



**HAL**  
open science

# Production de succinate par *Corynebacterium glutamicum* en microaérobiose : approches expérimentales et numériques, de l'échelle métabolique au bioréacteur

Amani Briki

► **To cite this version:**

Amani Briki. Production de succinate par *Corynebacterium glutamicum* en microaérobiose : approches expérimentales et numériques, de l'échelle métabolique au bioréacteur. Génie des procédés. Université de Lorraine, 2021. Français. NNT : 2021LORR0082 . tel-03354975

**HAL Id: tel-03354975**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-03354975v1>**

Submitted on 12 Jan 2022

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

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



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



UNIVERSITÉ  
DE LORRAINE



UNIVERSITÉ DE LORRAINE (UL)

École Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires (ENSAIA)

École Doctorale Sciences et ingénierie des molécules, des produits, des procédés, et de  
l'énergie (SIMPPÉ)

Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP)

---

## THÈSE

Soutenance le 12 mars 2021

Par

**Amani BRIKI**

En vue de l'obtention du titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE**

**Mention Procédés Biotechnologiques**

---

Sujet

**Production de succinate par *Corynebacterium glutamicum* en microaérobiose :  
approches expérimentales et numériques, de l'échelle métabolique au  
bioréacteur**

---

### Membres du jury

<b>Rapporteuses</b>	<b>Catherine Béal</b>	Professeur AgroParisTech
	<b>Audrey Soric</b>	Maître de Conférences HDR, École Centrale Marseille
<b>Examineurs</b>	<b>Carine Bideaux</b>	Ingénieure de Recherche CNRS, INSA Toulouse
	<b>Frédéric Jorand</b>	Professeur, Université de Lorraine Nancy
<b>Co-directeur</b>	<b>Frantz Fournier</b>	Professeur, Université de Lorraine Nancy
<b>Directeur</b>	<b>Stéphane Delaunay</b>	Professeur, Université de Lorraine Nancy
<b>Invités</b>	<b>Emmanuel Guedon</b>	Directeur de recherche CNRS, Nancy
	<b>Eric Olmos</b>	Professeur, Université de Lorraine Nancy

## **Remerciements**

Les travaux de cette thèse ont été menés au sein de l'équipe BioProMo du Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP). Je souhaite donc remercier le directeur du laboratoire, Mr Laurent FALK de m'y avoir accueillie.

J'adresse mes sincères remerciements à Mme Catherine BEAL et Mme Audrey SORIC d'avoir accepté de juger et d'évaluer ce travail en tant que rapporteuses ainsi que Mme Carine BIDEAUX et Mr Frédéric JORAND d'avoir accepté d'examiner ce manuscrit. Merci à Mr Emmanuel GUEDON et Mr Eric OLMOS d'avoir accepté de participer à la soutenance.

Je tiens tout particulièrement à exprimer ma profonde reconnaissance et respect à mes encadrants, Mr Stéphane DELAUNAY, Mr Frantz FOURNIER et Mr Eric OLMOS, qui m'ont encadré, soutenu, encouragé et conseillé tout au long de ces années de thèse. Je suis ravie d'avoir travaillé sous leurs directions.

Je remercie les membres d'équipe BioProMo qui m'ont accueillie dans leurs locaux. Merci particulièrement à Mr Fabrice BLANCHARD pour sa disponibilité, son aide et le partage des connaissances pour les analyses par HPLC et le montage des bioréacteurs. Merci à tous les permanents, les anciens et futurs docteurs pour leurs échanges amicaux, leurs encouragements et leur soutien moral pendant ces années de thèse.

Je tiens également à remercier mes collègues enseignants Mme Latifa CHEBIL, Mr Emmanuel RONDAGS, Mr Bruno EBEL, Mr, Jérémy PETIT et Mme Jennifer BURGAIN ainsi que les techniciens qui m'ont aidé et soutenu pendant la période d'enseignement.

Un remerciement particulier à ma famille de « Charmois », Mohtadi, Jihen, Amani, Assia, Cyrine, Ines, Mouad, Warda et Soufiane, de m'avoir motivée et surtout de me soutenir lors des périodes difficiles. Merci à Cathy, Lilia, Tina, Rafik et Farah pour tous les bons moments passés ensemble.

Enfin, un grand merci à mes chers parents, ma famille et mes amis en Tunisie, de m'avoir soutenue et m'encouragée, malgré la distance, tout au long de cette période spéciale pour moi.



# Sommaire

Introduction générale.....	1
I. Chapitre 1 : Synthèse bibliographique .....	I.6
Partie 1 : métabolisme .....	I.6
1. Succinate : importance et production.....	I.6
1.1. Utilisation du succinate .....	I.6
1.2. Voies de production du succinate .....	I.7
1.2.1. Voie chimique .....	I.7
1.2.2. Voie biologique.....	I.8
1.3. Microorganismes producteurs de succinate .....	I.8
1.3.1. Producteurs naturels .....	I.9
1.3.2. Producteurs modifiés génétiquement.....	I.9
2. Métabolisme de <i>Corynebacterium glutamicum</i> .....	I.11
2.1. Métabolisme du glucose .....	I.11
2.1.1. Entrée de glucose .....	I.11
2.1.2. Glycolyse.....	I.13
2.1.3. Voie des pentoses phosphate.....	I.15
2.1.4. Répartition du flux carboné entre la glycolyse et la voie des pentoses phosphate.....	I.16
2.2. Métabolisme du pyruvate .....	I.18
2.2.1. Cycle de Krebs.....	I.18
2.2.2. Voies anaérobies.....	I.21
2.2.3. Voie du glyoxylate.....	I.22
2.2.4. Répartition du flux carboné au niveau du nœud PEP-PYR-OAA.....	I.22
2.3. Autres substrats carbonés.....	I.23
3. Métabolisme énergétique de <i>C. glutamicum</i> .....	I.26
3.1. Respiration .....	I.27
3.1.1. La chaîne respiratoire .....	I.27
3.1.2. Phosphorylation oxydative : la $F_1F_0$ -ATP synthase .....	I.31
3.2. Fermentation.....	I.32
3.2.1. Voie de synthèse de lactate.....	I.32
3.2.2. Voie de synthèse du succinate .....	I.33
3.2.3. Voie de synthèse d'acétate .....	I.35
4. Optimisation de la production de succinate par <i>Corynebacterium glutamicum</i> .....	I.37
4.1. Modifications génétiques.....	I.37
4.2. Optimisation du procédé de production.....	I.42
4.2.1. Optimisation de la composition du milieu de culture .....	I.43

4.2.2.	Optimisation de stratégie de fermentation / stratégie d'oxygénation .....	I.44
Partie 2 :	Modélisation métabolique et cinétique: théorie et exemples de modèles de <i>C. glutamicum</i> .....	I.47
1.	Généralités .....	I.47
2.	Modélisation métabolique .....	I.49
2.1.	Notions de base ou terminologie .....	I.49
2.2.	Méthodologie de la modélisation métabolique .....	I.50
2.2.1.	Construction d'un réseau métabolique .....	I.50
2.2.1.1.	Approche descendante (top-down): .....	I.51
2.2.1.2.	Approche ascendante (Bottom-up).....	I.52
2.2.2.	Formulation d'un modèle métabolique .....	I.53
2.2.2.1.	Différents formalismes de modélisation .....	I.53
2.2.2.2.	Modélisation de la synthèse de la biomasse.....	I.55
2.2.3.	Méthodes de résolution .....	I.56
2.2.3.1.	Flux Balance Analysis (FBA) .....	I.57
2.2.3.2.	Dynamic flux balance analysis (dFBA) .....	I.59
2.2.3.3.	Exemples de modèles métaboliques de <i>C. glutamicum</i> .....	I.60
3.	Modélisation cinétique.....	I.63
3.1.	Modèles cinétiques .....	I.63
3.1.1.	Modèles décrivant la cinétique de croissance microbienne .....	I.63
3.1.2.	Modèles décrivant la cinétique de formation d'un produit .....	I.67
3.1.3.	Modèles décrivant la cinétique de consommation d'un substrat.....	I.68
3.1.4.	Modèles décrivant la maintenance .....	I.69
3.2.	Exemples de modèles cinétiques développés pour des cultures de <i>C glutamicum</i> .....	I.71
3.3.	Méthode d'identification des paramètres du modèle cinétique .....	I.75
3.3.1.	Généralités.....	I.75
3.3.2.	Principes des algorithmes génétiques.....	I.77
II.	Chapitre 2 : Matériels et Méthodes .....	II.82
1.	Étude expérimentale .....	II.82
1.1.	Souche microbienne utilisée .....	II.82
1.2.	Procédés de culture.....	II.82
1.2.1.	Composition des milieux de culture .....	II.82
1.2.2.	Précultures.....	II.82
1.2.3.	Culture discontinue en fiole .....	II.83
1.2.3.1.	Détermination des coefficients volumiques de transfert d'oxygène ( $k_La$ ) .....	II.83
1.2.3.2.	Conditions opératoires.....	II.84

1.2.4.	Culture en bioréacteur .....	II.85
1.2.4.1.	Montage du bioréacteur .....	II.85
1.2.4.2.	Culture continue.....	II.86
1.2.4.2.1.	Conditions opératoires.....	II.86
1.2.4.2.2.	Détermination de la vitesse volumique de consommation de glucose (GUR) II.87	
1.2.4.2.3.	Détermination de la vitesse volumique de consommation d'oxygène (OUR) II.87	
1.2.4.3.	Procédé semi-continu de production de succinate .....	II.90
1.3.	Méthodes analytiques.....	II.90
1.3.1.	Mesure de la concentration en biomasse .....	II.90
1.3.2.	Dosage des composés du milieu de culture : glucose et acides organiques.....	II.91
1.4.	Calcul des vitesses et des rendements.....	II.92
2.	Étude théorique.....	II.95
2.1.	Modélisation métabolique .....	II.95
2.1.1.	Construction d'un modèle métabolique réduit.....	II.95
2.1.2.	Représentation du modèle métabolique en langage SBML.....	II.98
2.1.3.	Méthode de simulation .....	II.100
2.1.3.1.	Mise en place de la matrice stœchiométrique .....	II.100
2.1.3.2.	Résolution FBA du modèle métabolique.....	II.100
2.2.	Modélisation cinétique.....	II.102
2.2.1.	Lois cinétiques .....	II.102
2.2.1.1.	Loi de croissance .....	II.102
2.2.1.2.	Loi de production des acides organiques.....	II.104
2.2.1.3.	Loi de consommation de substrat.....	II.104
2.2.2.	Méthode d'intégration des équations différentielles .....	II.104
2.2.3.	Méthodologie d'identification des paramètres.....	II.104
2.2.3.1.	Critère d'optimisation .....	II.104
2.2.3.2.	Méthode d'optimisation : Algorithme Génétique Diploïde (AGD).....	II.105
2.2.3.3.	Étude de sensibilité .....	II.106
2.2.4.	Méthodes d'analyse de la structure du modèle cinétique :.....	II.107
III.	Chapitre 3 : Identification des paramètres influençant la réponse physiologique de <i>Corynebacterium glutamicum</i> : impact de l'oxygénation et de la disponibilité en glucose .....	III.110
1.	Introduction.....	III.110
2.	Publication: <i>Corynebacterium glutamicum</i> , a natural overproducer of succinic acid? .....	III.112
3.	Contributions de l'article.....	III.123
4.	Résultats complémentaires.....	III.125

4.1.	Variation du pH au cours des cultures en fiole .....	III.125
4.2.	Le succinate est-il un co-substrat carboné et / ou énergétique ?.....	III.126
4.3.	Étude de l'impact du ratio OUR/GUR sur la production d'acides organiques par <i>C. glutamicum</i> en culture en fiole .....	III.127
4.4.	Étude de l'impact du ratio OUR/GUR sur la réponse physiologique de <i>C. glutamicum</i> en culture continue .....	III.131
4.4.1.	Détermination du $k_{La}$ pour chaque condition opératoire .....	III.131
4.4.2.	Suivi cinétique de la culture continue de <i>C. glutamicum</i> 2262 .....	III.133
4.4.3.	Analyse physiologique de <i>C. glutamicum</i> 2262 en fonction de l'apport en oxygène et en glucose .....	III.135
5.	Conclusion du chapitre 3 .....	III.140
IV.	Chapitre 4 : Modélisation cinétique de la réponse physiologique de <i>C. glutamicum</i> en limitation en oxygène : confirmation et quantification de l'impact du niveau d'oxygénation et de la disponibilité de glucose.....	IV.143
1.	Introduction.....	IV.143
2.	Projet de publication: A kinetic model to predict the effect of the oxygenation level and glucose concentration on the physiological response of <i>Corynebacterium glutamicum</i> .....	IV.145
2.1.	Introduction.....	IV.145
2.2.	Materials and methods .....	IV.149
2.2.1.	Kinetic models .....	IV.149
2.2.2.	Parameters identification .....	IV.149
2.2.2.1.	Optimization criterion .....	IV.150
2.2.2.2.	Optimization Method: diploid genetical-evolutionary algorithm <i>DGA</i> .....	IV.150
2.3.	Results and discussion.....	IV.152
2.3.1.	Model development .....	IV.152
2.3.1.1.	Growth model .....	IV.152
2.3.1.2.	Succinate production/consumption model .....	IV.153
2.3.1.3.	Lactate and acetate production/consumption model .....	IV.154
2.3.1.4.	Glucose consumption.....	IV.155
2.3.2.	Identification of model parameters .....	IV.155
2.3.3.	Model generalization: using a secondary model for estimated parameters .....	IV.163
2.3.4.	Transposition of the primary model on a mutant strain of <i>C. glutamicum</i> .....	IV.164
2.4.	Conclusion .....	IV.170
3.	Contributions de l'article.....	IV.171
4.	Analyses du modèle cinétique .....	IV.173
4.1.	Choix du domaine des paramètres du modèle cinétique .....	IV.173
4.2.	Choix du critère d'optimisation.....	IV.175
4.3.	Choix des paramètres à optimiser : étude de sensibilité .....	IV.178

5.	Analyse structurelle du modèle cinétique .....	IV.181
6.	Conclusions du chapitre .....	IV.192
V.	Chapitre 5 : Développement d'un modèle métabolique simplifié de <i>C. glutamicum</i> : étude et compréhension de son comportement à l'échelle extra- et intracellulaire .....	V.195
1.	Introduction.....	V.195
2.	Construction d'un modèle métabolique simplifié.....	V.197
2.1.	Réseau métabolique de <i>C. glutamicum</i> .....	V.197
2.1.1.	Métabolisme central.....	V.197
2.1.2.	Métabolisme énergétique .....	V.197
2.1.3.	Réactions de transport .....	V.199
2.2.	Modèle métabolique sous format SBML.....	V.199
2.3.	Vérification du modèle initial dans différentes conditions d'oxygénation .....	V.200
2.3.1.	Méthodologie de simulation des flux .....	V.200
2.3.2.	Simulation en aérobiose et anaérobiose.....	V.202
2.3.2.1.	Flux extracellulaires.....	V.202
2.3.2.2.	Répartition des flux carbonés intracellulaires.....	V.204
2.3.3.	Simulation en microaérobiose.....	V.207
2.4.	Ajustement du modèle.....	V.208
2.4.1.	Ajustement du métabolisme énergétique.....	V.208
2.4.2.	Ajustement de l'équation de production de biomasse .....	V.210
3.	Validation du modèle ajusté .....	V.212
3.1.	Simulation du métabolisme de <i>C. glutamicum</i> sous différents ratios OUR/GUR .....	V.212
3.1.1.	Simulation de la production de biomasse et des acides organiques en conditions stationnaires.....	V.213
3.1.1.1.	Comparaison des flux extracellulaires simulés par les trois modèles ajustés.....	V.213
3.1.1.2.	Comparaison des flux intracellulaires simulés par les trois modèles.....	V.216
3.1.2.	Simulation de la production de la biomasse et des acides organiques en conditions dynamiques .....	V.218
3.2.	Analyse de robustesse du modèle ajusté 3 .....	V.225
3.2.1.	Utilisation d'acides organiques comme substrats carbonés .....	V.225
3.2.2.	Simulation du comportement de <i>C. glutamicum</i> 2262 $\Delta$ ldhA en conditions stationnaires et dynamiques.....	V.232
4.	Conclusion .....	V.238
	Conclusions et perspectives .....	242
	Références.....	253
	Annexes.....	268



## Liste des figures

### Inroduction générale

**Figure1** : Démarche globale de la thèse ..... 2

### Chapitre 1

**Figure I.1** : molécules pouvant être synthétisées à partir d'acide succinique (Song and Lee, 2006). ..... I.6

**Figure I.2** : Exemple de la synthèse chimique de succinate à partir d'anhydride maléique. .... I.7

**Figure I.3** : Schéma simplifié des mécanismes des différents systèmes de transport du glucose chez *C. glutamicum* (Shin et al., 2018). ..... I.12

**Figure I.4** : Schéma simplifié de la glycolyse et de son mécanisme de régulation chez *C. glutamicum*. ..... I.13

**Figure I.5** : Schéma simplifié de la voie des pentoses phosphate et de son mécanisme de régulation chez *C. glutamicum*. ..... I.16

**Figure I.6** : La réaction de décarboxylation oxydative du pyruvate en acétyl-CoA catalysée par la pyruvate déshydrogénase. .... I.18

**Figure I.7** : Schéma simplifié du cycle de Krebs et de son mécanisme de régulation chez *C. glutamicum*. ..... I.19

**Figure I.8** : Schéma simplifié des voies d'utilisation des sources carbonées naturelles et alternatives chez *C. glutamicum*. (Baritugo et al., 2018). ..... I.24

**Figure I.9** : Schéma simplifié du couplage entre transfert d'électrons et formation d'ATP. .... I.27

**Figure I.10** : Représentation schématique des différents constituants de la chaîne respiratoire chez *C. glutamicum* (Bott and Niebisch, 2003). ..... I.28

**Figure I.11** : Schéma simplifié des différentes étapes de la respiration chez *C. glutamicum* (Bott and Niebisch, 2003). ..... I.30

**Figure I.12** : Schéma simplifié de la composition de la F1F0-ATP synthase. .... I.31

**Figure I.13** : Schéma simplifié de la voie de synthèse du lactate chez *C. glutamicum*. PGK, phosphoglycérate kinase ; LDH, lactate déshydrogénase ; PEP, phosphoénolpyruvate ; PYK, pyruvate kinase. .... I.32

**Figure I.14** : Schéma simplifié de la voie de synthèse du succinate chez *C. glutamicum*. PGK, phosphoglycérate kinase ; PEPC, phosphoénolpyruvate carboxylase ; PC, pyruvate carboxylase ; MDH, malate déshydrogénase ; FUM, fumarase ; SDH, succinate déshydrogénase. .... I.34

**Figure I.15** : Schéma simplifié de la voie de synthèse de l'acétate chez *C. glutamicum*. PGK, phosphoglycérate kinase, PDHC, pyruvate déshydrogénase complexe, PTA, phosphotransacétylase, ACK, acétate kinase, CTF, CoA transférase, PQQ, pyruvate : quinone oxydoréductase. .... I.36

**Figure I.16** : Cinétiques de production de lactate (■), succinate (○) et acétate (▲) et de consommation de glucose (◇) par *C. glutamicum* ATCC13032. Différents pourcentages de CO<sub>2</sub> ont été injectés : (A) 0%, (B) 20 % et (C) 100% de la saturation (Radoš et al., 2014). ..... I.43

**Figure I.17** : Les différents types de procédé de production de succinate « zéro-croissance » utilisés avec *C. glutamicum* (Lange et al., 2017). ..... I.45

**Figure I.18** : Illustration de la classification des modèles cinétiques en biotechnologie ..... I.48

**Figure I.19** : Les différentes étapes de modélisation métabolique à base de contraintes. (a) Construction d'un réseau métabolique à partir de la biochimie, de la génomique et de la physiologie connues. (b) Définition d'un espace de solution en imposant des contraintes physico-chimiques. (c) Détermination des solutions optimales selon la fonction « objectif » choisie. (d-g) Prédiction du comportement du microorganisme étudié par le modèle proposé, dans différentes situations (O'Brien et al., 2015). ..... I.50

**Figure I.20** : Comparaison des approches ascendantes et descendantes pour reconstruire un modèle métabolique. La boîte blanche de la figure définit différents niveaux d'informations sur la structure du réseau (Çakır and Khatibpour, 2014). ..... I.51

<b>Figure I.21</b> : Exemple de conversion d'un réseau métabolique en une représentation mathématique. <b>S</b> correspond à la matrice stœchiométrique. <b>V</b> et <b>v</b> représentent les vecteurs des concentrations de métabolites et les flux des réactions, respectivement, impliqués dans le modèle métabolique.....	1.57
<b>Figure I.22</b> : Modélisation de l'impact du rapport OUR/GUR sur les rendements carbonés de conversion du glucose en acides organiques, biomasse et CO <sub>2</sub> (Shinfuku et al., 2009). .....	1.61
<b>Figure I.23</b> : Différentes méthodes d'optimisation et de logiciels utilisés pour l'estimation des paramètres des modèles cinétiques. ....	1.76
<b>Figure I.24</b> : Les cinq niveaux d'organisation d'un algorithme génétique diploïde.....	1.78
<b>Figure I.25</b> : Cycle évolutif de l'algorithme génétique. ....	1.79

## Chapitre 2

<b>Figure II.1</b> : Montage de la culture continue.....	II.85
<b>Figure II.2</b> : Évolution du pourcentage en oxygène dissous dans le milieu de culture au cours du temps. Exemple d'une alimentation par 60 L/h d'oxygène pure avec la méthode statique (A) ou 60 L/h d'air dans le cas de méthode dynamique (B) et avec une vitesse d'agitation de 900 rpm. (1) phase de saturation en oxygène, (2) phase de désoxygénation, (3 et 4) phases de réoxygénation. La zone 3 est prise en compte pour le calcul de $k_{La}$ . La zone 4 correspond à la saturation du milieu de culture en oxygène. ....	II.89
<b>Figure II.3</b> : Démarche de la construction du modèle métabolique de <i>C. glutamicum</i> 2262 .....	II.96
<b>Figure II.4</b> : Les quatre parties constituant un modèle métabolique sous format SBML.....	II.98
<b>Figure II.5</b> : Exemples des (A) listes des unités, (B) listes des compartiments, (C) listes des métabolites et (D) listes des réactions.....	II.99
<b>Figure II.6</b> : Exemple d'une matrice stœchiométrique prenant en compte des réactions et métabolites impliqués dans la voie de glycolyse (liste des réactions dans Tableau II.4). ....	II.100
<b>Figure II.7</b> : Démarche de simulation FBA par le logiciel COBRA _ Toolbox via l'interface matlab. ....	II.101
<b>Figure II.8</b> : Démarche de la modélisation cinétique appliquée à <i>C. glutamicum</i> . ....	II.103

## Chapitre 3

<b>Figure III.1</b> : Démarche de l'étude expérimentale .....	III.111
---	---------

## Publication

<b>Figure I.1</b> : influence of volumetric mass transfer coefficient ( $k_{La}$ ) values on the (A) biomass, (B) glucose, (C) succinate, (D) acetate and (E and F) lactate production by <i>C. glutamicum</i> 2262. The values of $k_{La}$ were 0.6 (○), 5 (■), 11 (☆), 15 (▲), 20 (◆), 31 (◄), 44 (●), 77 (□), 90 (✱) and 118 h <sup>-1</sup> (◇). ....	III.116
<b>Figure 2</b> : Influence of the volumetric mass transfer coefficient ( $k_{La}$ ) on (A) the maximal specific growth rate, (B) the maximal specific glucose consumption rate (●), and the maximal specific lactate (▲), succinate (◆) and acetate (■) production rate by <i>C. glutamicum</i> 2262. ....	III.117
<b>Figure 3</b> : influence of the volumetric mass transfer coefficient ( $k_{La}$ ) on the yields of lactate (▲), succinate (◆) and acetate (■), from glucose. ....	III.117
<b>Figure 4</b> : Dependence of succinate production by <i>C. glutamicum</i> 2262, on the residual glucose concentration for the different $k_{La}$ conditions. The values of $k_{La}$ were 0.6 (○), 5 (■), 11 (☆), 15 (▶), 20 (◆), 31 (◄), 44 (●), 77 (□), 90 (✱) and 118 h <sup>-1</sup> (◇). ....	III.117
<b>Figure 5</b> : Kinetics of biomass concentration (A), succinate (B) and glucose (C) consumptions during cultures of <i>C. glutamicum</i> 2262 in un baffled shake flask at a $k_{La}$ value of 90 h <sup>-1</sup> and with initial concentrations of 35 mM succinate and no glucose (●), 42 mM succinate plus 28 mM glucose (□), and 42 mM succinate plus 60 mM glucose (☆). ....	III.118
<b>Figure 6</b> : Fed-batch culture of <i>C. glutamicum</i> 2262. Kinetics of (A) (●) glucose, (◆) succinate, (▲) lactate concentrations, and (B) biomass concentration. The dashed vertical line indicates the beginning of the	



anaerobic phase. The insert graph in part A presents the kinetics of organic acids corresponding to the transition phase (between 4 and 10 h culture). ..... III.119

### **Partie complémentaire**

- Figure III.2 :** évolution du pH au cours des cultures de *C. glutamicum* 2262 en fiole non chicanée, réalisées sous différentes conditions de transfert d'oxygène  $k_{La}$ . ..... III.125
- Figure III.3 :** évolution temporelle de la vitesse volumique de consommation de glucose (GUR) pour les cultures en fiole de *C. glutamicum* 2262 à différentes valeurs de  $k_{La}$ . Les valeurs de  $k_{La}$  imposées sont 0,6 h<sup>-1</sup> (—), 5 h<sup>-1</sup> (—), 11 h<sup>-1</sup> (—), 20 h<sup>-1</sup> (—), 31 h<sup>-1</sup> (—), 44 h<sup>-1</sup> (—), 77 h<sup>-1</sup> (—), 90 h<sup>-1</sup> (—) et 118 h<sup>-1</sup> (—). ..... III.128
- Figure III.4 :** évolution temporelle du ratio OUR/GUR pour les cultures en fiole de *C. glutamicum* 2262 à différentes valeurs de  $k_{La}$ . Les valeurs de  $k_{La}$  imposées sont 0,6 h<sup>-1</sup> (—), 5 h<sup>-1</sup> (—), 11 h<sup>-1</sup> (—), 20 h<sup>-1</sup> (—), 31 h<sup>-1</sup> (—), 44 h<sup>-1</sup> (—), 77 h<sup>-1</sup> (—), 90 h<sup>-1</sup> (—) et 118 h<sup>-1</sup> (—). ..... III.128
- Figure III.5 :** Évolution de la concentration en succinate produite en fonction du ratio OUR/GUR pour des cultures en fiole de *C. glutamicum* 2262 (A) et de *C. glutamicum* 2262 $\Delta$ ldhA (B), en imposant différents coefficients de transfert d'oxygène. Les valeurs de  $k_{La}$  imposées sont 0,6 h<sup>-1</sup> (—), 5 h<sup>-1</sup> (—), 11 h<sup>-1</sup> (—), 20 h<sup>-1</sup> (—), 31 h<sup>-1</sup> (—), 44 h<sup>-1</sup> (—), 77 h<sup>-1</sup> (—), 90 h<sup>-1</sup> (—) et 118 h<sup>-1</sup> (—). ..... III.129
- Figure III.6 :** Évolution temporelle de l'oxygène dissous (en pourcentage de la saturation), au cours de la culture continue de *C. glutamicum* 2262. La courbe en pointillé représente les vitesses d'agitation imposées. Les pointillés verticaux correspondent aux limites de chaque condition opératoire appliquée, présentées dans le tableau III.2. .... III.133
- Figure III.7 :** Cinétiques des concentrations en biomasse (bleu), en lactate (gris), en acétate (jaune) et en succinate (orange) pour les différentes conditions opératoires réalisées au cours de la culture continue de *C. glutamicum* 2262. Les détails de chaque condition opératoire sont reportés dans le tableau III.3. Le trait vertical marque le début de la phase stationnaire. .... III.134
- Figure III.8 :** Concentrations en biomasse, succinate, lactate et acétate, mesurées à l'état stabilisé pendant les différentes conditions opératoires, correspondant à différents ratio OUR/GUR, testées au cours de la culture continue de *C. glutamicum* 2262. La légende à droite indique la valeur des ratios OUR/GUR et les numéros des conditions opératoires présentées dans le tableau III.3. .... III.137
- Figure III.9 :** évolution des rendements carbonés de conversion du glucose en biomasse, CO<sub>2</sub> et acides organiques en fonction du ratio OUR/GUR, déterminés à partir des données expérimentales obtenues au cours des cultures en mode continu (A) et discontinu (B). Succinate (●), lactate (●), acétate (●), biomasse (●) et CO<sub>2</sub> (●). ..... III.137

### **Chapitre 4**

**Figure IV.1 :** Stratégie de l'étude de modélisation cinétique de *C. glutamicum* dans des conditions de limitation en oxygène ..... IV.144

### **Publication**

- Figure IV.2 :** Evolution of some kinetic parameters of the primary model: (A)  $\mu_{maxG}$  (●), (B)  $Y_L/GX$  (▲) et  $Y_S/GX$  (▲), (C)  $Y_X/GX$  (○) et  $Y_A/GX$  (Δ), (D)  $Y_L/XX$  (■),  $\mu_A/XX$  (□) et  $Y_S/XX$  (■), (E)  $\alpha_A$  (◆) et (F)  $m_L$  (●), as a function of  $k_{La}$  value. .... IV.156
- Figure IV.3 :** Time profiles of biomass (■) and glucose (●) concentrations during cultures in un baffled shake flasks of *C. glutamicum* 2262 performed at different  $k_{La}$  values : (A) 0.6 h<sup>-1</sup>, (B) 5 h<sup>-1</sup>, (C) 11 h<sup>-1</sup>, (D) 20 h<sup>-1</sup>, (E) 31 h<sup>-1</sup>, (F) 44 h<sup>-1</sup>, (G) 77 h<sup>-1</sup>, (H) 90 h<sup>-1</sup>, and (I) 118 h<sup>-1</sup>. Experimental data (symbols) and simulated data by primary (solid line) and generalized (dashed line) model were plotted on each figure. .... IV.157
- Figure IV.4 :** Time profiles of succinate concentration (●) during cultures in un baffled shake flasks of *C. glutamicum* 2262 performed at different  $k_{La}$  values: (A) 0.6 h<sup>-1</sup>, (B) 5 h<sup>-1</sup>, (C) 11 h<sup>-1</sup>, (D) 20 h<sup>-1</sup>, (E) 31 h<sup>-1</sup>, (F) 44 h<sup>-1</sup>, (G) 77 h<sup>-1</sup>, (H) 90 h<sup>-1</sup>, and (I) 118 h<sup>-1</sup>. Experimental data (symbols) and simulated data by primary (solid line) and generalized (dashed line) model were plotted on each figure. .... IV.159

**Figure IV.5 :** Time profiles of lactate (■) and acetate (●) concentrations during cultures in unbaffled shake flasks of *C. glutamicum* 2262 performed at different  $k_{LA}$  values: (A) 0.6 h<sup>-1</sup>, (B) 5 h<sup>-1</sup>, (C) 11 h<sup>-1</sup>, (D) 20 h<sup>-1</sup>, (E) 31 h<sup>-1</sup>, (F) 44 h<sup>-1</sup>, (G) 77 h<sup>-1</sup>, (H) 90 h<sup>-1</sup>, and (I) 118 h<sup>-1</sup>. Experimental data (symbols) and simulated data by primary (solid line) and generalized (dashed line) model were plotted on each figure.

.....IV.161

**Figure IV.6 :** Evolution of some kinetic parameters of primary model for growth, glucose consumption and organic acids production/consumption by *C. glutamicum* 2262Δ*ldhA*, as a function of  $k_{LA}$  values.

.....IV.165

## Partie complémentaire

**Figure IV.7 :** Profils de concentration d'acétate (noir) et lactate (gris) au cours des cultures en fiole de *C. glutamicum* 2262, réalisées dans différentes conditions de  $k_{LA}$  : concentrations expérimentales (points) et concentrations simulées par le modèle cinétique en utilisant les critères d'optimisation  $J_{rel}$  (courbe continue) et  $J_{max}$  (courbe pointillée).

.....IV.177

**Figure IV.8 :** Profils de concentration de succinate au cours des cultures en fiole de *C. glutamicum* 2262, réalisées dans différentes conditions de  $k_{LA}$  : concentrations expérimentales (points) et concentrations simulées par le modèle cinétique en utilisant les critères d'optimisation  $J_{rel}$  (courbe continue) et  $J_{max}$  (courbe pointillée).

.....IV.177

**Figure IV.9 :** Étude de sensibilité du modèle cinétique aux variations de ses paramètres. L'étude cinétique a été réalisée dans différentes conditions de  $k_{LA}$  (0,6 ; 5 ; 11 et 20 h<sup>-1</sup>).

.....IV.179

**Figure IV.10 :** Étude de sensibilité du modèle cinétique aux variations de ses paramètres. L'étude cinétique a été réalisée dans différentes conditions de  $k_{LA}$  (31 ; 44 ; 90 et 118 h<sup>-1</sup>).

.....IV.180

**Figure IV.11 :** Évolution des vitesses spécifiques de croissance de *C. glutamicum* 2262 au cours des cultures en fiole réalisées dans différentes conditions de  $k_{LA}$  : vitesses spécifiques de croissance sur glucose (—), sur acide organique (—) et globale (—).

.....IV.184

**Figure IV.12 :** Évolution des vitesses spécifiques de production et consommation de succinate au cours des cultures en fiole de *C. glutamicum* 2262, réalisées dans différentes conditions de  $k_{LA}$  : vitesses spécifiques de production liée à la croissance (—), non liée à la croissance (—), globale (—) et vitesse spécifique de consommation (—).

.....IV.185

**Figure IV.13 :** (A) Pourcentages de contribution des vitesses spécifiques de production liée (prod1) et non liée (prod 2) à la croissance dans la vitesse spécifique globale de production de lactate (L), de succinate (S) ou d'acétate (A). (B) Pourcentages de contribution à la vitesse spécifique de consommation de lactate (L) ou acétate (A) comme source énergétique (cons1) ou source carbonée (cons2) dans leur vitesse spécifique globale de consommation respective.

.....IV.186

**Figure IV.14 :** Évolution des vitesses spécifiques de production et consommation de lactate (A) et d'acétate (B) au cours des cultures en fiole de *C. glutamicum* 2262, réalisées dans différentes conditions de  $k_{LA}$  : vitesses spécifiques de production liée à la croissance (—), non liée à la croissance (—), globale (—) et vitesse spécifique de consommation pour la maintenance (—) et pour la croissance (—).

.....IV.188

**Figure IV.15 :** (A) Évolution des vitesses spécifiques de consommation de glucose : globale (—), et associées à la production de lactate (—), à la production de succinate (—), à la production d'acétate (—) et à la croissance (—) au cours des cultures en fiole de *C. glutamicum* 2262, réalisées dans différentes conditions de  $k_{LA}$  (5, 20 44 et 90 h<sup>-1</sup>). (B) : Évolution des valeurs des fonctions logistiques  $\varphi_G(G)$  (—),  $\varphi_G^S(G)$  (—) et la fonction de limitation en oxygène  $(1 - \varphi_{O_2}(X))$  (—) au cours du temps dans différentes conditions de  $k_{LA}$  (5, 20 44 et 90 h<sup>-1</sup>).

.....IV.189

**Figure IV.16 :** Pourcentages des vitesses spécifiques de consommation de glucose associées à : la maintenance (■), la production d'acétate (■), la production de succinate (■), la croissance (■) et la production de lactate (■), par rapport à la vitesse spécifique maximale globale de la consommation de glucose.

..... IV.190

## Chapitre 5

<b>Figure V.1 :</b> Les étapes de construction et de validation d'un modèle métabolique simplifié pour <i>C. glutamicum</i> 2262. ....	V.196
<b>Figure V.2 :</b> équation de biomasse pour <i>C. glutamicum</i> MH20-B22 (Marx et al., 1996a) .....	V.200
<b>Figure V.3 :</b> Flux simulés par le modèle métabolique initial en utilisant le solveur glpk (en gris) et matlab (en noir) (en mmol / gDW/ h). Les valeurs représentent les flux de la réaction R_shdA_2 (1), la réaction R_sdhCAB (2) et la réaction R_sucfum_r (3). ....	V.202
<b>Figure V.4 :</b> Modélisation des flux intracellulaires de <i>C. glutamicum</i> , par le modèle initial, en condition aérobie (en bleu) et en anaérobiose (en rouge). Les valeurs négatives de certains flux indiquent une réaction inverse. ....	V.206
<b>Figure V.5 :</b> Modélisation de l'impact du rapport OUR/GUR sur les rendements carbonés de conversion du glucose en lactate (*), succinate (♦), acétate (■), biomasse (●) et CO <sub>2</sub> (●). Les flux ont été simulés par le modèle initial. ....	V.207
<b>Figure V.6 :</b> Modélisation de l'impact du rapport OUR/GUR sur les rendements carbonés de conversion du glucose en lactate (*), succinate (♦), acétate (■), biomasse (●) et CO <sub>2</sub> (●). Les flux ont été simulés par le modèle ajusté. ....	V.210
<b>Figure V.7 :</b> Évolution des vitesses spécifiques de production de biomasse en aérobie (a) et des vitesses spécifiques de production de biomasse (b), de lactate et de succinate (c) en anaérobiose, simulées par le modèle ajusté, en multipliant le coefficient stochiométrique de certains précurseurs de la biomasse par un facteur 0 (—), 0,2 (—), 0,5 (—), 1 (—), 2 (—), ou 3 (—). ....	V.211
<b>Figure V.8 :</b> Comparaison entre les rendements carbonés obtenus par simulation par les trois modèles ajustés (1 à 3) et (a) les données expérimentales obtenues au cours d'une culture continue de <i>C. glutamicum</i> 2262 et (b) celles obtenues lors de l'étude de Shinfuku et al. (2009): biomasse (●), CO <sub>2</sub> (●), lactate (●), succinate (●) et acétate (●). ....	V.215
<b>Figure V.9 :</b> Distribution des flux intracellulaires au sein du métabolisme de <i>C. glutamicum</i> : flux simulés par modèle ajusté 1 en orange, modèle ajusté 2 en vert, modèle ajusté 3 en violet, modèle de Bartek et al. (2011) en gris et modèle de Mei et al. (2017) en bleu. Les valeurs représentent les pourcentages molaires de la consommation de glucose qui a été fixée à 7 mmol/ g DW/ h. ....	V.217
<b>Figure V.10 :</b> Évolution des vitesses spécifiques de croissance (a) et de production de succinate (b) lors d'une culture en fiole de <i>C. glutamicum</i> 2262, avec un $k_{LA}$ de 5, 11 ou 44 h <sup>-1</sup> : vitesses simulées par le modèle ajusté 1 (—), 2 (—) ou 3 (—) et par le modèle cinétique (—). ....	V.219
<b>Figure V.11 :</b> Évolution des vitesses spécifiques de production de lactate (a) et d'acétate (b) lors d'une culture en fiole de <i>C. glutamicum</i> 2262, avec un $k_{LA}$ de 5, 11 ou 44 h <sup>-1</sup> : vitesses simulées par le modèle ajusté 1 (—), 2 (—) ou 3 (—) et par le modèle cinétique (—). ....	V.220
<b>Figure V.12 :</b> Évolution des concentrations en lactate (a) et succinate (b) lors d'une culture en fiole de <i>C. glutamicum</i> 2262, avec un $k_{LA}$ de 5, 11 ou 44 h <sup>-1</sup> : concentrations simulées par le modèle ajusté 1 (—), 2 (—) ou 3 (—), par le modèle cinétique (—) et données expérimentales (■). ....	V.222
<b>Figure V.13 :</b> Évolution des concentrations en acétate (a) et glucose (b) lors d'une culture en fiole de <i>C. glutamicum</i> 2262, avec un $k_{LA}$ de 5, 11 ou 44 h <sup>-1</sup> : concentrations simulées par le modèle ajusté 1 (—), 2 (—) ou 3 (—), par le modèle cinétique (—) et données expérimentales (■). ....	V.223
<b>Figure V.14 :</b> Modélisation des flux intracellulaires du métabolisme de <i>C. glutamicum</i> 2262 en conditions aérobies à l'aide du modèle ajusté 3 en considérant le succinate (a), le lactate (b) et l'acétate (c) comme substrats. Les valeurs négatives de certaines réactions représentent des flux étant dans le sens inverse de ces réactions. Le flux de consommation de chaque acide organique imposé permet d'avoir un flux de production de biomasse de 0,47 h <sup>-1</sup> . ....	V.226
<b>Figure V.15 :</b> Évolution des vitesses spécifiques de croissance (a), de consommation de succinate (b), de production de lactate (c) et de production d'acétate (d) en fonction de la vitesse de consommation d'oxygène (OUR). Vitesses spécifiques de consommation de succinate en présence de glucose (3 mmol/	

g DW/ h) : (—) : 0 mmol/ g DW/ h, (—) : 1 mmol/ g DW/ h, (—) : 2 mmol/ g DW/ h (—) : 3 mmol/ g DW/ h et en absence de glucose (—) : 4,5 mmol/ g DW/ h et (—) : 7 mmol/ g DW/ h. ....	V.229
<b>Figure V.16</b> : Évolution des vitesses spécifiques de croissance (a), de consommation de lactate (b), de production de succinate (c) et de production d'acétate (d) en fonction de la vitesse de consommation d'oxygène (OUR). Vitesses spécifiques de consommation de lactate en présence de glucose (3 mmol/ g DW/ h) : (—) : 0 mmol/ g DW/ h, (—) : 1 mmol/ g DW/ h, (—) : 2 mmol/ g DW/ h, (—) : 3 mmol/ g DW/ h et en absence de glucose (—) : 4,5 mmol/ g DW/ h et (—) : 7 mmol/ g DW/ h. ....	V.230
<b>Figure V.17</b> : Évolution des vitesses spécifiques de croissance (a), de consommation d'acétate (b), de production de succinate (c) et de production de lactate (d) en fonction de la vitesse de consommation d'oxygène (OUR). Vitesses spécifiques de consommation d'acétate en présence de glucose (3 mmol/ g DW/ h) : (—) : 0 mmol/ g DW/ h, (—) : 1 mmol/ g DW/ h, (—) : 2 mmol/ g DW/ h, (—) : 3 mmol/ g DW/ h et en absence de glucose (—) : 4,5 mmol/ g DW/ h et (—) : 7 mmol/ g DW/ h. ....	V.231
<b>Figure V.18</b> : Simulation par le modèle ajusté 3 de l'impact du rapport OUR/GUR sur les rendements carbonés de conversion du glucose en lactate (*), succinate (♦), acétate (■), biomasse (●) et CO <sub>2</sub> (●) par <i>C. glutamicum</i> 2262Δ <i>ldhA</i> . ....	V.233
<b>Figure V.19</b> : Évolution des vitesses spécifiques de croissance (a), de production d'acétate (b) et de succinate (c) lors d'une culture en fiole de <i>C. glutamicum</i> 2262Δ <i>ldhA</i> , avec un <i>k<sub>LA</sub></i> de 5 et 11 h <sup>-1</sup> . Vitesses simulées par le modèle ajusté 3 (—) et le modèle cinétique (—).....	V.235
<b>Figure V.20</b> : Évolution des concentrations en succinate (a), acétate (b) et glucose (c) lors d'une culture en fiole de <i>C. glutamicum</i> 2262Δ <i>ldhA</i> , avec un <i>k<sub>LA</sub></i> de 5 et 11 h <sup>-1</sup> . Concentrations simulées par le modèle ajusté 3 (—) et données expérimentales (■).....	V.236
<b>Figure V.21</b> : Synthèse de principaux résultats obtenus au cours de l'étude de modélisation métabolique. ....	V.240

## Conclusions et perspectives

<b>Figure 2</b> : Synthèse des résultats obtenus au cours de la thèse.....	249
--	-----

# Liste des tableaux

## Chapitre 1

<b>Tableau I.1 : Exemples de producteurs de succinate : producteurs naturels et des producteurs modifiés génétiquement.</b> .....	I.10
<b>Tableau I.2 :</b> Répartition des flux carbonés, déterminés expérimentalement, entre la glycolyse et la voie des pentoses phosphate pendant la phase de croissance et la phase de production de lysine, de glutamate ou d'acides organiques par <i>C. glutamicum</i> à partir de glucose comme source carbonée.....	I.17
<b>Tableau I.3 :</b> Répartition des flux carbonés, déterminés expérimentalement, au nœud PEP-PYR-OAA pendant la phase de croissance sur glucose et la phase de production de lysine et glutamate chez <i>C. glutamicum</i> . .....	I.22
<b>Tableau I.4 :</b> Comparaison de la production de succinate par différentes souches de <i>C. glutamicum</i> modifiées génétiquement au cours de cultures avec du glucose comme substrat carboné.....	I.38
<b>Tableau I.5 :</b> Comparaison de la production de succinate par des souches de <i>C. glutamicum</i> modifiées génétiquement pour utiliser des substrats carbonés autres que le glucose .....	I.42
<b>Tableau I.6 :</b> Comparaison des trois types de modélisation métabolique. ....	I.54
<b>Tableau I.7 :</b> Exemples de modèles métaboliques complets ou simplifiés, de <i>C. glutamicum</i> .....	I.62
<b>Tableau I.8 :</b> Lois cinétiques non-structurées décrivant la croissance microbienne sur un ou plusieurs substrats.....	I.66
<b>Tableau I.9 :</b> Lois cinétiques non-structurées décrivant la production des métabolites.....	I.68
<b>Tableau I.10 :</b> Exemples des modèles cinétiques de <i>C. glutamicum</i> décrivant la croissance, la consommation de substrat et de la production de molécules.....	I.73
<b>Tableau I.11 :</b> Différents opérateurs de sélection et de croisement d'un algorithme génétique. ....	I.80

## Chapitre 2

<b>Tableau II.1 :</b> Composition de milieu MCGC modifié.....	II.83
<b>Tableau II.2 :</b> Les différentes conditions opératoires testées au cours des cultures en fiole avec <i>C. glutamicum</i> . ....	II.84
<b>Tableau II.3 :</b> Les différentes conditions opératoires testées au cours d'une culture continue à double alimentation de <i>C. glutamicum</i> .....	II.86
<b>Tableau II.4 :</b> Exemples de réactions biochimiques de la voie de la glycolyse impliquées dans le réseau métabolique de <i>C. glutamicum</i> 2262. LB et UB représentent les bornes minimales et maximales pour chaque réaction du réseau métabolique.....	II.97
<b>Tableau II.5 :</b> Réglage des paramètres de l'algorithme génétique diploïde.....	II.106

## Chapitre 3

### Publication

<b>Table 1:</b> Performances of succinate production processes using various microorganisms and substrates. ....	III.120
--	---------

### Partie complémentaire

<b>Tableau III.1 :</b> Concentrations maximales en biomasse obtenues au cours des cultures de <i>C. glutamicum</i> 2262 en fiole non chicanée réalisées avec un coefficient de transfert d'oxygène de 90 h <sup>-1</sup> en ajoutant différentes concentrations initiales de glucose et de succinate. Les rendements de conversion du glucose	
---	--

en biomasse ( $Y_{X/glu}$ ) et les vitesses spécifiques maximales de croissance ( $\mu$ ) ont été calculés. Les valeurs de l'écart-type de  $X_{max}$  et du coefficient de détermination ( $R^2$ ) pour le calcul de  $\mu_{max}$  sont indiquées.

..... III.126

**Tableau III.2 :** Valeurs des coefficients de transfert volumétrique d'oxygène ( $k_{LA}$ ) déterminées par les méthodes statique et dynamique. Les écarts types ont été précisés..... III.131

**Tableau III.3 :** Tableau récapitulatif des conditions opératoires d'agitation, de taux de dilution et de débit d'alimentation en glucose et en sels, appliquées lors d'une culture continue à double alimentation, avec *C. glutamicum* 2262. La concentration résiduelle en glucose et les valeurs du pourcentage d' $O_2$  dissous et en  $CO_2$  à la sortie de bioréacteur ont été mesurées dans les différentes conditions opératoires. Les vitesses volumiques de consommation de glucose (GUR) et d'oxygène (OUR) ainsi que le rapport entre les deux ont été calculés. .... III.132

**Tableau III.4 :** Moyenne, écart type et coefficient de variation (CV) de la concentration en biomasse à l'état stabilisé pour les différentes conditions opératoires testées au cours de la culture continue avec *C. glutamicum* 2262. .... III.135

## Chapitre 4

### Projet publication

**Tableau IV.1 :** Minimal and maximal of model parameters .....IV.151

**Tableau IV.2 :** Constant numerical parameters.....IV.156

**Tableau IV.3 :** The coefficients of polynomial relationships between the kinetic parameters used in the primary model and the  $k_{LA}$  value.  $R^2$  corresponded to the determination coefficient. ....IV.164

**Tableau IV.4 :** Coefficients of polynomial relationship between the kinetic parameters of *C. glutamicum* 2262 $\Delta ldhA$  and the  $k_{LA}$  value and corresponding determination coefficient  $R^2$ .....IV.167

**Tableau IV.5 :** Coefficient determination between the experimental and the simulated values of biomass, glucose, lactate, succinate and acetate concentrations, using the primary and generalized model, under different  $k_{LA}$  conditions. WT: *C. glutamicum* 2262,  $\Delta ldhA$ : *C. glutamicum* 2262 $\Delta ldhA$ . ....IV.169

### Partie complémentaire

**Tableau IV.6 :** les valeurs maximales et minimales des paramètres du modèle cinétique .....IV.174

**Tableau IV.7 :** Les coefficients de variation des valeurs des paramètres du modèle obtenues dans différentes conditions de  $k_{LA}$ , en utilisant les deux critères d'optimisation ( $J_{rel}$  et  $J_{max}$ ). Les coefficients de variation supérieurs à 10 % sont indiqués en rouge. ....IV.176

## Chapitre 5

**Tableau V.1 :** Flux d'oxygène et des acides organiques simulés par la méthode FBA à l'aide du logiciel COBRA, avec le solveur matlab. ....V.201

**Tableau V.2 :** Résolution FBA du modèle métabolique initial de *C. glutamicum* en conditions aérobies et anaérobies. Les rendements de conversion du glucose en biomasse,  $CO_2$ , et acides organiques, obtenus dans le présent travail et lors de précédentes études sont présentés en pourcentages, entre parenthèses. ....V.203

**Tableau V.3 :** Comparaison des flux intracellulaires de réactions du métabolisme de *C. glutamicum*, simulés par le modèle « initial » avec ceux reportés dans la littérature. Les résultats de flux intracellulaires issus de la littérature correspondent à des données expérimentales et des données de simulation par d'autres modèles. Les flux sont présentés en pourcentage par rapport au flux de glucose. ....V.204

**Tableau V.4 :** Caractéristiques du modèle métabolique ajusté de *C. glutamicum* .....V.209

<b>Tableau V.5 :</b> Résolution FBA du modèle ajusté de <i>C. glutamicum</i> 2262 en conditions aérobies et anaérobies.....	V.209
<b>Tableau V.6 :</b> Comparaison des intervalles de rapport OUR/GUR obtenus à partir des trois modèles métaboliques ajustés et du modèle de Shinfuku et al. (2009) pour la production de biomasse, de CO <sub>2</sub> , de lactate, de succinate et d'acétate. Les pourcentages des rendements carbonés maximaux sont présentés entre parenthèses. ....	V.213
<b>Tableau V.7 :</b> Valeurs des coefficients de détermination (R <sup>2</sup> ) d'une régression linéaire entre les résultats de simulation de la production de lactate et succinate par les trois modèles métaboliques ajustés et les flux simulés par le modèle cinétique, pour les différentes conditions de <i>k<sub>LA</sub></i> . ....	V.221
<b>Tableau V.8 :</b> État de fonctionnement des voies métaboliques dans le métabolisme du glucose, de l'acétate, du lactate et du succinate. ....	V.227

## Liste des abréviations

### Métabolites

13DPG	1,3-biphosphoglycérate
2PG	2-phosphoglycérate
3PG	3-phosphoglycérate
6PGC	6-phospho-gluconate
6PGL	6-phosphogluconolactone
AC	Acétate
ACCOA	Acétyl-CoA
ACN	Cis-Aconitate
ACTP	Acétyl phosphate
ADP	Adénosine diphosphate
AKG	$\alpha$ -cétoglutarate
AMP	Adénosine monophosphate
ATP	Adénosine triphosphate
CIT	Citrate
CO2	Dioxyde de carbone
DHAP	Dihydroxyacétone phosphate
E4P	Erythrose-4-phosphate
F6P	Fructose-6-phosphate
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FADH2	Flavine adénine dinucléotide (forme réduite)
FDP	Fructose 1,6-bisphosphate
FRU	Fructose
FUM	Fumarate
G3P	Glycéraldéhyde-3-phosphate
G6P	Glucose-6-phosphate
GLC	Glucose
GLX	Glyoxylate
GTP	Guanosine triphosphate
HCO3	Bicarbonate
ICIT	Isocitrate
LAC	Lactate
MAL	Malate
MQ	Ménaquinone
MQH2	Ménaquinol
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide (forme réduite)
NADP	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme réduite)
O2	Dioxygène
OAA	Oxaloacétate



PEP	Phosphoénolpyruvate
Pi	Phosphate inorganique
PYR	Pyruvate
R5P	Ribose-5-phosphate
RU5P	Ribulose-5-phosphate
S7P	Sédoheptulose-7-phosphate
SUCC	Succinate
SUCCOA	Succinyl-CoA
SUCR	Sucrose
SUCR6P	Sucrose-6-phosphate
SUCSAL	Succinate semialdéhyde
UQ	Ubiquinone 8
UQH2	Ubiquinol 8
XU5P	Xylulose-5-phosphate

---

### Enzymes

ACK	Acétate kinase
ACN	Aconitase
CS	Citrate synthase
CTF	CoA transférase
Dld	D-lactate déshydrogénase quinone-dépendante
ENO	Enolase
FBP	Fructose 1,6-biphosphatase
FDA	Fructose biphosphate aldolase
FUM	Fumarate hydratase
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GLK	Glucokinase ATP-dépendant
GND	6-phosphogluconate déshydrogénase
ICD	Isocitrate déshydrogénase
ICL	Isocitrate lyase
LDH	Lactate déshydrogénase
LldD	L-lactate déshydrogénase quinone-dépendante
MDH	Malate déshydrogénase NAD-dépendant
MQO	Malate : quinone oxydoréductase
MS	Malate synthase
OD	Oxaloacétate décarboxylase
ODHC	$\alpha$ -cétoglutarate déshydrogénase
PC	Pyruvate carboxylase
PDHC	Pyruvate déshydrogénase
PEPC	Phosphoénolpyruvate carboxylase
PEPCK	Phosphoénolpyruvate carboxykinase
PFKB	Phosphofructokinase
PGI	Glucose-6-phosphate isomerase
PGK	3-phosphoglycérate kinase
PGM	Phosphoglycérate mutase

PPGK	Glucokinase phosphate/ATP-dépendant
PQO	Pyruvate : quinone oxydoréductase
PTA	Phosphotransacétylase
PTS	Système phospho-transférase
PYK	Pyruvate kinase
RPE	Ribulose 5-phosphate épimérase
RPI	Ribose-5-phosphate isomérase
SDH	Succinate déshydrogénase
TAL	Transaldolase
TKT	Transcétolase
TPI	Triose phosphate isomérase
ZWF	Glucose-6-phosphate déshydrogénase

---

### Autres

ADN	Acide désoxyribonucléique
AG	Algorithme génétique
AGD	Algorithme génétique diploïde
ARN	Acide ribonucléique
dFBA	Dynamic Flux Balance Analysis
DOC	Dissolved oxygen concentration
DW	Dry Weight
FBA	Flux Balance Analysis
g	gramme
GUR	Glucose uptake rate / Vitesse de consommation d'oxygène
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
MFA	Metabolic Flux Analysis
mM	millimolaire
nm	Nanomètre
OD <sub>570</sub>	Densité optique à 570 nm
OTR <sub>max</sub>	Maximal Oxygen transfer rate
OUR	Oxygen uptake rate
pmf	Force motrice de proton
PPP	Voie des pentoses phosphate
RMN	Résonance magnétique nucléaire
WT	Wild type

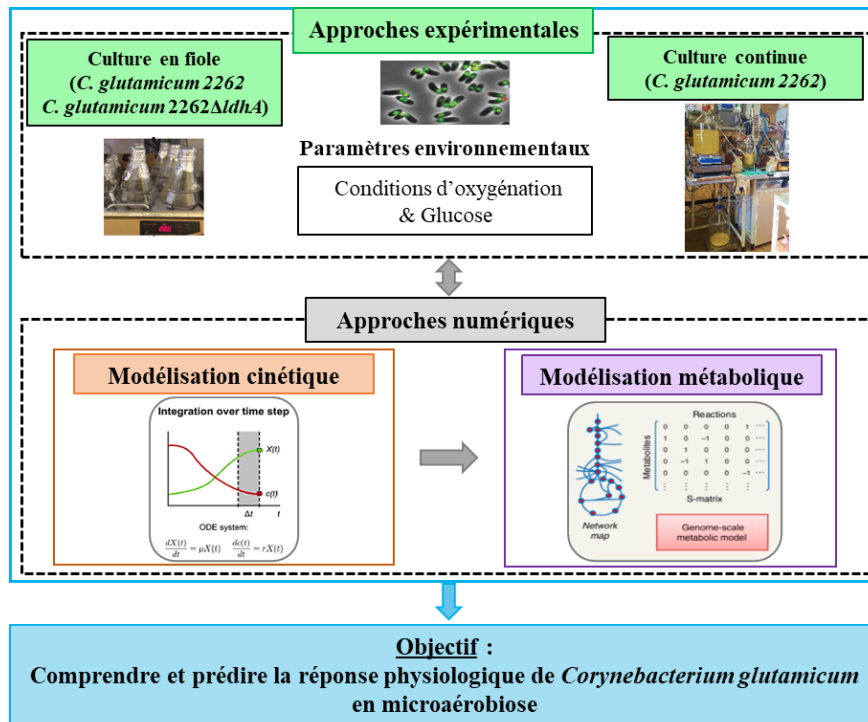


## Introduction générale

Durant les dernières décennies, les biotechnologies sont proposées comme alternatives aux procédés chimiques pour limiter l'épuisement des ressources pétrolières et les problèmes environnementaux. Ces biotechnologies, notamment « les biotechnologies blanches », visent à exploiter des ressources renouvelables, au travers des procédés fermentaires et enzymatiques (Dai et al., 2019). Actuellement, plusieurs molécules d'intérêt sont produites par ces bioprocédés dont l'acide succinique. Cet acide organique présente de nombreuses applications dans les domaines pharmaceutiques, plastiques, agroalimentaires et textiles (Yedur et al., 2001). En 2004, il a été classé, selon le Département Américain de l'Énergie, parmi les douze précurseurs chimiques les plus importants (Werpy and Petersen, 2004). Il peut être produit par plusieurs microorganismes tels que *Actinobacillus succinogenes*, *Basfia succiniproducens* ou encore *Anaerobiospirillum succiniciproducens*, qui sont connus comme producteurs naturels (Guettler et al., 1999; Hong, 2007; Lee et al., 1999; Scholten and Dägele, 2008; Zeikus et al., 1999). Face à l'augmentation de la demande de ce marché qui est estimé à 600 000 tonnes en 2020 (Dai et al., 2019), des stratégies de génie métabolique ont été utilisées pour améliorer la production de succinate par d'autres microorganismes plus robustes tels que *Saccharomyces cerevisiae*.

*Corynebacterium glutamicum* est une bactérie aéro-anaérobie facultative largement utilisée en industrie pour la production de glutamate et lysine pour des raisons de robustesse, le fait qu'elle soit non pathogène, non sporulante et ayant un génome stable. Grâce aux avancées du génie métabolique, cette bactérie est aujourd'hui potentiellement utilisable comme plate-forme pour la synthèse de plusieurs précurseurs chimiques. Il a été montré que son métabolisme est orienté vers la production des acides organiques notamment le succinate, en microaérobiose et en anaérobiose. Dans ces conditions, *C. glutamicum* produit majoritairement du lactate avec de quantités faibles de succinate (Dominguez et al., 1993; Okino et al., 2005). Plusieurs études ont été focalisées sur les modifications génétiques, afin d'améliorer la productivité et le rendement de production de succinate (Inui et al., 2004; Kaboré et al., 2015). Mais la production de cet acide organique est également fortement impactée par diverses conditions environnementales tels que la présence de CO<sub>2</sub>, le niveau d'oxygénation, le mode de transition entre phases aérobies et anaérobies (Kaboré et al., 2015, 2017; Käß et al., 2014; Radoš et al., 2014). En se basant sur ces facteurs environnementaux, plusieurs stratégies d'optimisation du procédé de production de succinate par *C. glutamicum* ont été proposées (Ahn et al., 2016; Baritugo et al., 2018; Dai et al., 2019; Jiang et al., 2017; Kaboré et al., 2017; Lange et al., 2017).

L'impact de l'oxygénation sur la production de succinate a ainsi fait l'objet de plusieurs travaux notamment celui de Kaboré (2015) au sein du LRGP. Mais, à ce jour, peu d'études se sont intéressées à l'impact de ce paramètre à l'échelle métabolique. Dans ce contexte, l'objectif général de cette thèse était d'étudier, de comprendre et de prédire la réponse physiologique de *C. glutamicum*, notamment lors de la production de succinate, en microaérobiose, en couplant des approches expérimentales et numériques. La démarche générale qui a été suivie au cours de ce travail est présentée dans la figure 1.



**Figure I.2 :** Démarche globale de la thèse

Au cours de ce travail, nous viserons à répondre aux questions suivantes :

Quel est l'impact d'un changement des conditions environnementales, oxygène et substrat carboné, sur la réponse physiologique de *C. glutamicum* ? Quel est le paramètre le plus pertinent pour présenter et quantifier cet impact ?

Quelles peuvent-être les représentations mathématiques les plus appropriées du comportement physiologique de *C. glutamicum* permettant de décrire à l'échelle macroscopique et métabolique l'effet de l'oxygénation et de la disponibilité en substrat carboné ?

Les modèles numériques définis pour une souche sauvage de *C. glutamicum*, *C. glutamicum* 2262, sont-ils transposables à une souche modifiée génétiquement, surproductrice de succinate, *C. glutamicum* 2262 $\Delta$ *ldhA* ?

Ce mémoire de thèse est divisé en 6 parties principales : une étude bibliographique, une partie « matériels et méthodes », trois parties de résultats et discussion et enfin, les conclusions et les perspectives de ce travail.

Le premier chapitre consiste en un état de l'art qui permet de positionner la thématique de cette thèse. Il synthétise les connaissances actuelles du métabolisme de *C. glutamicum* ainsi que des stratégies d'optimisation de la production de succinate par cette bactérie. Les 2 autres parties présentent l'approche de modélisation qu'elle soit cinétique ou métabolique.

Le second chapitre de ces travaux présente les différents outils expérimentaux et numériques utilisées lors de ces travaux de recherche.

La troisième partie de la thèse est constituée de trois sous-chapitres. Dans un premier temps, une étude expérimentale (chapitre 3) a été réalisée afin d'identifier des paramètres influençant la réponse physiologique de *C. glutamicum* dans des conditions de limitation en oxygène. Pour cela, différentes cultures discontinues et continues ont été réalisées dans différentes conditions d'oxygénation. Par la suite, en prenant en compte l'impact des paramètres définis, un procédé semi-continu a été réalisé afin d'évaluer la capacité de *C. glutamicum* 2262 à produire du succinate à l'échelle du bioréacteur. Dans un second temps (chapitre 4), en se basant sur les phénomènes observés expérimentalement, un modèle cinétique a été développé. L'objectif de ce dernier était de décrire les cinétiques de croissance, de production/consommation des acides organiques (lactate, succinate et acétate) et de consommation de glucose en fonction des conditions d'oxygénation. Ce modèle permet non seulement la prédiction mais aussi la quantification du comportement de *C. glutamicum* par intégration d'un modèle secondaire constitué des corrélations entre les paramètres cinétiques et le niveau d'oxygénation ( $k_{LA}$ ). Afin de vérifier sa robustesse, ce modèle a été transposé la souche modifiée génétiquement, *C. glutamicum* 2262 $\Delta$ *ldhA*. Ces deux premières études se sont focalisées sur la compréhension de la réponse physiologique de *C. glutamicum*, à l'échelle macro-cinétique, dans des conditions d'apport limité en oxygène, en particulier lors de la phase de production de succinate. Une modélisation métabolique, a ensuite été réalisée pour tenter de comprendre et expliquer le comportement de *C. glutamicum* à l'échelle métabolique. Le choix a été fait de construire un

modèle métabolique simplifié de cette bactérie. Ce dernier a été validé dans différentes conditions d'oxygénation et de disponibilité glucose. L'étape de validation a été réalisée à partir de données de la littérature et des données expérimentales qui ont pu être collectées au cours de ce travail

Enfin, la dernière partie du manuscrit synthétise les principaux résultats obtenus et propose des perspectives pouvant permettre de poursuivre et d'approfondir le travail réalisé.

# Chapitre 1

---



# I. Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

## Partie 1 : métabolisme

### 1. Succinate : importance et production

Le succinate (acide butane-1,4-dioïque) est un diacide carboxylique aliphatique. Il a été purifié pour la première fois par Georgius Agricola en 1546, par distillation d'ambre (Cheng et al., 2012; Song and Lee, 2006). Cet acide organique est classé parmi les douze précurseurs chimiques présentant le plus haut potentiel de valeur ajoutée selon le département américain de l'énergie (US Department of Energy) (Werpy and Petersen, 2004). Il est classé comme « GRAS » (Generally Recognized As Safe) par la FDA (Food and Drug Administration) (Yedur et al., 2001) ce qui lui permet d'être utilisé dans différents domaines industriels tels que l'alimentaire et le pharmaceutique (Cao et al., 2013; Intratec, 2017). En 2004, le potentiel de son marché et de ses dérivés a été estimé à plus de 270 000 tonnes par an (Willke and Vorlop, 2004). La demande en cet acide organique devrait augmenter pour atteindre plus de 700 000 tonnes par an en 2020 (Choi et al., 2015).

#### 1.1. Utilisation du succinate

De nombreuses applications de cet acide organique, dans différents domaines, ont été présentées dans plusieurs études (Figure I.1).

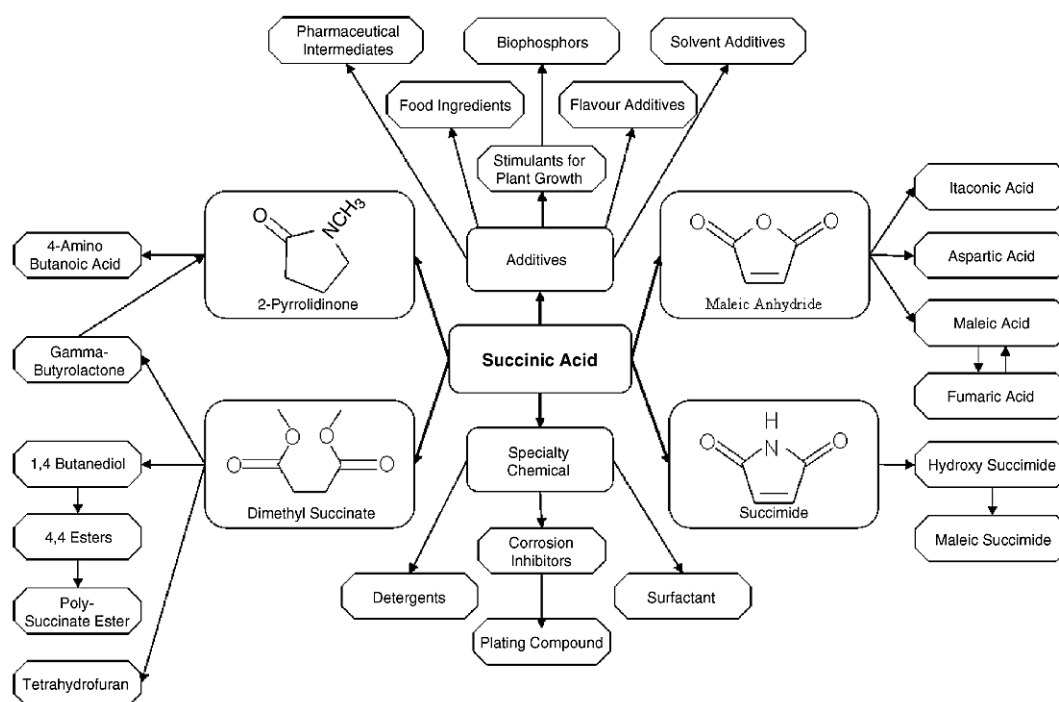


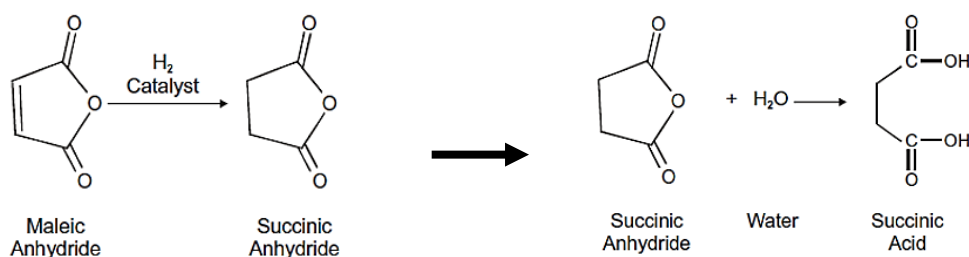
Figure I.1 : molécules pouvant être synthétisées à partir d'acide succinique (Song and Lee, 2006).

Cet acide organique est utilisé majoritairement comme surfactant, détergent, agent moussant ou chélateur permettant d'éviter la corrosion et les piqures des métaux. Il est utilisé dans les industries alimentaires comme acidifiant, modificateur du pH, agent aromatisant et agent antimicrobien. Il est également important pour la production de produits pharmaceutiques tels que les antibiotiques, ou encore pour la synthèse d'acides aminés et de vitamines (Sener et al., 1997; Zeikus et al., 1999). Cet acide organique est connu comme régulateur de croissance dans le domaine agricole et pour favoriser l'enracinement des plantes. A ce titre, il est utilisé dans le traitement de certaines semences (Dougall and Weyrauch, 1980). D'autre part, grâce à la linéarité de sa structure et à sa saturation, le succinate est un composant clé pour la production de plus de 30 produits chimiques, commercialement importants comme le 1,4-butanediol (BDO), le tétrahydrofurane, le  $\gamma$ -butyrolactone et la 2-pyrrolidinone, qui peuvent être utilisés, par la suite, pour la synthèse de bio-polymères (Cao et al., 2013; Cheng et al., 2012; Yu et al., 2011; Zeikus et al., 1999).

## 1.2. Voies de production du succinate

### 1.2.1. Voie chimique

Le succinate est produit principalement par voie chimique en utilisant la paraffine, l'anhydride maléique, l'acétylène ou l'acide acrylique comme matières premières. L'oxydation de la paraffine est la méthode historique pour la synthèse de succinate. La paraffine est oxydée en mélange d'acides di-carboxyliques, en présence de manganèse et de calcium. Le succinate dissous dans une phase aqueuse, est cristallisé après une distillation à la vapeur (Cao et al., 2013). Un autre processus largement utilisé pour la production de succinate, consiste en l'hydrogénation de l'anhydride maléique suivie par une hydratation (Figure I.2) (Vaswani, 2010). Ce processus est réalisé sous des conditions extrêmes en température et pression. De plus, la présence des catalyseurs à base des métaux nobles (Pd, Ru, ...) est importante pour ce processus. Un autre processus basé sur la réduction électrolytique de l'anhydride maléique en milieu acide a été utilisé pour la production de cet acide organique. Mais, ce processus demande beaucoup d'énergie électrique augmentant le coût de production (Cao et al., 2013).



**Figure I.2 :** Exemple de la synthèse chimique de succinate à partir d'anhydride maléique.

Le procédé chimique de production de succinate présente des inconvénients. Des conditions extrêmes en température et pression sont parfois nécessaires, la présence d'alliages de métaux coûteux peut être requise comme catalyseurs et les matières premières sont d'origine pétrolière. L'utilisation de ces dernières participe, non seulement, à l'épuisement de ces ressources non renouvelables mais aussi à de graves impacts environnementaux. Face à ces problèmes, des procédés de synthèse de succinate par voie biologique ont été développés.

### 1.2.2. Voie biologique

Le succinate est un intermédiaire du cycle de Krebs dans le métabolisme cellulaire. Il peut être un produit de fin de fermentation, en anaérobiose. L'utilisation de ressources renouvelables réduisant la formation de sous-produits toxiques et la pollution de l'environnement, fait de la production de succinate par voie biologique une voie particulièrement intéressante. Un autre avantage de ce procédé est la consommation de CO<sub>2</sub> pour la synthèse de succinate. Ce procédé biologique a été appliqué à l'échelle industrielle par trois sociétés BioAmber, Reverdia (puis Roquette après le retrait de DSM en 2019) et Succinity en utilisant *Escherichia coli*, *S. cerevisiae* ou *B. succiniproducens*, respectivement, comme microorganismes producteurs. Une autre entreprise, Myriant, s'est également intéressée au développement de cette bioproduction mais sans aboutir, semble-t-il, à la mise en place d'un site industriel. La capacité de production de succinate de ces différents sites était d'environ 64 000 tonnes par an en 2014, avec 30 000 tonnes/an produites par BioAmber (Jansen and van Gulik, 2014). Cette capacité de production biologique représentait 49 % de la production totale de succinate en 2014.

### 1.3. Microorganismes producteurs de succinate

Le succinate est naturellement produit à partir de sucres ou d'acides aminés par des bactéries productrices de propionate (*Propionibacterium* sp.), des bactérie gastro-intestinales typiques (*E. coli*, *Pectinatus* sp., *Bacteroides* sp.) et des bactéries du rumen (*Actinobacillus succinogenes*, *Bacteroides amylophilus*, *Prevotella ruminicola*, *Succinimonas amylolytica*, *Succinivibrio dextrinisolvans*, *Wolinella succinogenes* et *Cytophaga succinicans*) (Hong, 2007; Zeikus et al., 1999). Certains champignons sont aussi capables de produire le succinate tels que *Paecilomyces varioti* (Ling et al., 1978), *Aspergillus niger* (Bercovitz et al., 1990) et *Penicillium simplicissimum* (Gallmetzer et al., 2002). D'autres micro-organismes peuvent devenir producteurs de succinate suite à des manipulations de leur potentiel métabolique par génie génétique.

### 1.3.1. Producteurs naturels

Certains micro-organismes sont capables de produire naturellement des quantités importantes de succinate. Parmi ces producteurs naturels, les plus performants sont : *A. succinogenes* (Guettler et al., 1999), *A. succiniciproducens* (Lee et al., 1999) et *Mannhaimia succiniciproducens* (Lee et al., 2002). Ces souches ont été isolées de rumens. *Actinobacillus succinogenes* est classée parmi les micro-organismes les plus prometteurs pour la production de succinate à l'échelle industrielle, grâce à sa capacité à cataboliser une large gamme de sources carbonées comme les sucres simples (lactose, xylose, arabinose, cellobiose) mais aussi le lactosérum, la mélasse de canne, les hydrolysats des tiges de maïs ou de blé (Carvalho et al., 2016; Jiang et al., 2017). Des exemples de producteurs naturels de succinate sont présentés dans le Tableau I.1.

### 1.3.2. Producteurs modifiés génétiquement

Des micro-organismes sont capables de produire du succinate comme coproduit mais avec des rendements faibles. Des modifications génétiques ont été proposées afin d'améliorer la productivité et le rendement de la production de succinate par ces micro-organismes. *E. coli*, *C. glutamicum* et *S. cerevisiae* sont les micro-organismes les plus représentatifs des producteurs modifiés génétiquement. *Escherichia coli* est un micro-organisme de référence grâce à sa facilité de manipulation génétique et une croissance rapide (Lin et al., 2005a, 2005b; Millard et al., 1996; Stols and Donnelly, 1997). Plusieurs études ont démontré la capacité de production de souches modifiées génétiquement d'*E. coli* (Tableau I.1). À titre d'exemple, *E. coli* SD121 est capable de produire une concentration de 116,2 g L<sup>-1</sup> de succinate avec un rendement et productivité d'environ 1,13 g g<sup>-1</sup> glucose et 1,55 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, respectivement, au cours d'une culture en mode semi-continu, en anaérobiose (Wang et al., 2011).

**Tableau I.1 : Exemples de producteurs de succinate : producteurs naturels et des producteurs modifiés génétiquement.**

Microorganisme	Stratégie de fermentation	Substrat(s)	[biomasse] (g L <sup>-1</sup> )	[succinate] (g L <sup>-1</sup> )	Rendement (g g <sup>-1</sup> )	Productivité (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Référence
<b>Producteurs naturels</b>							
<i>A. Succinogenes</i>	Batch répété	Glucose	-	33,9	0,86	0,88	(Urbance et al., 2004)
<i>A. Succinogenes</i> 130Z	Batch	Glucose	-	66,4	0,67	0,79	(Guettler et al., 1996)
<i>A. Succinogenes</i> FZ53	Batch	Glucose	-	105,8	0,8	1,34	(Guettler et al., 1996)
<i>M. succiniciproducens</i>	Batch	Glucose + CO <sub>2</sub> <sup>(1)</sup>	3,44	13,5	0,68	1,87	(Lee et al., 2002)
	Batch	Lactose	3,30	13,5	0,72	1,22	(Lee et al., 2003)
<i>A. succiniciproducens</i>	Continue : D=0.085h <sup>-1</sup>	Lactose	-	24	0,72	2,1	(Samuelov et al., 1999)
	Fed-batch	Glucose + glycérol	OD <sub>660</sub> = 4,6	29,6	0,97	1,35	(Lee et al., 1999)
	Batch	Glucose + CO <sub>2</sub> <sup>(1)</sup>	OD <sub>660</sub> = 2,0	33	0,93	1,1	(Nghiem et al., 1997)
<i>A. succiniciproducens</i>	Système intégré <sup>(3)</sup>	Glucose	-	83	0,89	10,4	(Meynial-Salles et al., 2008)
<b>Producteurs modifiés génétiquement</b>							
<i>E. coli C</i>	Batch	Glucose + K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	-	71,5	1	0,9	(Jantama et al., 2008)
<i>E. coli</i> AFP111 (pTrc99A- <i>pyc</i> )	Bi-phase / Fed-batch	Glucose	10,2	99,2	1,10	1,3	(Vemuri et al., 2002)
<i>E. coli</i> HL27659K	Fed-batch	Glucose	OD <sub>600</sub> = 35	58,3	0,55	0,98	(Lin et al., 2005a)
<i>E. coli</i> AFP111	Bi-phase / Fed-batch	Glucose	6	101,2	1,07	1,89	(Jiang et al., 2010)
<i>E. coli</i> SD121	Bi-phase / Fed-batch	Glucose	19,6	116,2	1,13	1,55	(Wang et al., 2011)
<i>E. coli</i> Tang1683	Bi-phase / Fed-batch	Glucose	-	92,7	0,73	1,25	(Wei et al., 2016)

<sup>(1)</sup> : ajout de CO<sub>2</sub> sous forme de gaz

<sup>(2)</sup> : mg OD<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>

<sup>(3)</sup> système intégré : membrane-électrodialyse-bioréacteur

Contrairement aux bactéries à Gram négatif, peu de bactéries à Gram positif ont été évaluées pour leur capacité de production de succinate. Parmi celles-ci, *C. glutamicum* est capable de produire du succinate en anaérobiose ou dans des conditions de limitation de l'apport en oxygène, en utilisant du glucose comme source carbonée (Dominguez et al., 1993; Inui et al., 2004; Okino et al., 2005). Différentes modifications génétiques ont été d'appliquées sur cette bactérie pour accroître ces performances. À titre d'exemple, *C. glutamicum* S071/pGEX4-NCgl0275 produit la concentration en succinate la plus élevée rapportée dans la littérature scientifique avec environ 152 g L<sup>-1</sup> pour un rendement de 1,1 g g<sup>-1</sup> glucose (Tableau I.4) (Chung et al., 2017). C'est sur cette espèce bactérienne, en particulier que notre travail a porté.

## **2. Métabolisme de *Corynebacterium glutamicum***

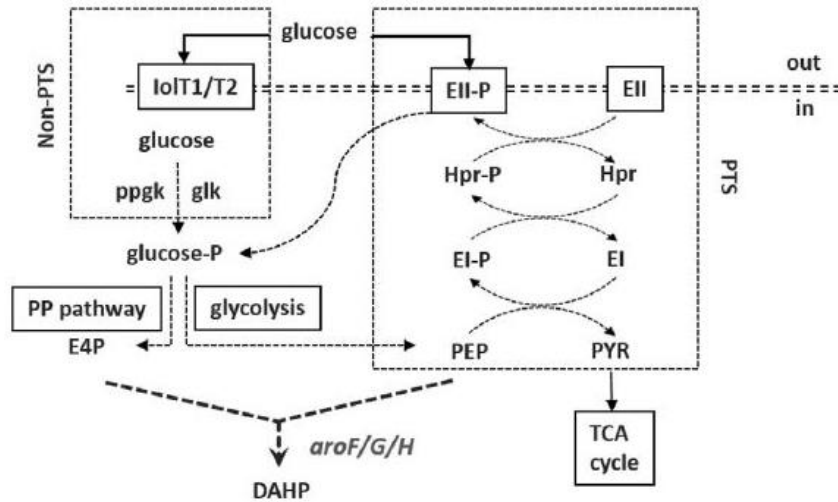
Le métabolisme cellulaire est un réseau de milliers des réactions biochimiques. Ces réactions sont divisées en deux catégories : le catabolisme ou réactions de dégradation et l'anabolisme ou réactions de synthèse. Parmi ces réactions, une partie du réseau est commune à tous les micro-organismes : c'est le métabolisme central. Mais il peut se différencier d'un organisme à un autre et d'une souche à une autre par la nature et la régulation des enzymes catalysant ces réactions métaboliques. Ce métabolisme central représente le point de départ des autres voies métaboliques de biosynthèse. Chez *C. glutamicum*, il est constitué de la glycolyse, de la voie des pentoses phosphate, du cycle de Krebs et des voies anaplérotiques.

### **2.1.Métabolisme du glucose**

#### **2.1.1. Entrée de glucose**

Le glucose peut pénétrer dans la cellule soit par le système perméase, soit par le système phosphotransférase, PTS. Chez *C. glutamicum*, le glucose est consommé principalement via le système PTS (Mori and Shiio, 1987; Parche et al., 2001). Ce système PTS découvert par Roseman et al. (1964) est un complexe multienzymatique utilisant le phosphoénolpyruvate comme source d'énergie. Il est composé de deux protéines cytoplasmiques communes ; la phosphotransférase I (EI, codé par le gène *ptsI*) et une protéine HPr (codé par le gène *ptsH*) ainsi que d'un complexe protéique spécifique du sucre ; Enzyme II. Le mécanisme du PTS consiste au transfert séquentiel du groupe phosphorylé du phosphoénolpyruvate à EI, à HPr, à EII et enfin au substrat (Figure I.3) (Ikeda, 2012 et 2011; Moon et al., 2007, Moon et al., 2005,

Parche et al., 2001). *Corynebacterium glutamicum* possède 4 types de PTS spécifiques du glucose, du fructose, du saccharose et d'un autre substrat non encore identifié. Dans le cas du glucose, ce dernier est codé par *ptsG*.

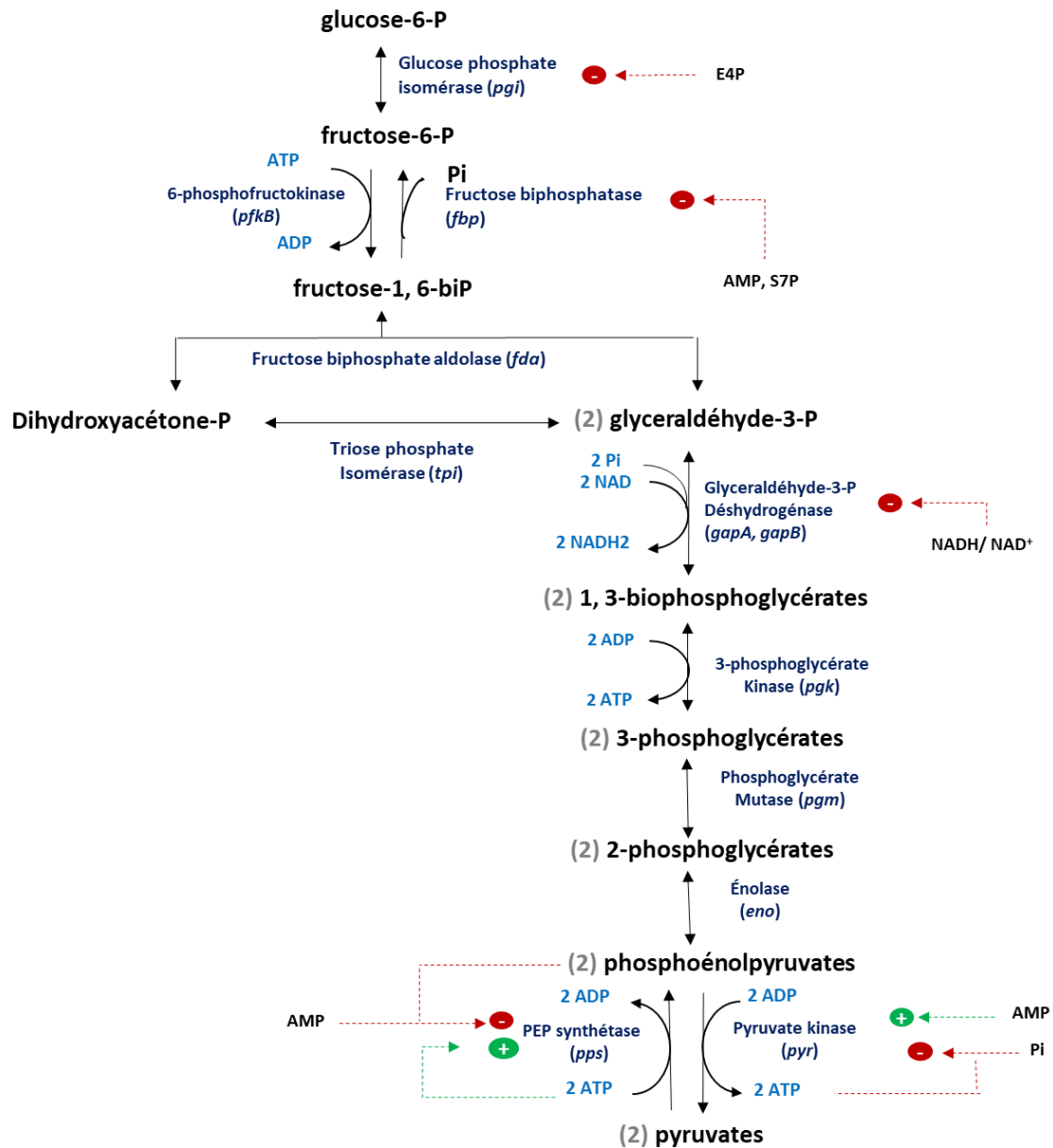


**Figure I.3 :** Schéma simplifié des mécanismes des différents systèmes de transport du glucose chez *C. glutamicum* (Shin et al., 2018).

Les PTS de *C. glutamicum* ont été caractérisés principalement à l'aide de souches mutées et par description phénotypique (Parche et al., 2001). Malgré l'absence de PTS chez une souche de *C. glutamicum*, une croissance marginale sur glucose a été observée. Celle-ci a été expliquée par la capacité de la perméase à suppléer partiellement le PTS (Cocaign-Bousquet et al., 1996; Parche et al., 2001). De plus, deux glucokinases, GLK et PPGK, responsables de la phosphorylation du glucose intracellulaire en glucose-6-phosphate ont été identifiées. La GLK (codée par *glk*) est impliquée dans le métabolisme du maltose qui est transformé en glucose à l'intérieur de la cellule. L'activité de la PPGK (codée par *ppgk*) dépend de la concentration intracellulaire en phosphate (Park et al., 2000). Certaines études montrent que la contribution de ces enzymes à la phosphorylation du glucose est de 15 % et 25 % dans le cas de *C. glutamicum* ATCC 17965 et de *C. glutamicum* 2262, respectivement (Cocaign-Bousquet et al., 1996; Gourdon et al., 2003). Mais cette contribution a été enregistrée en excès de glucose associée à une croissance élevée, permettant de réduire la limitation de la vitesse dans le transport de sucre (Cocaign-Bousquet et al., 1996). De plus, un troisième transporteur alternatif a été identifié chez *C. glutamicum* ATCC 31833 : il s'agit du transporteur du myo-inositol codé par *iolT1* et *iolT2*. Ce transporteur est similaire à la galactose perméase identifiée chez *E. coli*. Il est PEP-indépendant, utilisant le polyP ou l'ATP comme donneur de phosphate (Ikeda et al., 2015).

## 2.1.2. Glycolyse

La glycolyse est un ensemble des réactions métaboliques permettant de convertir le G6P en 2 pyruvates (Figure I.4). Ces conversions sont couplées avec la génération d'énergie sous forme de 3 ATP et 2 NADH.



**Figure I.4 :** Schéma simplifié de la glycolyse et de son mécanisme de régulation chez *C. glutamicum*.

La première réaction de la glycolyse consistant à l'isomérisation du glucose-6-phosphate (G6P) en fructose-6-phosphate (F6P) est catalysée par la glucose-6-phosphate isomérase (PGI)



(Sugimoto and Shiio, 1989). Une deuxième phosphorylation du produit de la première réaction (F6P) en fructose-1,6-biphosphate (FDP), est catalysée par la phosphofructokinase (PFKB). Cette dernière est considérée comme une enzyme clé pour la régulation de la glycolyse (Sugimoto and Shiio, 1989). Cette réaction de phosphorylation du F6P est une réaction irréversible. La réaction inverse est catalysée par la fructose bi-phosphatase (FBP) (Sugimoto and Shiio, 1989). Le F-1,6-biphosphate est converti en une molécule de glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P) et une molécule de dihydroxyacétone (DHAP). Cette réaction est catalysée par le fructose biphosphate aldolase (FDA) (Osten et al., 1989). La réaction réversible de l'isomérisation du DHAP en G3P est catalysée par la triose phosphate isomérase (TPI). La glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) catalyse la réaction de phosphorylation du G3P en 1,3-biphosphoglycérate (13DPG), en réduisant le cofacteur  $\text{NAD}^+$  en NADH. Cette enzyme est inhibée essentiellement par l'augmentation du rapport  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  (Dominguez et al., 1998). La conversion du 1,3-biphosphoglycérate en 3-phosphoglycérate est catalysée par la 3-phosphoglycérate kinase (PGK), en libérant un phosphate inorganique qui sert à phosphoryler l'ADP en ATP. La phosphoglycérate mutase (PGM) et l'énolase (ENO) catalysent respectivement la réaction de synthèse du 2-phosphoglycérate puis du 2 phosphoénolpyruvate (PEP). Les TPI, GAPDH et PGK sont regroupées dans le même cluster de gènes que la phosphoénolpyruvate carboxylase (Eikmanns, 1992). La synthèse de la GAPDH, de la TPI et de la PGK semble être sensible à la répression par le glucose (Dominguez et al., 1998). La pyruvate kinase (PYK) est une enzyme allostérique clé pour la régulation de la glycolyse, et plus largement du métabolisme énergétique de cette bactérie.

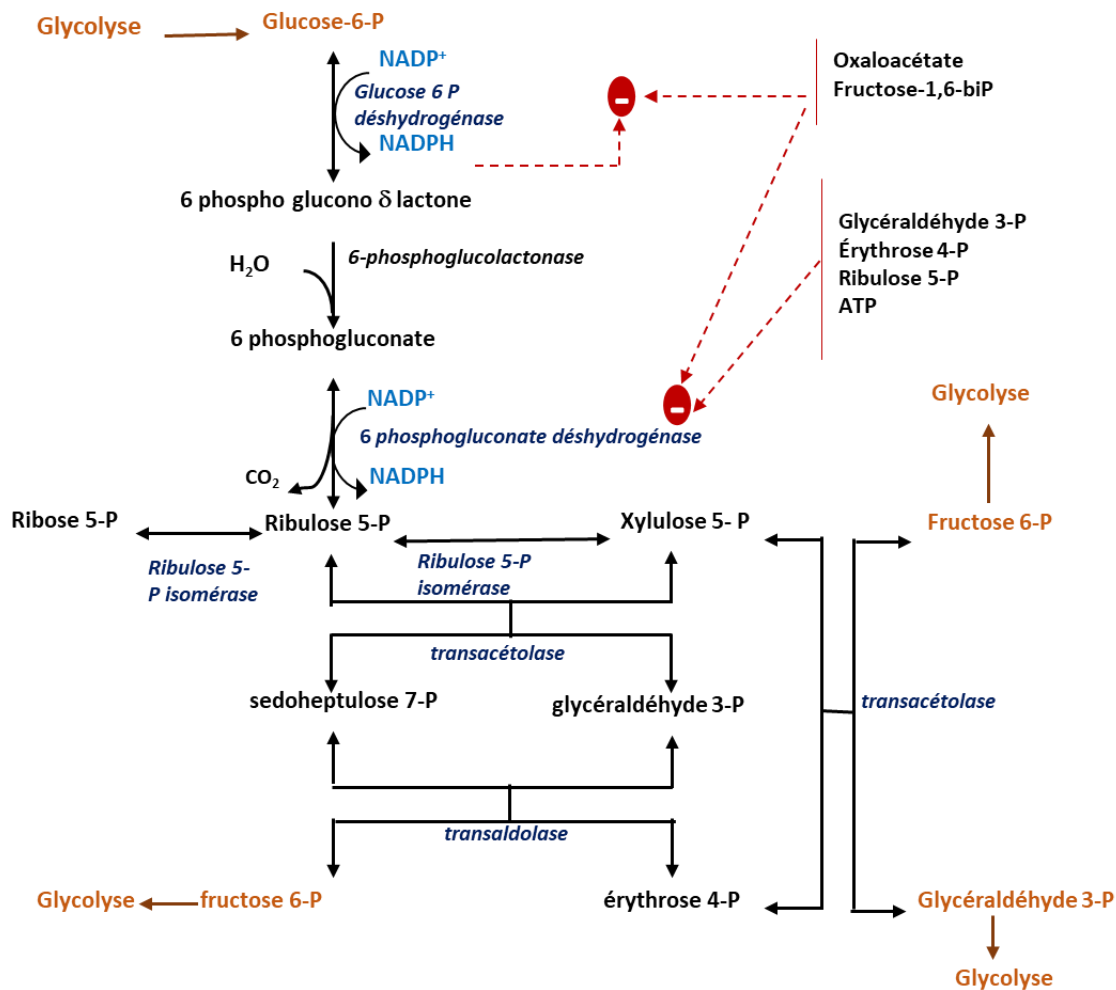
Certains travaux montrent que le pyruvate produit par le PTS suffit pour la croissance des corynébactéries, et donc, que la pyruvate kinase n'est pas indispensable lors de croissance sur des sucres assimilables par un système PTS (Gubler et al., 1994). D'autre part, l'étude de (Kalinowski et al., 2003a) montre que la pyruvate kinase chez *C. glutamicum* est codée par deux gènes (NCgl2008/*pyrk1* et NCgl2809/*pyk2*). Celle-ci intervient dans la régulation du métabolisme du pyruvate et donc de la production des acides organiques dans des conditions de limitation en oxygène (Chai et al., 2016). D'autre part, une faible activité de la PEP synthétase (PPS) a été mesurée chez *C. glutamicum*. Cette enzyme permet de catalyser la réaction inverse de celle catalysée par la pyruvate kinase. Son activité dépend de la nature du substrat carboné. Elle est ainsi 2 à 3 fois plus importante dans le cas d'utilisation de lactate comme source carbonée que celle mesurée avec glucose (Jetten et al., 1994).

La régulation de la glycolyse se fait au niveau du couple phosphofructokinase – fructose biphosphate et de la pyruvate kinase catalysant les deux réactions irréversibles de cette voie métabolique. Le contrôle le plus important est lié au niveau énergétique de la cellule : inhibition ou activation des enzymes par l'ATP, l'ADP ou l'AMP. Les métabolites intermédiaires n'ont pas d'effet direct sur l'activité des enzymes impliquées dans la glycolyse. Sauf, dans le cas de PGI et de FBP pour lesquelles deux métabolites issus de la voie des pentoses phosphate, l'érythrose-4-phosphate (E4P) et le sédoheptulose-7-phosphate (S7P) sont des inhibiteurs.

### 2.1.3. Voie des pentoses phosphate

La voie des pentoses phosphate (voie PPP) ou voie de l'hexose monophosphate est une voie importante dans le métabolisme du glucose chez les corynébactéries. Elle est considérée comme la source principale du NADPH. Cette voie permet de synthétiser des précurseurs nécessaires à la synthèse de l'histidine, des lipides, des acides nucléiques et des acides aminés aromatiques. Elle interagit avec la glycolyse au niveau du G6P, du F6P et du G3P (Figure I.5). La voie des pentoses phosphate peut se subdiviser en deux parties ; une partie oxydative et une partie non oxydative.

À partir du G6P, le ribose-5-phosphate (R5P) est synthétisé en trois étapes. La G6P déshydrogénase (codée par les deux gènes *zwf* et *opca*) catalyse la réaction d'oxydation du G6P en 6-phosphogluconolactone, en produisant un NADPH. Puis, la 6-phosphogluconolactonase (PGL) catalyse la conversion irréversible du 6-phosphogluconolactone en 6-phosphogluconate. Ce dernier est converti en ribulose-5-phosphate (RU5P), en libérant un CO<sub>2</sub> et un NADPH. Cette décarboxylation oxydative est catalysée par la 6-phosphogluconate déshydrogénase (GND). La synthèse de RU5P représente la partie oxydative (irréversible) de la voie des pentoses phosphate, responsable de la production de 2 NADPH. Parmi les enzymes de la partie oxydative de la voie de PPP, la G6P déshydrogénase et la 6-phosphogluconate déshydrogénase ont été purifiées et caractérisées chez *C. glutamicum* ATCC 13032 et ATCC 14067 (Moritz et al., 2000; Sugimoto and Shiio, 1987). La G6P déshydrogénase est l'enzyme clé de la voie des pentoses phosphate. Son activité est inhibée par le NADPH. La 6-phosphogluconate déshydrogénase est inhibée à la fois par NADPH et ATP (Moritz et al., 2000).



**Figure I.5 :** Schéma simplifié de la voie des pentoses phosphate et de son mécanisme de régulation chez *C. glutamicum*.

La partie non oxydative, réversible, de la voie des pentoses phosphate représente une série de réactions d'interconversion des sucres phosphate catalysées par la Ribulose-5-phosphate l'isomérase (RPI), la Ribulose-5-phosphate épimérase (RPE), les transcétolases (TKT), et la transaldolase (TAL) (Ikeda et al., 1999; Kamada et al., 2001; Sugimoto and Shiio, 1989).

#### 2.1.4. Répartition du flux carboné entre la glycolyse et la voie des pentoses phosphate

Pour comprendre et quantifier la répartition du flux entre la glycolyse et la voie des pentoses phosphate au niveau de glucose-6-phosphate, différentes méthodes, comme le suivi du glucose marqué radio-activement sur l'un de ces carbones (<sup>13</sup>C) et la RMN, ont été utilisées. Les flux carbonés entre ces deux voies métaboliques peuvent varier selon la méthode utilisée, la souche utilisée et son état physiologique. Des exemples de la répartition du flux carboné entre la glycolyse et la voie des pentoses phosphate sont reportés dans le tableau I.2. Ces flux carbonés

ont été déterminés dans différentes phases physiologiques (croissance et production d'acides aminés.

**Tableau I.2 :** Répartition des flux carbonés, déterminés expérimentalement, entre la glycolyse et la voie des pentoses phosphate pendant la phase de croissance et la phase de production de lysine, de glutamate ou d'acides organiques par *C. glutamicum* à partir de glucose comme source carbonée.

Souches	part (%) de la voie des pentoses phosphate	Références
<b>Croissance sur glucose</b>		
<i>C. glutamicum</i> S9114	40	(Mei et al., 2016)
<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	69	(Bartek et al., 2011)
<i>C. glutamicum</i> LE4	36	(Marx et al., 1997)
<i>C. glutamicum</i> ( <i>melassecola</i> )ATCC 17965	20 (fructose)	(Dominguez et al., 1998)
<i>C. melassecola</i>	45	(Rollin et al., 1995)
<b>Production d'acides organiques en anaérobiose</b>		
<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	2 (0% CO <sub>2</sub> )	(Radoš et al., 2014)
	5 (100% CO <sub>2</sub> )	
<b>Production de lysine</b>		
<i>C. glutamicum</i> MH20-22B	66	(Marx et al., 1996b)
<i>C. glutamicum</i> LE4	67	(Marx et al., 1997)
<i>C. glutamicum</i> MH20-22BΔgdh pEK1.9gdh1	76	(Marx et al., 1999)
<i>C. glutamicum</i> 21253	71	(Wittmann and Heinzle, 2001)
<b>Production de glutamate</b>		
<i>C. glutamicum</i> LE4	26	(Marx et al., 1997)
<i>C. glutamicum</i> S9114	19	(Mei et al., 2016)

En se basant sur des analyses de <sup>13</sup>C-MFA et RMN (Tableau I.2), la part de la voie PPP varie entre 36 et 70 % dans le cas de croissances de *C. glutamicum* sur glucose en aérobiose (Bartek et al., 2011; Marx et al., 1997; Mei et al., 2016; Rollin et al., 1995). Ceci peut être expliqué par l'absence de la transhydrogénase qui est responsable de la production de NADPH à travers l'interconversion du NADH et du NADPH chez *C. glutamicum*. Cette bactérie utilise donc la voie des pentoses phosphate comme source de NADPH au lieu de cette enzyme (Yamauchi et al., 2014). En utilisant le fructose comme source carbonée, la part de la voie PPP ne représente que 20% du flux carboné, pendant la phase exponentielle de croissance. Cette observation a été expliquée par la désactivation de l'activité de la fructose biphosphatase, catalysant la conversion de FDP en F6P, pendant le catabolisme du fructose, ce qui limite la synthèse de F6P et donc le flux entrant dans la voie de PPP (Dominguez et al., 1998). De même, l'état physiologique de *C. glutamicum* influence le fonctionnement de la voie PPP. Certaines études ont montré que la part de cette voie est légèrement augmentée pendant la phase de production

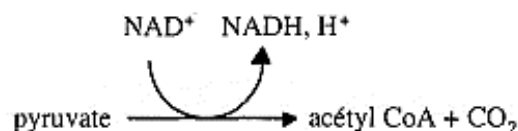
de lysine (entre 66 et 76%) (Kiefer et al., 2002; Marx et al., 1996b, 1997, 1999) alors que ce pourcentage est nettement moins importante (19 – 26 %) dans le cas de la production de glutamate (Marx et al., 1997; Mei et al., 2016).

D'autre part, la répartition du flux carboné entre la glycolyse et la voie des pentoses phosphate est fortement influencée par le niveau d'oxygénation. En aérobiose, la part de la voie PPP représente environ la moitié du flux carboné (Tableau I.2). Mais, en anaérobiose, sa part est presque nulle (2 %). Ce pourcentage peut augmenter à 5 % en injectant du CO<sub>2</sub> dans le milieu de culture jusqu'à saturation du milieu (Radoš et al., 2014). L'activation de la voie PPP en aérobiose est probablement due à la croissance cellulaire pour laquelle le NADPH est un précurseur important. En revanche, en absence d'oxygène, la croissance de *C. glutamicum* s'arrête et une production des acides organiques est déclenchée. Dans ces conditions, une partie importante du flux carboné est orientée vers le métabolisme du pyruvate pour la production des acides organiques permettant ainsi de maintenir l'équilibre redox intracellulaire.

## 2.2.Métabolisme du pyruvate

### 2.2.1. Cycle de Krebs

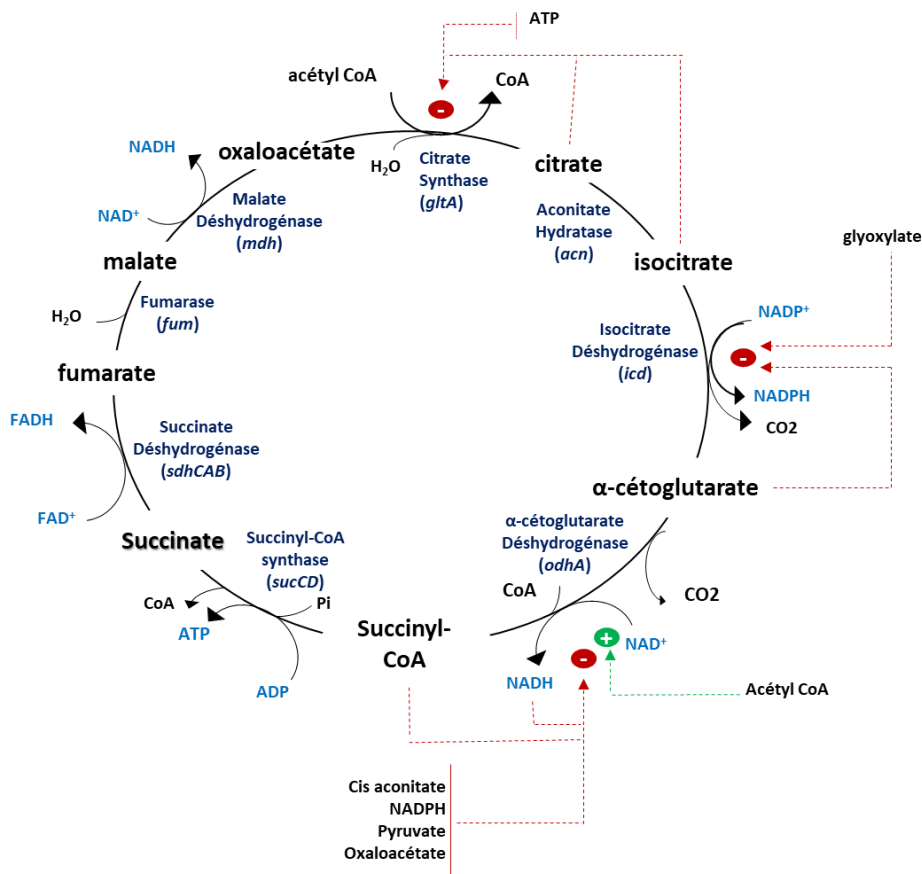
Le cycle de Krebs est constitué par des réactions de catabolisme et d'anabolisme. Ce cycle est responsable de l'oxydation de l'acétyl CoA (ACCOA) en produisant de l'ATP et des métabolites précurseurs nécessaires pour la croissance et la production des produits d'intérêts.



**Figure I.6 :** La réaction de décarboxylation oxydative du pyruvate en acétyl-CoA catalysée par la pyruvate déshydrogénase.

L'entrée du cycle de Krebs est l'ACCOA. La voie de synthèse de ce métabolite dépend de la source carbonée. Dans le cas de croissance sur des carbohydrates (C6 ou C5) ou sur le lactate, une décarboxylation oxydative du pyruvate permet de produire de l'ACCOA, du CO<sub>2</sub> et du NAD<sup>+</sup> (Figure I.6). Cette réaction est catalysée par la pyruvate déshydrogénase (PDHC). Cette dernière est un complexe de trois enzymes : la pyruvate déshydrogénase (E1p), la dihydrolipoamide acétyltransférase (E2p) et la dihydrolipoamide déshydrogénase (E3p). (Schreiner et al., 2005) ont montré que l'enzyme E1p, codée par le gène *aceE*, est essentielle pour l'activité du complexe PDHC. La suppression de ce gène se traduit par une inhibition

totale de la croissance (Schreiner et al., 2005). La PDHC est un point de régulation important du métabolisme de *C. glutamicum*. Elle est limitante, pour la croissance sur lactate ou sur un mélange de glucose et de lactate (Cocaign et al., 1993; Cocaign-Bousquet and Lindley, 1995). En revanche, sur acétate, ce dernier est converti en acétyl-P puis en ACCOA, lequel est catabolisé au sein du cycle de Krebs.



**Figure I.7 :** Schéma simplifié du cycle de Krebs et de son mécanisme de régulation chez *C. glutamicum*.

Le cycle de Krebs est composé de 8 réactions qui permettent la synthèse de cofacteurs nécessaires à la chaîne respiratoire et de métabolites transformés par la suite en acides aminés ou acides organiques (Figure I.7). L'ACCOA est condensé avec un OAA en citrate. Cette réaction est catalysée par la citrate synthase (CS), codée par *gltA* (Eikmanns et al., 1994). L'activité spécifique de cette enzyme dépend de la source de carbone. Le gène *gltA* est surexprimé deux fois dans le cas d'une croissance sur acétate, par rapport à un développement sur glucose ou sur un mélange de glucose et acétate (Gerstmeir et al., 2003; Hayashi et al., 2002; Muffler et al., 2002; Wendisch et al., 2000). Ensuite, le citrate est converti en isocitrate par une isomérisation, catalysée par l'aconitase (ACN) qui est codée par *acn*. L'isocitrate est décarboxylé en  $\alpha$ -cétoglutarate en libérant une molécule de  $\text{CO}_2$  et un cofacteur NADPH. Cette

décarboxylation oxydative est catalysée par l'isocitrate déshydrogénase (ICD), codée par *icd* (Eikmanns et al., 1995). Cette enzyme joue un rôle important dans la régulation des flux carbonés entre le cycle de Krebs et le cycle du glyoxylate, pendant la croissance sur acétate ou éthanol. L' $\alpha$ -cétoglutarate est transformé en glutamate ou oxydé via le cycle de Krebs. Le complexe  $\alpha$ -cétoglutarate déshydrogénase (ODHC) catalyse la transformation irréversible de l' $\alpha$ -cétoglutarate en succinyl-CoA en libérant une molécule de NADH. Comme la PHDC, l'ODHC est un complexe de trois enzymes ; Eo1 codée par *odhA*, Eo2 codé par *sucB* et LPD codé par *lpd* (Usuda et al., 1996). Elle est inhibée par les cofacteurs NADPH et NADH. Le succinyl-CoA est converti, par la suite, en succinate et CoA en phosphorylant une molécule d'ADP en ATP. La formation de succinate est catalysée par la succinyl-CoA synthétase (SCS/STK, succinate thiokinase). Chez *C. glutamicum*, cette enzyme est codée par deux gènes, *sucC* et *sucD* (Kalinowski et al., 2003b). Puis, le succinate est oxydé en fumarate. Cette réaction est catalysée par une enzyme membranaire, la succinate déshydrogénase (SDH, Succinate : ménaquinone oxydoréductase), codée par les trois gènes *sdhC*, *sdhA* et *sdhB*, constituant un opéron (Kalinowski et al., 2003b). Cette enzyme est impliquée dans la chaîne respiratoire de *C. glutamicum* (Bott and Niebisch, 2003). Par la suite, l'inter-conversion du fumarate en malate est catalysée par la fumarase (FUM, fumarate hydratase), codée par *fum* (Kalinowski et al., 2003b). La dernière réaction du cycle de Krebs consiste en l'oxydation du malate en oxaloacétate. La régénération de l'oxaloacétate est accompagnée par une réduction d'une molécule d'ubiquinone en ubiquinone-H<sub>2</sub>. Cette réaction est catalysée par la malate déshydrogénase. *Corynebacterium glutamicum* possède deux types de cette enzyme ; une malate déshydrogénase NAD-dépendant (MDH) codée par *mdh* et une malate : quinone oxydoréductase (MQO) codé par *mgo*. Celle-ci est une enzyme membranaire impliquée dans la respiration aérobie (Molenaar et al., 1998). Selon des analyses *in vivo* et biochimiques, il a été proposé que MQO serait la principale responsable de la conversion du malate en oxaloacétate (Molenaar et al., 2000). En revanche, la MDH est probablement le catalyseur de la réaction inverse (Marx et al., 1997). L'activité spécifique de MQO et MDH est 3 fois plus importante pendant une croissance sur acétate que lors d'une croissance sur glucose (Molenaar et al., 2000).

La succession des huit réactions, présentées ci-dessus, représente la branche oxydative de cycle de Krebs. Cette branche est principalement active en aérobiose. En absence d'oxygène, la dernière réaction de cycle de Krebs se déroule dans le sens inverse, correspondant à la réduction de l'OAA en malate. Ce dernier est converti en fumarate puis en succinate. Il s'agit de la

branche réductrice. Le produit final de cette voie est le succinate (paragraphe 3.2.2. Voie de synthèse du succinate).

### 2.2.2. Voies anaplérotiques

Les voies anaplérotiques permettent d'alimenter le cycle de Krebs en OAA ou malate qui sont utilisés par les voies anaboliques de ce cycle. Ces voies regroupent de nombreuses enzymes ; la phosphoénolpyruvate carboxylase, la pyruvate carboxylase, l'enzyme malique, la phosphoénolpyruvate carboxykinase et l'oxaloacétate décarboxylase.

La pyruvate carboxylase (PC) et la PEP carboxylase (PEPC) catalysent les réactions de synthèse de l'oxaloacétate. La PEPC (codé par *ppc*) catalyse la carboxylation du PEP en oxaloacétate, en fixant une molécule de CO<sub>2</sub> et en libérant un phosphate inorganique. La PC catalyse la carboxylation irréversible du pyruvate en OAA. Chez *C. glutamicum*, le gène codant cette enzyme est 3 fois surexprimée en présence de lactate comme substrat carboné par rapport au glucose (Koffas et al., 2002; Peters-Wendisch et al., 1998). Ces deux enzymes sont actives pendant la phase de croissance de *C. glutamicum* sur glucose. Selon des études de <sup>13</sup>C-RMN, la contribution de PC est beaucoup plus importante que PEPC, avec 90 % de la production totale de l'oxaloacétate par carboxylation (Park et al., 1997a; Petersen et al., 2000).

D'autre part, trois enzymes anaplérotiques catalysent des réactions de décarboxylation. La PEP carboxykinase (PEPCK), codé par *pck*, catalyse la décarboxylation réversible de l'oxaloacétate en PEP. Cette réaction est accompagnée par une phosphorylation de GDP en GTP. L'activité spécifique de cette enzyme dépend de la source de carbone et pas de la phase de croissance. Cette activité est 2/3 fois plus exprimée en utilisant acétate/lactate comme sources de carbone, par rapport au glucose (Riedel et al., 2001). La deuxième réaction de décarboxylation de l'oxaloacétate, cette fois-ci en pyruvate, est catalysée par l'oxaloacétate décarboxylase (OD) (Jetten and Sinskey, 1995). Le gène codant cette enzyme n'est pas encore identifié. La troisième enzyme, l'enzyme malique, codée par *malE*, catalyse la décarboxylation réversible du malate en pyruvate en utilisant un cofacteur NADPH (Gourdon et al., 2000). Cette enzyme joue un rôle important pour la génération de NADPH en utilisant différents substrats autres que le glucose (Dominguez et al., 1998). Gourdon et al. (2000) suggèrent que la fonction physiologique de cette enzyme est plutôt la décarboxylation de malate liée à la génération de NADPH que de la carboxylation du pyruvate.



### 2.2.3. Voie du glyoxylate

Le cycle du glyoxylate est une voie métabolique dérivant du cycle de Krebs. Cette voie est active dans le cas de croissance sur des substrats autre que les carbohydrates, tels que l'acétate, l'éthanol et les acides gras. Il a été supposé que les enzymes catalysant cette voie sont réprimées par la présence de glucose ou tout autre substrat facilement assimilable (Gerstmeir et al., 2003; Inui et al., 2004). Les deux enzymes clés de cycle du glyoxylate sont l'isocitrate lyase et la malate synthase. L'isocitrate lyase (ICL) catalyse le clivage de l'isocitrate en succinate et glyoxylate. La malate synthase (MS) catalyse la condensation irréversible du glyoxylate et l'ACCOA aboutissant au malate et au CoA. Ces deux enzymes (MS et ICL) sont codées par *aceB* et *aceA*, respectivement (Reinscheid et al., 1994). Elles sont essentielles pour la croissance de *C. glutamicum* sur acétate (Gerstmeir et al., 2003; Wendisch et al., 1997).

### 2.2.4. Répartition du flux carboné au niveau du nœud PEP-PYR-OAA

Plusieurs travaux ont étudié et quantifié la répartition du flux carboné au nœud PEP-PYR-OAA, en se basant sur des méthodes expérimentales (<sup>13</sup>C-RMN). Etant donné que les différentes voies anaplérotiques conduisent au même type d'enrichissement isotopique, il est difficile de différencier entre ces voies métaboliques. Leurs activités respectives sont donc regroupées. Les résultats de certaines études sont reportés dans le tableau I.3.

**Tableau I.3 :** Répartition des flux carbonés, déterminés expérimentalement, au nœud PEP-PYR-OAA pendant la phase de croissance sur glucose et la phase de production de lysine et glutamate chez *C. glutamicum*.

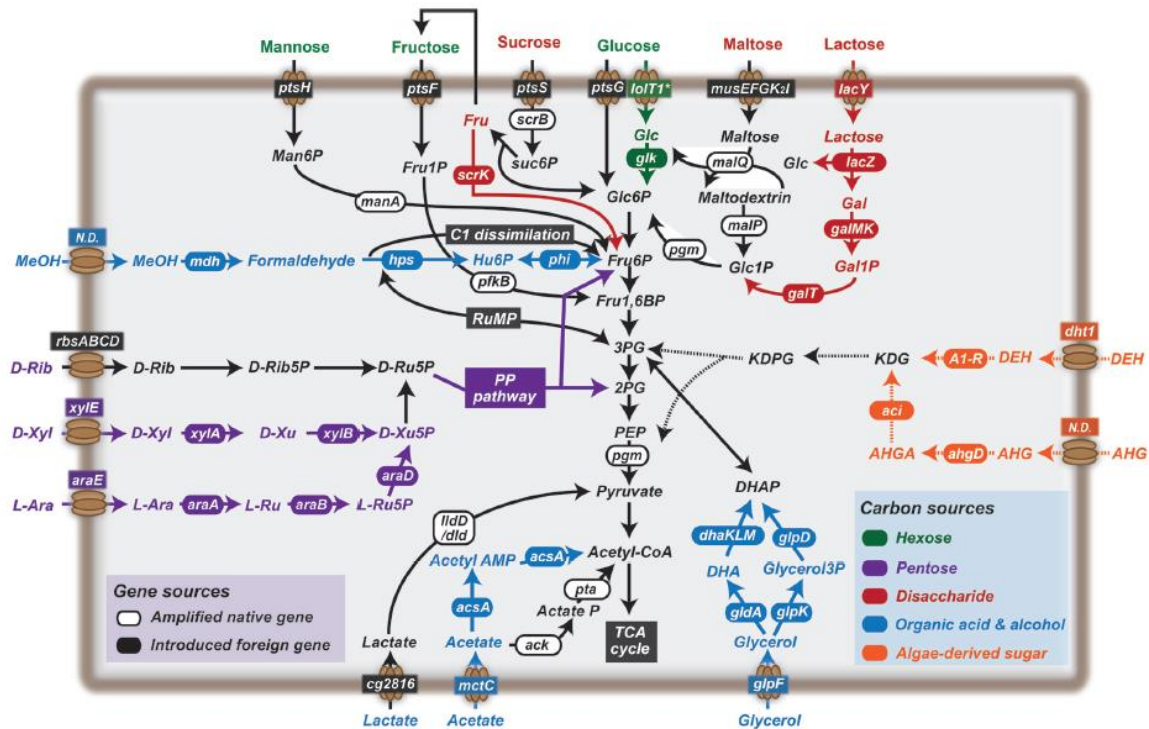
Souche	Part (%) de la voie anaplérotique	Entrée cycle de Krebs	Références
<b>Croissance</b>			
<i>C. glutamicum</i> S9114	37	109	(Mei et al., 2016)
<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	20	75	(Wendisch et al., 2000)
<i>C. glutamicum (melassecola)</i> ATCC 17965	63 (fructose)	27	(Dominguez et al., 1998)
<i>C. melassecola</i>	38	62	(Rollin et al., 1995)
<b>Production de lysine</b>			
<i>C. glutamicum</i> MH20-22B	38	62	(Marx et al., 1996b)
<i>C. glutamicum</i> MH20-22BΔgdh pEK1.9gdh-1	44	58	(Marx et al., 1999)
<i>C. glutamicum</i> 21253	37	57	(Wittmann and Heinzle, 2001)
<b>Production de glutamate</b>			
<i>C. glutamicum</i> LE4	14	40	(Marx et al., 1997)
<i>C. glutamicum</i> S9114	17	114	(Mei et al., 2016)

Pendant la phase de croissance, sur glucose, de *C. glutamicum*, la part du flux de carbone empruntant la voie anaplérotique varie entre 20 et 38 % (Marx et al., 1997; Mei et al., 2016; Rollin et al., 1995; Wendisch et al., 2000) alors qu'avec le fructose comme substrat carboné, la part de cette voie (63 %) est environ deux fois plus importante (Dominguez et al., 1998). La part de cette voie métabolique représente environ 1/3 du flux carboné total. En aérobiose, les voies anaplérotiques permettent de régénérer l'oxaloacétate qui, avec l'ACCoA, permet l'entrée du carbone dans le cycle de Krebs. Un flux suffisant en OAA permet d'assurer un bon fonctionnement de cycle de Krebs et donc d'assurer la disponibilité en précurseurs nécessaires pour la production de la biomasse. En revanche, en anaérobiose, la conversion de PEP/PYR en OAA permet d'améliorer le flux dans la branche réductrice du cycle de Krebs et par conséquent de soutenir une production plus importante de succinate qui permet de régénérer les cofacteurs réduits. Pendant la production de lysine, la répartition du flux au nœud PEP-PYR-OAA est proche de celle au cours de la croissance sur glucose (Marx et al., 1996b, 1999; Wittmann and Heinzle, 2001) alors que cette répartition diminue à 14-17 % dans le cas de la production de glutamate (Marx et al., 1997; Mei et al., 2016). D'autre part, en plus de sa conversion en OAA, une part importante du pyruvate synthétisé est orientée vers le cycle de Krebs. En aérobiose, cela représente entre 62 et 109 % du flux de carbone (Mei et al., 2016; Rollin et al., 1995; Wendisch et al., 2000). Ces pourcentages peuvent être expliqués par le rôle de cette voie métabolique pour la synthèse des précurseurs nécessaires à la croissance cellulaire. Par contre, en anaérobiose, une forte réduction voire une annulation du flux carboné à travers la branche oxydative du cycle de Krebs a été observée alors que le flux dans la branche réductrice est beaucoup plus important. En présence d'une concentration saturante en CO<sub>2</sub> dans le milieu de culture, la part de cette branche réductrice atteint 65 % dans des conditions anaérobies (Radoš et al., 2014).

### 2.3. Autres substrats carbonés

Le glucose est le substrat carboné préférentiel de *C. glutamicum* mais des sources carbonées alternatives ont cependant été utilisées afin d'améliorer la croissance de cette bactérie et la formation de certains produits d'intérêt. Cette bactérie est capable de cataboliser des monosaccharides (glucose, fructose, ribose), des disaccharides (saccharose, mannose et maltose), des alcools (inositol et éthanol), des acides aminés (L-glutamate et L-glutamine) et des acides organiques (pyruvate, propionate, lactate, acétate et gluconate) (Baritugo et al., 2018; Blombach and Seibold, 2010; Wendisch et al., 2000; Wieschalka et al., 2013). Par contre, elle

est incapable de métaboliser certains pentoses (D-xylose, L-arabinose), les polysaccharides complexes (amidon, cellulose, etc) et certains di/monosaccharides (lactose, galactose). Afin d'élargir le spectre des sources carbonées pour *C. glutamicum*, des modifications génétiques ont été réalisées chez cette bactérie (Figure I.8) (Baritugo et al., 2018; Blombach and Seibold, 2010; Wendisch et al., 2000; Wieschalka et al., 2013).



**Figure I.8 :** Schéma simplifié des voies d'utilisation des sources carbonées naturelles et alternatives chez *C. glutamicum*. (Baritugo et al., 2018).

Comme dit précédemment, *C. glutamicum* consomme naturellement certains acides organiques. Ceux-ci sont des produits finaux de fermentation en anaérobiose, mais ils peuvent être utilisés comme sources carbonées et énergétiques en aérobiose. *Corynebacterium glutamicum* possède des systèmes de transport et des systèmes de conversion spécifiques pour ces acides organiques. La L-lactate déshydrogénase quinone-dépendante (LldD), codé par *lldD*, est essentielle pour l'utilisation du L-lactate. Cette enzyme catalyse la conversion du L-lactate en pyruvate (Stansen et al., 2005). Le D-lactate peut être catabolisé par l'intermédiaire de la D-lactate déshydrogénase quinone-dépendante (Dld) codé par *dld* (Kato et al., 2010). Cette enzyme a été identifiée chez *C. glutamicum* ATCC 13032 et ATCC 14310, mais pas chez *C. glutamicum* R. Les gènes *lldD* et *NCgl2816*, codant la lactate perméase (transporteur hypothétique) forment un opéron (Stansen et al., 2005). Ces auteurs ont montré que LldD est essentielle pour la croissance de *C. glutamicum* sur L-lactate alors que la lactate perméase n'est pas indispensable. Le niveau transcriptionnel de l'opéron *NCgl2816-lldD* est contrôlé par le régulateur LldR. Ce dernier

réprime l'expression de l'opéron *NCgl2816-lldD* en absence de L-lactate et il l'induit en présence de L-lactate dans le milieu de culture ou suite à une accumulation intracellulaire de cet acide organique (Georgi et al., 2008). Ainsi, l'activité spécifique de la LldD dépend de la source de carbone. Son activité est 10 fois plus importante lors d'une croissance sur lactate ou mélange lactate/glucose que dans le cas d'une croissance sur glucose, D-lactate ou pyruvate. En revanche, l'activité de la Dld est faiblement sensible à la nature de la source carbonée (Stansen et al., 2005).

L'acétate est naturellement consommé par *C. glutamicum* en aérobiose, comme source de carbone (Wendisch et al., 2000). Cet acide organique est transporté vers le compartiment intracellulaire soit par un système de diffusion, dans le cas de présence de concentrations élevées en acétate ou des conditions de pH neutre ou acide, soit par un transporteur secondaire, MctC (codé par le gène *mctC*), dans des conditions alcalines ou en présence de concentrations faibles en acétate. MctC est essentiel aussi pour la consommation de pyruvate et de propionate. Il présente une affinité élevée pour l'acétate et le propionate et une affinité moins importante pour le pyruvate (Jolkver et al., 2009). Suite à son transport à l'intérieur du cytoplasme, l'acétate est phosphorylé en acétyl-phosphate par l'intermédiaire de l'acétate kinase (codé par *ack*). L'acétyl-phosphate est converti par la suite en ACCOA par la phosphotransacétylase (*pta*) (Gerstmeir et al., 2003). La présence d'acétate comme source carbonée permet d'augmenter fortement l'expression de la majorité des gènes de cycle de Krebs (*gltA*, *acn*, *sucCD*, *sdhCAB* et *fum*), les gènes *aceA* et *aceB* codant les deux enzymes clés de la voie du glyoxylate (Han et al., 2008) et les gènes codant la gluconéogenèse (*pps*, *pck* et *malE*) (Han et al., 2007).

En revanche, *C. glutamicum* semble être incapable de croître sur certains acides dicarboxyliques (succinate, fumarate et malate) lorsqu'ils sont présents comme unique substrat carboné et énergétique potentiel dans le milieu de culture. Des transporteurs pour ces acides dicarboxyliques ont été identifiées chez *C. glutamicum* ATCC 13032: DctA et DccT (Youn et al., 2009, 2008). Une enzyme homologue à DccT a également été identifiée chez *C. glutamicum* R, et nommée DcsT (Teramoto et al., 2008). Il a été montré que *C. glutamicum* ne peut utiliser le succinate comme substrat carboné que dans le cas d'une surexpression de gènes *dctA* et *dccT* codant les deux transporteurs (Youn et al., 2009, 2008). Mais, une faible croissance de *C. glutamicum* R a été observée sur milieu solide en utilisant uniquement le succinate comme substrat carboné et énergétique (Teramoto et al., 2008). Le transporteur DccT a été caractérisé. Il appartient à la famille des transporteurs d'ions divalents et de sodium. Son activité dépend de

la phase de croissance et de la présence de succinate et de glucose. L'activité maximale a été mesurée au début de la phase exponentielle. Celle-ci diminue au milieu de la phase exponentielle et pendant la phase stationnaire de la croissance. Ainsi, l'ajout de succinate permet d'améliorer l'activité de ce transporteur, mais cette activité est réprimée par un ajout de glucose (Teramoto et al., 2008). En se basant sur l'étude de mutants, il a été prouvé que DccT et DctA sont les seuls transporteurs de succinate, malate et fumarate présents chez *C. glutamicum*.

Certaines études ont montré la capacité de *C. glutamicum* à co-utiliser les différents substrats carbonés présents dans le milieu de culture tels que glucose/acétate, glucose/lactate, glucose/fructose (Cocaign et al., 1993; Dominguez et al., 1997; Wendisch et al., 2000). La co-consommation des substrats est une caractéristique typique de *C. glutamicum* (Blombach and Seibold, 2010). Contrairement aux autres bactéries, aucune répression catabolique n'a été observée chez *C. glutamicum* sauf dans le cas d'une croissance sur éthanol et acétate où la bactérie a consommé préférentiellement l'éthanol (Arndt et al., 2008; Kramer et al., 1990). Il a été montré que les acides organiques produits au début d'une culture en anaérobiose (lactate, acétate et succinate) sont co-consommés dès qu'un apport en oxygène suffisant est effectué en fin de culture (Conrady et al., 2019; Dominguez et al., 1993; Kaboré et al., 2015)..

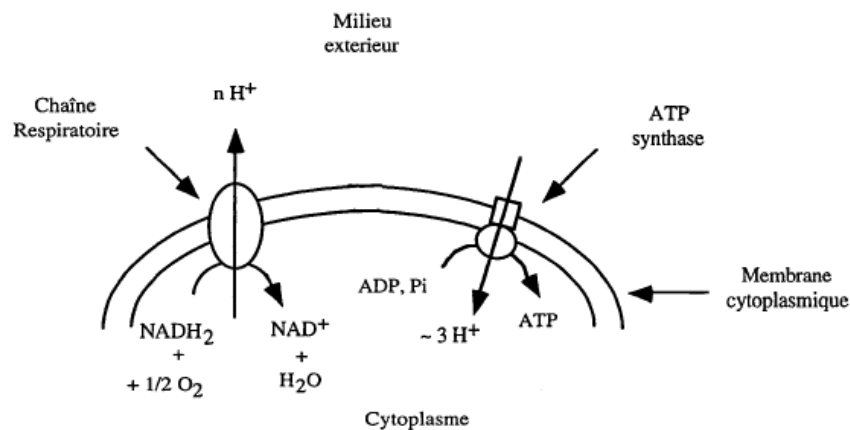
### **3. Métabolisme énergétique de *C. glutamicum***

Afin de répondre à ses besoins énergétiques pour sa croissance et sa maintenance, *C. glutamicum* utilise l'énergie libérée au cours de réactions chimiques (réactions d'oxydoréduction). Cette bactérie est non seulement anaérobie facultative mais aussi nitrate réductase positive. Elle est donc capable d'effectuer des oxydations terminales indifféremment en aérobiose ou anaérobiose. En aérobiose, l'oxygène est l'accepteur final des électrons produits suite au cours des réactions d'oxydation du métabolisme. Mais, en anaérobiose, l'accepteur final des électrons est le nitrate. En absence de ces deux accepteurs (dioxygène et nitrate), *C. glutamicum* adapte son métabolisme à l'anaérobiose en réalisant la fermentation ce qui la conduit à produire des acides organiques tels que le lactate, l'acétate et le succinate.

Selon la disponibilité en oxygène et en nitrate, différents modes de métabolisme énergétique peuvent donc être mis en œuvre par *C. glutamicum* : la respiration aérobie, la respiration anaérobie et la fermentation.

### 3.1.Respiration

*Corynebacterium glutamicum* possède deux réservoirs d'énergie : le potentiel électrochimique membranaire, appelée aussi force motrice de proton (pmf), et la génération d'ATP. Lors de la respiration, le transfert d'électrons et des protons issus des réactions d'oxydoréduction, génère un gradient électrochimique de protons au niveau de la membrane cytoplasmique qui, couplé au transport des protons vers le cytoplasme, contribue à la synthèse d'ATP. La respiration comporte deux phases : (1) une chaîne respiratoire correspondant à un ensemble des réactions d'oxydoréductions générant la pmf et (2) une phosphorylation oxydative consistant au couplage de la phosphorylation d'ADP en ATP avec une importation des protons de l'extérieur (Figure I.9).

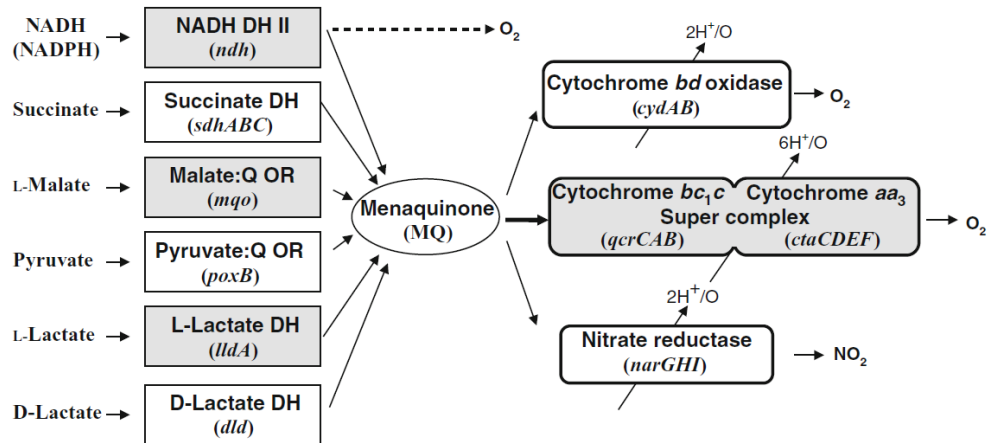


**Figure I.9 :** Schéma simplifié du couplage entre transfert d'électrons et formation d'ATP.

#### 3.1.1. La chaîne respiratoire

La chaîne respiratoire est une chaîne de transfert d'électrons et des protons issus de l'oxydation d'acides organiques (succinate, lactate, pyruvate, ...) et des cofacteurs (NADH, NADPH, FADH<sub>2</sub>) produits par le métabolisme central. Le transfert d'électrons et de protons se déroule en deux étapes : (1) un transfert d'électrons et protons pour la réduction de la ménaquinone (MQ) (premier accepteur) en ménaquinol (MQH<sub>2</sub>), suivi par (2) un transfert d'électrons seulement de la ménaquinol vers le dioxygène (accepteur final) à travers les cytochromes. Les protons transportés pendant la première phase sont utilisés, par la suite, pour la formation de H<sub>2</sub>O. Différents complexes protéiques membranaires sont impliqués dans la chaîne respiratoire. Elle est constituée d'au moins huit déshydrogénases : NADH déshydrogénase, succinate déshydrogénase, malate : quinone oxydoréductase, pyruvate : quinone oxydoréductase, D-lactate déshydrogénase, L-lactate déshydrogénase, glycerol-3-phosphate déshydrogénase et proline déshydrogénase. Elle contient aussi deux chaînes alternatives des oxydases terminales,

le super-complexe cytochrome  $bc_1$ - $aa_3$  et le cytochrome  $bd$  oxydase, et une nitrate réductase (Bott and Niebisch, 2003; Matsushita et al., 1998; Molenaar et al., 1998).



**Figure I.10 :** Représentation schématique des différents constituants de la chaîne respiratoire chez *C. glutamicum* (Bott and Niebisch, 2003).

### Les déshydrogénases de la chaîne respiratoire

Les déshydrogénases sont impliquées dans la première étape de la chaîne respiratoire (réduction de la ménaquinone) (Figures I.10 et I.11). La NADH déshydrogénase est le principal complexe enzymatique de la chaîne respiratoire permettant d'oxyder les cofacteurs (NADH, FADH) du métabolisme central. Chez *C. glutamicum*, un seul type de NADH déshydrogénase (NADH-II, codé par *ndh*) a été purifié. Il a été montré qu'en absence du gène *ndh*, l'oxydation du NADH est réalisée par l'intermédiaire du couple MDH/MQO (Nantapong et al., 2004). La malate : quinone oxydoréductase (MQO, enzyme membranaire) catalyse l'oxydation du malate en oxaloacétate en réduisant la ménaquinone (MQ) en MQH<sub>2</sub> (Figure I.11) (Molenaar et al., 1998). En revanche, la réaction inverse est catalysée par la malate déshydrogénase (MDH, enzyme cytoplasmique) permettant d'oxyder le NADH en NAD<sup>+</sup> (Figure I.11). Le couple d'enzymes, LDH/L-LDH, peut aussi substituer la NADH déshydrogénase dans le cas de mutant privés du gène *ndh* (Nantapong et al., 2004). La SDH, enzyme de cycle de Krebs, est impliquée dans la chaîne respiratoire en aérobiose. Cette enzyme catalyse l'oxydation du succinate en fumarate couplée avec la réduction de la ménaquinone (Hegerhall, 1997). La pyruvate déshydrogénase, utilise le NAD<sup>+</sup> comme accepteur d'électron des cofacteurs réduits générés par cette réaction. *Corynebacterium glutamicum* possède aussi une pyruvate : quinone oxydoréductase (ou pyruvate oxydase) qui catalyse la décarboxylation du pyruvate en acétate et CO<sub>2</sub> en utilisant la

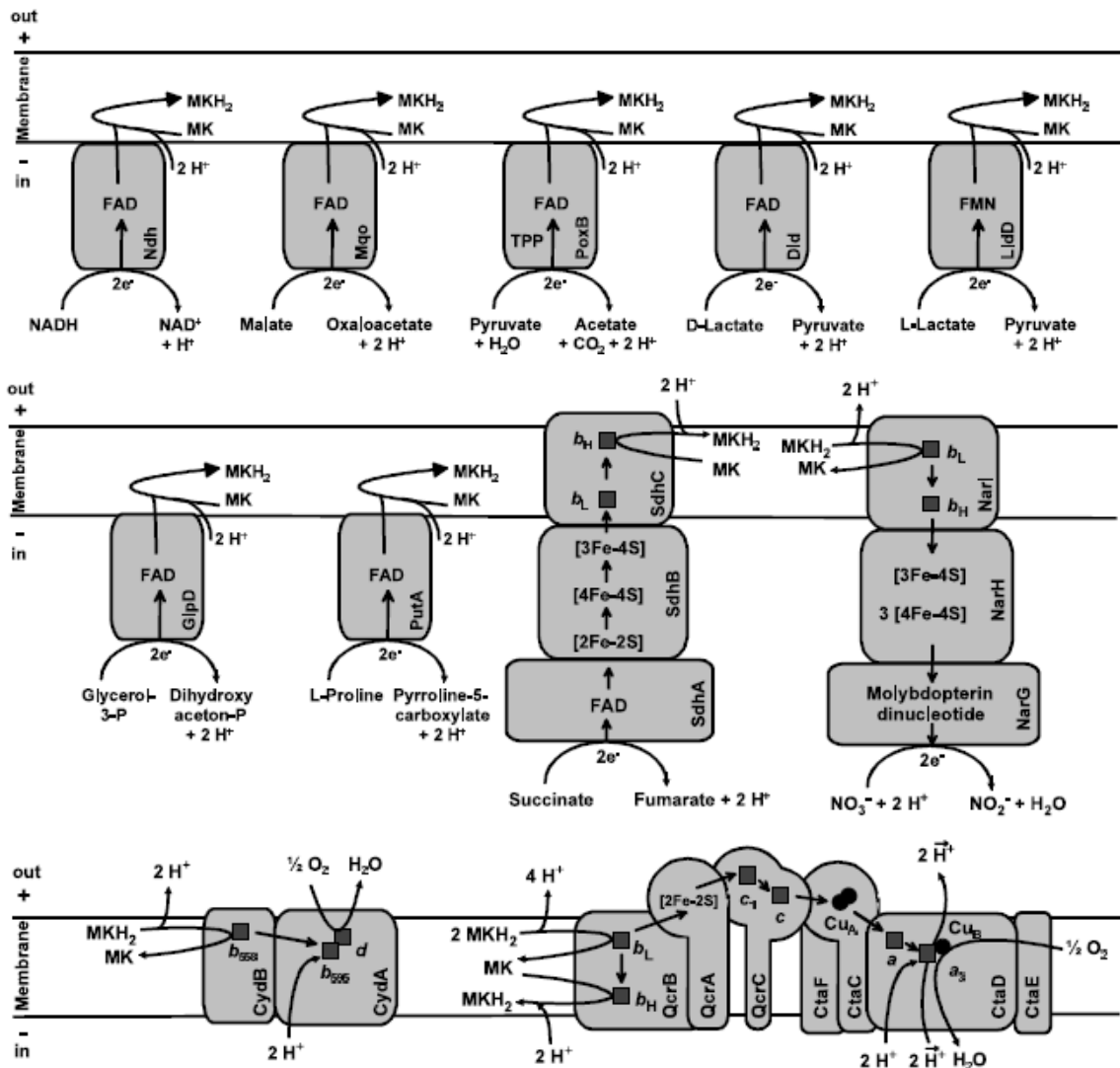
quinone comme accepteur d'électron. De plus, deux enzymes de la voie de synthèse du glycérol et du glutamate peuvent intervenir dans la chaîne respiratoire de *C. glutamicum* (Figure I.11). Il s'agit de la glycerol-3-phosphate déshydrogénase qui catalyse l'oxydation du glycérol-3-phosphate en di-hydroxy-acétone phosphate en réduisant la quinone et de la proline déshydrogénase, un enzyme bi-fonctionnelle, qui catalyse l'oxydation de la L-proline en  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate, en utilisant la quinone comme accepteur d'électron, puis en L-glutamate, en utilisant le  $\text{NAD}^+$  comme accepteur d'électron (Bott and Niebisch, 2003).

### Les systèmes cytochrome et la nitrate réductase

Après la réduction de la ménaquinone en ménaquinol ( $\text{MQH}_2$ ), l'oxydation de  $\text{MQH}_2$  et le transfert d'électrons peuvent être réalisés par 3 branches alternatives : 2 oxygène réductases (système des cytochromes) ou une nitrate réductase.

En aérobiose, le transfert d'électrons du ménaquinol à l'oxygène est catalysé soit par le super-complexe cytochrome  $\text{bc}_1\text{-aa}_3$ , soit par la cytochrome bd oxydase (Kusumoto et al., 2000; Niebisch and Bott, 2003). Cette dernière présente une affinité élevée à l'oxygène alors que le complexe  $\text{bc}_1\text{-aa}_3$  possède une affinité faible (Kusumoto et al., 2000; Lange et al., 2018; Niebisch and Bott, 2003). Le complexe  $\text{bc}_1\text{-aa}_3$  représente la branche principale de la respiration aérobie chez *C. glutamicum* (Koch-Koerfges et al., 2013). La désactivation de cette branche influence négativement la vitesse de croissance, le rendement de production de biomasse, la respiration et la génération d'un gradient de protons alors que le coefficient de maintenance augmente. La suppression de la cytochrome bd oxydase ( $\Delta\text{cydAB}$ ), quant à elle, impacte la croissance seulement dans des conditions de limitation en oxygène (Koch-Koerfges et al., 2013). Ceci confirme que le super-complexe  $\text{bc}_1\text{-aa}_3$  est prédominant dans des conditions d'aérobiose alors que le cytochrome bd oxydase est plus utilisé pendant la phase stationnaire de croissance, dans le cas de limitations en oxygène (Bott and Niebisch, 2003; Kusumoto et al., 2011). En absence des deux branches, la succinate : ménaquinone est une alternative pour la génération du pmf (Koch-Koerfges et al., 2013). D'autre part, la branche  $\text{bc}_1\text{-aa}_3$  possède une efficacité énergétique beaucoup plus importante que celle de la branche bd puisqu'elle permet de transporter 6 protons par 2 électrons ( $6 \text{H}^+ / 2 \text{e}^-$ ) à travers la membrane alors que la deuxième branche alternative bd est capable de transporter seulement 2 protons par 2 électrons ( $2 \text{H}^+ / 2 \text{e}^-$ ) (Bott and Niebisch, 2003).





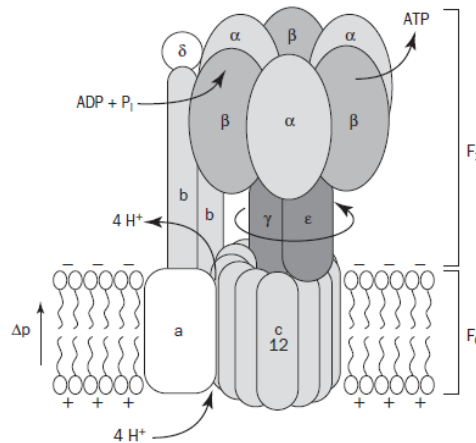
**Figure I.11** : Schéma simplifié des différentes étapes de la respiration chez *C. glutamicum* (Bott and Niebisch, 2003).

En anaérobiose, *C. glutamicum* adapte son métabolisme en utilisant la troisième branche alternative, la nitrate réductase, pour le transfert d'électrons par la chaîne respiratoire (respiration anaérobie). Nishimura et al. (2007) ont montré que *C. glutamicum* est capable de croître en absence d'oxygène, en utilisant le nitrate comme accepteur final d'électrons. La réduction du nitrate en nitrite par l'intermédiaire de la nitrate réductase est couplée à un transfert d'électrons du ménaquinol au nitrate et à la génération d'un gradient électrochimique de protons (Tatsumi and Inui, 2012). Chez *C. glutamicum*, la nitrate réductase est codée par l'opéron *narGHJI* et le transporteur de nitrate/nitrite est codé par *narK*.

La première phase de respiration, les réactions d'oxydoréduction, génère un potentiel électrochimique de protons. Ce potentiel membranaire contribue à la production du deuxième réservoir énergétique : l'ATP.

### 3.1.2. Phosphorylation oxydative : la $F_1F_0$ -ATP synthase

Cette étape de phosphorylation oxydative d'ADP en ATP est catalysée par la  $F_1F_0$ -ATP synthase. Cette dernière, appelée également  $H^+$ -ATPase, est un complexe enzymatique membranaire (Figure I.12). Elle est composée de deux parties  $F_0$  (membranaire) et  $F_1$  (cytoplasmique). La partie basale membranaire  $F_0$  joue un rôle de canal pour le passage des protons de/vers l'extérieur (Pelmont, 2005).



**Figure I.12 :** Schéma simplifié de la composition de la  $F_1F_0$ -ATP synthase.

La production d'ATP par ce système est accompagnée par un retour des protons vers le cytoplasme. La synthèse d'une molécule d'ATP par  $F_1F_0$ -ATP synthase nécessite le transport de 3 à 4 protons. En aérobiose, le transfert de deux électrons, issus de l'oxydation du NADH, à l'oxygène par la branche  $bc_1$ - $aa_3$  aboutit à la sécrétion de 6 protons qui servent à la production de 1,5 à 2 ATP. Mais, l'utilisation de la branche  $bd$  ou de la nitrate réductase permet la libération de 2 protons seulement et donc la production de 0,5 à 0,7 ATP (Bott and Niebisch, 2003). Ce système fonctionne aussi dans le sens inverse où l'hydrolyse d'ATP en ADP se fait conjointement avec une translocation des protons vers l'extérieur générant un potentiel électrochimique au niveau de la membrane. En raison de son fonctionnement réversible, ce système est appelé ATPase/ATP synthase (Pelmont, 2005). Inui et al. (2007) ont montré que le niveau de transcription de l'opéron de la  $H^+$ -ATPase, diminue environ de moitié en limitation en oxygène, par rapport à des conditions non limitantes. Dans ces conditions, cette enzyme sert à hydrolyser l'ATP afin de maintenir le gradient électrochimique au niveau de la membrane cytoplasmique. De plus, à l'aide de mutants déficients en  $F_1F_0$ -ATP synthase, il a été montré que la phosphorylation oxydative n'est pas essentielle pour la croissance de *C. glutamicum*. Ceci a été expliqué par la synthèse d'ATP à partir d'intermédiaires carbonés phosphorylés au

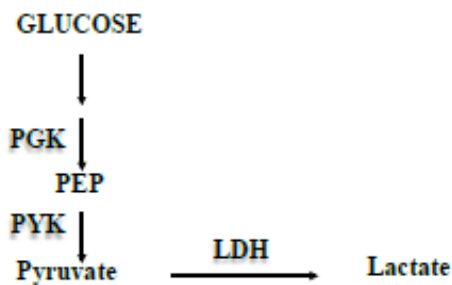
niveau de la 3-phosphoglycérate kinase, de la pyruvate kinase et de la conversion de l'ACCOA en acétate par l'acétate kinase (Koch-Koerfges et al., 2012).

### 3.2. Fermentation

En absence des deux accepteurs finals d'électrons de la chaîne respiratoire (dioxygène et nitrate), *C. glutamicum* adopte un métabolisme fermentaire qui génère des acides organiques. *Corynebacterium glutamicum* produit majoritairement du lactate avec des co-produits comme le succinate et l'acétate (Dominguez et al., 1993; Inui et al., 2004; Okino et al., 2005).

#### 3.2.1. Voie de synthèse de lactate

En absence d'oxygène, la production de lactate permet de maintenir l'équilibre électronique en oxydant le cofacteur NADH synthétisé par la glycéraldehyde-3 phosphate au cours de la glycolyse (Inui et al., 2004; Toyoda et al., 2009). Le pyruvate est converti en lactate par l'intermédiaire de la lactate déshydrogénase (LDH, codée par *ldhA*) (Figure I.13).



**Figure I.13 :** Schéma simplifié de la voie de synthèse du lactate chez *C. glutamicum*. PGK, phosphoglycérate kinase ; LDH, lactate déshydrogénase ; PEP, phosphoénolpyruvate ; PYK, pyruvate kinase.

Les études de souches dépourvues en LDH ont permis de montrer qu'il n'existe pas, chez *C. glutamicum*, d'isoenzymes de la LDH. Ainsi, cette enzyme ne fonctionne que dans le sens de conversion de pyruvate en lactate (Dietrich et al., 2009; Inui et al., 2004). La désactivation de cette enzyme provoque un arrêt total de la production de lactate et une diminution de la vitesse de consommation de glucose et du rapport  $NAD^+/NADH$  (Inui et al., 2004). Ces auteurs suggèrent que l'absence de l'activité de LDH engendre une diminution de l'oxydation du NADH et donc une accumulation intracellulaire de ce cofacteur. Cette accumulation induit une inhibition de la GAP déshydrogénase et par conséquent de la glycolyse (Inui et al., 2004).

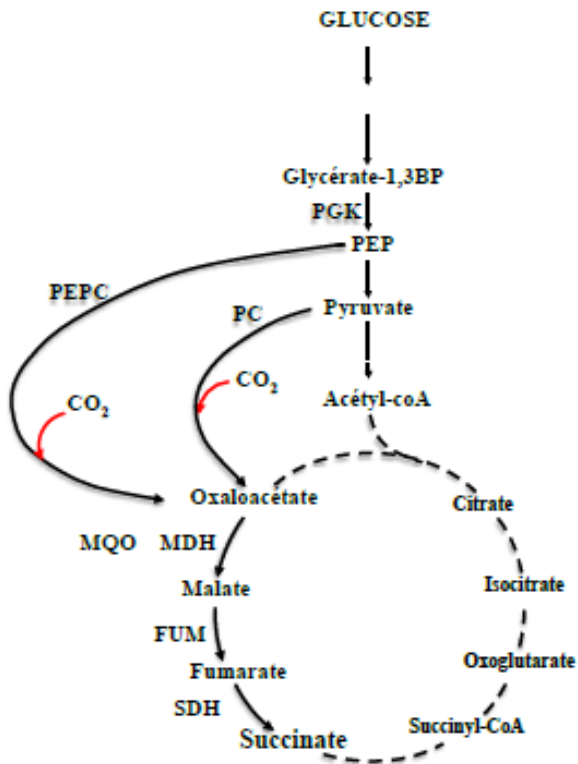
La présence de glucose est essentielle pour induire et contrôler l'expression de *ldhA*. Celle-ci est remarquablement induite au début de la phase stationnaire de la croissance en présence de sucre alors que cette induction est complètement réprimée en absence de cette source carbonée

(Toyoda et al., 2009). Ainsi, une production de lactate peut être observée en aérobiose. Cette production est plus importante en utilisant le fructose comme source carbonée qu'avec le glucose (Dominguez et al., 1998; Kiefer et al., 2002). D'autre part, l'activité de la LDH est fortement influencée par le niveau d'oxygénation. Dans des conditions de limitation en oxygène, l'activité de cette enzyme augmente d'un facteur 5 par rapport à celle mesurée en absence de limitation (Inui et al., 2004). De même, une surexpression de *ldhA* a été observée pendant une phase de transition de l'aérobiose vers l'anaérobiose. Son expression est 2 fois plus élevée au début la phase de micro-aérobiose qu'en anaérobiose (Lange et al., 2018).

### 3.2.2. Voie de synthèse du succinate

En aérobiose, le succinate est un intermédiaire du cycle de Krebs alors qu'en anaérobiose, il peut être un produit final de fermentation. Dans des conditions de limitation d'oxygène, le succinate est produit majoritairement via la voie anaplérotique et la branche réductrice du cycle de Krebs (Dominguez et al., 1993; Inui et al., 2004; Okino et al., 2005). Il a été mesuré que cette voie était responsable de 97 % de la production de succinate alors que la branche oxydative du cycle de Krebs ne produisait que 3 % du succinate en anaérobiose (Radoš et al., 2014).

Le phosphoénolpyruvate produit à partir du glucose par la glycolyse est converti en oxaloacétate par la PEPC. L'oxaloacétate peut, également, être synthétisé à partir de pyruvate par la PC. Il est converti, par la suite, en malate par l'intermédiaire de la MDH, puis en fumarate grâce à l'activité de la fumarase et enfin en succinate par l'intermédiaire de la succinate déshydrogénase (Figure I.14).



**Figure I.14 :** Schéma simplifié de la voie de synthèse du succinate chez *C. glutamicum*. PGK, phosphoglycérate kinase ; PEPC, phosphoénolpyruvate carboxylase ; PC, pyruvate carboxylase ; MDH, malate déshydrogénase ; FUM, fumarase ; SDH, succinate déshydrogénase.

En anaérobiose ou en limitation en oxygène, la synthèse du succinate permet d'oxyder le NADH, produit au niveau de la glycolyse. L'oxydation de NADH en  $\text{NAD}^+$  est couplée à la réaction de conversion de l'oxaloacétate en malate. De même, la conversion du fumarate en succinate permet l'oxydation du  $\text{FADH}_2$  en  $\text{FAD}^+$ .

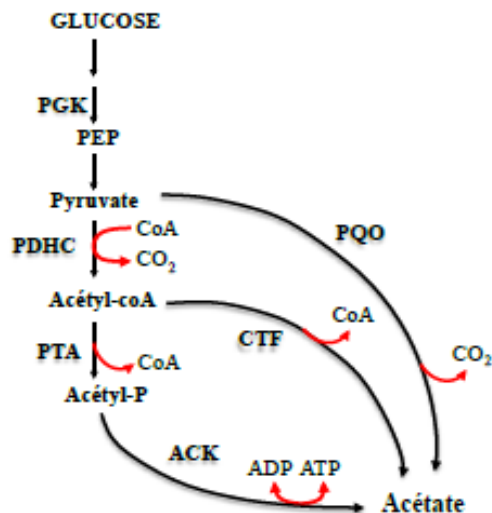
Des souches de *C. glutamicum* privées soit de *mdh*, soit de *fum* soit de *sdhA* sont incapables de produire du succinate en limitation d'oxygène, montrant que les trois enzymes de la branche réductrice de cycle de Krebs (MDH, FUM et SDH) sont indispensables à la synthèse du succinate chez cette bactérie (Inui et al., 2007, 2004). De même, ces auteurs (Inui et al., 2004) ont montré que la PEPC est l'enzyme anaplérotique prédominante en limitation d'oxygène chez *C. glutamicum*. La surexpression de cette enzyme permet, non seulement, d'améliorer la production de succinate en limitation en oxygène mais aussi l'activité de la MDH (Inui et al., 2007). Une sur-régulation au niveau transcriptionnel des gènes *ppc* et *mdh* (2,7 fois plus) a été observée chez la souche *C. glutamicum* R en limitation en oxygène par rapport à l'aérobiose. En revanche, les gènes *fum* (codant la fumarase), *sdhA*, *sdhB* et *sdhC* (codant la succinate déshydrogénase) sont sous-régulés dans ces mêmes conditions (Inui et al., 2007). Cependant, Lange et al. (2018) ont montré que les gènes *mdh* et *fum* sont neuf et trois fois, respectivement, sur-régulés au niveau transcriptionnel au début de la phase de transition de l'aérobiose en anaérobiose (micro-aérobiose) alors que la transcription du cluster *sdhABCD* diminue,

tardivement, d'un facteur 5 en anaérobiose. D'autre part, (Inui et al., 2004) suggèrent que la voie du glyoxylate n'est pas impliquée dans la production de succinate (Inui et al., 2004). Aucun changement de l'expression transcriptionnelle des gènes *aceA* et *aceB* n'a été observé en limitation en oxygène (Inui et al., 2007).

Chez *C. glutamicum*, le succinate intracellulaire est transporté vers l'extérieur par un exporteur appelé *SucEI* (Huhn et al., 2011). Cet exporteur est fonctionnel pendant la phase de production du succinate. Il appartient à la famille des transporteurs aspartate : alanine. Le niveau d'expression de *sucEI* est beaucoup plus élevé dans des conditions de limitation en oxygène ou en anaérobiose. La suppression de ce gène provoque une diminution de 30 % de la productivité en succinate et de la vitesse de consommation de glucose ainsi qu'une accumulation intracellulaire de succinate (1,7 fois) et de FDP (1,6 fois), en micro-aérobiose. Mais, en anaérobiose, la production de succinate est complètement stoppée (Fukui et al., 2011).

### 3.2.3. Voie de synthèse d'acétate

A l'instar du lactate et du succinate, *C. glutamicum* produit également de l'acétate, en limitation d'oxygène (Dominguez et al., 1993; Inui et al., 2004; Okino et al., 2005). Cet acide organique peut être synthétisé soit par conversion directe du pyruvate, soit indirectement par l'intermédiaire de l'ACCOA (Figure I.15). Le pyruvate est converti directement en acétate par la pyruvate : quinone oxydoréductase (PQO) (Schreiner and Eikmanns, 2005). Il peut aussi être converti en acétyl-CoA par la pyruvate déshydrogénase (PDHC). L'ACCOA peut, ensuite, être soit hydrolysé en acétate par la CoA-transférase (CTF) soit être converti en acétyl-P par la phosphotransacétylase (PTA) qui donnera l'acétate suite à une déphosphorylation catalysée par l'acétate kinase (ACK). La voie de synthèse d'acétate par l'intermédiaire de PTA-ACK est énergétiquement plus favorable que celle avec CTF en raison du couplage avec une phosphorylation d'ADP en ATP (Gerstmeir et al., 2003; Yasuda et al., 2007).



**Figure I.15 :** Schéma simplifié de la voie de synthèse de l'acétate chez *C. glutamicum*. PGK, phosphoglycérate kinase, PDHC, pyruvate déshydrogénase complexe, PTA, phosphotransacétylase, ACK, acétate kinase, CTF, CoA transférase, PQQ, pyruvate : quinone oxydoréductase.

Des études de souches déficientes en enzymes impliquées dans la synthèse d'acétate indiquent que la voie principale de synthèse d'acétate en limitation d'oxygène utilise l'ACCOA comme intermédiaire. En effet, une souche de *C. glutamicum* déficiente pour le gène codant la sous unité E1p de PDHC (*aceE*) est incapable de synthétiser de l'acétate en aérobiose et n'en produit qu'une quantité très faible en conditions de limitation en oxygène (Blombach et al., 2007). De plus, l'inactivation simultanée de deux voies de synthèse d'acétate via l'acétyl-CoA (PTA-ACK et CTF) engendre une diminution importante de la production d'acétate. Cependant, l'inactivation de chaque enzyme indépendamment, n'a pas d'effet significatif sur la production de ce métabolite, ce qui peut être expliqué par la compensation de la déficience de chaque voie par l'autre (Yasuda et al., 2007). Enfin, une production faible d'acétate a été observée dans le cas des souches de *C. glutamicum*  $\Delta aceE \Delta ldhA$  et  $\Delta aceE \Delta pqq \Delta ldhA$ , ce qui est dû probablement à l'existence d'une voie de production d'acétate encore non identifiée chez *C. glutamicum* (Yasuda et al., 2007).

Les études métaboliques de *C. glutamicum*, présentées ci-dessus, montrent une flexibilité importante de son réseau métabolique pour s'adapter au changement des conditions environnementales et aux perturbations externes. Elle peut maintenir sa croissance et la production de certains métabolites par une redirection locale du flux métabolique permettant de répondre à tous ses besoins anaboliques et cataboliques. Grâce à ces caractéristiques et les connaissances sur son métabolisme, *C. glutamicum* peut être un candidat idéal pour une production optimisée de succinate.

#### **4. Optimisation de la production de succinate par *Corynebacterium glutamicum***

Afin d'améliorer la performance de cette bactérie pour la production de succinate, différentes stratégies ont été proposées : (i) des modifications génétiques en éliminant les voies de formation des coproduits ou en améliorant les flux à travers les voies de production de succinate, (ii) des stratégies de contrôle du bioprocédé en optimisant les conditions opératoires influençant cette production, (iii) une combinaison des deux stratégies précédentes (Ahn et al., 2016; Baritugo et al., 2018; Dai et al., 2019; Jiang et al., 2017; Kaboré et al., 2017; Lange et al., 2017; Radoš et al., 2014).

##### **4.1. Modifications génétiques**

Comme expliqué précédemment, trois voies métaboliques peuvent être impliquées dans la synthèse de succinate : (1) la branche oxydative du cycle de Krebs, (2) la voie anapérotyque et la branche réductrice du cycle de Krebs ou (3) la voie du glyoxylate. En se basant sur ces connaissances, différentes stratégies de modifications génétiques ont été proposées pour améliorer le rendement et la productivité de la production de succinate. Des exemples des souches mutantes de *C. glutamicum*, productrices de succinate sont reportés dans le Tableau I.4.

En anaérobiose ou micro-aérobiose, *C. glutamicum* produit majoritairement du lactate avec des concentrations faibles en succinate et acétate (Inui et al., 2004; Okino et al., 2005). La première idée d'amélioration de la production de succinate a donc été la désactivation de la voie de synthèse du lactate. La suppression de *ldhA* provoque une inhibition totale de la production de lactate. Mais, seule une légère augmentation de la production de succinate a été enregistrée avec une production plus importante d'acétate comparée à celle obtenue avec la souche sauvage (Tableau I.4) (Inui et al., 2004; Kaboré et al., 2015).



**Tableau I.4 :** Comparaison de la production de succinate par différentes souches de *C. glutamicum* modifiées génétiquement au cours de cultures avec du glucose comme substrat carboné.

Souches	Modification génétique		Substrats	Procédé/Mode de culture <sup>(4)</sup>	[Succinate] (g L <sup>-1</sup> )	Productivité (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Rendement <sup>(3)</sup> (g g <sup>-1</sup> )	Co-produits (g L <sup>-1</sup> )	Références
	Délétion des gènes	Expression des gènes							
<i>C. glutamicum R</i>	-	-	Glucose + NaHCO <sub>3</sub>	Bi-étage / Fed-batch	23	3,83	0,19	Lac (95)	(Okino et al., 2005)
<i>C. glutamicum 2262</i>	<i>ldhA</i>	-	Glucose	Mono-phase/ batch	5	-	0,25	Acét (1)	(Kaboré et al., 2017)
				Tri-phase (DOC2) / batch	38,6	-	0,62	Acét (4)	
<i>C. glutamicum R</i>	<i>ldhA</i>	<i>pyc</i> (pCRA717)	Glucose + NaHCO <sub>3</sub>	Bi-étage / Fed-batch	146,0	3,17	0,92	Acét (16)	(Okino et al., 2008a)
<i>C. glutamicum BOL3/pAN6-gap</i>	<i>ldhA, cat, ppo, et pta-ackA</i>	<i>pyc, fdh et gapA</i>	Glucose + formate	Bi-étage / Fed-batch	133,8	2,53	1,1	AKG (5) Malate (3) ...	(Litsanov et al., 2012a)
<i>C. glutamicum NC-3-1</i>	<i>ldhA, ATPase<sup>(1)</sup></i>	<i>xylA, xylB et gapA<sup>(2)</sup></i>	Glucose + NaHCO <sub>3</sub>	Bi-étage / Fed-batch	113,0	2,35	0,94	Pyr (3,9) Acét (4,2)	(Xu et al., 2016)
<i>C. glutamicum NC-3</i>	<i>ldhA</i>	<i>xylA, xylB et gapA<sup>(2)</sup></i>	Glucose + NaHCO <sub>3</sub>	Bi-étage / Fed-batch	81,3	1,69	0,73	Pyr (4,9) Acét (15)	(Zhou et al., 2015)
<i>C. glutamicum NC-3b-3</i>	<i>ldhA, ptsG, iolR</i>	<i>xylA, xylB gapA, iolT1 et ppgk<sup>(2)</sup></i>			90,74	1,89	0,96	Pyr (3,9) Acét (6,5)	
<i>C. glutamicum</i>	<i>ldhA, ppo, cat et pta,</i>	<i>Psod-ppc, pEpycglAsucE et pXaceAB</i>	Glucose + NaHCO <sub>3</sub>	Bi-étage / Fed-batch	109	1,11	0,87	Acét (4,5) AKG (15)	(Zhu et al., 2014)

<b><i>C. glutamicum</i> ZX1</b>	<i>ldhA, pqo, cat et pta, sdhCAB</i>	<i>acsA</i> <sup>(4)</sup> , <i>gltA</i>	Glucose	Bi-étage / Fed-batch	28,5	0,42	0,41	Pyr	(Zhu et al., 2013)
<b><i>C. glutamicum</i> BL-1/pAN6-<i>pyc</i><sup>P458S</sup><i>ppc</i></b>	<i>pqo, pta-ackA, sdhCAB et cat</i>	pAN6- <i>pyc</i> <sup>P458S</sup> <i>ppc</i>	Glucose	Bi-étage / Fed-batch - aérobie	10,6	0,09	0,3	Pyr (2) Acét (1)	(Litsanov et al., 2012b)
<b><i>C. glutamicum</i> S071/pGEX4-NCgl0275</b>	<i>ldhA, pta-ackA, actA, poxB, pck et ptsG</i>	<i>pyc</i> <sup>P458S</sup> , P <sub>ufi</sub> :: <i>ppc</i> , P <sub>ufi</sub> :: <i>pckG</i> <sup>(5)</sup>	Glucose + MgCO <sub>3</sub>	Mon-phase / Fed-batch	152,2	1,11	1,1	AKG Pyr	(Chung et al., 2017)
<b><i>C. glutamicum</i> ELB-P</b>	<i>aceE, pqo, ldhA C-TilvN, alaT et actA</i>	-	Glucose	Tri-phase / Fed-batch	38,9	0,66	0,67	Pyr	(Wieschalk et al., 2013)

(1) : mutation ponctuelle

(2) : intégration des gènes au niveau chromosomique

(3) : le rendement est calculé sans prendre en considération la quantité de glucose utilisée pour la croissance pendant la première phase (dans le cas de culture à deux phases)

(4) : en anaérobiose

(5) : de *M. succiniciproducens*

Une deuxième stratégie permettant de réduire l'accumulation de pyruvate et sa conversion en acétate en limitation en oxygène a été proposée. Cette stratégie consiste en la surexpression de *pyc* codant la pyruvate carboxylase, chez une souche mutante, *C. glutamicum*  $\Delta$ *ldhA*. Au cours d'une culture en fed-batch, cette souche, *C. glutamicum*  $\Delta$ *ldhA* PCRA717, produit 146 g L<sup>-1</sup> de succinate avec un rendement de 0,92 g g<sup>-1</sup> et une productivité de 3,17 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (Tableau 1.4) (Okino et al., 2008a). Cette concentration en succinate est parmi les plus élevées reportées dans la littérature (Tableau I.1 et I.4). La surexpression de l'activité de la pyruvate carboxylase favorise la conversion du pyruvate en oxaloacétate et par la suite en succinate. Néanmoins, une production d'acétate (16 g L<sup>-1</sup>) est toujours présente chez cette souche (Okino et al., 2008a). Pour cela, certaines études ont envisagé de désactiver les gènes responsables de cette production (Chung et al., 2017; Litsanov et al., 2012a; Zhu et al., 2014). Ces gènes sont *pta-ackA*, *pqo* et *cat* codant la phospho-trans-acétylase, l'acétate kinase, la pyruvate : menaquinone oxydoréductase et l'acétyl-COA transférase, respectivement. Litsanov et al. (2012a) ont construit une souche, *C. glutamicum* BOL3/pAN6-*gap*, chez laquelle tous ces gènes mais aussi *ldhA* ont été éliminés. De plus, dans cette souche, le flux à travers la voie anaplérotique, mais aussi sur la disponibilité en cofacteurs (NADH) nécessaires pour la production de succinate ont été accrus. Théoriquement, seules deux moles de NADH peuvent être produites par la glycolyse à partir d'une mole de glucose. Dans l'étude de Litsanov et al. (2012a), le gène *fdh* codant la formate déshydrogénase de *Mycobacterium vaccae* a été intégré dans la souche mutante afin d'augmenter l'apport en NADH. Le gène *gapA* a été surexprimé afin de limiter l'inhibition de l'activité de GAPDH par le ratio NADH/NAD<sup>+</sup>. La souche ainsi construite est capable de produire 134 g L<sup>-1</sup> de succinate avec une productivité de 2,53 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> et un rendement de 1,1 g g<sup>-1</sup> de glucose (1,67 mol mol<sup>-1</sup> de glucose) pendant une culture semi-continue avec un apport en glucose et en formate (Tableau 1.4) (Litsanov et al., 2012a). De même, la stratégie de Xu et al. (2016) a été basée sur la disponibilité en NADH, mais cette fois-ci en inhibant l'activité de H<sup>+</sup>-ATPase. La souche créée dans cette étude, *C. glutamicum* NC-3-1, est capable de produire 113 g L<sup>-1</sup> de succinate avec une productivité importante de 2,35 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (Xu et al., 2016). Une autre stratégie, consistant en l'augmentation de la disponibilité de PEP, en diminuant son utilisation par le système de transport du glucose PTS a été appliquée dans l'étude de Zhou et al. (2015). Suite à l'inactivation de ce système, les gènes *iolT* et *ppgk*, codant la perméase spécifique du glucose et la glucokinase, ont été surexprimés pour maintenir la consommation de glucose. La souche créée, *C. glutamicum* NC-3b-3, est capable de produire 91 g L<sup>-1</sup> de succinate pendant une culture en mode semi-

continu, avec des concentrations faibles en pyruvate et acétate (Zhou et al., 2015). Certaines études ont envisagé d'améliorer la production de succinate non seulement à travers ces voies préférentielles (voie anaérobiotique et branche réductrice du cycle de Krebs) mais aussi via la voie du glyoxylate. Les deux enzymes clés de la voie du glyoxylate, la citrate et la malate synthase, ont été surexprimées ainsi que la citrate synthase permettant ainsi d'augmenter la conversion de l'ACCOA et de l'OAA en citrate. Le gène *sucE* codant le transporteur/exporter de succinate en anaérobiose a également été surexprimé. Cette souche permet de produire 109 g L<sup>-1</sup> de succinate avec un rendement et une productivité de 0,87 g g<sup>-1</sup> de glucose et 1,11 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, respectivement, au cours d'une culture semi-continue (Zhu et al., 2014). Une autre étude s'est focalisée sur l'amélioration des flux métaboliques au niveau de la troisième voie de production de succinate ; la branche oxydative du cycle de Krebs. Une interruption de cette voie au niveau de la conversion de succinate en malate permet d'améliorer l'accumulation de succinate comme produit final, en aérobiose. Pour cela, le gène *sdhCAB* responsable de cette réaction a été supprimé en plus de la désactivation des voies de production de lactate et acétate (suppression de *pta*, *pqo cat*, et *ldhA*). Le gène *acs* codant l'ACCOA synthase de *Bacillus subtilis* a été intégré à cette souche de *C. glutamicum* pour favoriser la consommation d'acétate. Ainsi, le gène *gltA* codant la citrate synthase a été surexprimé pour améliorer le flux carboné à l'entrée de cycle de Krebs et donc la production de succinate par la voie oxydative du cycle de Krebs. Cette souche de *C. glutamicum* est capable de synthétiser 28,5 g L<sup>-1</sup> de succinate avec 0,41 g g<sup>-1</sup> de glucose et 0,42 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> de rendement et de productivité, respectivement (Zhu et al., 2013). Récemment, Chung et al. (2017) ont montré que la production de succinate est inhibée par son accumulation dans le milieu de culture. Une inhibition totale de la production a été observée avec 250 mM de succinate. La stratégie proposée par ces auteurs a été basée non seulement sur la suppression des voies de production des co-produits mais aussi sur la surexpression du gène *whcA* (ou *NCgl0275*), correspondant à un régulateur négatif de la réponse au stress oxydatif (Choi et al., 2009), pour supprimer cette inhibition. La souche créée est capable de produire 152 g L<sup>-1</sup> de succinate avec un rendement et une productivité élevée de 1,11 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> et 1,1 g g<sup>-1</sup>, respectivement. Cette concentration en succinate est la plus élevée, reportée dans la littérature (Chung et al., 2017).

Le glucose est généralement la source carbonée la plus utilisée pour la production de succinate. Différentes modifications génétiques de *C. glutamicum* ont été appliquées pour améliorer la production de succinate en utilisant des substrats carbonés alternatifs comme le glycérol, l'arabinose et le xylose. Des exemples de souches de *C. glutamicum* construites dans

cet objectif sont présentés dans le tableau I.5. Ainsi, la souche créée par Mao et al. (2018) est capable de produire une concentration importante de succinate d'environ 99 g L<sup>-1</sup> à partir d'un hydrolysats de lignocellulose, avec une productivité élevée de 4,29 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.

**Tableau I.5 :** Comparaison de la production de succinate par des souches de *C. glutamicum* modifiées génétiquement pour utiliser des substrats carbonés autres que le glucose

Souche	Mode de culture	Substrats	[Succinate] (g L <sup>-1</sup> )	Rendement <sup>(2)</sup> (g g <sup>-1</sup> )	Références
Aérobie					
<i>C. glutamicum</i> ZX1 (pXaraBAD, pEacsAglTA)	Batch	L-arabinose	13 (0,36 <sup>(2)</sup> )	0,36	(Chen et al., 2014)
Microaérobie					
<i>C. glutamicum</i> $\Delta$ ldhA, SSI : <i>pyc</i> <sub>9</sub> <sup>(3)</sup>	26 cycles de recyclage des cellules	Glucose + NaHCO <sub>3</sub>	634	0,71	(Jojima et al., 2016)
<i>C. glutamicum</i> $\Delta$ ldhA, $\Delta$ pta-ackA : P <sub>trc</sub> : <i>xylAB</i> d' <i>E. coli</i>	Batch	Xylose + glucose + NaHCO <sub>3</sub> <sup>(4)</sup>	40,8 (0,85)	0,69	(Wang et al., 2014)
Anaérobie					
<i>C. glutamicum</i> $\Delta$ pqo :P	Fed-batch	Glycérol	38,4	1,02	(Litsanov et al., 2013)
<i>C. glutamicum</i> $\Delta$ ldhA $\Delta$ ackA- <i>pta</i> $\Delta$ pqo $\Delta$ cat P <sub>sod</sub> <i>pyc</i> P <sub>sod</sub> <i>ppc</i> P <sub>sod</sub> <i>tal</i> P <sub>sod</sub> <i>tkl</i> P <sub>trf</sub> <i>araE</i> <i>pX-xcbAB</i> , <i>pEpycglAsucE</i>	Procédé à deux étapes	Hydrolysats lignocellulosique	98,6 (4,29)	0,87	(Mao et al., 2018)

<sup>(1)</sup> : Productivité en g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>

<sup>(3)</sup> : 9 copies du gène *pyc* sont intégrées dans le génome de la souche hôte

<sup>(4)</sup> : hydrolysats d'épis de maïs

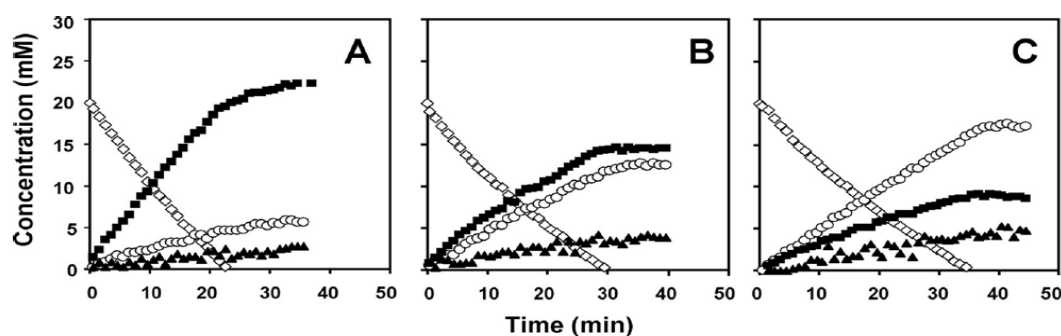
<sup>(2)</sup> : le rendement est calculé sans prendre en considération la quantité de glucose utilisée pour la croissance pendant la première phase (dans le cas de culture en deux phases)

## 4.2.Optimisation du procédé de production

L'optimisation du procédé de production est une autre approche très importante pour l'amélioration de la production de succinate. La production de succinate par *C. glutamicum* dépend de plusieurs paramètres, essentiellement le niveau d'oxygénation et la présence de CO<sub>2</sub>. Certaines études ont montré que l'optimisation de ces deux paramètres permet d'améliorer la productivité et le rendement en succinate. Cette approche se base sur l'optimisation de la composition du milieu de culture, des stratégies d'apport en oxygène ou d'une combinaison des deux.

#### 4.2.1. Optimisation de la composition du milieu de culture

Le comportement physiologique de *C. glutamicum* dépend fortement de la composition du milieu de culture, en particulier de la nature des substrats carbonés et azotés. Les concentrations en glucose, sulfate d'ammonium, sulfate de magnésium et phosphate dipotassique influencent significativement la production de succinate par *C. glutamicum* (Jeon et al., 2013). Cependant, Okino et al. (2008a) ont montré que la concentration en glucose, dans une gamme de 20 à 420 mM, n'avait aucun impact sur les vitesses de consommation du glucose, de production de succinate et sur le rendement de conversion du glucose en succinate.



**Figure I.16 :** Cinétiques de production de lactate (■), succinate (○) et acétate (▲) et de consommation de glucose (◇) par *C. glutamicum* ATCC13032. Différents pourcentages de CO<sub>2</sub> ont été injectés : (A) 0%, (B) 20 % et (C) 100% de la saturation (Radoš et al., 2014).

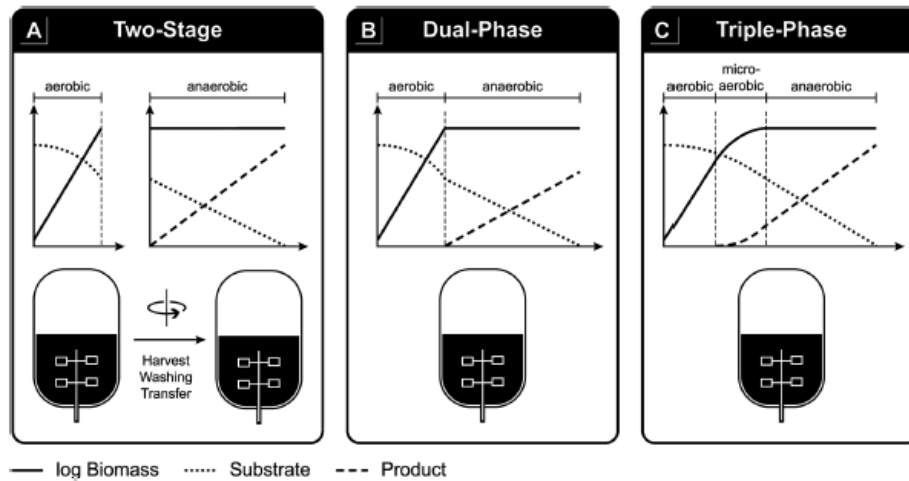
De même, la disponibilité de CO<sub>2</sub> dans le milieu de culture impacte fortement la production de succinate. Une molécule de CO<sub>2</sub> est nécessaire pour la conversion du pyruvate ou du phosphoenolpyruvate en oxaloacétate et, par la suite, en succinate. Théoriquement, 1,71 moles de succinate peuvent être produites avec une mole de glucose et une mole de CO<sub>2</sub>. Ce rendement théorique peut augmenter jusqu'à 2 moles/mole de glucose en injectant suffisamment de CO<sub>2</sub> dans le milieu de culture (McKinlay et al., 2007). En se basant sur des analyses <sup>13</sup>C-NMR *in vivo*, une étude de l'effet de la disponibilité de CO<sub>2</sub> sur le métabolisme de *C. glutamicum* ATCC13032, en anaérobiose, a démontré que la présence de 20 % de CO<sub>2</sub> permet de doubler la production de succinate (de 5,9 à 11,8 mM) et de diminuer d'un tiers la production de lactate. En augmentant le pourcentage à 100% de CO<sub>2</sub>, le rendement de la conversion du glucose en succinate augmente (3 fois) à 1 mol mol<sup>-1</sup> et celui de la production de lactate diminue de 1,22 à 0,42 mol mol<sup>-1</sup> de glucose. Dans ces conditions, le succinate devient le produit majoritaire avec une concentration maximale de 17,5 mM. Mais, l'augmentation du pourcentage de CO<sub>2</sub> dans le milieu de culture induit aussi une augmentation de la production d'acétate. Celle-ci est 2 fois plus importante avec 100 % CO<sub>2</sub> que celle obtenue en absence de CO<sub>2</sub> (Figure I.16) (Radoš et al., 2014).

En revanche, l'étude de Michel et al. (2015) montre que les rendements de conversion du glucose en lactate, succinate et acétate sont modérément impactés, en présence de 10 % de CO<sub>2</sub> en anaérobiose. La concentration de succinate augmente de 18,2 à 20,6 mM en présence de 0 et 10 % de CO<sub>2</sub>, respectivement. De plus, un effet important du CO<sub>2</sub> a été observé sur la croissance avec une augmentation de la densité optique d'environ 50 % en présence de 10 % de CO<sub>2</sub>. Aucun changement n'a été détecté pour des pourcentages au-delà de 10%. Ces auteurs ont expliqué la différence entre leurs résultats et ceux de Radoš et al. (2014) par la différence des conditions opératoires de deux cultures : un milieu minimum contenant du glucose additionné de 15 g/L de tryptone (Michel et al., 2015) contre un tampon sans source d'azote, de soufre et de phosphore (Radoš et al., 2014).

D'autre part, plusieurs études ont envisagé la combinaison des deux approches d'optimisation de la production de succinate. Au cours de cultures de souches mutantes de *C. glutamicum* productrices de succinate, différentes sources de CO<sub>2</sub> ont été ajoutées au milieu de culture. Inui et al. (2004) ont ainsi montré que l'ajout de bicarbonate influence les flux métaboliques de *C. glutamicum*  $\Delta$ ldhA en limitation d'oxygène. Cet ajout permet d'augmenter la production de succinate (concentration 3,6 fois plus importante) ainsi que la production de lactate (2,3 fois) et la vitesse de consommation de glucose (2,5 fois). De plus, le rendement de la conversion du glucose en succinate le plus élevée (1,1 g g<sup>-1</sup> glucose) est obtenu avec la souche *C. glutamicum* BOL3/pAN6-gap en présence de formate comme source de CO<sub>2</sub>. Le formate représente aussi une source en NADH qui est un co-substrat important pour la production de succinate (Litsanov et al., 2012a).

#### 4.2.2. Optimisation de stratégie de fermentation / stratégie d'oxygénation

En plus de la disponibilité en CO<sub>2</sub>, l'oxygénation est un paramètre clé pour la production de succinate. Dans des conditions de limitation en oxygène, le succinate est produit avec un rendement faible de 0,09 mol mol<sup>-1</sup> glucose lors d'une culture en mode discontinu (Okino et al., 2005). Afin de favoriser et améliorer la production de succinate, différentes stratégies d'optimisation du procédé ont été appliquées. En s'appuyant sur la caractéristique de l'absence de croissance de *C. glutamicum* lors de la production des acides organiques en limitation en oxygène, différents procédés « zéro-croissance » ont été élaborés (Lange et al., 2017). Ces procédés se décomposent en une phase aérobie, pour la croissance bactérienne, et une phase anaérobie, pour la production de succinate. Une phase intermédiaire de micro-aérobiose est parfois présente (figure I.17).



**Figure I.17 :** Les différents types de procédé de production de succinate « zéro-croissance » utilisés avec *C. glutamicum* (Lange et al., 2017).

Un premier procédé « zéro-croissance » bi-étage a été proposé par Okino et al. (2008a). Pendant la première étape, une concentration importante en biomasse est produite en alimentant avec des quantités suffisantes en oxygène. Puis, les cellules sont récupérées, lavées et transférées dans un autre bioréacteur pour la production de succinate en anaérobiose. Avec la souche *C. glutamicum*  $\Delta ldhA$ -pCRA717, une concentration en succinate de  $146 \text{ g L}^{-1}$  a été obtenue avec un rendement de  $1,4 \text{ mol mol}^{-1}$  glucose au cours d'une culture en mode semi-continu avec  $50 \text{ g DW L}^{-1}$  de biomasse, en alimentant avec du glucose et du bicarbonate (Okino et al., 2008a). Ce même type de procédé a été utilisé par Litsanov et al. (2012a). Ces auteurs ont créé une souche mutante privée des gènes responsables de la production de lactate et d'acétate, *C. glutamicum* BOL-3/pAN6-gap. Cette souche est capable de produire  $134 \text{ g L}^{-1}$  de succinate avec un rendement élevé de  $1,67 \text{ mol mol}^{-1}$  glucose au cours d'une culture en mode semi-continu (ajout de glucose et de formate), en anaérobiose (Litsanov et al., 2012a). La production de succinate au cours de ce procédé « zéro-croissance » a été optimisée par un système de recyclage (Jojima et al., 2016). Après une phase aérobie de croissance, les cellules ont été lavées puis placées dans des conditions de limitation en oxygène. Ce cycle a été répété 26 fois. Une stabilité de la production de succinate avec *C. glutamicum* CRZ21 pendant 572 h avec seulement 0,7 % de diminution de la productivité spécifique par cycle de recyclage et une augmentation de 79% du rendement de production de succinate comparé à celui obtenu lors d'une culture semi-continue sans recyclage, a pu être obtenu (Jojima et al., 2016). Certaines études ont envisagé des procédés mono-étagé, bi-phase. Autrement dit, la phase de croissance est suivie directement par la phase de production dans un seul et même bioréacteur. Ce type de procédé a été appliqué pour la production de succinate par *E. coli* (Jiang et al., 2010; Martínez et al., 2010; Vemuri et al., 2002; Wu et al., 2007). (Vemuri et al., 2002) ont



montré que les enzymes induites en aérobiose restaient actives en anaérobiose et donc influençaient négativement la production de succinate par *E. coli*. Afin d'éviter l'impact de ces enzymes et d'assurer une activation efficace des enzymes impliquées dans la production de succinate, une phase de transition, micro-aérobie, a été ajoutée au cours de procédé bi-phase : c'est le procédé tri-phasique. En outre, les conditions d'apport d'oxygène pendant les phases aérobies et micro-aérobies, influencent la concentration en biomasse et la viabilité de celle-ci pendant la phase de transition et de production de succinate en anaérobiose. Différentes stratégies de transition entre l'aérobiose et l'anaérobiose ont été appliquées au cours de cultures de *C. glutamicum* 2262 $\Delta$ *ldhA*. Une augmentation de la production de succinate, entre 228 % et 641 % par rapport à celle obtenue suite à un passage brutal de l'aérobiose à l'anaérobiose, a été observée selon la stratégie de transition appliquée (Kaboré et al., 2017). Ces auteurs ont appliqué quatre stratégies de transition différentes dont deux basées sur le contrôle de la concentration en oxygène dissous (DOC) et deux autres sur le débit d'air. La production optimale de succinate (327 mM avec un rendement de 0.94 mol mol<sup>-1</sup>) a été obtenue avec la transition progressive où la DOC a été fixé à 50 % pendant la phase de croissance, puis réduite à 20 % pendant 2 heures, puis à 10 % pendant 2 h et enfin à 0 %. Lange et al. (2018) ont montré que pendant la phase de transition, micro-aérobie, les métabolismes oxydatifs et fermentaires étaient présents conjointement. Une sous-régulation de gènes codant la branche oxydative du cycle de Krebs a été observé alors que les gènes *ldhA*, *mdh* et *fum* codant la production de lactate et les enzymes de la branche réductive de ce cycle étaient surexprimés (Lange et al., 2018).

Certaines études sur la production de succinate de *C. glutamicum* ont été réalisées à petite échelle en utilisant des cultures en fiole ou en micro-plaque. Dans ces conditions, la limitation en oxygène est auto-induite par la croissance cellulaire. (Kaboré et al., 2015) ont montré que le niveau d'oxygénation, caractérisé par le coefficient de transfert d'oxygène ( $k_{LA}$ ), impactait fortement le comportement physiologique de *C. glutamicum* 2262 $\Delta$ *ldhA*. Selon les valeurs de  $k_{LA}$ , une production optimale séquentielle des acides organiques a été observée : la production optimale de succinate correspondait à des  $k_{LA}$  entre 10 et 19 h<sup>-1</sup> alors que le maximum d'acétate était produit à des  $k_{LA}$  entre 19 et 33 h<sup>-1</sup>. De même, cet impact a été décrit chez *C. glutamicum* ATCC13032 cultivée dans des systèmes BioLector (culture en plaque de microtitration), en se basant sur la vitesse de transfert d'oxygène, OTR<sub>max</sub> (Käß et al., 2014). Une production des acides organiques a été observée pour des OTR<sub>max</sub> entre 5,7 et 3,27 mM/h, les concentrations maximales en lactate, succinate et acétate correspondant à l'OTR<sub>max</sub> la plus faible (3,27 mM/h).

## **Partie 2 : Modélisation métabolique et cinétique: théorie et exemples de modèles de *C. glutamicum***

### **1. Généralités**

Vu la complexité des systèmes biologiques, la connaissance du métabolisme d'un microorganisme, basée sur des études expérimentales, est souvent limitante. Afin de simplifier et généraliser la réalité d'un microorganisme, une deuxième approche a été proposée : c'est la modélisation mathématique. Se basant sur des équations mathématiques, des liens entre les entrées et les sorties d'un système biologique étudié peuvent être établis. Les principaux objectifs de l'utilisation des modèles sont : la prédiction des capacités biologiques (O'Brien et al., 2015), la compréhension de la réponse physiologique d'un microorganisme (Liu et al., 2010) et l'étude de certaines situations difficiles à réaliser expérimentalement (Ashyraliyev et al., 2009).


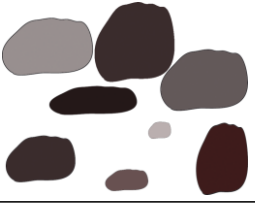
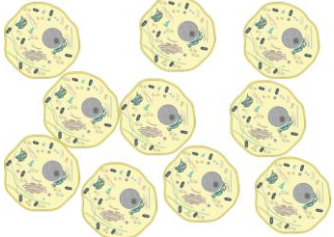
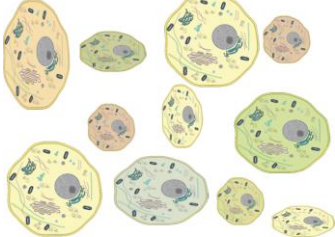
La phase de modélisation proprement dite est principalement basée sur trois étapes : (1) la définition précise de l'objectif de l'étude, (2) la construction du modèle en se basant sur des hypothèses permettant de simplifier le système étudié et (3) la vérification de la qualité du modèle, notamment sa capacité prédictive, et de sa robustesse.

Selon le degré de connaissances du métabolisme d'un microorganisme et les données expérimentales, les modèles mathématiques peuvent être classés principalement en deux grands groupes (Alfonsi et al., 2005; Wilkinson, 2009):

- Modèles « boîtes blanches » ou phénoménologiques : Les équations de ces modèles sont une représentation des phénomènes qu'ils décrivent. Des connaissances approfondies sur la physiologie et le métabolisme d'un micro-organisme sont nécessaires. Ceci rend le développement de ce type de modèles long et compliqué à cause de manque de connaissances sur certains mécanismes impliqués dans le métabolisme du microorganisme.
- Modèles « boîtes noires ». Les équations qui décrivent et imitent le comportement du système sont purement mathématiques et ne s'appuient sur aucune loi particulière. Ils donnent une vision globale sans besoin des mécanismes physiques, thermodynamiques, chimiques ou biologiques qui régissent le système. La prédiction par ce type de modèle est limitée aux domaines opératoires où il a été établi (interpolateur).

Il existe aussi des modèles intermédiaires entre les modèles « phénoménologique » et « boîtes noires » appelés modèles hybrides ou « boîtes grises ».

Une seconde classification des modèles est également usuelle dans les modèles biologiques. On distingue en effet les modèles structurés et non-structurés, d'une part, et les modèles ségrévés et non ségrévés, d'autre part. La figure I.18 est extraite des pages personnelles des membres de l'Université de Namur (<http://perso.fundp.ac.be>), aujourd'hui inaccessibles. Les modèles structurés distinguent des compartiments à l'intérieur de la cellule quand les modèles non structurés la considèrent comme une entité homogène. Les modèles ségrévés distinguent les cellules sur la base de caractéristiques spécifiques (âge, ADN, taille) quand les modèles non ségrévés considèrent que toutes les cellules présentent les mêmes caractéristiques et donc le même comportement.

	<b>Non ségrévés</b>	<b>Ségrévés</b>
<b>Non structurés</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cellules non compartimentées</li> <li>• Population homogène</li> </ul> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cellules non compartimentées</li> <li>• Population hétérogène</li> </ul> 
<b>Structurés</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cellules compartimentées</li> <li>• Population homogène</li> </ul> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cellules compartimentées</li> <li>• Population hétérogène</li> </ul> 

**Figure I.18 :** Illustration de la classification des modèles cinétiques en biotechnologie

Il est également courant de distinguer les modèles statiques où les prédictions du modèle correspondent à un état stable, voire pseudo-stationnaire, du système et les modèles dynamiques qui décrivent l'évolution au cours du temps du système.

Ainsi, dans le cas du système biologique, deux approches de modélisation sont appliquées principalement : l'approche statique et l'approche dynamique (Machado et al., 2011). Dans cette étude, l'approche statique a permis d'étudier la répartition des flux métaboliques à l'état quasi-stationnaire : il s'agit de la modélisation métabolique. Une approche dynamique a été

utilisée pour décrire les cinétiques des réactions présentant l'effet de changement des conditions environnementales sur les concentrations et flux : c'est la modélisation cinétique. Dans cette partie « Modélisation », nous présentons le principe de ces deux types de modélisation, ainsi que leurs applications à *C. glutamicum*.

## **2. Modélisation métabolique**

### **2.1. Notions de base ou terminologie**

#### Réseau métabolique

Un réseau métabolique regroupe l'ensemble des réactions chimiques impliquées dans un métabolisme, ainsi que les entités biologiques intervenant dans ces réactions. Ces entités biologiques sont classées en deux catégories ; (1) les enzymes catalysant ces réactions et (2) les molécules consommées et produites par ces réactions

#### Flux métabolique, flux réactionnel et activité enzymatique

Le flux réactionnel est le flux à travers une réaction biochimique particulière et le flux métabolique correspond au flux à travers tout un réseau de réactions biochimiques. Le flux métabolique correspond donc à une succession de flux réactionnels. Il représente le flux général de matière (ou d'énergie) à travers une voie métabolique. À l'état stationnaire, le flux métabolique est égal au flux réactionnel de l'étape limitante.

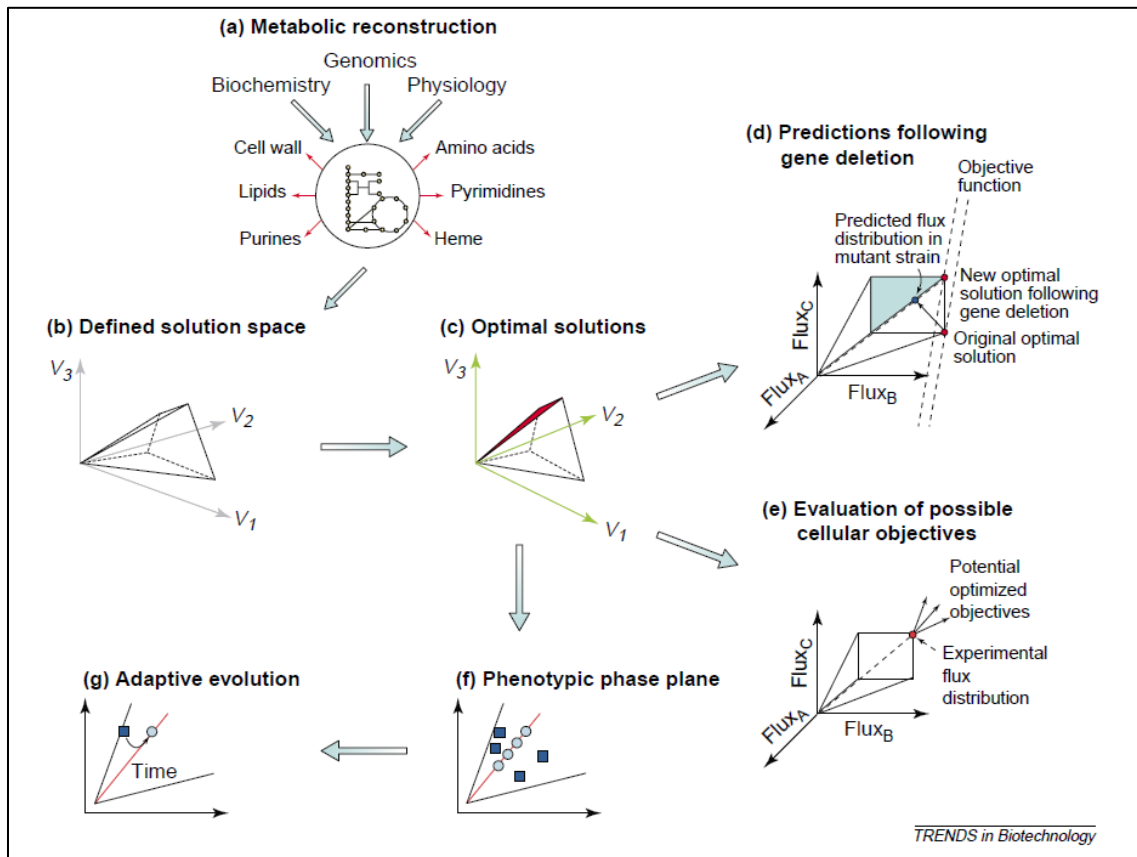
De même, le flux réactionnel ou l'activité enzymatique sont deux notions équivalentes à l'état stationnaire. Ces deux notions permettent de décrire la vitesse de conversion d'un substrat en produit. Mais, la différence entre les deux est le référentiel. Le flux réactionnel fait référence à un volume réactionnel (vitesse de conversion volumique), ou une masse (vitesse de conversion spécifique). Par contre, l'activité enzymatique est rapportée à une quantité de protéine enzymatique (en masse ou unité enzymatique).

#### État quasi-stationnaire

L'hypothèse de l'état quasi-stationnaire, se base sur la loi de conservation de la masse. Autrement dit, l'ensemble des flux de production d'un métabolite est égal à l'ensemble des flux de consommation. Cette hypothèse est valable si la dynamique des flux intracellulaires est beaucoup plus rapide que l'évolution des conditions environnementales. En outre, la variation

des concentrations en métabolites, à l'état transitoire, est négligeable et donc des valeurs stables pour les concentrations sont atteintes rapidement (Covert and Palsson, 2003; Hofmeyr, 1986).

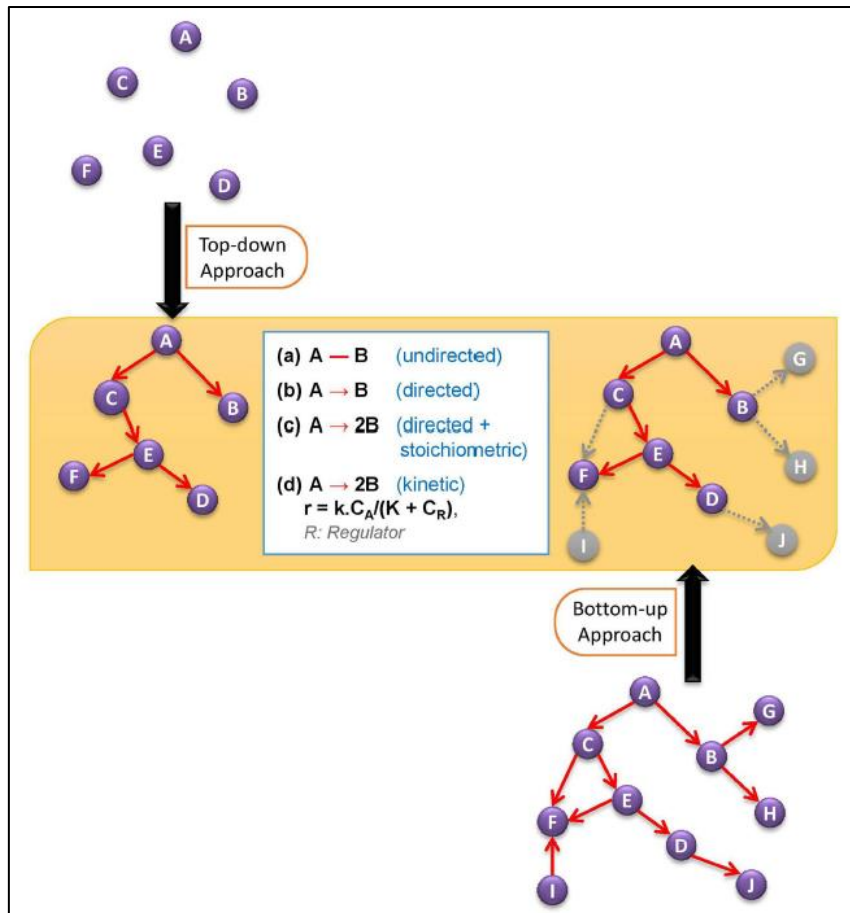
## 2.2.Méthodologie de la modélisation métabolique



**Figure I.19** : Les différentes étapes de modélisation métabolique à base de contraintes. (a) Construction d'un réseau métabolique à partir de la biochimie, de la génomique et de la physiologie connues. (b) Définition d'un espace de solution en imposant des contraintes physico-chimiques. (c) Détermination des solutions optimales selon la fonction « objectif » choisie. (d-g) Prédiction du comportement du microorganisme étudié par le modèle proposé, dans différentes situations (O'Brien et al., 2015).

### 2.2.1. Construction d'un réseau métabolique

Le métabolisme est le réseau de réactions biochimiques d'un être vivant qui convertit les sources de carbone et d'énergie, en biomasse, énergie et coproduits (Yilmaz and Walhout, 2017). Il se compose d'un grand nombre de réactions constituant des voies métaboliques. Ces réactions sont catalysées par des enzymes qui sont codées par des gènes. La construction du réseau métabolique se base sur les relations entre ces gènes, protéines et réactions déjà connues. Selon le type de données utilisées, deux approches peuvent être appliquées pour générer la construction : l'approche ascendante et l'approche descendante (Figure I.20) (Bruggeman and Westerhoff, 2007).



**Figure I.20** : Comparaison des approches ascendantes et descendantes pour reconstruire un modèle métabolique. La boîte blanche de la figure définit différents niveaux d'informations sur la structure du réseau (Çakır and Khatibipour, 2014).

#### 2.2.1.1. Approche descendante (top-down):

Des informations du génome sont utilisées pour la construction du squelette du réseau puis des détails du réseau sont ajoutés (Kim et al., 2015, 2012). Il s'agit d'une construction automatique à l'aide d'outils tels que SEED et Pathway Tools. La première étape de la construction d'un réseau métabolique consiste en une collecte des informations sur le génome du microorganisme à partir des bases des données génomiques : c'est l'étape de l'annotation fonctionnelle de génome. Il existe deux types de bases des données : soit spécifique pour certains microorganismes (EcoCyc pour *E. coli*), soit génériques comme KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). L'annotation de génome permet d'identifier les enzymes impliquées dans le métabolisme d'un microorganisme. Les réactions métaboliques sont assemblées, par la suite, en voie métabolique. Il existe différents outils d'assemblage des réactions métaboliques comme COBRA Toolbox, BiGG (Schellenberger et al., 2011), KEGG (Kanehisa et al., 2014),

EcoCyc (Keseler et al., 2013). Ce premier réseau métabolique ainsi construit peut présenter certaines lacunes telles que l'absence de certains gènes, l'incohérence du réseau métabolique avec les principes généraux du métabolisme (la stœchiométrie des réactions), la faisabilité thermodynamique du modèle (la direction des réactions). Pour cela, le premier réseau métabolique construit est généralement complété en se basant, cette fois-ci, sur des données biochimiques et physiologiques déterminées expérimentalement. Les données biochimiques permettent de déterminer la présence de réactions ou de voies qui ne sont pas indiquées dans les données génomiques, de valider les connectivités dans le réseau métabolique. Dans certains cas, la même réaction est catalysée par différentes enzymes. Ce type d'informations permet donc d'attribuer et de préciser les spécificités de substrat de certaines enzymes. En plus des données génomiques et biochimiques, des données physiologiques sont nécessaires pour compléter le réseau métabolique. Ces données permettent d'identifier les gènes supplémentaires responsables de phénotypes. Elles permettent aussi de vérifier la présence ou l'absence de certaines réactions métaboliques (Covert et al., 2001; O'Brien et al., 2015; Thiele and Palsson, 2010).

Cette approche descendante permet de créer un réseau métabolique à l'échelle génomique, « un réseau complet ». Mais, elle reste limitée par les informations actuelles en biologie induisant parfois des manques dans le réseau construit.

#### 2.2.1.2. Approche ascendante (Bottom-up)

Contrairement à l'approche descendante, l'approche ascendante consiste en une construction manuelle du réseau, composant par composant. L'objectif principal de cette approche est de combiner les différentes voies déjà connues en un même modèle. Des voies métaboliques sont intégrées progressivement, pour construire le réseau principal, en se basant sur des connaissances sur les gènes, les métabolites et les réactions déjà décrites dans la littérature. Le modèle ainsi construit peut, ensuite, être progressivement élargi en intégrant plus de détails, en fonction des avancées sur la compréhension du métabolisme du microorganisme étudié. Néanmoins, étant donnée la simplicité de ces modèles, des lacunes peuvent également être présentes, comme avec l'approche décrite précédemment. Elle est cependant largement utilisée pour la construction de modèles réduits, notamment du métabolisme central de microorganismes tels que *E. coli* et *S. cerevisiae* (Kremling et al., 2001; Schmid et al., 2004).

Pour construire un réseau métabolique quelle que soit l'approche appliquée, certaines informations sur les réactions sont nécessaires : la nature des substrats et des produits, les coefficients stœchiométriques associés, la réversibilité des réactions et la nature des catalyseurs enzymatiques. Les processus de transport doivent également être pris en compte dans les réseaux métaboliques. Des métabolites, consommés ou produits, peuvent être transportés du compartiment intracellulaire vers le compartiment extracellulaire. Pour cela, des informations sur la localisation des métabolites (compartiment intra/extracellulaire) doivent être ajoutées dans le modèle construit.

## 2.2.2. Formulation d'un modèle métabolique

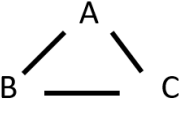
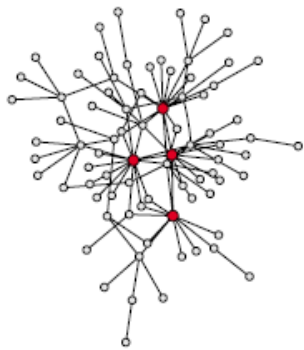
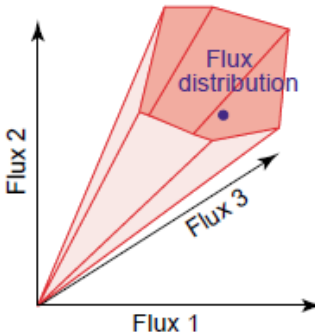
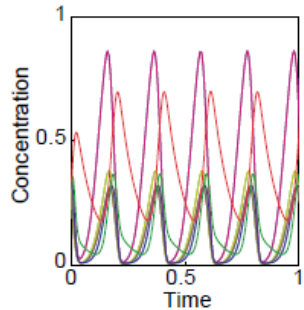
Avant l'analyse et la vérification d'un réseau construit, il est nécessaire de le convertir en une représentation mathématique. Le choix du formalisme d'un modèle est une étape importante pour décrire le métabolisme avant la modélisation. Le modèle doit également comporter une réaction simulant la synthèse de biomasse. Enfin, selon le type de formalisme choisi, différentes méthodes de résolution peuvent être utilisées. Ces différentes étapes sont présentées ci-dessous.

### 2.2.2.1. Différents formalismes de modélisation

Selon le niveau d'analyse des réseaux considérés, trois principaux types de modélisation peuvent être réalisés : modélisation structurelle, modélisation basée sur les contraintes (matrices stœchiométriques) et modélisation basée sur le mécanisme (Stelling, 2004). Une comparaison entre les trois types de modélisation est présentée dans le tableau 1.6. La modélisation à base des contraintes, utilisée dans ce travail, est abordée plus en détail dans le paragraphe suivant.



**Tableau I.6 :** Comparaison des trois types de modélisation métabolique.

	<b>Modélisation structurale</b>	<b>Modélisation à base de contraintes</b>	<b>Modélisation à base de mécanismes</b>
<b>Principe</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Modèle basé sur une représentation graphique, ne prend pas en considération les stœchiométries et les paramètres cinétiques.</li> </ul>  <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Création de graphes présentant les interactions entre les métabolites ou les réactions constituant le modèle</li> <li>➤ Analyse et vérification de la structure des réseaux reconstruits.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Modèle basé sur les stœchiométries mais non sur les paramètres cinétiques.</li> </ul> $A + B \rightleftharpoons C$ <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Détermination de la distribution des flux intracellulaires au sein d'un métabolisme, à l'état stationnaire.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Modèle basé sur les stœchiométries et les données cinétiques (concentration des métabolites et paramètres cinétiques).</li> </ul> $A + B \xrightleftharpoons[K_{-1}]{K_1} C$ <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Détermination de la variation des flux intracellulaires au cours d'une culture, présentant l'impact des conditions environnementales.</li> </ul>
<b>Type des modèles</b>	Modèle métabolique statique		Modèle métabolique dynamique
<b>Représentation graphique des solutions de la résolution du modèle métabolique</b>			

### Modélisation à base de contraintes

Ce type de modélisation correspond au niveau intermédiaire d'intégration des connaissances biologiques. Elle permet de prédire la distribution du flux métabolique dans un espace de solutions, en partant de l'hypothèse d'un état stable, quasi-stationnaire (Kauffman et al., 2003; Price et al., 2003). Les flux métaboliques sont représentés par la vitesse des réactions chimiques et des transports. Ces relations sont décrites par une matrice stœchiométrique (Patil et al., 2004). Des variables quantitatives sont utilisées pour exprimer les vitesses présentées dans cette matrice. Cette méthode ne nécessite pas de connaître les paramètres cinétiques des réactions intégrées dans le modèle. Pour cette raison, cette méthode peut être appliquée sur des réseaux de grande taille.

De ce fait, le modèle à base de contraintes permet d'obtenir une ou plusieurs cartes de flux qui décrivent la répartition et les vitesses des réactions au sein du réseau métabolique. La prédiction par ces modèles peut être améliorée par la contrainte de l'espace de solution. Ainsi, en appliquant des contraintes pertinentes, il est possible d'obtenir une seule carte de flux. Par contre, dans le cas d'un système sous-déterminé, c'est-à-dire avec un nombre de flux supérieur au nombre de métabolites, l'espace des solutions ne peut pas être totalement contraint et donc plusieurs cartes de flux sont possibles.

#### 2.2.2.2. Modélisation de la synthèse de la biomasse

Dans la modélisation métabolique, des connaissances sur la production de la biomasse doivent être intégrées afin de prédire le flux de croissance du microorganisme et l'impact de celui-ci sur l'ensemble des flux métaboliques. Pour cela, une réaction artificielle, dite « réaction de biomasse » est ajoutée dans le modèle métabolique. Cette réaction regroupe l'ensemble des précurseurs nécessaires à la synthèse des macromolécules constitutrices de la biomasse.

Selon l'objectif de la modélisation et le type du modèle, la biomasse peut être présentée par une composition globale ou simplifiée. Dans le cas d'une composition globale, la réaction de biomasse est constituée d'un ensemble de sous-réactions présentant chacune la synthèse d'un type de macromolécules à partir de ses précurseurs. Les macromolécules considérées dans une équation de biomasse globale sont les protéines, l'ADN, l'ARN, les acides gras libres, les triglycérides, les phospholipides, les lipo-polysaccharides, les polysaccharides libres, le peptidoglycane et les cofacteurs. D'autre part, afin de simplifier la complexité du système biologique et la masse des informations à prendre en considération, la plupart des méthodes de

modélisation métabolique se base sur des solutions simplifiées, intégrant plus ou moins d'informations adaptées selon le microorganisme étudié. Cette méthode, basée sur la démarche d'Ingraham et al. (1983), s'établit en trois étapes. La première étape consiste à décomposer la cellule bactérienne en structures macromoléculaires connues (protéines, paroi, acides nucléiques, ...). Puis, les voies de biosynthèse de ces macromolécules sont étudiées afin de déterminer la nature et la quantité de monomères et d'énergie nécessaire (acides aminés, acides gras, acides nucléiques, sucres, ATP, NADH et NADPH). Ensuite, les métabolites précurseurs, appartenant aux voies du métabolisme central et des composés énergétiques, permettant la synthèse de tous les monomères, sont identifiés. Cette méthode simplifiée permet de déterminer les métabolites précurseurs nécessaires pour la synthèse de la biomasse à partir de la source de carbone et d'énergie. Ces métabolites sont exprimés par des proportions par rapport à un gramme de biomasse (en mmol/ g DW).

La composition de la biomasse et les précurseurs consommés dépendent sensiblement des conditions de croissance, notamment des conditions environnementales, de la vitesse de croissance ainsi que des perturbations génétiques. À chaque condition de croissance devrait être établie une équation de biomasse spécifique. Dans le but de simplifier la représentation d'un système biologique, une seule équation est généralement utilisée, pour les mêmes conditions environnementales, tout au long d'un procédé. Dans le cas de *C. glutamicum*, certaines équations de biomasse ont été établies lors de croissance sur glucose (Marx et al., 1996a) ou sur lactate (Cocaign-Bousquet and Lindley, 1995) ainsi que dans des conditions de limitation en glucose (Cocaign-Bousquet et al., 1996) (Annexe 1). Ces études ont été basées sur une composition simplifiée de biomasse alors que d'autres études (Shinfuku et al., 2009) ont modélisé la biomasse par une équation globale plus complexe.

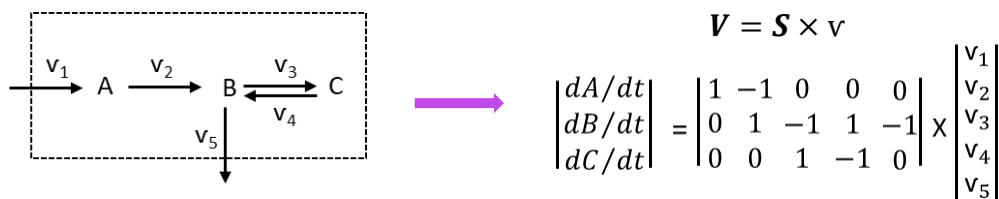
### 2.2.3. Méthodes de résolution

Différentes approches ont été développées pour prédire l'état d'un réseau métabolique reconstruit. Certaines approches, FBA (Flux Balance Analysis) et MFA (Metabolic Flux Analysis), sont basées sur l'hypothèse de l'état quasi-stationnaire. La méthode FBA est largement utilisée pour prédire la distribution des flux intracellulaires (Orth et al., 2010). Ayant été utilisée au cours de ce travail, elle sera détaillée par la suite. Dans le cas de modèles métaboliques simplifiés, la méthode MFA (Metabolic Flux Analysis) peut être utilisée afin de déterminer la répartition des flux métaboliques, en se basant sur la minimisation des différences

entre les données expérimentales et les valeurs calculées par le modèle (Llaneras and Picó, 2008; Palsson, 2006).

### 2.2.3.1. Flux Balance Analysis (FBA)

L'analyse FBA est constituée de deux étapes : (1) la construction d'une matrice stœchiométrique et la définition de contraintes, et (2) l'optimisation d'une fonction « objectif » par programmation linéaire. Comme déjà évoqué dans la partie « formulation du modèle métabolique », la première étape consiste à convertir le réseau métabolique en une représentation mathématique sous forme d'une tabulation (matrice stœchiométrique) dont les colonnes représentent les métabolites, les lignes, les flux et les cases, les coefficients stœchiométriques. Ces coefficients représentent la relation entre un métabolite et les flux définis dans le modèle. Le coefficient est négatif pour les composants consommés et positif pour les métabolites produits. Le coefficient zéro est attribué si le métabolite n'est pas impliqué dans la réaction (Figure I.21).



**Figure I.21** : Exemple de conversion d'un réseau métabolique en une représentation mathématique. **S** correspond à la matrice stœchiométrique. **V** et **v** représentent les vecteurs des concentrations de métabolites et les flux des réactions, respectivement, impliqués dans le modèle métabolique.

Ensuite, un état quasi stationnaire est appliqué aux équations du système. Celui-ci se base sur l'hypothèse que les intermédiaires réactionnels sont consommés dès qu'ils sont formés ; c'est la loi de conservation de masse. La concentration des métabolites intracellulaires reste donc constante et la vitesse de consommation est équilibrée par la vitesse de production. Donc, le produit de la matrice stœchiométrique (**S**) et du vecteur de flux des réactions (**v**) est un vecteur nul (vecteur de vitesse des réactions).

État quasi-stationnaire :  $S \times v = 0$

Cette hypothèse de l'équilibre des masses à l'état quasi-stationnaire permet de simplifier et de définir les limites du système étudié. Les contraintes d'équilibre, représentées par des équations, sont le principal support du modèle FBA. Ainsi, la stœchiométrie du système impose des contraintes sur le flux des métabolites à travers le réseau pour rendre le système solvable. Ce

système ne dépend donc que de la stœchiométrie et du vecteur de flux. Ensuite, d'autres contraintes sont appliquées sur les flux en imposant des bornes maximales et minimales pour chaque flux dans le réseau métabolique. Ces égalités et ces inégalités définissent l'espace des distributions de flux admissibles d'un système.

La deuxième étape consiste à définir un objectif correspondant à un phénotype cellulaire. Cet objectif est formulé à l'aide d'une fonction « objectif ». Cette dernière correspond généralement à une réaction du réseau métabolique dont le flux est maximisé ou minimisé. La fonction « objectif » permet de formuler différents types de contraintes correspondant par exemple à la croissance cellulaire, à la synthèse d'un produit ou à la minimisation de la consommation d'ATP. Comme évoqué précédemment, dans le cas d'optimisation de la croissance cellulaire, une réaction artificielle de la production de biomasse est ajoutée dans le modèle. La fonction « objectif » est formalisée dans le modèle de manière suivante :

Objectif :

$$\max Z = c^T \times v$$

Sous contraintes :

$$\begin{vmatrix} 1 & -1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & -1 & 1 & -1 \\ 0 & 0 & 1 & -1 & 0 \end{vmatrix} \begin{vmatrix} v_1 \\ v_2 \\ v_3 \\ v_4 \\ v_5 \end{vmatrix} = 0$$

Et  $lb_i \leq v_i \leq Ub_i$

Où  $c^T$ , représentant la fonction « objectif », est un vecteur de taille n (le nombre des réactions). Il contient 1 sur la ligne correspondante à la réaction objectif et 0 sur les n-1 autres lignes.  $v$  est un vecteur de flux contraints par des bornes minimales et maximales,  $lb$  et  $Ub$ , respectivement.

Ce problème constitue un programme linéaire qui peut être résolu par un optimiseur linéaire. Il existe différents algorithmes de programmation linéaire comme COBRA Toolbox et OptFlux (Edwards et al., 2002; Kauffman et al., 2003; Orth et al., 2010). Le principe de la programmation linéaire est présenté en annexe 2.

La méthode FBA est limitée à une analyse qualitative des réseaux métaboliques, sous l'hypothèse de l'état quasi-stationnaire. Afin de bien comprendre les phénomènes métaboliques intracellulaires et caractériser l'état transitoire du métabolisme cellulaire, d'autres approches de modélisation, basée aussi sur la stœchiométrie, ont été introduit, comme par exemple, la dFBA (Dynamic Flux Balance Analysis).

### 2.2.3.2. Dynamic flux balance analysis (dFBA)

Cette méthode combine l'analyse du réseau métabolique basée sur l'hypothèse de l'état quasi-stationnaire pour le métabolisme intracellulaire avec un modèle cinétique décrivant l'impact des conditions environnementales. Elle applique la résolution FBA en optimisant la production de biomasse à chaque intervalle de temps ( $dt$ ) et est résolue par programmation linéaire (LP) (Höffner et al., 2013; Mahadevan et al., 2002; Varma and Palsson, 1994). Cette méthode prend en considération aussi la variation des concentrations en substrats et en produits à chaque intervalle de temps. En supposant que le métabolisme est à l'équilibre à chaque pas de temps, l'intégration des flux permet de décrire l'évolution des concentrations extracellulaires au cours du temps (Mahadevan et al., 2002).

$$C_i(t + dt) = S_i \times v(t) \times X(t) \times dt + C_i(t)$$

$$X(t + dt) = \mu(t) \times X(t) \times dt + X(t)$$

$C_i(t + dt)$  et  $C_i(t)$  représentent les concentrations en métabolite  $i$  à l'instant  $(t+dt)$  et  $t$ , respectivement.  $X(t + dt)$  et  $X(t)$  sont les concentrations en biomasse à l'instant  $(t+dt)$  et  $t$ , respectivement.  $S_i$  et  $v(t)$  sont, respectivement, le vecteur des coefficients stœchiométriques correspondant à un métabolite  $i$  ( $i^{\text{ème}}$  ligne de la matrice stœchiométrique  $S$ ) et le vecteur des flux à l'instant  $t$ . Le produit de ces deux vecteurs donne la variation de concentration d'un métabolite  $i$  pendant le pas du temps  $dt$  ( $dC_i/dt$ ).  $\mu(t)$  est le flux de production de biomasse.

Cette méthode a été appliquée pour l'étude de la croissance d'*E. coli* dans un milieu avec du glucose comme seule source carbonée, et de la production d'acétate au cours des cultures en batch et en fed-batch. Elle a permis de prédire et comprendre la croissance diauxique chez cette bactérie en culture discontinue (Mahadevan et al., 2002; Varma and Palsson, 1994).

La méthode dFBA a été également utilisée pour étudier la production de l'éthanol dans une co-culture de *S. cerevisiae* et *Scheffersomyces stipitis*. Ces auteurs ont montré la capacité d'un

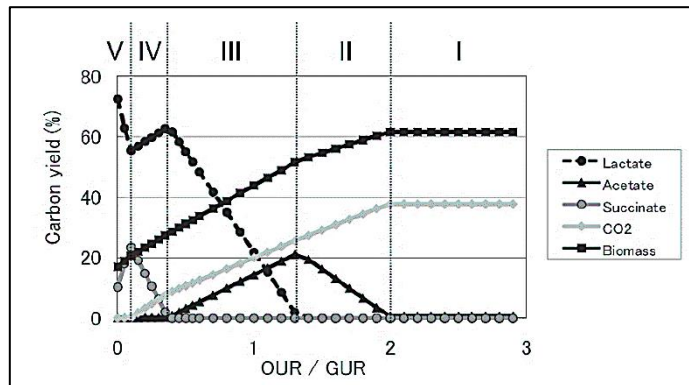
modèle métabolique dynamique à piloter un procédé et à guider des modifications génétiques pour améliorer la production de l'éthanol en microaérobiose en utilisant deux substrats carbonés, le glucose et le xylose (Hanly and Henson, 2013).

#### 2.2.3.3.Exemples de modèles métaboliques de *C. glutamicum*

Dans le cas de *C. glutamicum*, différents modèles ont été construits (Tableau 1.7). Ces modèles ont été largement utilisés pour la prédiction de la production des acides aminés comme la lysine, la valine et l'histidine, ainsi que la croissance de différentes souches de *C. glutamicum* dans différentes conditions environnementales. En revanche, l'utilisation de chaque modèle est généralement limitée à des applications particulières, en raison de la simplification du métabolisme et du manque d'informations importantes pour certaines réactions et voies métaboliques. Parmi ces modèles, le modèle iJM658 (Mei et al., 2016), a été construit à partir des informations génomiques de *C. glutamicum* S9114. Cette souche a été créée par mutagénèse et elle est largement utilisée pour la production industrielle de L-glutamate en Chine. Ce modèle contient des informations sur les systèmes de consommation et d'excrétion du L-glutamate permettant son utilisation pour l'étude et la prédiction de la production de cet acide aminé. Par contre, il ne peut pas être appliqué à une autre souche, *C. glutamicum* ATCC13032, en raison de différences dans les génomes de ces deux souches (Mei et al., 2016). Un autre modèle a été proposé, par Kjeldsen and Nielsen (2009a), pour *C. glutamicum* ATCC13032 permettant la prédiction de la production de lysine. En 2017, Zhang et al. (2017) ont établi un nouveau modèle pour cette même souche, appelé iCW773. Ce modèle est capable de prédire, avec précision, la croissance et la distribution de flux cellulaires dans différentes conditions de croissance. Ainsi, il a permis de proposer des interventions génétiques pour l'amélioration de la production de proline, de L-lysine, de 1,2-propanediol et d'iso-butanol (Zhang et al., 2017). De plus, ce modèle a été utilisé récemment pour l'amélioration de la production de trans-4-hydroxyl-L-proline par *C. glutamicum*, en désactivant la succinyl-COA synthase afin de diriger l' $\alpha$ -cétoglutarate vers l'hydroxylation de proline (Zhang et al., 2019).

D'autre part, le modèle développé par Kjeldsen and Nielsen (2009a), Model<sub>Cg1</sub>, a été modifié en modèle Model<sub>Cg2</sub>, constitué de 502 réactions et 423 métabolites, afin de prédire la production de lysine (Shinfuku et al., 2009). Ce modèle a été aussi utilisé pour simuler l'influence de l'apport en oxygène sur le comportement de *C. glutamicum*. Il est à noter que ce modèle est, à ce jour, le seul proposé pour prédire la production des acides organiques par cette bactérie en limitation en oxygène. Les résultats de ce travail sont présentés par des rendements

carbonés de conversion du glucose en biomasse et acides organiques en fonction du ratio vitesse de consommation d'oxygène/vitesse de consommation de glucose (OUR/GUR) (figure I.22).



**Figure I.22 :** Modélisation de l'impact du rapport OUR/GUR sur les rendements carbonés de conversion du glucose en acides organiques, biomasse et CO<sub>2</sub> (Shinfuku et al., 2009).

Lors de la phase de transition de l'aérobiose à l'anaérobiose, l'impact du rapport OUR/GUR peut être divisé en cinq phases principales (figure I.22): La première phase (I, OUR/GUR > 2) correspond à la phase d'aérobiose. C'est la phase de la production de biomasse et de CO<sub>2</sub>. La deuxième phase (II, 1,3 < OUR/GUR < 2) commence par une chute de la production de biomasse et de CO<sub>2</sub>. Suite à la diminution de l'apport en oxygène, une partie du glucose est convertie en acétate pour produire d'ATP. La phase trois (III, 0,4 < OUR/GUR < 1,3) correspond à la diminution de la production de biomasse, de CO<sub>2</sub> et d'acétate et au déclenchement de la production de lactate. En raison du manque d'oxygène, la bactérie adapte son métabolisme à la production de lactate et arrête progressivement le cycle de Krebs afin de ré-oxyder le NADH produit. La phase quatre (IV, 0,1 < OUR/GUR < 0,4) intervient à partir d'un OUR/GUR de l'ordre de 0.4. La bactérie adapte son métabolisme cette fois-ci à la production de succinate au lieu de lactate. En effet, la production de succinate permet d'oxyder 2 fois plus de NADH que la voie de synthèse du lactate. La phase cinq (V, OUR/GUR < 0,1) correspond à des ratios OUR/GUR très faibles. Une ré-augmentation de la production de lactate a lieu contre une diminution de la production de succinate. Ceci a été expliqué par l'activation de l'enzyme malique qui transforme le malate en pyruvate. Le malate, précurseur du succinate étant moins disponible, la synthèse de ce dernier diminue. L'excédent de pyruvate est ensuite converti en lactate.

Les résultats de simulation par ce modèle métabolique complet ont été confrontés à des données expérimentales mais de façon réduite. En effet, seuls deux points de la phase de production de succinate et un point pour la phase de production d'acétate ont été étudiés. Il a été montré que, pour ces 3 états particuliers, la prédiction de ce modèle métabolique est en accord avec les données expérimentales (Shinfuku et al., 2009).



**Tableau I.7** : Exemples de modèles métaboliques complets ou simplifiés, de *C. glutamicum*.

Espèces	Modèle	Méthode d'optimisation	Gènes	Métabolites	Réactions	Application	Références
<b>Modèles métaboliques à l'échelle génomique</b>							
<i>C. glutamicum</i> ATCC13032	iCW773	FBA Cobra Toolbox (GLPK)	773	950	1207	Production de L-histidine	(Schwentner et al., 2019)
						Croissance sur 7 différentes sources carbonées Production de L-lysine 1,2 propanédiol isobutanol et L-proline	(Zhang et al., 2017)
<i>C. glutamicum</i> S9114	iJM658	FBA Cobra Toolbox (GLPK)	658	984	1065	Croissance sur différentes sources de carbone et d'azote Production de glutamate Amélioration de la production de $\gamma$ -aminobutyrate et isoleucine	(Mei et al., 2016)
<i>C. glutamicum</i> ATCC13032	Model <sub>Cg</sub> 1	BioOptv4.9 software	247	411	246	Production de lysine	Kjeldsen and Nielsen, 2009;
	Model <sub>Cg</sub> 2	FBA Lindo _ Matlab	277	423	502	Profils des flux métaboliques pour différents niveaux d'oxygénation (production des acides organiques) Production de lysine	Shinfuku et al., 2009
<b>Modèles métaboliques simplifiés</b>							
<i>C. glutamicum</i> ATCC13032	-	<sup>13</sup> C MFA	-	24	22	Comparaison de la production de L-valine par une souche sauvage et 4 souches mutantes de <i>C. glutamicum</i> : ATCC 13032, $\Delta ace$ , $\Delta ace$ (pJC4ilvBNCE), $\Delta ace \Delta pqo$ (pJC4ilvBNCE) et $\Delta ace \Delta pqo$ (pJC4ilvBNCE) (pBB1pntAB)	(Bartek et al., 2011)
	-	<sup>13</sup> C MFA	-	-	81	Étude de la voie anaplérotique chez <i>C. glutamicum</i> : identification des flux anaplérotiques.	(Kappelmann et al., 2016)
<i>C. glutamicum</i> ATCC 21253	-	-	-	37	36	Étude de la distribution des flux métaboliques pendant la phase de croissance et la production de lysine par une souche sauvage de <i>C. glutamicum</i> .	(Vallino and Stephanopoulos, 2000)

### 3. Modélisation cinétique

La modélisation cinétique est une méthode largement utilisée aussi pour l'étude et la compréhension de divers phénomènes biologiques chez différents microorganismes. Le modèle cinétique permet de prédire l'évolution dynamique du système étudié, de contrôler et d'optimiser les conditions opératoires de certains procédés. Il se base sur des observations cinétiques macroscopiques au cours d'une culture.

En se basant sur les connaissances des phénomènes impliqués ou supposés et les expériences réalisées pour étudier ces phénomènes, différents modèles peuvent être utilisés pour décrire les cinétiques de croissance microbienne, de production de molécules d'intérêt et de consommation de substrat. Ces modèles ordinaires sont souvent représentés par des équations différentielles.

Dans les modèles cinétiques, les paramètres cinétiques dépendent souvent des conditions expérimentales dans lesquelles ils ont été identifiés. Le modèle primaire est alors complété par des modèles secondaires qui tentent de décrire la relation de dépendance entre les paramètres cinétiques du modèle primaire et les conditions expérimentales. Ce type de modèles est largement utilisé pour décrire l'influence de la température et du pH sur les cinétiques des bactéries lactiques, par exemple. Les corrélations entre les paramètres cinétiques et les conditions environnementales sont généralement présentées par des relations polynomiales (Beal et al., 1989; Geeraerd et al., 2004; Ng and Schaffner, 1997). Dans la suite de cette partie, des exemples de modèles primaires non-structurés sont présentés.

#### 3.1. Modèles cinétiques

##### 3.1.1. Modèles décrivant la cinétique de croissance microbienne

Selon l'objectif de la modélisation et les phases de croissance à étudier, différents modèles décrivant la cinétique de croissance microbienne peuvent être utilisés. Ils s'appuient sur une représentation de la vitesse spécifique de croissance  $\mu$  ( $h^{-1}$ ) définie comme suit :

$$\mu = \frac{r_X'''}{X}$$

où  $X$  ( $g \cdot L^{-1}$ ) et  $r_X'''$  ( $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ ) sont respectivement la concentration en biomasse, la vitesse volumique de croissance.

Il existe 3 modèles initiaux : modèle exponentiel, modèle logistique et modèle de Monod.

### Modèle exponentiel

C'est le premier modèle qui a été proposé pour modéliser la croissance d'une population. Il a été proposé par Malthus en 1798. La croissance de la population est représentée sous la forme :

$$\mu = \beta$$

Le paramètre  $\beta$  représente la vitesse spécifique de croissance Malthusienne.

Un bilan dans un réacteur en mode discontinu conduit à :  $dX/dt = \beta X$ . Ce modèle décrit seulement la phase exponentielle de croissance de la population. Il ne permet pas de représenter les phases non exponentielles, en particulier la phase stationnaire où la concentration en population tend vers un nombre fini (la concentration maximale).

### Modèle logistique

Le modèle logistique, appelé également modèle de Verhulst (1838) a été proposé la première fois pour décrire la croissance d'une population animale  $y$  qui se stabilise au cours du temps. Ce modèle représente l'inhibition de la croissance de la population par sa concentration elle-même. Il est exprimé sous forme d'une équation différentielle :

$$\frac{dy}{dt} = ay \left(1 - \frac{y}{K}\right)$$

Ce modèle a été utilisé par la suite pour décrire la vitesse spécifique de croissance microbienne, sous la forme suivante :

$$\mu = \mu_{max} \left(1 - \frac{X}{X_{max}}\right)$$

où  $X_{max}$  (g/L) est la concentration maximale en biomasse obtenue à la fin de la croissance, correspondant à la phase stationnaire. Pour ce modèle, la phase de latence est ignorée et donc le taux de croissance maximal,  $\mu_{max}$ , est supposé atteint dès le début de la culture.

### Modèle de Monod

Le modèle de Monod (1941) est un modèle référence pour la description de la croissance microbienne. Ce modèle prend en considération l'effet de la limitation en substrat. Il représente la relation entre la vitesse spécifique de croissance  $\mu$  et la concentration en substrat limitant  $S$ .

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S}$$

Avec  $\mu_{max}$  ( $h^{-1}$ ), le taux spécifique maximal de croissance,  $K_S$ , la constante de saturation. Cette dernière représente la concentration en substrat à laquelle  $\mu$  est égale à la moitié de  $\mu_{max}$ . Selon la concentration en substrat et  $K_S$ , le modèle de Monod peut être simplifié :

- Si  $K_S \ll S$ , la vitesse spécifique de croissance est proche de  $\mu_{max}$  ( $\mu \approx \mu_{max}$ ). Le modèle cinétique est d'ordre 0.
- Si  $K_S$  est proche de  $S$ , l'équation de Monod décrit une cinétique réactionnelle d'ordre compris entre 0 et 1.
- Si  $K_S \gg S$ , le modèle cinétique est d'ordre 1.

Comme précédemment décrit, les modèles initiaux représentent la croissance microbienne pendant certaines phases de croissance en négligeant les autres phases, en particulier la phase de latence. Certaines études ont envisagé d'adapter ces modèles initiaux en prenant en considération cette phase. Pour cela, un décalage temporel a été introduit en remplaçant la variable  $t$  par la différence  $(t - \lambda)$  entre le temps  $t$  et la durée de latence  $\lambda$ .

D'autre part, les trois modèles initiaux sont des modèles simplifiés, appliqués dans des conditions particulières. Mais, en réalité, le microorganisme est un système complexe où plusieurs phénomènes peuvent coexister provoquant un ralentissement de la croissance, comme l'inhibition par le substrat et/ou le produit. De même, en présence de plusieurs substrats, des phénomènes de diauxie ou de co-consommation peuvent avoir lieu. Afin de tenir en compte de ces phénomènes observés macroscopiquement, certaines modifications ont été appliquées sur les modèles initiaux. Des exemples de modèles modifiés sont reportés dans le tableau I.8.

**Tableau I.8 :** Lois cinétiques non-structurées décrivant la croissance microbienne sur un ou plusieurs substrats.

Modèle	Remarques	Références
<b>Modification du terme de limitation en substrat</b>		
$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_S - S}$		(Hanson and Tsao, 1972)
$\mu = \mu_{max} \frac{S^n}{K_S + S^n}$	n : constante strictement positive	(Moser, 1958)
<b>Inhibition par le substrat</b>		
$\mu = \mu_{max} \frac{S}{(K_S + S) \left(1 + \frac{S}{K_i}\right)}$	$K_i$ : constante d'inhibition	(Andrews, 1968)
$\mu = \frac{1}{X} \mu_{max} \frac{S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_i}} \left(1 + \frac{S}{K}\right)$	$K_i$ : constante d'inhibition K : constante	(Edwards, 1970)
$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_i} \left(1 + \frac{S}{K}\right)}$		
$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S}$ ; si $S < S_c$ $\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S} - K_i(S - S_c)$ ; si $S > S_c$	$K_i$ : constante d'inhibition $S_c$ : concentration critique en substrat	(Wayman and Tseng, 1976)
$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S} \left(1 - \frac{S}{S_c}\right)^n$	$S_c$ : concentration critique en substrat n : constante strictement positive	(Luong, 1987)
$\mu = \mu_{max} \left(1 - \frac{S}{S_c}\right)^n \frac{S}{K_S + S - \left(1 - \frac{S}{S_c}\right)^m}$	$S_c$ : concentration critique en substrat n et m: constante strictement positive	(Han and Levenspiel, 1988)
<b>Inhibition par le produit</b>		
$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S} \frac{K_p}{K_p + P}$	$K_p$ : constante d'inhibition	(Aiba et al., 1968)
$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S} (1 - K_p P)$	$K_p$ : constante d'inhibition	(Ramkrishna et al., 1967)
$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S} \left(1 - \frac{P}{P_c}\right)^n$	$P_c$ : concentration critique en produit n : constante strictement positive	(Levenspiel, 1980)
$\mu = \mu_{max} \left(1 - \frac{P}{P_c}\right)^n$		
$\mu = \mu_{max} \left(1 - \frac{P}{P_c}\right)^n \frac{S}{K_S + S - \left(1 - \frac{P}{P_c}\right)^m}$	$P_c$ : concentration critique en produit n et m : constante strictement positive	(Han and Levenspiel, 1988)
$\mu = \mu_{max} \left(1 - \frac{X}{X_c}\right)^n \frac{S}{K_S + S - \left(1 - \frac{X}{X_c}\right)^m}$	$X_c$ : concentration critique en biomasse n et m : constante strictement positive	
$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S} \left(1 - \left(\frac{P}{P_c}\right)^n\right)$	$P_c$ : concentration critique en produit n : constante strictement positive	(Luong, 1985)
$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S}, P < P_c$ $\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S} e^{(-k(P - P_c))}$ $P > P_c$	$P_c$ : concentration critique en produit k : constante strictement positive	(Yeh et al., 1991)
<b>Inhibition par plusieurs produits</b>		

$\mu = \mu_{max} \left[ \prod_i \left( 1 - \frac{P_i}{P_C} \right)^{\alpha_i} \right]$	$P_i$ : concentration en $i^{\text{ème}}$ produit inhibiteur $P_C$ : concentration critique en $i^{\text{ème}}$ produit inhibiteur $\alpha_i$ : constante	(Zeng et al., 1994)
<b>Croissance sur plusieurs substrats</b>		
$\frac{\mu}{\mu_{max}} = \frac{S_1}{K_1+S_1} \left( \frac{S_2}{K_2+S_2} \right)$	$k_1$ et $k_2$ : constante de saturation correspondant au substrat $S_1$ et $S_2$	(Megee III et al., 1972)
$\frac{\mu}{\mu_{max}} = W_1 \frac{S_1}{K_1+S_1} + W_2 \frac{S_2}{K_2+S_2}$ $W_1 = \frac{\frac{S_1}{K_1}}{\frac{S_1}{K_1} + \frac{S_2}{K_2}} ; W_2 = \frac{\frac{S_2}{K_2}}{\frac{S_1}{K_1} + \frac{S_2}{K_2}}$		(Mankad and Bungay, 1988)
$\mu(S_1, S_2) = \mu_{max} \frac{\frac{\mu_{max1} S_1}{K_1+S_1} + \frac{\mu_{max2} S_2}{K_2+S_2}}{\frac{\mu_{max1} S_1}{K_1+S_1} + \frac{\mu_{max2} S_2}{K_2+S_2} + \left(\frac{K_1}{K_2}\right) S_2}$		(Yoon et al., 1977)

### 3.1.2. Modèles décrivant la cinétique de formation d'un produit

La vitesse volumique de production de molécules d'intérêts  $r_p'''$  dépend à la fois de la vitesse volumique de croissance,  $r_x'''$ , et de la concentration en biomasse,  $X$ . En général, la formation des produits est représentée par le modèle de Luedeking-Piret (1959) :

$$r_p''' = \alpha r_x''' + \beta X$$

Les paramètres  $\alpha$  (g/ g) et  $\beta$  (g/ g U.O.D/ h) sont les constantes de modèle de Luedeking-Piret. Ce modèle montre un couplage partiel de la production de métabolites avec la croissance microbienne.

Divers modèles décrivant la production d'un métabolite, proposés dans la littérature, sont dérivés du modèle de Luedeking-Piret. Des exemples de ces modèles sont reportés dans le tableau I.9.

**Tableau I.9** : Loix cinétiques non-structurées décrivant la production des métabolites.

Modèles	Remarque	Références
<b>Modèles dérivés de modèle de Luedeking-Piret</b>		
$r_p''' = a \ln X / \mu - b - c P$	a, b et c : constantes empiriques X : concentration en biomasse P: concentration en produit	(Holzberg et al., 1967)
$v = a \mu + b(1 - e^{-c \mu})$	a, b et c : constantes empiriques v : vitesse spécifique de production	(Amrane and Prigent, 1994)
$v = (a \mu + \beta) \frac{K_i}{K_i + S}$	$\alpha$ et $\beta$ : constante du modèle de Luedeking-Piret K <sub>i</sub> : constante d'inhibition S : concentration en substrat	(Wang et al., 2008)
<b>Autres modèles</b>		
$v = v_{max} \frac{S}{K_S + S} \left(1 - \left(\frac{P}{P_c}\right)^m\right)$	K <sub>s</sub> : constante de saturation P <sub>c</sub> : concentration critique en produit m : constante strictement positive	(Luong, 1985)
si P < P <sub>c</sub> : $v = v_{max} \frac{S}{K_S' + S}$ ; si P ≥ P <sub>c</sub> : $v = v_{max} \frac{S}{K_S + S} e^{(-k(P - P_c))}$	k : constante empirique v <sub>max</sub> : vitesse spécifique maximale	(Yeh et al., 1991)
$v = a S$	a : constante cinétique	(Hanson and Tsao, 1972)
$v = v_{max} e^{(-kP)}$	k : constante empirique	(Aiba et al., 1968)
$v = v_{max} \frac{S}{K_S + S} \frac{K_P}{K_P + P}$	k <sub>s</sub> : constante de saturation k <sub>p</sub> : constante d'inhibition	(Ohara et al., 1992)

### 3.1.3. Modèles décrivant la cinétique de consommation d'un substrat

La vitesse volumique de consommation d'un substrat,  $r_s'''$ , dépend des besoins d'une cellule pour la croissance, de la production des métabolites et du besoin énergétique. En tenant compte de ces trois activités, la vitesse volumique est représentée par la formule suivante :

$$r_s''' = \frac{1}{Y_{X/S}} \mu X + \frac{1}{Y_{P/S}} r_p''' + m X$$

Les variables  $Y_{X/S}$  (g DW/ g substrat) et  $Y_{P/S}$  (g produit/ g substrat) correspondent aux rendements en biomasse et au produit, respectivement, par rapport au substrat.  $m$  (g substrat/ g DW/ h) représente la constante de maintenance.

### 3.1.4. Modèles décrivant la maintenance

#### Généralités

Afin de correctement décrire les cinétiques microbiens, il est parfois important de prendre en considération le terme de maintenance. Ce dernier représente la consommation d'énergie pour toute fonction autre que la production de cellules (Pirt and Hinshelwood, 1965). Il exprime l'énergie nécessaire pour tout processus non lié à la croissance comme l'osmorégulation, la perte extracellulaire de composés non impliqués dans l'osmorégulation, les mécanismes de défense au stress oxydatif, la mobilité cellulaire, la synthèse ou la réparation des macromolécules, le changement des voies métaboliques (van Bodegom, 2007; Wang and Post, 2012). Le besoin énergétique pour la maintenance a été différencié en deux types : maintenance endogène et maintenance physiologique. La maintenance physiologique prend en considération l'énergie nécessaire pour quatre fonctions non liées à la croissance seulement : l'osmorégulation, la mobilité cellulaire, le mécanisme de défense et la synthèse et le renouvellement des composés macromoléculaires (van Bodegom, 2007; Wang and Post, 2012). Le deuxième type de maintenance, la maintenance endogène, est déduit à partir de l'utilisation du substrat après l'arrêt de la croissance (Dawes and Ribbons, 1965, 1964, 1962; Pirt and Hinshelwood, 1965). Récemment, un autre type de maintenance, appelée besoin énergétique minimal a été identifié. Ce type de maintenance exprime l'énergie utilisée pour les fonctions essentielles d'une cellule en absence de croissance suite à une limitation en substrat (Kempes et al., 2017).

Pour la détermination de la maintenance, certains processus sont pris en considération et d'autres sont négligés (van Bodegom, 2007). Dans certaines études, la maintenance a été évaluée soit par la maintenance endogène, soit par la maintenance physiologique.

#### Modèles de maintenance

La maintenance peut être modélisée généralement par deux modèles initiaux : le modèle de Herbert et le modèle Pirt (van Bodegom, 2007; Wang and Post, 2012). Le modèle de Herbert décrit la maintenance endogène, représentée comme un taux spécifique de croissance négatif :

$$\mu(S) = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S} - a$$

$$q(S) = \frac{\mu(S)}{Y_{max}} = \frac{\mu_{max} \frac{S}{K_S + S}}{Y_{max}}$$

(van Bodegom, 2007; Wang and Post, 2012)

$\mu$  : taux spécifique de croissance « réel » ( $s^{-1}$ )

$\mu_{max}$  : taux spécifique maximal de croissance ( $s^{-1}$ )

$S$  : concentration en substrat ( $g L^{-3}$ )

$a$  : **taux spécifique de maintenance** ( $s^{-1}$ )

$K_S$  : constant de Monod / constant de saturation

$Y_{max}$  : rendement maximal théorique en biomasse (déterminé en ignorant tous les processus non liés à la croissance) ( $g g^{-1}$ )



q : vitesse spécifique de consommation de substrat (g g<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>)

Dans le modèle de Pirt, la maintenance a été exprimée par une constante intégrée à la vitesse spécifique de consommation du substrat. Ce terme de maintenance est appelé coefficient de maintenance ou maintenance non liée à la croissance (Pirt, 1982; van Bodegom, 2007; Wang and Post, 2012).

$$\mu(S) = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S}$$

$$q(S) = \frac{\mu(S)}{Y_{max}} + m$$

(van Bodegom, 2007; Wang and Post, 2012)

$\mu$  : taux spécifique de croissance « réel » (s<sup>-1</sup>)

$\mu_{max}$  : taux spécifique maximal de croissance (s<sup>-1</sup>)

S : concentration en substrat (g L<sup>-1</sup>)

$K_S$  : constante de Monod / constante de saturation

**m : le coefficient de maintenance**

$Y_{max}$  : rendement maximal théorique en biomasse (déterminé en ignorant tous les processus non liés à la croissance) (g g<sup>-1</sup>)

q : vitesse spécifique de consommation de substrat (g g<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>)

Les deux modèles de Herbert et Pirt montrent que l'énergie pour la maintenance dépend seulement du temps ou de la biomasse. En revanche, certaines études ont montré que la maintenance dépend aussi de la phase de croissance et de la vitesse spécifique de croissance (Lipson, 2015; Pirt, 1982; Pirt and Hinshelwood, 1965; van Bodegom, 2007; Wang and Post, 2012). Ainsi, ces deux termes peuvent varier avec la concentration en substrat (Wang and Post, 2012). Afin de prendre en considération la relation entre la maintenance et, à la fois, la concentration en substrat et en biomasse, les modèles de base, de Herbert et de Pirt, ont été combinés pour donner le modèle suivant (Beefink et al., 1990; Wang and Post, 2012) :

$$\mu(S) = \mu_{max,C} h(S) - m_q [1 - h(S)]$$

$$q(S) = \frac{\mu_{max,C} h(S)}{Y_G} + m_q \frac{h(S)}{Y_G}$$

(Wang and Post, 2012)

$\mu_{max,C}$  : vitesse spécifique maximale de croissance (h<sup>-1</sup>)

$h(S)$  : fonction du substrat avec :

$$h(S = 0) = 0,$$

$$h(S) \rightarrow 1 \text{ si } S \gg K_S$$

$m_q$  : facteur de maintenance physiologique spécifique (h<sup>-1</sup>)

$Y_G$  : rendement maximal théorique en biomasse

Le modèle obtenu suite à une combinaison entre le modèle de Herbert et Pirt représente la maintenance en deux termes : l'un est lié à la biomasse et le deuxième au substrat.

De même, pour prendre en considération la relation entre la maintenance et la vitesse spécifique de croissance ( $\mu$ ), (Pirt, 1982) a adapté son modèle initial en intégrant le terme  $m_v \left(1 - \frac{\mu}{\mu_{max}}\right)$ .

Le modèle de Pirt modifié est présenté par l'équation suivante :

$$q = m_c + \frac{\mu}{Y_G} + m_v \left(1 - \frac{\mu}{\mu_{max}}\right)$$

(Pirt, 1982)

$m_c$  : coefficient de maintenance constant

$m_v \left(1 - \frac{\mu}{\mu_{max}}\right)$  : coefficient de maintenance lié à la croissance

Il existe de très nombreux modèles non-structurés, phénoménologiques selon le procédé étudié. Dans la plupart des cas, les cinétiques de croissance et de production des métabolites sont dérivées des modèles initiaux. Dans le paragraphe suivant, nous présentons, des exemples de modèles cinétiques de la croissance et de la production de molécules d'intérêt par *C. glutamicum*.

### **3.2.Exemples de modèles cinétiques développés pour des cultures de *C glutamicum***

Des modèles ont été proposés pour décrire les cinétiques de croissance de *C. glutamicum* dans des conditions de culture variées (limitation en substrat, inhibition par le produit ou le substrat) ainsi que les cinétiques de consommation du substrat et de production de molécules d'intérêt. Ces modèles sont reportés dans le tableau 1.10. La cinétique de croissance de cette bactérie a été modélisée à l'aide des trois modèles initiaux présentés ci-dessus. Les premiers modèles ont été proposés pour décrire la cinétique de croissance d'une souche productrice de glutamate (*C. glutamicum* ATCC 13869) (Bona and Moser, 1997a). Ces auteurs ont montré que la biotine était le substrat limitant pour la production de glutamate. La croissance a été modélisée par deux modèles : le modèle logistique et le modèle de Monod. Ces deux modèles prennent en considération la limitation en biotine. La phase de latence a également été prise en compte en introduisant le terme L ( $L = t - t_L$ ) dans le modèle proposé. Il a été montré que les deux modèles proposés simulaient parfaitement la croissance de *C. glutamicum* dans les conditions de cette étude. De plus, ces auteurs ont proposé un autre modèle pour la cinétique de croissance en utilisant cette fois-ci un modèle couplé du modèle de Monod et du modèle exponentiel (Bona and Moser, 1997b). Dans cette étude, un modèle exponentiel adapté décrivant la cinétique de la production de glutamate dans des conditions de limitation en biotine a été proposé. Le modèle de consommation de substrat n'a pris en compte que la croissance et la production de glutamate (Bona and Moser, 1997b). En revanche, Khan et al. (2005) ont proposé un modèle cinétique de croissance de *C. glutamicum* au cours d'un procédé de production de glutamate en tenant compte de l'inhibition de la croissance par le produit. Ce modèle cinétique présente deux termes : un terme de Monod décrivant la limitation en substrat (glucose) et un terme d'inhibition par le produit basé sur un modèle logistique. D'autre part, Shen et al. (2015) ont développé un

modèle cinétique décrivant la croissance de *C. glutamicum*, la consommation de glucose et d'urée et la production de bioflocculant au cours d'un procédé en mode discontinu. La cinétique de croissance a été décrite par un modèle de Levenspiel modifié en prenant en considération la corrélation entre la concentration maximale en biomasse et la concentration initiale en glucose. Un modèle de Luedeking-Piret modifié a été utilisé pour décrire la vitesse de production de bioflocculant en prenant compte la phase de latence. La vitesse de consommation de glucose décrit seulement le besoin pour la croissance et la maintenance alors que le besoin pour la production de bioflocculant a été négligé. Ce modèle a été testé sur différentes concentrations initiales en biomasse et en glucose (Shen et al., 2015). Récemment, un modèle cinétique décrivant la croissance de *C. glutamicum* sur des résidus lignocellulosiques contenant du glucose, du mannose et du xylose a été publié (Sinner et al., 2019). Une équation différentielle décrivant la vitesse de consommation de chacun de trois sucres a été proposé en se basant sur un modèle de Monod modifié. Un terme d'inhibition de la consommation de chaque sucre par la liqueur de sulfite usée a été introduit. La cinétique de croissance sur les trois sucres a été décrite comme la somme de la croissance sur chaque sucre en utilisant la vitesse de consommation de chaque sucre et le rendement de conversion de ce sucre en biomasse.

**Tableau I.10 :** Exemples des modèles cinétiques de *C. glutamicum* décrivant la croissance, la consommation de substrat et de la production de molécules.

<b>Production de glutamate dans des conditions de limitation en biotine</b> (Bona and Moser, 1997b)	<b>Vitesse spécifique de croissance</b>	$\mu = \mu_{max} \frac{b - b_{min}}{K_b + (b - b_{min})} (1 - \exp(-t/t_L))$ Avec $b = A_0/X$ et $b_{min} = A_0/A_m$
	<b>Vitesse de production de glutamate</b>	$q_p = q_{pmax} (1 - \exp(-t/t_m))$
	<b>Vitesse de consommation de glucose</b>	$r_S''' = -\frac{1}{Y_{X/S}} r_X''' - \frac{1}{Y_{P/S}} r_P'''$
$A_0$ : concentration initiale en biotine $A_m$ : concentration $b$ : concentration spécifique en biotine		$b_{min}$ : concentration spécifique minimale en biotine $t_L$ : temps de latence $t_m$ : temps de maturation
<b>Croissance dans des conditions de limitation en biotine</b> (Bona and Moser, 1997b)		<b>Vitesse de croissance</b>
$b_{min}$ : concentration spécifique minimale en biotine $b$ : concentration spécifique en biotine		$\frac{dX}{dt} = \mu_{max} \left(1 - \frac{b_{min}}{b}\right) L$ $\frac{dX}{dt} = \mu_{max} \frac{(b - b_{min})}{K_b - (b - b_{min})} L$ Avec $L = \{\tanh(t - t_L) + 1\}/2$
$b_{min}$ : concentration spécifique minimale en biotine $b$ : concentration spécifique en biotine		$t_L$ : temps de latence $K_b$ : constant de Monod pour la concentration spécifique de Monod
<b>Production de bioflocculant</b> (Shen et al., 2015)	<b>Cinétique de la production de biomasse</b>	$C_{x,0} = \frac{C_{x,0} \exp(\mu_m t)}{1 - \frac{C_{x,0}}{C_{x,max}} [1 - \exp(\mu_m t)]}$ Avec $C_{x,max} = C_{x,max0} + \frac{2A}{\pi} \frac{w}{4(C_{S,0} - C_{S,C})^2 + w^2}$
	<b>Vitesse de production de bioflocculant</b>	$r_P''' = Y_{P/X} \frac{dC_X}{d(t-t_d)} + \beta C_X$
	<b>Vitesse de consommation de glucose et d'urée</b>	$r_S''' = -\left(\frac{1}{Y_{X/S}} \frac{dC_X}{dt} + m C_X\right)$

		$r_U''' = -\frac{1}{Y_{X/U}} \frac{dC_X}{dt}$
$C_{i,0}$ : concentration initiale en i (i : biomasse (X), glucose (S), urée (U)) $C_{x,max}$ : concentration maximale en biomasse	$C_{i,max0}$ : concentration maximale en biomasse la plus faible $C_{S,C}$ : concentration initiale en glucose avec la concentration maximale en biomasse	m : coefficient de maintenance $t_d$ : temps de latence A et w : constants
<b>Croissance avec inhibition par L-glutamate*</b> (Khan et al., 2005)	<b>Vitesse de croissance</b>	$\frac{dX}{dt} = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S} \left(1 - \frac{P}{P_{max}}\right)^n X$
* : L-glutamate est le produit de la fermentation	$P_{max}$ : concentration maximale en L-glutamate	
<b>Croissance de <i>C. glutamicum</i> sur résidus lignocellulosique (glucose + mannose + xylose)</b> (Sinner et al., 2019)	<b>Vitesse spécifique de consommation du substrat i (glucose ou mannose ou xylose)</b>	$q_{S,i} = q_{Smax,i} \frac{C_{S,i}}{K_{S,i} \left(1 + \sum_{j=1, j \neq i}^3 \frac{C_{S,j}}{K_{S,j}}\right) + C_{S,i}} \frac{K_{I,SSL}}{K_{I,SSL} + C_{I,SSL}}$
	<b>Vitesse spécifique de croissance sur les trois substrats</b>	$\mu = \sum_{i=1}^3 q_{S,i} Y_{XS,i}$
$C_{S,i}$ : concentration en substrat i $K_{S,i}$ : constante de saturation du substrat i	$K_{I,SSL}$ : constante d'inhibition par SSL (Spent Sulfite liquor) liqueur de sulfite usée	$C_{I,SSL}$ : concentration en SSL $Y_{XS,i}$ : rendement de conversion du substrat i en biomasse

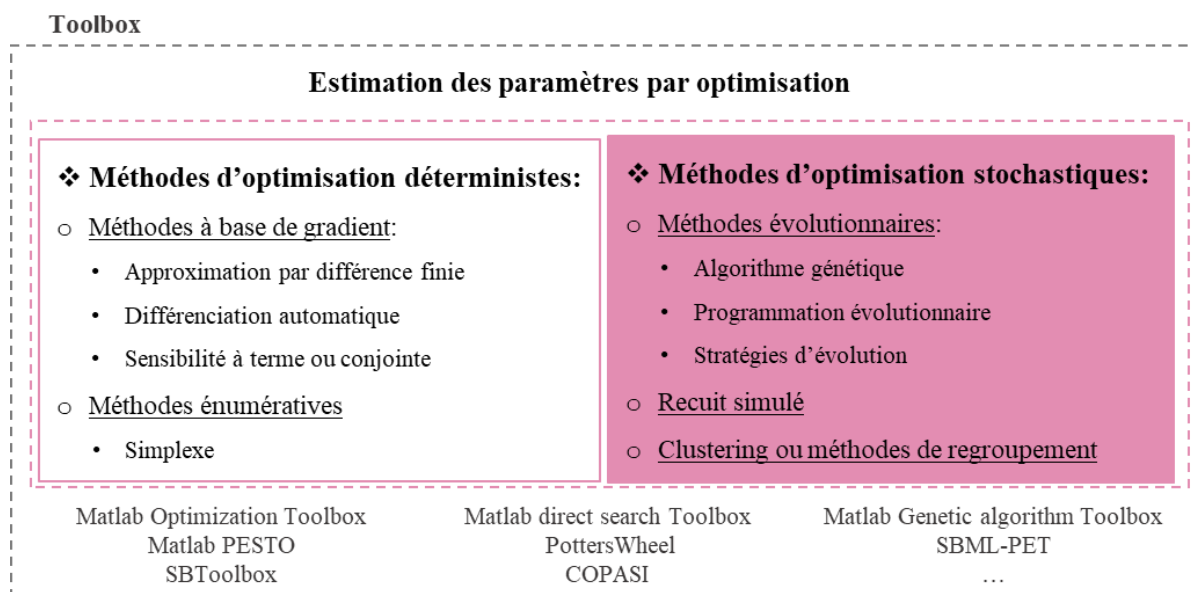
### 3.3.Méthode d'identification des paramètres du modèle cinétique

#### 3.3.1. Généralités

Un modèle cinétique est représenté par des variables d'état (concentrations en biomasse, produit, substrat), des paramètres permettant de quantifier les phénomènes décrits par ces variables (Das and Jayaprakash, 2018). Les valeurs de ces paramètres sont très importantes pour l'utilité du modèle cinétique pour l'explication et la prédiction de certains phénomènes biologiques. Elles permettent de connecter la structure du modèle proposé avec la réalité des données biologiques. Pour cela, l'estimation des paramètres est une étape clé de la modélisation.

La méthode d'estimation des paramètres dépend du type du système étudié (du type du modèle). Les modèles cinétiques peuvent être subdivisés en modèles linéaires et modèles non linéaires. Les paramètres d'un modèle linéaire peuvent rapidement être déterminés par une régression linéaire ou multiple. Contrairement au modèle linéaire, il est impossible de déterminer sans itération une solution optimale unique pour un modèle non linéaire. Des algorithmes d'optimisation sont nécessaires pour l'estimation des paramètres. Différentes méthodes d'optimisation peuvent être utilisées. Des exemples de ces méthodes sont reportés dans la figure I.23. Les méthodes déterministes, comme les méthodes énumératives et le gradient conjugué, permettent de trouver des solutions de manière méthodique et déterministe. Ces méthodes sont utilisées pour des problèmes de dimensions peu élevées. Par contre, les méthodes stochastiques (ou méthodes heuristiques), tels que les algorithmes évolutionnaires et le recuit simulé permettent de se rapprocher de l'optimum recherché dans des espaces de grande dimension mais elles peuvent se révéler lentes en matière de convergence. Les méthodes d'optimisation déterministe et stochastique peuvent être couplées pour améliorer la convergence.

Les méthodes d'optimisation peuvent être subdivisés en deux classes : locale et globale. Les méthodes d'optimisation locales convergent rapidement à un minimum. Comme son nom l'indique, la solution trouvée pourrait être un minimum local. Une fois que ce minimum est déterminé, la méthode est incapable de continuer le calcul pour déterminer le vrai minimum (minimum global). Si l'initialisation des valeurs des paramètres est suffisamment proche du minimum global, la méthode d'optimisation locale est capable de converger vers ce minimum global. Inversement, les méthodes d'optimisation globales sont capables de trouver l'optimum global d'une fonction.



**Figure I.23 :** Différentes méthodes d'optimisation et de logiciels utilisés pour l'estimation des paramètres des modèles cinétiques.

Dans la plupart des modèles cinétiques (non linéaire, stochastiques, hybrides, etc...), l'estimation des paramètres est une étape d'optimisation. L'objectif de celle-ci est de déterminer un vecteur de paramètres permettant de minimiser la différence entre les données expérimentales et celles simulées par le modèle, autrement de minimiser une fonction « objectif ». La définition de cette différence peut changer selon l'objectif de l'optimisation et le type du modèle cinétique étudié. Elle est généralement représentée par une somme des différences au carrée (SSE : sum of Squared Errors) ou critère des moindres carrés.

L'étape d'optimisation (estimation des paramètres ou identification paramétrique) devient compliquée dans le cas où la dimension du problème est grande. Il n'existe pas de méthode universelle pour l'identification paramétrique. Le choix de la méthode est donc essentiel mais l'initialisation du point de départ ou du domaine de recherche de la méthode est aussi une étape primordiale (et souvent empirique) pour réussir à identifier les paramètres optimaux. Au-delà de la difficulté de rechercher les paramètres optimaux d'un modèle, l'évaluation de la qualité des paramètres obtenus est aussi complexe. En fait, la qualité des paramètres dépend non seulement de comment le modèle décrit le phénomène étudié, de l'existence d'un seul ensemble de paramètres optimaux, mais aussi de la quantité et de la qualité (en précision et en signification) des données expérimentales (Ashyraliyev et al., 2009).

Les méthodes évolutionnaires sont des méthodes stochastiques applicables sur des modèles complexes qui décrivent des systèmes de grande taille, nécessitant peu de connaissance des propriétés mathématiques du système en question. Ces méthodes se basent sur les principes

d'évolution naturelle d'une population d'individus, où chaque individu représente une solution potentielle du problème. Elles se basent sur des itérations mathématiques (des générations d'individus). Ces méthodes se caractérisent par une recherche stochastique multipoints qui est indépendante de toute connaissance sur la fonction à optimiser. Il existe trois types de méthodes évolutionnaires : les algorithmes génétiques, la programmation évolutionnaire et les algorithmes des stratégies d'évolution (Perrin et al., 1997). Dans la suite, seuls les algorithmes génétiques sont abordés en détails.

### 3.3.2. Principes des algorithmes génétiques

Les algorithmes génétiques (AG) représentent une branche des algorithmes évolutionnaires la plus connue et la plus utilisée pour l'optimisation des problèmes difficiles et complexes, grâce à leur simplicité de conception et de mise en œuvre et à une certaine robustesse due à l'utilisation de l'aléatoire. Les algorithmes génétiques sont basés sur la théorie de Darwin de l'évolution naturelle des organismes selon des phénomènes d'hérédité et des lois de survie. Le concept de ces algorithmes a été développé par Holland et al., (1975).

#### ❖ Notions de base d'un algorithme génétique

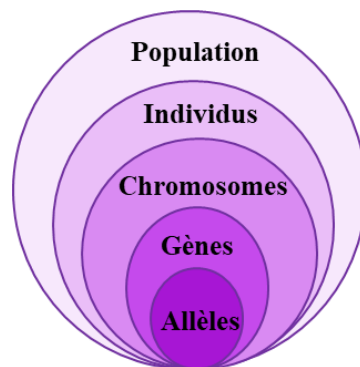
L'AG traduit le concept biologique en une représentation mathématique décrivant l'évolution d'une population d'individus d'une génération à une autre pour concentrer les individus avec la meilleure capacité de survie (Fonteix et al., 1995; Kramer, 2017; Perrin et al., 1997). Il est donc nécessaire de définir au préalable certains éléments utilisés pour la représentation génétique d'un problème à traiter :

- Un individu (Figure I.24) est représenté par un ou plusieurs chromosomes qui est formé par des gènes. Par analogie, la solution d'un problème représenté par un vecteur de paramètres, est ainsi modélisée en chromosome. Chaque paramètre correspond à un gène dont sa valeur est représentée par un allèle.
- Une population d'individus (Figure I.24) est un ensemble d'individus qui possèdent chacun un patrimoine génétique et une capacité de survie. Elle représente ainsi un ensemble de vecteurs qui contiendra, à terme, la solution optimale du problème.
- Une génération est l'ensemble des opérations génétiques permettant de passer d'une population à la population suivante. La génération peut être divisée en deux phases :



une phase d'élimination des individus les moins performants de la population courante et une phase de reproduction des nouveaux individus remplaçant les individus éliminés. Les individus les plus performants de la population courante et les nouveaux individus forme la nouvelle population. En langage informatique, la  $i^{\text{ème}}$  génération correspond à la population obtenue après  $i$  itérations de l'algorithme.

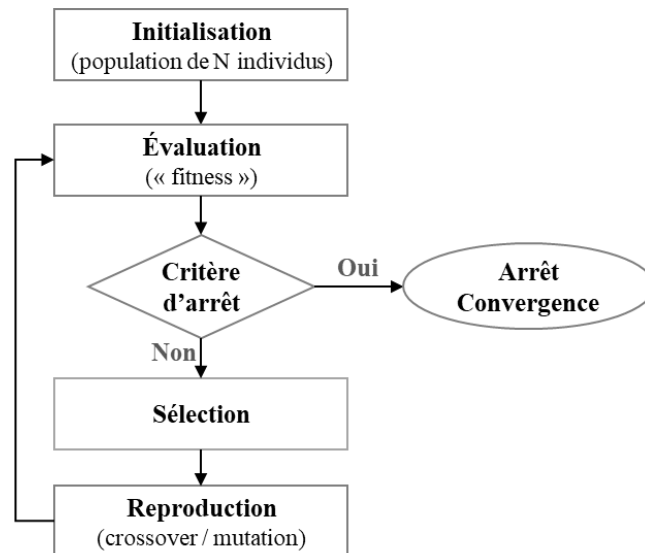
- Des opérateurs génétiques correspondent aux opérateurs de reproduction (croisement et mutation) et opérateurs de sélection.
- Un critère de performance est utilisé pour la sélection des individus dans une population. La performance (ou « fitness ») est associée au critère d'optimisation à traiter. La fonction qui relie critère et fitness a une influence importante sur la convergence de l'algorithme. Le choix de cette fonction dépend de problème à traiter.
- Le critère d'arrêt correspond à la condition de terminaison du processus d'optimisation. Ce critère permet d'évaluer la qualité (l'optimalité) de la solution obtenue.



**Figure I.24** : Les cinq niveaux d'organisation d'un algorithme génétique diploïde.

### ❖ Principe des algorithmes génétiques

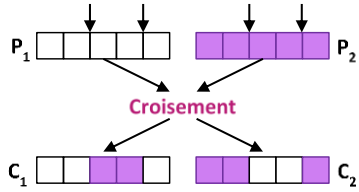

Le fonctionnement d'un algorithme génétique est basé sur un processus évolutif (Figure I.25).



**Figure I.25** : Cycle évolutif de l’algorithme génétique.

Ce processus commence par la création d’une population initiale contenant N individus, de manière aléatoire en se basant sur les connaissances fournies sur le problème à traiter. Ces individus sont représentés soit par un code binaire soit par un code réel. L’AG est une méthode stochastique. Mais ce hasard est dirigé par un critère d’évaluation. La population initiale évoluera au cours des générations jusqu’à convergence vers une population acceptable dans laquelle se trouve la solution. La génération d’une nouvelle population est basée sur des opérateurs de sélection et de reproduction. À partir de la population initiale, un ensemble d’individus de la génération N sont conservés pour la génération N+1 s’appuyant sur une démarche élitiste ou non (opérateurs de sélection, Tableau I.11). Les individus conservés dans cette première phase sont utilisés comme un vivier de parents dans la deuxième phase de reproduction des nouveaux individus pour compléter la nouvelle population (nouvelle génération). Cette étape de reproduction s’appuie sur des opérateurs de croisement (tableau I.11) et/ ou de mutation. Les nouveaux individus doivent être au moins aussi bons que le parent le moins performant (dernier individu conservé), ce qui assure l’évolution progressive d’une génération à l’autre. Ce processus itératif s’arrête quand la condition de terminaison est remplie. Cette condition d’arrêt peut être soit un nombre maximal de génération *a priori* fixé, soit un seuil de précision (Kramer, 2017; Kumar et al., 2010; McCall, 2005).

**Tableau I.11** : Différents opérateurs de sélection et de croisement d'un algorithme génétique.

<b>Opérateurs de sélection</b>	
<b>Principe</b>	❖ Choisir les individus les plus performants et éliminer les mauvais afin d'avoir une population la plus proche de converger vers l'optimum global.
<b>Différentes approches</b>	<p>Les opérateurs de sélection s'appuient sur l'un des trois critères suivants : probabilité identique, rang et critère de performance.</p> <p><u>Sélection élitiste</u> : ou sélection par rang, elle permet de classer les individus d'une population par ordre d'adaptation, selon un critère de performance (« fitness »).</p> <p><u>Sélection par roulette biaisée</u> : consiste à associer à chaque individu une probabilité de sélection proportionnelle à sa valeur de performance. Elle se base sur le principe de la roue de la fortune.</p> <p><u>Sélection par tournoi</u> : consiste à une sélection proportionnelle sur un sous-ensemble des individus, puis en un choix parmi ce sous-ensemble des individus qui ont le meilleur score d'adaptation.</p> <p><u>Sélection uniforme</u> : se base sur le hasard, sélection uniforme sans prendre en compte le score d'adaptation. Chaque individu a une probabilité <math>1/N</math> pour être sélectionné.</p> <p>(Jebari and Madiafi, 2013; Kramer, 2017; Saini, 2017; Shukla et al., 2015)</p>
<b>Opérateurs de croisement</b>	
<b>Principe</b>	❖ Transformer les caractéristiques dominantes des parents aux enfants pour reproduire des individus plus performants d'une génération à l'autre.
<b>Différentes approches</b>	<p><u>Croisement à découpage (unique ou multiple point)</u> : se base sur le tirage, au hasard, d'une ou plusieurs positions chez chacun des parents. Les deux sous-chaines terminales sont ensuite échangées entre les deux chromosomes.</p>  <p><u>Croisement arithmétique</u> : le choix des deux gènes parentaux se fait à la même position <math>i</math> dans chacun des parents. Les nouveaux gènes sont définis par une combinaison linéaire des gènes parentaux.</p>  <p>(Kora and Yadlapalli, 2017; Kramer, 2017; Kumar et al., 2010)</p>

# Chapitre 2

---

## II. Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

### 1. Étude expérimentale

#### 1.1. Souche microbienne utilisée

La souche principalement étudiée au cours de cette étude expérimentale est *Corynebacterium glutamicum* 2262. Elle a été largement utilisée au sein du LRGP pour l'étude de la production de glutamate et des acides organiques (lactate, succinate et acétate). Nous avons aussi utilisé une souche déficiente pour le gène de la lactate déshydrogénase (*C. glutamicum* 2262 $\Delta$ ldhA), issue de *C. glutamicum* 2262, obtenue au cours des travaux de thèse de Kaboré (2015).

#### 1.2. Procédés de culture

##### 1.2.1. Composition des milieux de culture

Le milieu de culture utilisé au cours de cette étude est le milieu MCGC (Minimum *Corynebacterium glutamicum* citrate). Ce milieu a été modifié, en remplaçant le citrate par la déféroxamine afin de faciliter l'assimilation des ions ferriques. Ainsi, deux compositions différentes de MCGC, qui ont été optimisées dans une précédente étude (Kaboré, 2015), ont été utilisées pour les cultures en fiole, en mode discontinu et en bioréacteur, en mode continu. Ces compositions sont reportées dans le tableau II.1.

Afin d'éviter la précipitation de certains composants de milieu de culture, lors de la stérilisation, les solutions de glucose, des sels de base, de sels A et sels B sont stérilisées séparément à 121°C pendant 20 minutes. Les vitamines sont stérilisées par filtration (filtre stérile avec porosité de 0,22  $\mu$ m). Après la stérilisation, les différentes solutions sont mélangées dans des proportions définies respectant les concentrations indiquées dans le tableau ci-dessous (Tableau II.1).

##### 1.2.2. Précultures

Afin d'obtenir des cellules en phase exponentielle de croissance utilisée par la suite comme inoculum, deux précultures successives, A et B, sont réalisées à partir d'un aliquot glycérolé (20% de glycérol) de *C. glutamicum* 2262 stocké à - 80 °C. Ces deux précultures sont préparées dans des fioles d'Erlenmeyer chicanées, en verre, de 500 mL de volume total, contenant 50 mL de MCGC modifié. Elles sont incubées à 33 °C sur une table d'agitation à 200 rpm. Pour la première préculture (A), le milieu de culture estensemencé avec 1 mL du stock glycérolé. L'incubation est réalisée pendant une nuit. Puis, 5 mL de cette préculture A

sont utilisés pour ensemercer la préculture B. Cette dernière est incubée, dans les mêmes conditions opératoires, jusqu'à l'obtention d'une DO<sub>570nm</sub> comprise entre 20 et 30. À ce stade, la fiole est plongée dans l'éthanol 70 % (vol/vol) à -20 °C afin de bloquer la croissance bactérienne. Puis, elle est conservée à 4 °C jusqu'à une durée de 24 h, maximum.

**Tableau II.1** : Composition de milieu MCGC modifié.

	Composition	Concentration finale		Unité
		Culture en fiole	Culture en bioréacteur	
<b>Sels de base</b>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	36,7	7,44	g L <sup>-1</sup>
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,9	5,90	g L <sup>-1</sup>
	NaCl	0,96	1,97	g L <sup>-1</sup>
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3,8	7,86	g L <sup>-1</sup>
<b>Sels A</b>	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	455,84	39,31	mg L <sup>-1</sup>
	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	45,6	3,93	mg L <sup>-1</sup>
	FeCl <sub>3</sub>	4,6	0,39	mg L <sup>-1</sup>
<b>Sels B</b>	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,2	0,07	mg L <sup>-1</sup>
	CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,46	0,03	mg L <sup>-1</sup>
	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	4,6	0,26	mg L <sup>-1</sup>
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,23	0,01	mg L <sup>-1</sup>
	Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ·10H <sub>2</sub> O	0,46	0,03	mg L <sup>-1</sup>
<b>Vitamines</b>	CaCl <sub>2</sub>	94,9	8,18	mg L <sup>-1</sup>
	Biotin	2,3	0,20	mg L <sup>-1</sup>
	Thiamine	22,8	1,97	mg L <sup>-1</sup>
	Deferoxamine	3,4	0,29	mg L <sup>-1</sup>
	Betain	1937,32	0,20	mg L <sup>-1</sup>
	Urée	3,9	-	g L <sup>-1</sup>
<b>Substrat carboné</b>	Glucose	33	85,5	g L <sup>-1</sup>

### 1.2.3. Culture discontinue en fiole

L'un des objectifs de ce travail est d'étudier l'impact du niveau d'oxygénation sur le comportement de *C. glutamicum* au cours de cultures discontinues. Pour cela, différentes cultures sont réalisées dans des fioles d'Erlenmeyer en verre, non chicanées, en imposant des conditions d'oxygénation caractérisées par le coefficient de transfert d'oxygène ( $k_{La}$ ).

#### 1.2.3.1. Détermination des coefficients volumiques de transfert d'oxygène ( $k_{La}$ )

Les valeurs de  $k_{La}$  imposées au cours des cultures en fiole sont estimées par la formule de Sletzky et al. (2004) :

$$k_{La} = 0,024 \times N^{1,16} V_L^{-0,83} d_0^{0,38} d^{1,92}$$

Cette formule est basée sur des paramètres comme la vitesse d'agitation ( $N$  en rpm), le volume de remplissage ( $V_L$  en mL), le diamètre de la fiole ( $d$  en cm), et diamètre d'agitation de la table d'agitation ( $d_0$  en cm). Elle est valable pour  $N$  compris entre 50 et 500 rpm,  $V_L$  entre 4 et 20 %,  $d_0$  entre 1,25 et 10 cm et un volume total de fiole entre 50 et 1000 mL.

### 1.2.3.2. Conditions opératoires

Au cours de cette étude, différentes valeurs de  $k_{LA}$  sont imposées (entre 0 et 118 h<sup>-1</sup>) en faisant varier des paramètres comme la vitesse d'agitation ( $N$ ), le volume total des fioles ( $V_T$ ), le volume de remplissage des fioles ( $V_L$ ), le diamètre de fiole et le diamètre d'agitation de la table d'agitation ( $d_0$ ). Les différentes conditions opératoires testées sont reportées dans le tableau ci-dessous (Tableau II.2).

**Tableau II.2 :** Les différentes conditions opératoires testées au cours des cultures en fiole avec *C. glutamicum*.

Vitesse d'agitation (rpm)	Volume total de fiole $V_T$ (mL)	Volume de remplissage $V_L$ (mL)	Diamètre de fiole $d$ (cm)	Diamètre d'agitation $d_0$ (cm)	$k_{LA}$ estimé (h <sup>-1</sup> )
0	250	100	8	0	0 (0,6)
100	250	170	8	2,5	5
170	500	250	10	2,5	11
170	500	175	10	2,5	15
170	250	75	8	2,5	20
170	500	100	10	5	31
170	1000	100	12	5	44
170	1000	50	12	5	77
180	500	30	10	5	90
170	500	20	10	5	118

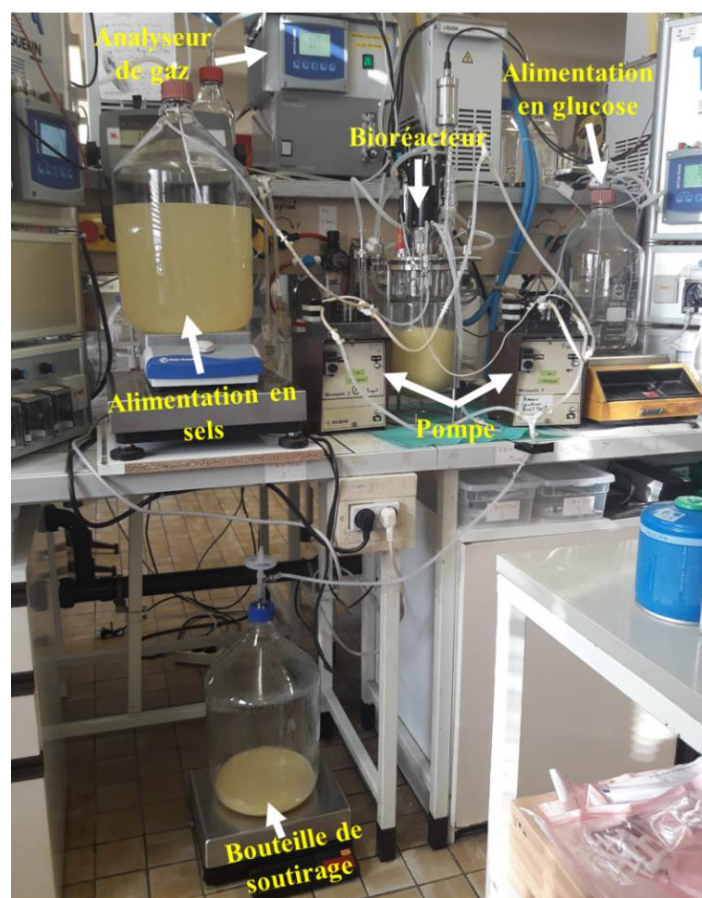
Pour chaque condition opératoire, différentes fioles ont été utilisées de façon à ce que chaque fiole corresponde à un point de la courbe de cinétique de croissance. Ces différentes fioles ont étéensemencées par la préculture B. Un volume d'inoculum a été ajouté pour chaque fiole permettant d'avoir une densité optique initiale entre 1,5 et 2.

## 1.2.4. Culture en bioréacteur

### 1.2.4.1. Montage du bioréacteur

Les cultures en mode continu et semi-continu de *C. glutamicum* sont réalisées dans un bioréacteur de 2L à double enveloppe. Ce bioréacteur présente un axe d'agitation avec un mobile d'agitation de type Rushton (à 4 pales) ainsi que 2 contre-pales statiques afin d'éviter l'effet de vortex dans le cas des vitesses d'agitation élevées (1200 et 900 rpm). Il est muni aussi d'une canne de prélèvement de milieu de culture, de différentes entrées pour les sondes de pH, de mesure de la pression partielle en oxygène, pour l'ajout des solutions acide/base et de deux septums pour l'ajout de l'inoculum et de l'antimousse. Une entrée d'air à travers un diffuseur de gaz à 10 orifices est ajoutée en bas du bioréacteur, permettant l'apport d'oxygène dans le milieu de culture.

Au cours des cultures, la température est réglée à 33°C et le pH à 7,6, par l'ajout d'une solution acide (HCL 2N) ou basique (KOH 10 N).



**Figure II.1** : Montage de la culture continue.



## 1.2.4.2. Culture continue

### 1.2.4.2.1. Conditions opératoires

Au cours de la culture continue, une double alimentation est réalisée. La première consiste en la solution de glucose et la seconde en la solution de sels (Figure II.1). La séparation des deux solutions permet, d'une part, de bien maîtriser la vitesse volumique de la consommation de glucose (GUR) en changeant principalement le débit d'alimentation de la solution de glucose et sa concentration initiale et, d'autre part, d'éviter le phénomène de précipitation des sels au niveau des tuyaux de conduite dans le cas des faibles débits d'alimentation. Pour les différentes conditions appliquées, le débit d'alimentation de la solution en sels reste élevé puisque représentant plus de 80 % du débit total de l'alimentation. Le volume de milieu de culture est de 1 L. Au cours de cette culture, différents débits d'alimentation en solution de glucose et solution des sels, taux de dilution, concentrations en glucose dans la solution d'alimentation et vitesses d'agitation ont été imposées. Les différentes conditions opératoires sont reportées dans le tableau II.3.

**Tableau II.3 :** Les différentes conditions opératoires testées au cours d'une culture continue à double alimentation de *C. glutamicum*.

Conditions	Vitesses d'agitation (rpm)	D <sup>(1)</sup> (h <sup>-1</sup> )	Q sels (L/h)	Q glu <sup>(2)</sup> (L/h)	[glu] <sup>(3)</sup> (g/L)
<b>1</b>	900	0,093	0,075	0,018	100
<b>2</b>		0,195	0,173	0,022	
<b>3</b>		0,197	0,181	0,017	
<b>4</b>	700	0,198	0,182		
<b>5</b>	500	0,197	0,181		
<b>6</b>	300	0,193	0,176	0,034	
<b>7</b>	500	0,239	0,205		150
<b>8</b>		0,230	0,196		
<b>9</b>		0,236	0,203		250
<b>10</b>		0,270	0,236		75
<b>11</b>	200	0,231	0,197		

<sup>(1)</sup> : taux de dilution

<sup>(2)</sup> : débit d'alimentation en solution glucose

<sup>(3)</sup> : concentration de glucose dans la solution d'alimentation

#### 1.2.4.2.2. Détermination de la vitesse volumique de consommation de glucose (GUR)

En mode continu, à l'état stabilisé, la vitesse volumique de consommation de glucose (GUR) dépend essentiellement du débit d'alimentation en glucose et de la concentration en glucose dans la solution d'alimentation. Cette vitesse (GUR) est calculée par l'équation suivante :

$$GUR = D \times \left( \frac{[glu]_0 * Q_{glu}}{D} - [glu]_{excès} \right)$$

Avec  $[glu]_0$  (g/L) : la concentration en glucose dans la solution d'alimentation.

$Q_{glu}$  (L/h) : le débit d'alimentation en solution glucose.

$D$  ( $h^{-1}$ ) : taux de dilution.

$[glu]_{excès}$  (g/L) : la concentration en glucose résiduel dans le milieu de culture.

Dans le cas d'une carence en glucose, la formule de GUR est simplifiée à :

$$GUR = [glu]_0 * Q_{glu}$$

#### 1.2.4.2.3. Détermination de la vitesse volumique de consommation d'oxygène (OUR)

La vitesse volumique de consommation d'oxygène (OUR) est un paramètre clé pour cette étude. Cette vitesse est déterminée par la formule suivante :

$$OUR = k_L a \times O_2^{sat} (100\% - O_2)$$

$O_2$  (en %) représente le pourcentage en oxygène dissous dans le milieu de culture à l'instant  $t$  et  $O_2^{sat}$  (en mM) sa concentration à saturation.  $k_L a$  est le coefficient volumique de transfert d'oxygène.

Dans cette étude, la valeur de  $k_L a$  correspondant à chaque vitesse d'agitation imposée au cours de la culture continue est déterminée graphiquement par la méthode de désoxygénation.

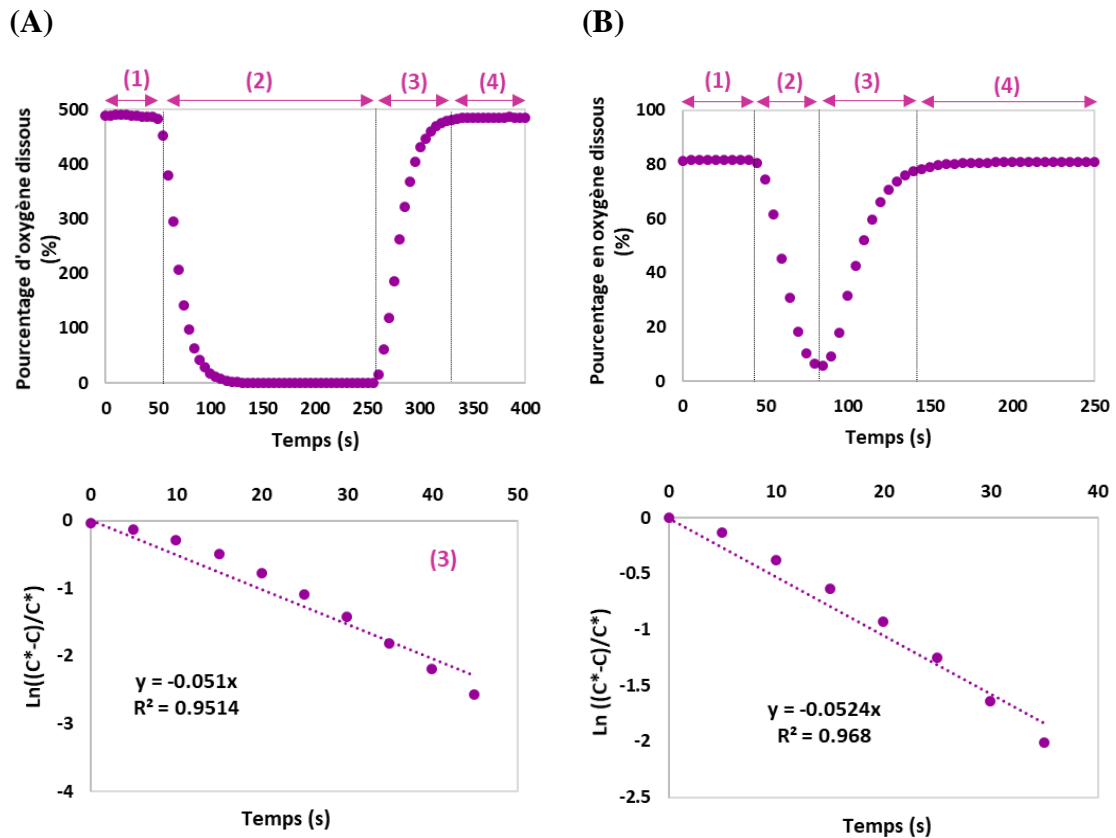
##### Détermination graphique du $k_L a$ par la méthode de désoxygénation :

Dans un bioréacteur de 2L (avec configuration identique à celle utilisée pour la culture continue), le coefficient de transfert d'oxygène est déterminé dans 1L de milieu de culture MCGC modifié. Cette méthode consiste à suivre l'évolution du pourcentage en oxygène dissous dans le milieu de culture au cours du temps. Elle peut être réalisée en présence (méthode dynamique) ou en absence des microorganismes (méthode statique). Cette manipulation se déroule en trois phases :

- 1. Un débit d'air ou d'oxygène pur est introduit dans le milieu de culture qui est soumis à une vitesse d'agitation donnée. Ces deux paramètres (débit d'air et vitesse d'agitation) ont été choisis pour correspondre aux conditions opératoires testées lors de la culture continue. Cette phase est caractérisée par une valeur de saturation en oxygène de la phase liquide ( $C_L^*$ ).
- 2. Phase de désoxygénation. Dans le cas de la méthode statique, l'injection d'oxygène pur est remplacée par de l'azote jusqu'à éliminer tout l'oxygène du milieu de culture. Dans le cas de méthode dynamique, la désoxygénation est due à la consommation d' $O_2$  dissous dans le milieu de culture par les microorganismes après l'arrêt de l'aération. La fin de cette phase est présentée par une valeur minimale stationnaire en oxygène dissous (une valeur nulle en absence des microorganismes).
- 3. Phase de réoxygénation. L'ajout d'azote est arrêté et un débit d'air est renvoyé de nouveau dans le milieu de culture jusqu'à atteindre la valeur de saturation en oxygène ( $C_L^*$ ).

Pour mesurer les pourcentages en oxygène dissous dans le milieu de culture ( $C_L$ ), une sonde optique à oxygène est utilisée (Metler Toledo, Suisse). Le temps de réponse de cette sonde est d'environ 5 secondes, ce qui permet de suivre l'évolution de ce paramètre sans erreur importante, en particulier dans le cas des vitesses d'agitation faibles et de la méthode dynamique (en présence de microorganismes ce qui provoque une consommation rapide d'oxygène et donc une évolution rapide du pourcentage en oxygène dissous dans le milieu de culture).

Un exemple de chaque méthode de désoxygénation (méthode statique et, méthode dynamique) est présenté dans la figure II.2.



**Figure II.2** : Évolution du pourcentage en oxygène dissous dans le milieu de culture au cours du temps. Exemple d'une alimentation par 60 L/h d'oxygène pure avec la méthode statique (A) ou 60 L/h d'air dans le cas de méthode dynamique (B) et avec une vitesse d'agitation de 900 rpm. (1) phase de saturation en oxygène, (2) phase de désoxygénation, (3 et 4) phases de réoxygénation. La zone 3 est prise en compte pour le calcul de  $k_{LA}$ . La zone 4 correspond à la saturation du milieu de culture en oxygène.

La valeur de  $k_{LA}$  est déterminée à partir des données présentées dans la zone 3 de la courbe correspondant à l'augmentation de pourcentage d'oxygène (début de la phase de réoxygénation). En se basant sur un bilan matière, la vitesse de transfert d'oxygène dans le bioréacteur ( $OTR$ ) peut être calculé à partir de l'équation :

$$OTR = k_L a \times (C_L^* - C_L)$$

Par intégration de cette équation, le coefficient  $k_{LA}$  est déduit par l'équation suivante :

$$\ln\left(\frac{(C_L^* - C_L)}{(C_L^* - C_0)}\right) = -k_L a \times t$$

La valeur de ce coefficient est présentée par unité de temps (pour l'exemple présenté par la figure II.2, il est exprimé en seconde<sup>-1</sup>). En absence de microorganisme,  $C_0$  est nul.

#### 1.2.4.3. Procédé semi-continu de production de succinate

Un procédé mono-étape triphasique, constitué d'une phase d'aérobiose, d'une phase de transition de l'aérobiose à l'anaérobiose et d'une phase d'anaérobiose, a été réalisé avec *C. glutamicum* 2262. La configuration du bioréacteur est celle présentée plus haut.

Le milieu de culture est inoculé par un volume de préculture B calculé pour avoir une densité optique 570 nm initiale de 1,5. Le volume final de la culture est de 1,13 L avec une concentration initiale en glucose de 85.5 g/L et de 14 g/L de NaHCO<sub>3</sub>. Pendant la première phase, en aérobiose, le pourcentage d'oxygène dissous dans le milieu de culture est maintenu à 50 % de la saturation par injection d'air et en imposant la même vitesse d'agitation de 900 rpm. Dès que la densité optique atteint 30, la transition de l'aérobiose vers l'anaérobiose est débutée. La stratégie de transition appliquée a été développée au cours des travaux de Kaboré et al. (2017). Il s'agit d'une désoxygénation progressive. Le pourcentage en oxygène dissous est réduit et régulé à 20 % pendant 2h, puis à 10 % pendant également 2h. À la fin de cette phase de transition, l'aération est arrêtée, mais l'agitation est maintenue à 900 rpm. Très rapidement, du fait de la consommation des bactéries, le pourcentage en oxygène dissous devient nul. La phase d'anaérobiose qui correspond à la phase de production des acides organiques, débute alors. Pendant cette phase, une alimentation en glucose et en NaHCO<sub>3</sub> est réalisée. 50 mL d'une solution de glucose à 630 g/L et 50 mL de NaHCO<sub>3</sub> à une concentration de 84 g/L sont ajoutés après 10, 18, 24, 28 42, 48, 53 et 68 h de culture.

### 1.3. Méthodes analytiques

#### 1.3.1. Mesure de la concentration en biomasse

La concentration en biomasse est déterminée par méthode spectrophotométrique en mesurant la densité optique à 570 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Hitachi 2000 (Sciencetec, France). Puis, les valeurs de DO sont converties en concentration en biomasse ([X]) en utilisant un coefficient de corrélation (c) entre ces deux paramètres :

$$[X] = DO \times c$$

Le coefficient de corrélation est établi en se basant sur une courbe d'étalonnage entre la matière sèche et la DO<sub>570nm</sub>.

La matière sèche est déterminée selon le protocole décrit dans les travaux de Guillouet (1996). Pour cela, 5 mL d'une solution de thiosulfate de sodium à 400 g.L<sup>-1</sup>, utilisée comme marqueur de l'espace interstitiel, sont ajoutés à un échantillon de 100 mL de culture. Le mélange obtenu est agité dans un bain de glace pendant 5 min. Puis, il est centrifugé à 7 000 g, pendant 2 min, à 4 °C. Le surnageant (1) est conservé et le culot est récupéré dans 15 mL d'une solution de NaCl à 0,9 %. Ce mélange est centrifugé dans les mêmes conditions. A l'issue de cette seconde centrifugation, le surnageant (2) est conservé, pesé ( $m_2$  en g) et sa masse volumique ( $\rho_2$ ) est déterminée. Le culot, de son côté, est resuspendu dans 15 mL d'eau distillée et placé dans une coupelle en aluminium, préalablement séchée (48h, à 110°C). L'ensemble est mis à 110 °C, pendant 48 h, avant de peser la matière sèche obtenue ( $M_{SC\ mesurée}$ ). Cette valeur est corrigée par la soustraction de la masse de NaCl ( $[NaCl]$  en g.L<sup>-1</sup>) qui a pénétré dans le volume interstitiel ( $V_{int}$ ) lors du lavage de culot :

$$M_{SC} = M_{SC\ mesurée} - \left( \frac{V_{int} \times [NaCl]}{1000} \right)$$

Le volume interstitiel est déterminé par la formule suivante :

$$V_{int} = \frac{m_2 \times [Thio]_2}{\rho_2 \times [Thio]_1}$$

Avec  $[Thio]_1$  et  $[Thio]_2$ , les concentrations en thiosulfate de sodium dans les surnageant 1 et 2, respectivement. Ces concentrations sont déterminées par un dosage à l'iode dans les deux surnageant récupérés.

Deux coefficients de corrélation distincts ont été déterminés. Ils étaient de 0,41 g/L/ $U_{D0570}$  pour la culture continue et de 0,35 g/L/ $U_{D0570}$  pour les cultures discontinues et semi-continues.

### 1.3.2. Dosage des composés du milieu de culture : glucose et acides organiques

#### Préparation des échantillons

Différents prélèvements d'un volume approprié (2-3 mL) ont été effectués périodiquement tout au long des cultures. Dans un premier temps, les échantillons sont centrifugés à 10 000 g pendant 5 min à 4 °C, afin d'éliminer les cellules. Puis, le surnageant récupéré est filtré avec un filtre de porosité 0,22  $\mu$ m. Tous les échantillons filtrés sont stockés à - 20 °C jusqu'à l'analyse par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC).

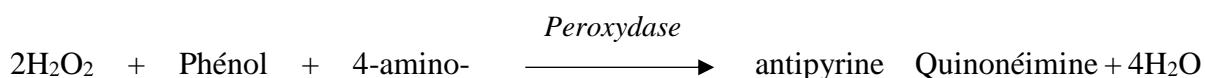
### Dosage des acides organiques

Les concentrations en acides organiques (lactate, succinate, pyruvate, acétate et fumarate) sont mesurées par HPLC (10 ADVP, Shimadzu) connectée à un détecteur à barrette de diodes DAD (Shimadzu). La séparation des acides organiques est réalisée sur une colonne échangeuse d'ions (8 mm x 300 mm, Bio-Rad Aminex HPX-87H), en mode isocratique, à un débit de 0,7 mL.min<sup>-1</sup> et à une température de 50 °C. 10 µL d'échantillon sont injectés pour chaque analyse. La phase mobile est composée d'acide sulfurique (50 mM). L'analyse dure 20 min et les temps de rétention des différents composés attendus sont les suivants : 10,2 min pour l'acide succinique, 10,9 min pour le l'acide lactique, et 13,1 min pour l'acide acétique.

### Dosage du glucose

Pour l'analyse du glucose, une HPLC (10ADVP, Shimadzu) connectée à un réfractomètre RI 410 (Waters, France) est utilisé. La phase mobile est une solution d'acide sulfurique à 5 mM. Toutes les autres conditions opératoires sont identiques au protocole de dosage des acides organiques. Le temps de rétention du glucose est 7,7 min. Ce type de dosage par HPLC est utilisé pour quantifier les concentrations en glucose au cours des cultures en fiole et de la culture semi-continue.

Pour le suivi de l'évolution de la concentration en glucose résiduel dans le milieu de culture au cours de la culture continue, un analyseur photométrique automatisé Gallery<sup>TM</sup> (Thermo Fisher Scientific) est utilisé. Cette analyse de glucose se base sur un dosage colorimétrique impliquant la succession de deux réactions enzymatiques. Le kit enzymatique utilisé est le kit « glucose Oxydase/Peroxydase » (GOD-POD, Thermo Fisher Scientific, France). Le principe de ces deux réactions est le suivant :



L'apparition de la quinoéimine est détectée à 480 nm par spectrométrie. La concentration en glucose est proportionnelle à l'intensité de coloration de ce composé.

#### **1.4. Calcul des vitesses et des rendements**

Les concentrations mesurées en biomasse, glucose et acides organiques sont utilisées pour calculer les paramètres cinétiques que sont les vitesses de consommation et de production ainsi que les rendements. Avant le calcul de ces paramètres, l'ensemble des données sont

lissées par la méthode numérique d'interpolation "Smoothing Spline" (Matlab, Mathworks, USA).

### Cultures en mode discontinu (fiolle)

La vitesse spécifique instantannée de croissance ( $\mu$ , en  $h^{-1}$ ) est calculée par l'équation suivante :

$$\mu = \frac{1}{[X]_f} \times \frac{d[X]_f}{dt}$$

Avec  $[X]_f$  (g/L), la concentration en biomasse.

A partir de cette équation, la vitesse spécifique maximale de croissance ( $\mu_{max}$ ) peut être déduite comme suit :  $\mu_{max} = \max_t(\mu)$

Les vitesses spécifiques instantannées de production des acides organiques ( $r_{AO}$ , en g/ gDW/ h), de consommation de glucose ( $r_{glu}$ , en g/ gDW/ h) et les vitesses maximales ( $r_{AO,max}$  et  $r_{glu,max}$ ) sont calculées selon :

$$r_{AO} = \frac{1}{[X]_f} \times \frac{d[OA]_f}{dt} \quad ; \quad r_{AO,max} = \max_t(r_{AO})$$

$$r_{glu} = -\frac{1}{[X]_f} \times \frac{d[glu]_f}{dt} \quad ; \quad r_{glu,max} = -\max_t\left(\frac{1}{[X]_f} \times \frac{d[glu]_f}{dt}\right)$$

Avec  $[OA]_f$  and  $[glu]_f$  (en g/L) les concentrations en acides organiques et glucose, respectivement.

Ainsi, les rendements maximaux de conversion du glucose en biomasse ou en acides organiques sont déterminés par :

$$Y_{X/glu} = \frac{[X]_{max} - [X]_{init}}{[glu]_{init} - [glu]}$$

$$Y_{AO/glu} = \frac{[AO]_{max} - [AO]_{init}}{[glu]_{init} - [glu]}$$

Avec  $[X]_{max}$  et  $[AO]_{max}$  (en g/L), les concentrations maximales en biomasse et acide organique, respectivement,  $[X]_{init}$ ,  $[AO]_{init}$  et  $[glu]_{init}$  (en g/L) les concentrations initiales en biomasse, acide organique et glucose, respectivement,  $[glu]$  (en g/L) la concentration en glucose résiduelle correspondant à la concentration maximale en biomasse ou en acide organique.



D'autre part, les rendements carbonés de conversion du glucose en biomasse et en acides organiques, pendant la phase de croissance avec limitation en oxygène, ont été déterminés par une régression linéaire entre les concentrations en biomasse ou acides organiques et les concentrations en glucose.

Lors des cultures discontinues, le rapport OUR/GUR a été calculé. GUR a été déterminé par régression linéaire entre les concentrations résiduelles en glucose et le temps, pendant la phase de croissance avec limitation en oxygène. L'OUR a été calculé par la même expression que lors de la culture continue (chapitre M&M, 1.2.4.2.3) dans laquelle  $O_2 = 0$ .

### Culture en mode continu

Les vitesses de croissance, de consommation de glucose et de production des acides organiques sont déterminées en se basant sur les bilans matières à l'état stationnaire. La vitesse spécifique de croissance ( $\mu$ ) est égale au taux de dilution ( $D$ , en  $h^{-1}$ ):

$$\mu = D = \frac{Q}{V}$$

Avec  $Q$  (en  $L \cdot h^{-1}$ ), le débit d'alimentation et de soutirage et  $V$  (en L), le volume total de milieu de culture dans le bioréacteur.

La vitesse spécifique de production des acides organiques est calculée suivant :

$$r_{AO} = \frac{1}{[X]} \times \frac{Q}{V} [AO]$$

La vitesse spécifique de consommation de glucose est :

$$r_{glu} = \frac{1}{[X]} \times \frac{Q}{V} ([glu]_0 - [glu])$$

Ces vitesses sont utilisées par la suite pour le calcul des rendements de conversion de glucose en biomasse ( $Y_{X/glu}$ ) et acide organique ( $Y_{AO/glu}$ ) :

$$Y_{X/glu} = \frac{\mu}{r_{glu}} = \frac{[X]}{[glu]_{init} - [glu]}$$

$$Y_{AO/glu} = \frac{r_{AO}}{r_{glu}} = \frac{[AO]}{[glu]_0 - [glu]}$$

$[X]$  et  $[AO]$  sont les concentrations en biomasse et acide organique, respectivement, obtenues à l'état stationnaire de chaque condition opératoire,  $[glu]$  et  $[glu]_0$  sont les concentrations en

glucose résiduel dans le milieu de culture et la concentration en glucose de la solution d'alimentation, respectivement.

Les rendements carbonés de conversion du glucose en produit  $i$  ( $Y^C_{i/glu}$ , en mol C/mol C, (avec  $i \in \{\text{Lactate, Succinate, Acétate, Biomasse}\}$ ) ont été déterminés comme suit :

$$Y^C_{i/glu} = \frac{r_i}{r_{glu}} * \frac{MM_{glu}}{MM_i} * \frac{n_i}{n_{glu}}$$

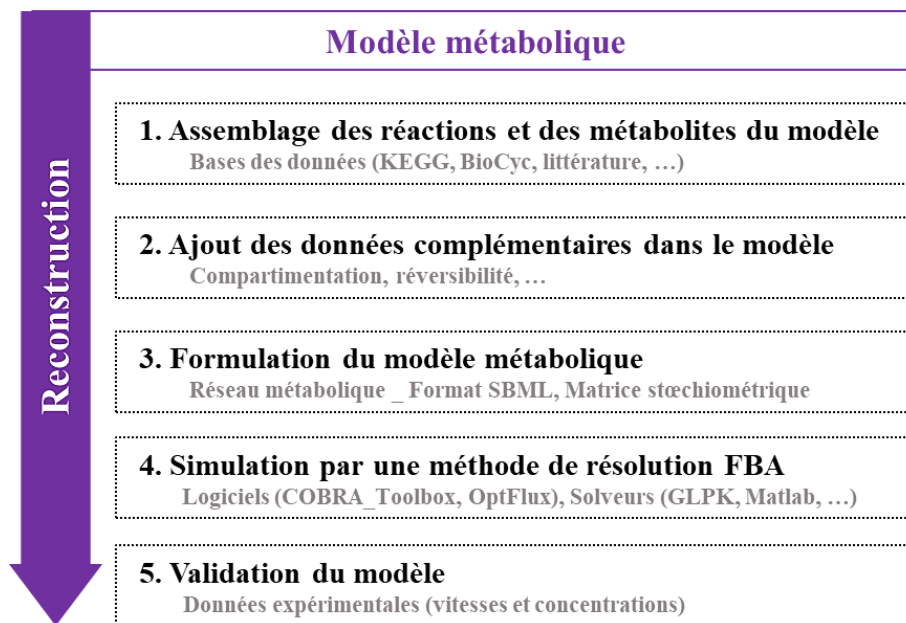
$MM_i$  et  $MM_{glu}$  (g/ mol) représentent la masse molaire du produit  $i$  et du glucose, respectivement,  $n_i$  et  $n_{glu}$  correspondent aux nombres d'atomes de carbone dans le produit  $i$  et le glucose. La masse molaire de la biomasse a été déterminée en s'appuyant sur la composition élémentaire générale de la souche *C. glutamicum* ATCC17935 (Cocaign et al., 1992).

## 2. Étude théorique

### 2.1. Modélisation métabolique

#### 2.1.1. Construction d'un modèle métabolique réduit

La construction du modèle de *C. glutamicum* 2262 a été réalisé en suivant les différentes étapes décrites dans la figure II.3:



**Figure II.3** : Démarche de la construction du modèle métabolique de *C. glutamicum* 2262

### Assemblage des réactions et des métabolites

Les données utilisées pour construire le modèle métabolique simplifié de *C. glutamicum* 2262 ont été collectées à partir des bases de données KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, Japon) et BioCyc (SRI International, USA), de données issues de la littérature et des informations concernant les génomes, les réactions biochimiques, les enzymes et les métabolites impliqués dans ces réactions. 100 réactions et 75 métabolites ont ainsi été assemblés dans un réseau métabolique (plus de détails dans le chapitre 5). Ce dernier regroupe les voies du métabolisme central (glycolyse, voie des pentoses phosphate et cycle de Krebs) et des voies énergétiques. Ces voies sont impliquées dans la production des précurseurs nécessaires à la croissance et à la survie de la bactérie.

Afin de quantifier la croissance de cette bactérie, le modèle comporte également une réaction regroupant l'ensemble des précurseurs nécessaires à la synthèse de la biomasse. Plusieurs « réactions de biomasse » ont été testées au cours de ce travail (Annexe 1, voir chapitre 5). De plus, comme le modèle est utilisé pour étudier le comportement de *C. glutamicum* à différents niveaux d'oxygénation donc dans des conditions favorables à la production des acides organiques, les voies de synthèse des acides acétique et lactique ainsi que les voies anaplérotiques impliquées dans la synthèse du succinate ont été intégrées dans le réseau métabolique. D'autre part, afin de prendre en considération l'échange entre le cytoplasme et le milieu de culture, des réactions de transport pour certains métabolites, tels que le glucose et les acides organiques (lactate, acétate et succinate) ont été jointes au réseau métabolique.

Le réseau métabolique construit est présenté sous forme d'un tableau. Les différentes réactions et métabolites impliqués dans ce réseau métabolique sont reportés dans les annexes 3, 4 et 5.

A partir des informations assemblées, une liste des réactions et une liste des métabolites ont été établies dans un fichier Excel<sup>®</sup> (Microsoft, USA). Dans ces deux listes, un identifiant et un nom sont attribuées à chaque réaction et métabolite. L'identifiant d'une réaction est souvent le nom de l'enzyme catalysant cette réaction. De plus, d'autres informations comme la compartimentation et la réversibilité, sont requises dans le réseau métabolique. Un exemple de certaines réactions de la voie de la glycolyse est présenté dans le tableau II.4.

**Tableau II.4 :** Exemples de réactions biochimiques de la voie de la glycolyse impliquées dans le réseau métabolique de *C. glutamicum* 2262. LB et UB représentent les bornes minimales et maximales pour chaque réaction du réseau métabolique.

Rxnname	Rxn description	Formula	Genes	Protein	Subsystem	Reversible	LB	UB	Objective
glk	glucokinase	GLC[c] + ATP[c] --> G6P[c] + ADP[c] + H[c]	cg2399 + cg2091	glk	Glycolysis / Gluconeogenesis	0	0	1000	0
pgi	g6p isomerase	G6P[c] <=> F6P[c]	cg0973 + cg1700	pgi		1	-1000	1000	0
pfkA	phosphofructokinase	F6P[c] + ATP[c] --> FDP[c] + ADP[c] + H[c]	cg2116 + cg1409	pfkA		0	0	1000	0
glpX	fructose 16biphosphatase	FDP[c] + H2O[c] --> F6P[c] + Pi[c]	cg1157	glpX		0	0	1000	0
fdA	fructose biphosphate aldolase	FDP[c] <=> DHAP[c] + G3P[c]	cg3068	fdA		1	-1000	1000	0
tpiA	triosephosphate isomerase	DHAP[c] <=> G3P[c]	cg1789	tpiA		1	-1000	1000	0
pgk	phosphoglycerate kinase	13DPG[c] + ADP[c] <=> 3PG[c] + ATP[c]	cg1790	pgk		1	-1000	1000	0
gpmA	phosphoglycerate mutase	3PG[c] <=> 2PG[c]	cg3206 + cg0519 + cg0482	gpmA		1	-1000	1000	0
eno	phosphopyruvate hydratase	2PG[c] <=> PEP[c] + H2O[c]	cg1111	eno		1	-1000	1000	0
pyk	pyruvate kinase	PEP[c] + ADP[c] + H[c] --> PYR[c] + ATP[c]	cg2291 + cg3218	pyk		0	0	1000	0

La réversibilité de la réaction est précisée par des codes binaires. Elle vaut 1 si la réaction est réversible et 0 si elle est irréversible. De même, des bornes minimales et maximales sont attribuées à chaque réaction selon sa réversibilité. Par défaut, pour une réaction réversible, la borne minimale est égale -1000 et la borne maximale est égale 1000. Dans le cas inverse, la borne minimale est fixée à zéro.

Un même métabolite peut être intra- ou extracellulaire. Pour faire la différence entre les deux, une lettre (« c » pour cytoplasme et « e » pour extracellulaire) est ajoutée entre deux crochets après chaque métabolite pour indiquer sa localisation. À titre d'exemple, pour la réaction de transport du glucose (équation ci-dessous), ce dernier est transporté du milieu de culture, extracellulaire par définition, vers le cytoplasme par le système PTS. Les autres métabolites de cette réaction sont intracellulaires :



## 2.1.2. Représentation du modèle métabolique en langage SBML

Afin de convertir le réseau métabolique en une représentation mathématique nécessaire pour la résolution numérique du modèle, ce réseau doit être représenté sous un format particulier, le format SBML (Systems Biology Markup Language). Ce format correspond à une représentation simple et lisible par des logiciels de résolution numérique.

```
<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<sbml xmlns="http://www.sbml.org/sbml/level2" level="2" version="1" xmlns:html="http://www.w3.org/1999/xhtml">
  <model id="Cgl_iCG922" name="C. glutamicum">
    <listOfUnitDefinitions>
    </listOfUnitDefinitions>
    <listOfCompartments>
    </listOfCompartments>
    <listOfSpecies>
    </listOfSpecies>
    <listOfReactions>
    </listOfReactions>
  </model>
</sbml>
```

**Figure II.4 :** Les quatre parties constituant un modèle métabolique sous format SBML.

Un modèle métabolique, sous format SBML, contient 4 parties (Figure II.4) :

- *Liste des unités* (Figure II.5.A) : cette liste définit l'unité des flux des réactions métaboliques impliqués dans le modèle. Ces flux sont exprimés en mmol/ g DW/ h, sauf le flux de la réaction de biomasse qui est exprimé en  $h^{-1}$  (g DW/ g DW/ h).
- *Liste des compartiments* (Figure II.5.B) : le compartiment intracellulaire est représenté par la lettre « c » et la lettre « e » correspond au compartiment extracellulaire.
- *Liste des espèces ou métabolites* (Figure II.5.C) : chaque ligne de cette liste correspond à un métabolite auquel un identifiant, un nom et un compartiment sont attribués.

```
<listOfUnitDefinitions>
  <unitDefinition id="mmol_per_gDW_per_hr">
    <listOfUnits>
      <unit kind="mole" scale="-3" multiplier="1" offset="0" />
      <unit kind="gram" exponent="-1" multiplier="1" offset="0" />
      <unit kind="second" exponent="-1" multiplier="0.000277777777777778" offset="0" />
    </listOfUnits>
  </unitDefinition>
</listOfUnitDefinitions>
```

(A)

```
<listOfCompartments>
  <compartment id="c" name="Cytoplasm"/>
  <compartment id="e" name="Extracellular"/>
</listOfCompartments>
```

(B)

(C)

```

<listOfSpecies>
  <species id="M_13DPG_c" name="3-Phospho-D-glyceroyl phosphate" compartment="c"/>
  <species id="M_2PG_c" name="2-Phospho-D-glycerate" compartment="c"/>
  <species id="M_3PG_c" name="3-Phospho-D-glycerate" compartment="c"/>
  <species id="M_6PGC_c" name="6-Phospho-D-gluconate" compartment="c"/>
  <species id="M_6PGL_c" name="D-Glucono-1,5-lactone 6-phosphate" compartment="c"/>
  <species id="M_AC_c" name="Acetate" compartment="c"/>
  <species id="M_AC_e" name="Acetate" compartment="e"/>

```

(D)

```

<reaction id="R_glk" name="glucokinase" reversible="0">
  <notes>
    <html:p>GENE_ASSOCIATION: </html:p>
    <html:p>SUBSYSTEM: Glycolysis / Gluconeogenesis</html:p>
    <html:p>note: </html:p>
    <html:p>Equation: GLC[c] + ATP[c] --> G6P[c] + ADP[c] + H[c]</html:p>
  </notes>
  <listOfReactants>
    <speciesReference species="M_GLC_c" stoichiometry="1"/>
    <speciesReference species="M_ATP_c" stoichiometry="1"/>
  </listOfReactants>
  <listOfProducts>
    <speciesReference species="M_G6P_c" stoichiometry="1"/>
    <speciesReference species="M_ADP_c" stoichiometry="1"/>
    <speciesReference species="M_H_c" stoichiometry="1"/>
  </listOfProducts>
  <kineticLaw>
    <math xmlns="http://www.w3.org/1998/Math/MathML">
      <ci> FLUX_VALUE </ci>
    </math>
    <listOfParameters>
      <parameter id="LOWER_BOUND" value="0" units="mmol_per_gDW_per_hr"/>
      <parameter id="UPPER_BOUND" value="1000" units="mmol_per_gDW_per_hr"/>
      <parameter id="FLUX_VALUE" value="0" units="mmol_per_gDW_per_hr"/>
      <parameter id="OBJECTIVE_COEFFICIENT" value="0" units="mmol_per_gDW_per_hr"/>
    </listOfParameters>
  </kineticLaw>
</reaction>

```

**Figure II.5 :** Exemples des (A) listes des unités, (B) listes des compartiments, (C) listes des métabolites et (D) listes des réactions.

- *Liste des réactions* (Figure II.5.D) : Cette liste présente des informations sur toutes les réactions impliquées dans le réseau métabolique. La description de chaque réaction comporte trois parties. La première partie correspond à un en-tête où, un identifiant, un nom et sa réversibilité (0 et 1 pour irréversible et réversible, respectivement) sont indiqués. La deuxième partie décrit les réactifs et les produits de cette réaction ainsi que leurs coefficients stœchiométriques. Dans la troisième partie, la loi cinétique associée à cette réaction est définie par quatre paramètres : borne minimale, borne maximale, valeur de flux et coefficient objectif. Ce dernier vaut 1 si la réaction est la fonction objectif et 0 pour les autres réactions.

### 2.1.3. Méthode de simulation

Afin de résoudre le modèle métabolique proposé, une méthode FBA basée sur des contraintes a été utilisée. Cette méthode nécessite la formulation de réseau métabolique en représentation mathématique (matrice stœchiométrique).

#### 2.1.3.1. Mise en place de la matrice stœchiométrique

Une fois le modèle construit et présenté sous format SBML, il est converti en une représentation mathématique sous forme d'une matrice stœchiométrique (n, m). Cette matrice est constituée de n lignes et m colonnes dont n représente le nombre de métabolites et m correspond au nombre de réactions (nombre des inconnus). Les éléments de cette matrice correspondent aux coefficients stœchiométriques. Les coefficients des réactifs (molécules consommées) d'une réaction sont multipliés par (-1). La matrice stœchiométrique utilisée initialement dans cette étude est de taille (75, 100). Un exemple des réactions et des métabolites reportés dans le tableau 2.4, est présenté ci-dessous sous forme d'une matrice stœchiométrique de taille 10 x10 (Figure II.6).

	R_glk	R_pgi	R_pfkA	R_glpX	R_fda	R_tpiA	R_pglk	R_gpmA	R_eno	R_pyk
GLC_c	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G6P_c	1	-1	0	0	0	0	0	0	0	0
F6P_c	0	1	-1	0	0	0	0	0	0	0
FDP_c	0	0	1	-1	0	0	0	0	0	0
G3P_c	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
3PG_c	0	0	0	0	0	0	1	-1	0	0
2PG_c	0	0	0	0	0	0	0	1	-1	0
PEP_c	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-1
ADP_c	1	0	1	0	0	0	-1	0	0	-1
ATP_c	-1	0	-1	0	0	0	1	0	0	1

**Figure II.6** : Exemple d'une matrice stœchiométrique prenant en compte des réactions et métabolites impliqués dans la voie de glycolyse (liste des réactions dans Tableau II.4).

#### 2.1.3.2. Résolution FBA du modèle métabolique

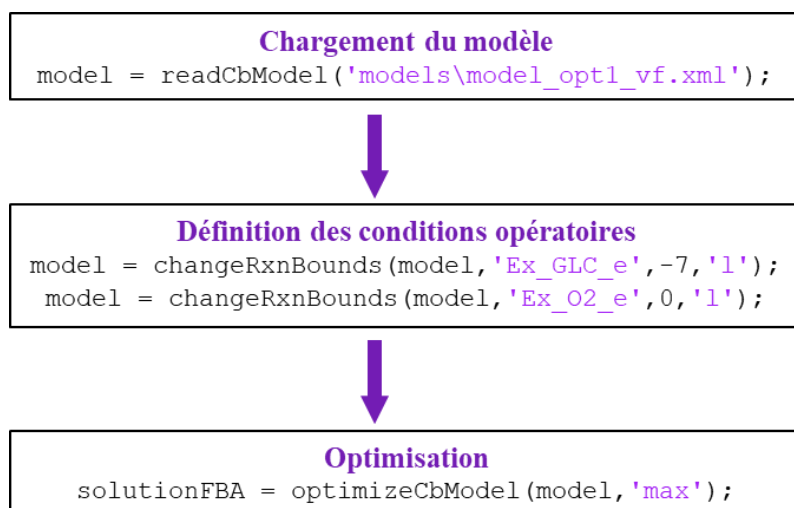
Dans ce travail, deux logiciels, COBRA Toolbox (Schellenberger et al., 2011) et OptFlux (Rocha et al., 2010), sont utilisés pour la résolution numérique du modèle métabolique. OptFlux a été utilisé pour les analyses préliminaires du modèle, pour tester le format du modèle et pour faire des simulations dans des conditions d'aérobiose et anaérobiose.

Cependant, avec ce logiciel, il est impossible de réaliser des boucles de simulations dans différentes conditions opératoires. Pour cela, le logiciel COBRA est utilisé à la place d'Optflux pour les différentes simulations, en conditions stationnaires et dynamiques, réalisées au cours de cette étude (chapitre 5).

Différents solveurs pour la résolution FBA, à l'aide du logiciel COBRA via Matlab, ont été testés tels que « glpk, matlab et gurobi ». Pour changer de solveur, la commande suivante peut être utilisée en précisant le nom de solveur et le type de programmation (programmation linéaire) :

```
solverOK = changeCobraSolver('nom_solveur','LP');
```

Les différentes étapes nécessaires pour la réalisation d'une simulation FBA pour le modèle métabolique proposé, à l'aide du logiciel COBRA \_ Toolbox via l'interface de Matlab, sont présentées dans la figure suivante (Figure II.7).



**Figure II.7** : Démarche de simulation FBA par le logiciel COBRA \_ Toolbox via l'interface matlab.

La première étape consiste au chargement du modèle métabolique sous forme de 4 matrices :

- La matrice stœchiométrique S
- Un vecteur de coefficient objectif « c »
- 2 vecteurs colonne « lb » et « ub » représentant les bornes minimales et maximales pour chaque réaction du modèle.

Puis, afin de simuler le comportement de *C. glutamicum* dans les différentes conditions opératoires étudiées, des flux de consommation d'oxygène, de glucose ou encore d'acides organiques ont été imposés en modifiant les deux bornes de la réaction d'échange de ce métabolite considéré (Exemple : Ex\_O2\_e, Figure II.7).



Dès que le modèle est converti en une représentation matricielle et que des contraintes sont imposées, une optimisation est lancée par la fonction « OptimizeCbModel ».

## 2.2. Modélisation cinétique

La démarche suivie pour la modélisation des cinétiques de croissance, de production/consommation des acides organiques et de consommation de glucose est présentée par la figure II.8.

### 2.2.1. Lois cinétiques

#### 2.2.1.1. Loi de croissance

La croissance microbienne peut être modélisée par différentes lois selon le microorganisme et les conditions opératoires de la culture. Elle peut être décrite, en fonction de la concentration en biomasse  $X$  (g/L), par la vitesse de production de biomasse  $r_X$  (g/h) ou par la vitesse spécifique de production de la biomasse  $\mu$  ( $h^{-1}$ ) :

$$\mu = \frac{r_X}{X}$$

Dans notre étude, les modèles de vitesse spécifique de croissance seront dérivés de trois principaux modèles:

- Modèle de Monod :  $\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S}$
- Modèle dérivé de Monod, à deux co-substrats :  $\mu = \mu_{max} \frac{S_1}{K_{S_1} + S_1} \frac{S_2}{K_{S_2} + S_2}$
- Modèle logistique (ou modèle de Verhulst) :  $\mu = \mu_{max} X \left(1 - \frac{X}{X_{max}}\right)$

Dans certains cas, afin de décrire l'inhibition par la concentration en produit, un modèle de Levenspiel (1980) peut être appliqué :  $\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S} \left(1 - \frac{P}{P_{max}}\right)^n$

Avec  $S$  ou  $S_i$  (g/L) et  $P$  (g/L), la concentration en substrat et produit,  $X_{max}$  (g/L) la concentration maximale en biomasse.

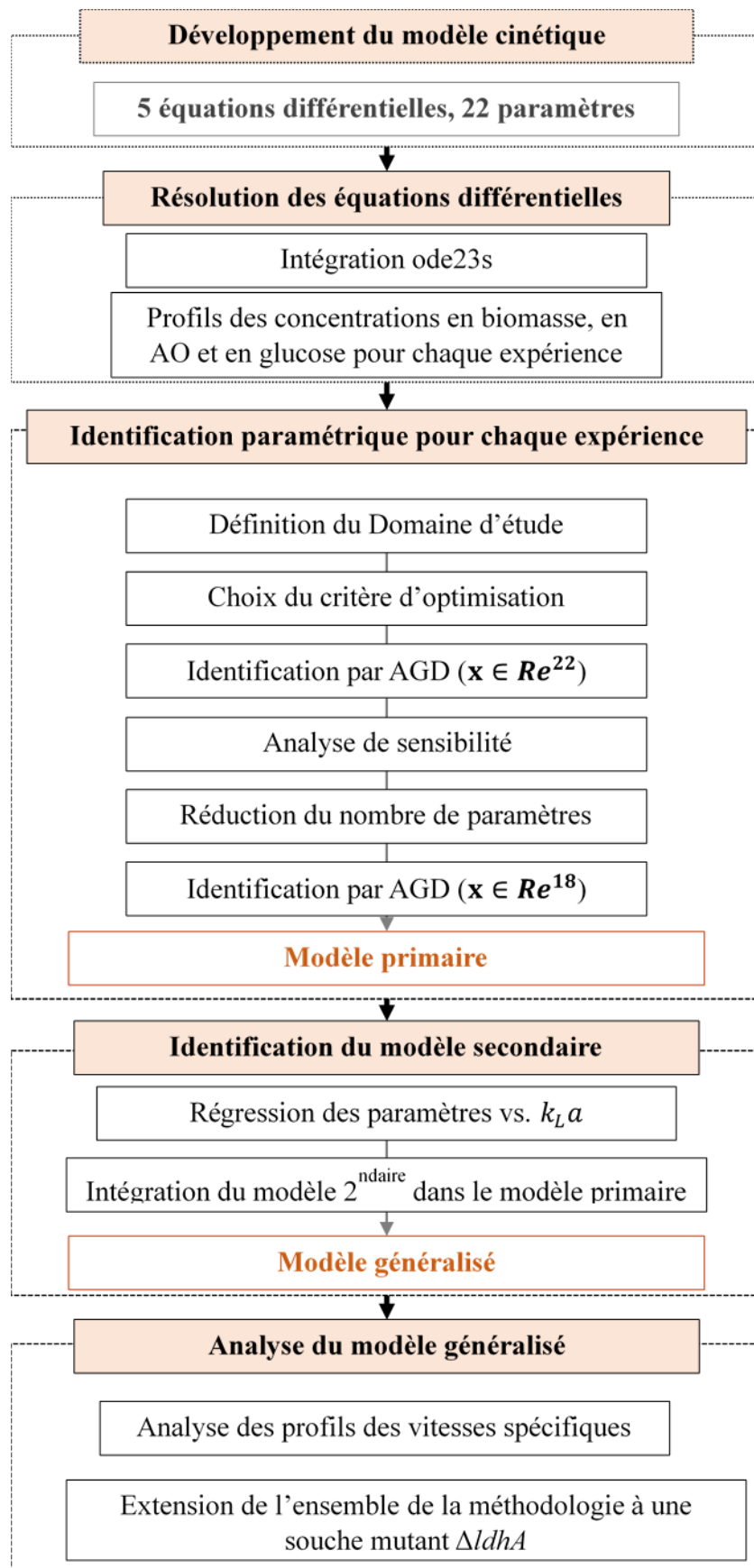


Figure II.8 : Démarche de la modélisation cinétique appliquée à *C. glutamicum*.

### 2.2.1.2. Loi de production des acides organiques

La cinétique de production des acides organiques est décrite par le modèle de Luedeking – Piret (1959). Ce modèle décrit le lien entre la vitesse volumique de formation de l'acide organique, le taux de croissance et la concentration en biomasse :

$$r_p''' = \alpha r_x''' + \beta X$$

Avec  $r_p'''$  (g / L/ h) et  $r_x'''$  (g DW/ L/ h) les vitesses volumiques de production de produit et de biomasse, et  $\alpha$  (g / g DW) et  $\beta$  (g / g DW/h) les constantes de modèle de Luedeking-Piret.

### 2.2.1.3. Loi de consommation de substrat

Le modèle cinétique décrivant la vitesse consommation d'un substrat  $r_s$  (g/ L/ h) prend en considération les différentes activités qui répondent au besoin de la cellule : croissance, production des métabolites et besoins énergétiques.

$$r_s''' = \frac{1}{Y_{X/S}} r_x''' + \frac{1}{Y_{P/S}} r_p''' + m X$$

$Y_{X/S}$  (g DW/ g substrat) et  $Y_{P/S}$  (g produit / g substrat) représentent les rendements de conversion de substrat en biomasse et en produit respectivement. Le paramètre  $m$  (g/g DW/h) représente la constante de maintenance.

### 2.2.2. Méthode d'intégration des équations différentielles

Les lois cinétiques de la croissance, la consommation de substrat (glucose) et la production des acides organiques sont intégrées dans des bilans matière de chaque constituant. Le problème est ainsi décrit par un système d'équations différentielles. Ces équations sont résolues à l'aide d'une méthode d'intégration de Matlab (ode23s) basée sur une formule Rosenbrock d'ordre 2 modifié.

### 2.2.3. Méthodologie d'identification des paramètres

Dans cette étude cinétique, le modèle développé présente des paramètres cinétiques (associés à des phénomènes physiologiques) et numériques (sans réalité physiologique). Ces paramètres ont été identifiés à l'aide d'une méthode d'optimisation stochastique : l'algorithme génético-évolutionnaire diploïde (AGD). L'utilisation de cette méthode nécessite de définir au préalable un critère d'optimisation et l'ensemble des paramètres à optimiser.

#### 2.2.3.1. Critère d'optimisation

L'identification des paramètres du modèle consiste à déterminer le vecteur de paramètres qui minimise la différence entre les concentrations expérimentales et celles simulées par le modèle. Cette différence a été formulée à l'aide de deux critères, correspondant à des écarts relatifs :

$$J_{max} = \sum_{j=1}^q \left( \sum_{i=1}^p (Y_{ij}^{exp} - Y_{ij}^{mod})^2 / (Max Y_j^{exp})^2 \right)$$

$$J_{rel} = \sum_{j=1}^q \left( \sum_{i=1}^p ((Y_{ij}^{exp} - Y_{ij}^{mod})^2 / (Y_j^{exp})^2) \right)$$

Avec p et q correspondant au nombre de point expérimentaux et au nombre de variable d'état du modèle (concentration en glucose, biomasse, lactate, succinate et acétate) respectivement.  $Y_{ij}^{exp}$  et  $Y_{ij}^{mod}$  représentent les données expérimentales (exp) et simulées (mod) de la j<sup>ème</sup> variable au i<sup>ème</sup> point expérimental. Le critère  $J_{max}$  représente l'erreur relative à la concentration maximale de l'expérience alors que le critère  $J_{rel}$  correspondant à l'erreur relative à la concentration en chaque point expérimental.

Le choix du critère le plus pertinent sera réalisé en comparant les paramètres optimaux obtenus pour chacun de ces deux critères. Pour comparer ces valeurs, un coefficient de variation (CV) a été défini pour chaque paramètre ( $p_i$ ) du modèle :

$$CV (\%) = \frac{\Delta p_i^{opt}}{\bar{p}_i^{opt}} = \frac{(p_{i,max}^{opt} - p_{i,rel}^{opt})}{\frac{(p_{i,max}^{opt} + p_{i,rel}^{opt})}{2}} \times 100$$

$\Delta p_i^{opt}$  et  $\bar{p}_i^{opt}$  représentent l'écart et la moyenne, respectivement, entre la valeur optimale du paramètre ( $p_{i,max}^{opt}$ ) obtenue avec le critère  $J_{max}$  et celle ( $p_{i,rel}^{opt}$ ) obtenue avec le critère  $J_{rel}$ .

#### 2.2.3.2. Méthode d'optimisation : Algorithme Génétique Diploïde (AGD)

L'algorithme génétique diploïde (AGD) utilisé dans ce travail est un code matlab (scripts + fonctions), développé au LRGP (Fonteix et al., 1995; Perrin et al., 1997). Le principe de cette méthode est présenté dans l'annexe 6. Les valeurs des paramètres de l'AGD fixées pour cette étude sont présentées dans le tableau suivant.

**Tableau II.5** : Réglage des paramètres de l’algorithme génétique diploïde

<b>Taille de la population</b>	2500
<b>Taux de mortalité</b>	1/3
<b>Taux de mutation</b>	0,05
<b>Taux d’homozygotie</b>	0,5
<b>Précision sur le critère</b>	$10^{-3}$

### 2.2.3.3. Étude de sensibilité

La première étape de cette étude consiste à définir les valeurs des différents paramètres du modèle cinétique. Comme il est difficile de déterminer les valeurs de certains paramètres du modèle à partir des données expérimentales ou de la littérature, nous avons choisi de passer par une étape d’identification préliminaire de tous les paramètres à l’aide de l’AGD. L’ensemble des valeurs estimées pour les différents paramètres du modèle constituent un vecteur  $\chi_{opt}$  correspondant à un critère d’optimisation  $J_{opt}$ .

Une étude de sensibilité a ensuite été réalisée afin d’évaluer l’impact de la variation de la valeur de chaque paramètre sur la valeur de critère d’optimisation. Ceci permet d’identifier les paramètres les moins influant. Les valeurs de ces paramètres peu sensibles, sont ainsi associées à un très large intervalle de confiance. Ils peuvent, dans certains cas, être considérés *a posteriori* comme constants et sortir du processus d’identification des paramètres du modèle.

Pour cela, la valeur de chaque paramètre a été modifiée entre -20 et 20 % de sa valeur optimale, en maintenant tous les autres paramètres à leur valeur optimale (dans  $\chi_{opt}$ ). Pour chaque modification, un vecteur  $\chi_k$  contenant la valeur modifiée du  $k^{\text{ème}}$  paramètre  $x_k$  et les valeurs optimales des autres paramètres  $x_{j,opt}$  ( $j = 1, N, j \neq k$ ) est créé. Les équations différentielles du modèle sont ensuite intégrées, en utilisant ce vecteur de paramètres  $\chi_k$  et le calcul de critère d’optimisation correspondant  $J_k$  est calculé (voir paragraphe 2.2.2.1. Critère d’optimisation). Enfin, un écart relatif  $\Delta J_{opt}$  (%) entre le critère d’optimisation obtenus  $J_k$  et le critère optimal  $J_{opt}$  est calculé par la formule suivante :

$$\Delta J_{opt} (\%) = \frac{(J_k - J_{opt})}{J_{opt}} \times 100$$

Les résultats sont présentés, pour chaque paramètre, sous la forme d'une courbe  $\Delta J_{opt}$  (%) vs.  $\Delta x_k$  (%), avec :

$$\Delta x_k (\%) = \frac{(x_k - x_{k,opt})}{x_{k,opt}} \times 100$$

#### 2.2.4. Méthodes d'analyse de la structure du modèle cinétique :

Comme le modèle cinétique est un modèle générique composé de 5 équations où chaque équation est la contribution de plusieurs phénomènes parallèles et séquentiels, nous avons choisi d'analyser plus précisément la structure de notre modèle en étudiant la contribution de chaque terme du modèle à la vitesse globale de production ou consommation. Pour des raisons de simplification, cette étude est basée sur des vitesses maximales observées au cours de l'expérience simulée.

##### Contribution maximale dans la vitesse globale de production ou consommation

Prenant l'exemple de la production d'un acide organique, la vitesse globale de cette production est égale à la somme de vitesse de production liée à la croissance  $q^{prod,1}(t)$  et celle non liée à la croissance  $q^{prod,2}(t)$ . Afin d'évaluer la contribution maximale relative de chaque terme  $\%q^{prod,i}(t_{i,max})$ ;  $i \in \{1,2\}$  dans la vitesse globale de production, le pourcentage suivant est défini :

$$\%q^{prod,i}(t_{i,max}) = \frac{q^{prod,i}(t_{i,max})}{q^{prod,i}(t_{i,max}) + q^{prod,j}(t_{i,max})} * 100$$

Avec  $t_{i,max}$  correspond à l'instant t où le  $i^{ème}$  terme est maximal.

La même formule a été utilisée pour le calcul de la contribution maximale de chaque terme dans la vitesse globale de la consommation de chaque acide organique.

##### Contribution dans la vitesse maximale globale de glucose

La contribution de la vitesse de consommation de glucose associée à la production d'un composant k ( $q_G^k$ ) ou à la maintenance dans la vitesse maximale globale de consommation de glucose ( $q_G^{max}$ ) est déterminée par la formule suivante :

$$\%q_G^k = \frac{q_G^k(t_{q_G^{max}})}{q_G^{max}} * 100$$

Avec  $q_G^k(t_{q_G^{max}})$ , la vitesse de consommation de glucose associée à la production du composant k (avec  $k \in \{\text{Lactate, Succinate, Acétate, Biomasse}\}$ ) ou à la maintenance, à un instant  $t_{q_G^{max}}$  correspondant à la vitesse maximale de consommation de glucose ( $q_G^{max}$ ).

#### Corrélation entre les données expérimentales et celles de simulation

Afin d'évaluer la fiabilité du modèle, des coefficients de détermination  $R^2$  entre les données modélisées ( $\hat{y}_i$ ) et expérimentales ( $y_i$ ) ont été calculés pour chaque variable d'état du modèle (biomasse, lactate, succinate, acétate et glucose), à chaque condition de  $k_{La}$ .

$$R^2 = 1 - \frac{\sum(y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum(y_i - \bar{y})^2}$$

Avec  $\bar{y}$  représente la moyenne des données expérimentales.

# Chapitre 3

---



### **III. Chapitre 3 : Identification des paramètres influençant la réponse physiologique de *Corynebacterium glutamicum* : impact de l'oxygénation et de la disponibilité en glucose**

#### **1. Introduction**

En apport limité en oxygène ou en anaérobiose, *C. glutamicum* produit majoritairement du lactate avec de l'acétate et du succinate comme co-produits. Cependant, le comportement de cette bactérie dépend des conditions environnementales. Il a été montré qu'une augmentation du pourcentage en CO<sub>2</sub> dissous dans le milieu de culture permettait d'améliorer la production de succinate aux dépens de la production de lactate chez *C. glutamicum* ATCC13032 (Radoš et al., 2014). De même, le niveau d'oxygénation et le mode de transition de l'aérobiose vers l'anaérobiose exercent une forte influence sur la réponse physiologique de *C. glutamicum*. Kaboré et al., (2015) ont montré que la production maximale de succinate, par la souche *C. glutamicum* 2262Δ*ldhA* privée du gène codant la lactate déshydrogénase, est mesurée à des  $k_{LA}$  faibles, entre 10 et 19 h<sup>-1</sup>, au cours de cultures en fiole d'Erlenmeyer. Plus le coefficient de transfert d'oxygène est important, plus la croissance et la production d'acétate sont importantes et moins la production de succinate est élevée. De même, l'influence respective de l'apport en oxygène et de la vitesse de consommation de glucose a été simulée, à l'aide d'un modèle métabolique, chez *C. glutamicum* ATCC13032 (Shinfuku et al., 2009). En suivant l'évolution des rendements de conversion du glucose en produits carbonés en fonction du ratio vitesse de consommation d'oxygène sur vitesse de consommation de glucose (OUR/GUR), il a été montré que selon ce ratio, il existait une production séquentielle des acides organiques avec une production de succinate correspondant aux ratios les plus faibles (< 0,4). En revanche, une re-assimilation des acides organiques, précédemment produits, a été observée en fin de la culture. Celle-ci a été expliquée par l'épuisement du substrat carboné initial, les acides organiques servant alors de source carbonée et / ou énergétique (Dominguez et al., 1993 ; Conrady et al., 2019 ; Kaboré et al., 2015).

Dans ce contexte, l'objectif des travaux présentés dans ce chapitre est d'identifier les paramètres influençant la réponse physiologique de *C. glutamicum* 2262 en conditions de limitation de l'apport en oxygène. La première partie est présentée sous la forme d'une publication acceptée par le journal « Engineering in Life Sciences ». Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'impact à la fois de l'oxygénation et de la disponibilité en glucose

sur le comportement de *C. glutamicum* 2262 au cours de cultures discontinues (cultures en fiole d'Erlenmeyer). Sur la base des résultats obtenus, un procédé tri-phasique reprenant, pour partie, les travaux de Kaboré et al. (2015) a été proposé pour optimiser la production de succinate par *C. glutamicum* 2262, souche non modifiée génétiquement.

Une seconde partie de ce chapitre est consacrée à la présentation de données complémentaires obtenues lors de cultures en fiole réalisées à différentes conditions de  $k_{La}$ . Ces résultats ont permis de préciser le phénomène de reconsommation de succinate et de déterminer le rôle de ce dernier au sein du métabolisme. Enfin, l'impact du ratio (OUR/GUR) sur la physiologie de *C. glutamicum* a été étudié lors de cultures en fiole (mode discontinu) et en bioréacteur mécaniquement agité (mode continu).

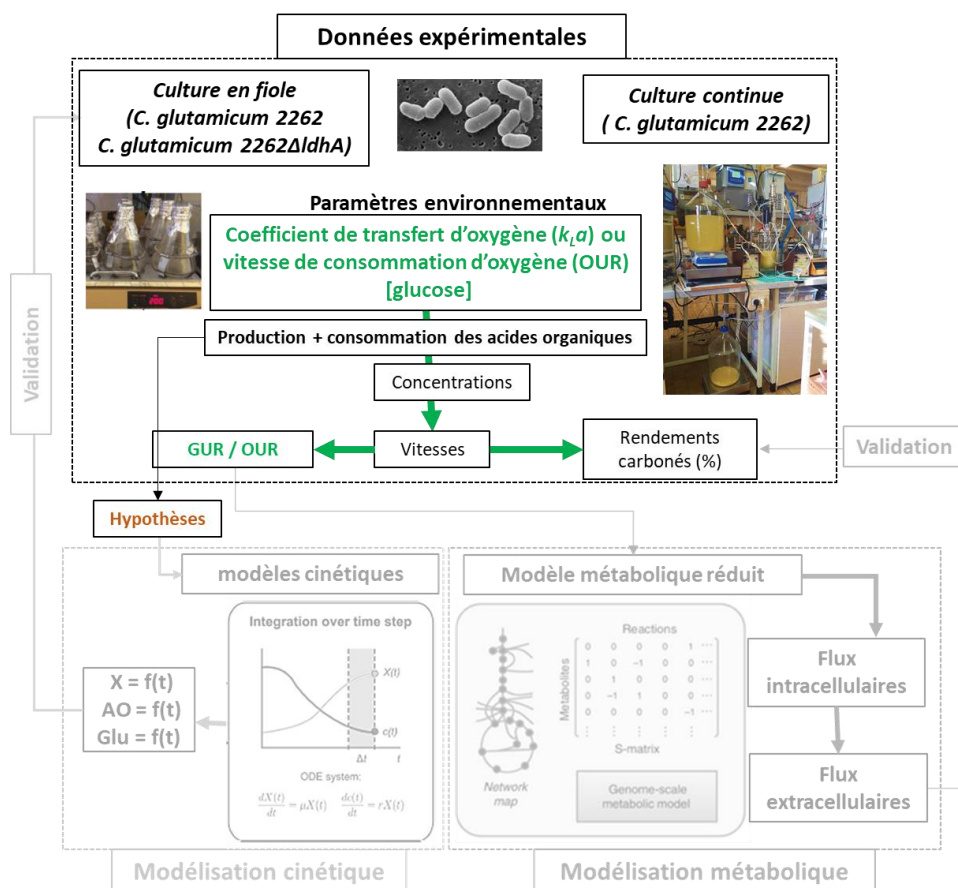


Figure III.1 : Démarche de l'étude expérimentale

## 2. Publication: *Corynebacterium glutamicum*, a natural overproducer of succinic acid?

Received: 27 August 2019 | Revised: 3 January 2020 | Accepted: 3 January 2020  
DOI: 10.1002/elsc.201900141



Engineering

in Life Sciences

### RESEARCH ARTICLE

# *Corynebacterium glutamicum*, a natural overproducer of succinic acid?

Amant Brki<sup>1,2</sup> | Karim Kabore<sup>1,2</sup> | Eric Olmos<sup>1,2</sup> | Sabine Bosselaar<sup>1,2</sup> |  
Fabrice Blanchard<sup>1,2</sup> | Michel Flick<sup>1,2</sup> | Emmanuel Guedon<sup>1,2</sup> | Frantz Fournier<sup>1,2</sup> |  
Stéphane Delaunay<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, CNRS, Vandoeuvre Cedex, France

<sup>2</sup>Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, Université de Lorraine, Vandoeuvre Cedex, France

#### Correspondence

Stéphane Delaunay, CNRS, Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, UMR 7274, 2 avenue de la forêt de Haye, BP 20163, 54505 Vandoeuvre Cedex, France.  
Email: stephane.delaunay@univ-lorraine.fr

#### Abstract

*Corynebacterium glutamicum* is well known as an important industrial amino acid producer. For a few years, its ability to produce organic acids, under micro-aerobic or anaerobic conditions was demonstrated. This study is focused on the identification of the culture parameters influencing the organic acids production and, in particular, the succinate production, by this bacterium. *Corynebacterium glutamicum* 2262, used throughout this study, was a wild-type strain, which was not genetically designed for the production of succinate. The oxygenation level and the residual glucose concentration appeared as two critical parameters for the organic acids production. The maximal succinate concentration ( $4.9 \text{ g L}^{-1}$ ) corresponded to the lower  $k_L a$  value of  $5 \text{ h}^{-1}$ . Above  $5 \text{ h}^{-1}$ , a transient accumulation of the succinate was observed. Interestingly, the stop in the succinate production was concomitant with a lower threshold glucose concentration of  $9 \text{ g L}^{-1}$ . Taking into account this threshold, a fed-batch culture was performed to optimize the succinate production with *C. glutamicum* 2262. The results showed that this wild-type strain was able to produce  $93.6 \text{ g L}^{-1}$  of succinate, which is one of the highest concentration reported in the literature.

#### KEYWORDS

*Corynebacterium glutamicum*, oxygen transfer, residual glucose concentration, succinate

## 1 | INTRODUCTION

*Corynebacterium glutamicum* has become a platform organism for white biotechnology widely used in industry for the production of amino acids such as lysine and glutamate [1,2]. Several studies have demonstrated its ability to produce a variety of other metabolites, such as organic acids in oxygen-deprived conditions [3–5]. The impact of such culture conditions on the growth of *C. glutamicum*

remains discussed. In this environment, *C. glutamicum* R produced lactate, succinate, and acetate without significant growth [6]. It was also previously assumed that *C. glutamicum* ATCC13032 can grow anaerobically only in the presence of nitrate [7,8]. However, recently, it was demonstrated that, even in the absence of nitrate, this same strain exhibited a residual growth, in anaerobic conditions, using glucose, fructose, sucrose, or ribose as substrates and with lactate, succinate, and acetate as products [9].

Abbreviations: DOC, dissolved oxygen concentration;  $k_L a$ , volumetric mass transfer coefficient; LDH, lactate dehydrogenase.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2020 The Authors. *Engineering in Life Sciences* published by WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

The previously mentioned organic acids are the main products identified during culture of *C. glutamicum* under oxygen-deprived conditions. One of them, succinate, classified by U.S. Department of Energy as one of the top 12 building block chemicals from biomass, has a wide variety of applications such as surfactant, foaming agent, food, or pharmaceutical additive. It can also serve also a platform for the synthesis of other chemicals as 1,4-butanediol and tetrahydrofuran, which can be used in polymer synthesis [10,11]. Metabolic and/or process engineering strategies have been applied to improve the succinate production in *C. glutamicum*. However, it is accepted in the scientific literature that the optimization of the succinate production by *C. glutamicum* necessitates a genetic improvement of this bacterium. In anaerobic conditions, succinate is synthesized via glycolysis by carboxylation of PEP or pyruvate to oxaloacetate and through the reductive branch of the TCA cycle [6]. The addition of CO<sub>2</sub>, in gaseous form or as carbonate salt, enhanced the production rate and yield of succinate produced by wild-type or metabolically engineered strains of *C. glutamicum* [4,6,12]. Okino et al. [4] developed a two-step process for succinate production in which cells grew aerobically, were harvested, washed, and transferred in a second bioreactor with anaerobic conditions for the organic acid production. Using this two-step process, an engineered strain was able to produce 146 g L<sup>-1</sup> succinate with a yield of 1.4 mol mol<sup>-1</sup> glucose, after 46 h of culture [13]. With this strain, no lactate production was observed, but a large amount of acetate was produced. Later, Litsanov et al. [14] engineered *C. glutamicum* ATCC13032 to reduce the acetate production. The resultant strain was able to produce 134 g L<sup>-1</sup> succinate with a yield of 1.67 mol mol<sup>-1</sup> glucose using the two-step process with an anaerobic fed batch phase. Alternatively, an one-step process with successive aerobic transition and anaerobic phases in the same bioreactor was set up [15]. These last authors demonstrated that the transition from aerobic to anaerobic conditions, defined as micro-aerobic conditions, had a strong influence on organic acid production. According to Kaboré et al. [15], micro-aerobic conditions consist in a constantly limiting oxygen transfer rate but with non-zero dissolved oxygen concentrations. Similarly, Byun et al. [16] characterized this oxygenation state as a phase with low dissolved oxygen concentration (0–5%). It was also shown, by determination of the volumetric mass transfer coefficient ( $k_L a$ ) during cultures in shake flask and using a mutant strain of *C. glutamicum* deleted for lactate dehydrogenase (LDH), that a critical oxygenation level had to be defined according to the produced organic acid. The optimal transfer condition corresponded to  $k_L a$  values between 10 and 19 h<sup>-1</sup> for succinate production and, 19 and 33 h<sup>-1</sup> for acetate production [15]. Additionally, different strategies of transition from the aerobic to anaerobic conditions have been studied. Compared to an instantaneous transition from aerobiosis to anaerobiosis, applying an

### PRACTICAL APPLICATION

Succinate is one of the 12 top bio-based building blocks. Several strategies have been developed to optimize the bioproduction of this di-acid such as identification of natural overproducing microbial strains or genetic design of current industrial microorganisms, mainly *Escherichia coli* or *Corynebacterium glutamicum*. Nevertheless, the understanding of the impacts of the culture parameters on the physiology of the microorganisms may also constitute an accurate approach to improve the production of organic acids by non-genetically designed microorganisms. Then, based on the understanding of the physiological behaviour of *C. glutamicum*, a GRAS bacterium, a process with a controlled oxygen transfer rate was proposed for the production of organic acids including succinic acid. Applying this process allowed the production of one of the highest concentration of succinate reported to date with a non-genetically modified microorganism.

optimized transition strategy led to an increase in the succinate concentration up to 640% [15]. This positive impact of a micro-aerobic environment on the synthesis of succinate was also observed in *E. coli*. The introduction of a micro-aerobic phase at the end of the aerobic growth phase resulted in a significant increase in the expression of genes involved in the succinate synthesis pathway, and thus improved the succinate yield and productivity during the anaerobic phase [17].

The capacity of the microbial biocatalysts to re-consume the product of interest may affect the performance of some bioprocesses. Concerning the production of succinate by *C. glutamicum*, a decrease in the succinate concentration, in micro-aerobic environments, was previously noticed at the end of cultures using a strain deleted for LDH. This re-consumption was related, according to the authors, to the glucose depletion in the culture medium [18]. Moreover, recently, Conrady et al. [19] showed that *C. glutamicum* was able to simultaneously consume glucose and the produced organic acids (lactate, acetate, and succinate) when the oxygenation of the culture medium was sufficient. These works suggest that the understanding and the control of the succinate consumption by *C. glutamicum* may contribute to enhance the performances of succinate production by this bacterium.

Therefore, this study aimed to evaluate the physiological behaviour of a wild-type strain of *C. glutamicum* in an oxygen-deprived environment and to compare it with those strains designed for the succinate production. The second goal of the



study was to investigate the ability of *C. glutamicum* to consume the previously produced succinate. Then, based on the collected data and the data from the literature, and using only a process engineering strategy, the potential of *C. glutamicum* in terms of succinate production was determined.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Strain and culture medium

*Corynebacterium glutamicum* 2262 was used in this study. This non-genetically engineered strain, initially used for the glutamate overproduction [20] was cultivated in a modified MCGC mineral salt medium in which the citrate was replaced by deferroxamine. The medium compositions for the culture in shake flask and in bioreactor can be found in Supporting Information Table S1.

### 2.2 | Determination of the volumetric mass transfer coefficient $k_L a$

The  $k_L a$  ( $\text{h}^{-1}$ ) can be determined by experimental method or by empirical model. In our study, we used the empirical correlation of Seletzky et al. [21] based on the operating parameters as the shaking frequency ( $N$ , rpm), filling volume ( $V$ , mL), the maximal shake flask diameter ( $d$ , cm), and shaking diameter ( $d_0$ , cm; Equation (1)). This model is based on data obtained from a chemical model system (sodium sulfite) in which the catalyst, cobalt sulfate, simulated a microbial oxygen consumption. It was successfully used with several microbial catalysts such as *C. glutamicum* ATCC13032 [21] and *Streptomyces pristinaespiralis* [22]. Moreover, using a *ldhA*-deleted strain of *C. glutamicum* 2262, Kaboré et al. [18] demonstrated the very good agreement between experimental and estimated values with a relative difference less than 10%.

$$k_L a = 0.024 \times N^{1.16} \times V^{-0.83} \times d_0^{0.38} \times d^{1.92} \quad (1)$$

This correlation was validated for a broad range of the operating parameters ( $N$ : 50–500 rpm;  $V$ : 4–20%;  $d_0$ : 1.25–10 cm, and flask volumes between 50 and 1000 mL), and the accuracy was 30% [21].

### 2.3 | Culture conditions

A first preculture (A) consisted in 50 mL of MCGC, contained in a 500 mL baffled shake flask, inoculated with 1 mL of a glycerol stock of *C. glutamicum* 2262. The preculture (A) was performed at a temperature of 33°C and an agitation rate of 200 rpm, until reaching an optical density at 570 nm of 60. Five milliliters of this preculture (A) were used to inoculate a second preculture (B) performed in the same

operating conditions. When the optical density at 570 nm reached the value of 30, the preculture (B) was stopped by immersing the flask in 70% v/v ethanol, at a temperature of  $-20^\circ\text{C}$ . Then, the flask was stored at a temperature of  $4^\circ\text{C}$  for 24 h maximum. Preculture (B) was used as inoculum for the culture experiments in flasks. All the cultures were performed in unbaffled shake flasks. By varying the shaking frequency ( $N$ ), the flask maximal volume ( $V_T$ ), the filling volume ( $V_L$ ), the flask diameter ( $d$ ) and the shaking diameter ( $d_0$ ), different  $k_L a$ , and then, oxygenation conditions were applied. All the culture conditions are listed in Supporting Information Table S2. To avoid modification in the oxygenation conditions by the volume changes due to samplings, for each  $k_L a$  condition, several flasks were used in parallel. Each flask was sacrificed for the determination of biomass and organic acid concentrations at a single culture time and in a specific  $k_L a$  condition. For a  $k_L a$  about  $90 \text{ h}^{-1}$ , other cultures were performed by adding succinate and or glucose in the medium. Succinate was dissolved in water, adjusted to pH 7.6 with KOH, and sterilized by filtration. All cultures were performed at  $33^\circ\text{C}$  and the initial pH was adjusted to 7.6 with KOH.

### 2.4 | One-step process for the organic acid production using *C. glutamicum* 2262

The culture was performed in a 2 L stirred tank bioreactor equipped with pH,  $\text{O}_2$ , and temperature probes. During the culture, the temperature was maintained at a value of  $33^\circ\text{C}$ . The pH was regulated at a set point of 7.6 by automatic addition of a 10 N KOH solution or 2 N HCl solution using a peristaltic pump. The agitation rate was maintained at a value of 900 rpm. The initial culture medium was 1.13 L of MCGC medium containing  $85.5 \text{ g L}^{-1}$  of glucose combined with  $14 \text{ g L}^{-1}$  of  $\text{NaHCO}_3$ . A feeding was applied after the transition phase, once the aeration was totally stopped. Eight pulses of 50 mL of glucose at a concentration of  $630 \text{ g L}^{-1}$  and 50 mL of  $\text{NaHCO}_3$  solution at a concentration of  $84 \text{ g L}^{-1}$  were performed after 10, 18, 24, 28, 42, 48, 53, and 68 h, respectively.

A one-step process based on three successive aerobic, micro-aerobic, and anaerobic phases was used for the succinate production by *C. glutamicum* 2262. During the aerobic phase, the dissolved oxygen concentration (DOC) was maintained at a constant concentration of 50% of air saturation by changing the airflow rate. When the cells reached the optical density of about 30 at 570 nm, a progressive deoxygenation based on the control of dissolved oxygen concentration was applied. In this study, the best transition strategy proposed by Kaboré et al. [15] was applied: the dissolved oxygen level was switched from 50 to 20% then to 10% of air saturation. The DOC was maintained for at least 2 h for each level. At the end of the transition phase, the aeration was totally stopped that initiated the anaerobic phase.

## 2.5 | Analytical methods

The biomass concentration was determined by the measurement of absorbance at 570 nm with a Thermo Scientific Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific, France). The dry cell concentration was calculated using the following relation:

$$(\text{g DW L}^{-1}) = 0.35 \times \text{OD}_{570 \text{ nm}} \quad (2)$$

The lactate, succinate, acetate, pyruvate, and fumarate concentrations were measured by HPLC according to the method described by Kaboré et al. [18].

## 2.6 | Determination of kinetic parameters

The global kinetic parameters were determined for each experiment. Maximal specific growth, glucose consumption, and organic acid production rates were calculated as follows:

$$\begin{aligned} \mu_{\max} &= \max_t \left( \frac{1}{[X]_f} \times \frac{d[X]_f}{dt} \right) \\ q_{\max}^{OA} &= \max_t \left( \frac{1}{[X]_f} \times \frac{d[OA]_f}{dt} \right) \\ q_{\max}^{glu} &= -\max_t \left( \frac{1}{[X]_f} \times \frac{d[glu]_f}{dt} \right) \end{aligned}$$

where  $[X]_f$ ,  $[OA]_f$ , and  $[glu]_f$  were fitted concentrations of biomass, organic acids, and glucose, respectively. The fitting was performed using smoothing spline interpolation method (Matlab, Mathworks, USA).

## 3 | RESULTS

### 3.1 | Effect of gas–liquid mass transfer on the growth, the glucose consumption, and the organic acids production

To investigate the impact of oxygenation level on the physiological response of the wild-type strain, *C. glutamicum* 2262, batch cultures were performed in unbaffled shake flasks. As it was previously validated for a mutant strain of *C. glutamicum* 2262 [18], the correlation of Seletzky et al. [21] was used for the evaluation of applied  $k_L a$  during the cultures. This parameter was set at 0.6, 5, 11, 15, 20, 31, 44, 77, 90, and 118  $\text{h}^{-1}$ , respectively. Time profiles of biomass, glucose, and organic acid concentration collected during these different experiments are presented in Figure 1. Pyruvate and fumarate were also detected, in addition of lactate, succinate, and acetate. However, fumarate and pyruvate concentrations remained below 0.12 and 0.44  $\text{g L}^{-1}$ , respectively, and were not significantly influenced by the changes in the gas–liquid mass transfer (data not shown).

Increasing the  $k_L a$  value from 0.6 to 118  $\text{h}^{-1}$  led to an increase of the maximal concentration of biomass from 2 to 12  $\text{g L}^{-1}$  (Figure 1A). Up to 44  $\text{h}^{-1}$ , the  $k_L a$  had also a strong influence on the maximal specific growth rate. Above this threshold, the bacterial growth was less impacted (Figure 2A).

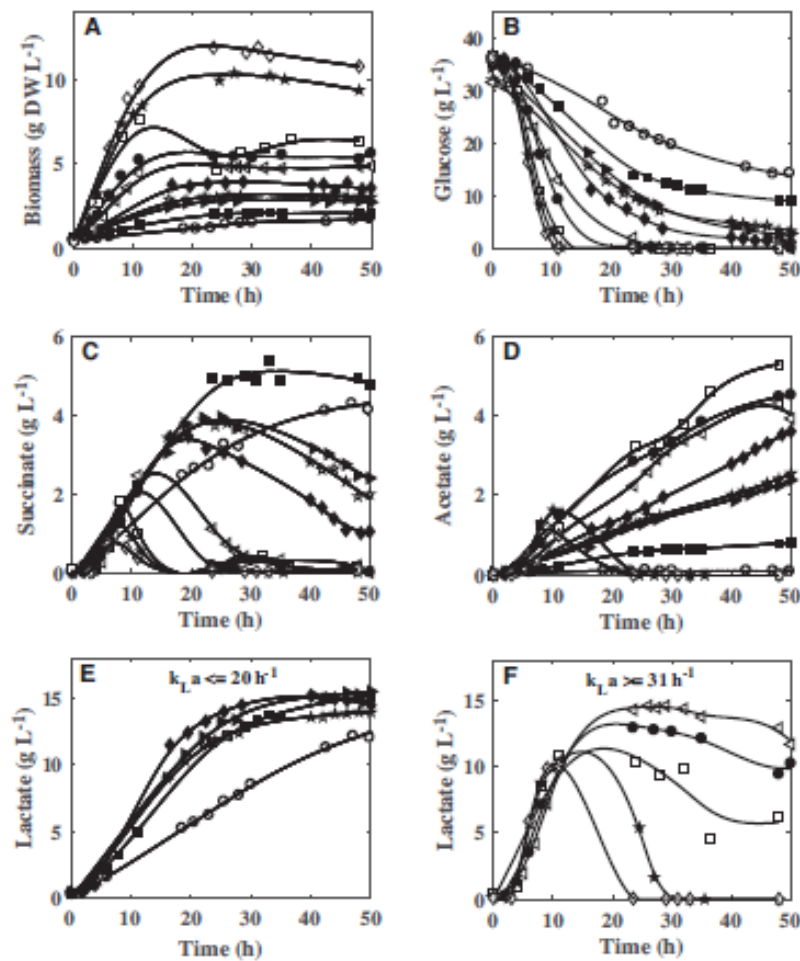
In this study, glucose was used as the sole initial carbon source. Increasing the gas–liquid mass transfer induced an earlier depletion of glucose (Figure 1B). While the glucose was not entirely consumed during the cultures with  $k_L a$  under 20  $\text{h}^{-1}$ , glucose exhaustion was observed from  $k_L a = 31 \text{ h}^{-1}$  and higher. Residual concentrations of 1.3, 2.9, 3.1, 9, and 13.1  $\text{g L}^{-1}$  glucose were determined in the supernatant of the cultures at  $k_L a$  values of 20, 15, 11, 5, and 0.6  $\text{h}^{-1}$ , respectively. The glucose was consumed with the same maximal specific consumption rate, about 1.15  $\text{g (g DW)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , for  $k_L a$  values higher than 20  $\text{h}^{-1}$  (Figure 2B).

In all the culture conditions, the production of lactate, succinate, and acetate was noticed (Figure 1C–F). The lactate appeared always as the main product. Remarkably, the maximal lactate concentration remained very similar for  $k_L a$  values between 5 and 31  $\text{h}^{-1}$ , with concentrations between 14.4 and 15.3  $\text{g L}^{-1}$  (Figure 1E), and decreased for higher  $k_L a$  values (Figure 1F). Above 31  $\text{h}^{-1}$ , the accumulation of lactate was transitory, which is due to the consumption of the previously produced lactate. This use of lactate as a substrate was closely correlated to the glucose exhaustion in the culture medium (Figure 1B,F). The lactate from glucose yield decreased with the increase in the  $k_L a$  value. The highest lactate yields, about 0.55  $\text{g g}^{-1}$  glucose, were reached for  $k_L a$  values of 0.6 and 5  $\text{h}^{-1}$  (Figure 3). Similarly, the optimal specific production rate of lactate was obtained at  $k_L a$  value of 5  $\text{h}^{-1}$  (Figure 2B).

The second organic acid, in a quantitative point of view, was acetate. Up to 5.3  $\text{g L}^{-1}$  were accumulated at 77  $\text{h}^{-1}$ . The synthesis of this organic acid was drastically impacted by the  $k_L a$ . Its maximal concentration increased with the  $k_L a$  from 0.6 to 77  $\text{h}^{-1}$ . Then, it was only transiently produced at 90 and 118  $\text{h}^{-1}$  (Figure 1D). The acetate reassimilation was concomitant with the lactate reconsumption (Figure 1D,F). As the maximal concentration, the acetate from glucose yield and the specific acetate production rate displayed a maximum value according to the gas–liquid mass transfer coefficient. The maximum yield was measured for  $k_L a$  ranging from 31 to 77  $\text{h}^{-1}$  (Figure 3), whereas the maximal specific acetate production rate reached a plateau, with maximum value close to 0.06  $\text{g (g DW)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , for  $k_L a$  values between 20 and 90  $\text{h}^{-1}$  (Figure 2B).

Additionally, *C. glutamicum* 2262 produced succinate during the different cultures. The maximal succinate concentration (4.9  $\text{g L}^{-1}$ ) and conversion yield (0.22  $\text{g g}^{-1}$  glucose) corresponded to lowest  $k_L a$  values, 0.6 and 5  $\text{h}^{-1}$  (Figures 1C and 3). Similarly, the highest maximal specific succinate production rate was obtained to the  $k_L a$  value of 5  $\text{h}^{-1}$ . A



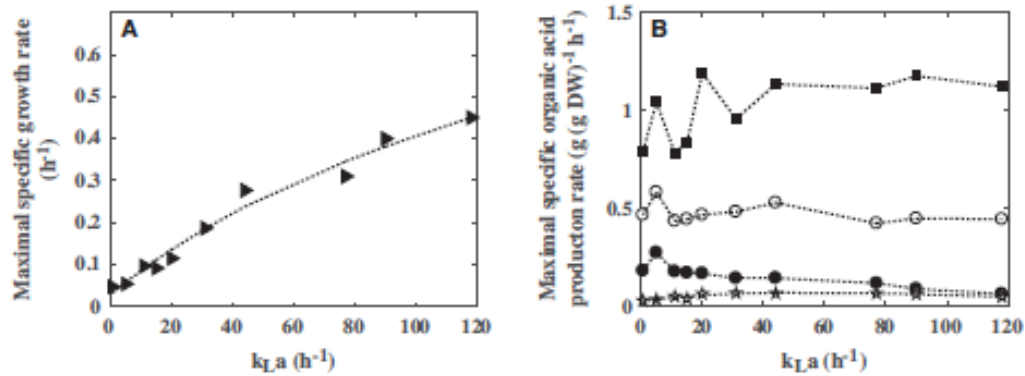


**FIGURE 1** Influence of volumetric mass transfer coefficient ( $k_{L,a}$ ) values on the (A) biomass, (B) glucose, (C) succinate, (D) acetate, and (E and F) lactate production by *C. glutamicum* 2262. The values of  $k_{L,a}$  were 0.6 (○), 5 (■), 11 (☆), 15 (▲), 20 (◆), 31 (◄), 44 (●), 77 (◻), 90 (★), and 118  $\text{h}^{-1}$  (◇)

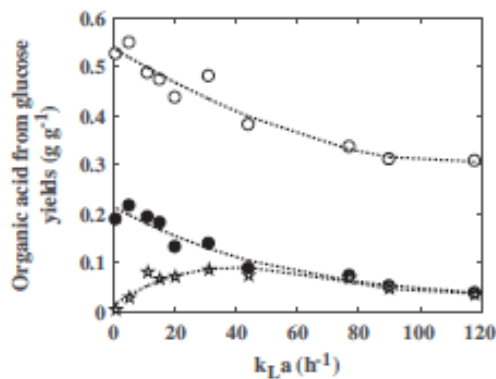
decrease in the succinate maximal concentration and the maximal specific succinate production rate was then observed when increasing the  $k_{L,a}$  value. Interestingly, except at 0.6 and 5  $\text{h}^{-1}$ , the succinate accumulation in the culture broth was transient. The stop of the net succinate production occurred earlier during the culture as the  $k_{L,a}$  increased, leading to a lower succinate final concentration for  $k_{L,a}$  between 11 and 20  $\text{h}^{-1}$  and to close to zero at the end of the cultures for  $k_{L,a}$  above 31  $\text{h}^{-1}$ . It is noticeable that the succinate re-assimilation started while glucose was still available in the culture broth for bacterial growth and energetic needs. To better put that into evidence, the succinate concentrations were plotted versus the glucose residual concentrations. In all the gas-liquid mass transfer conditions, the succinate re-assimilation occurred at a lower threshold glucose concentration of about 9  $\text{g L}^{-1}$  (Figure 4). A concomitant consumption of both succinate and glucose was then measured until the complete depletion of the latter.

### 3.2 | Succinate as a co-substrate for *C. glutamicum* 2262

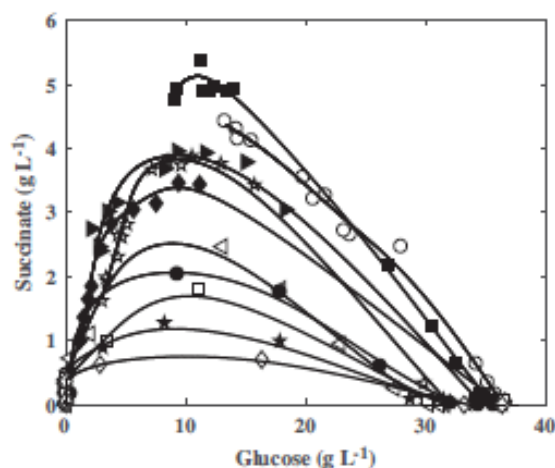
In order to determine the role of succinate as a substrate, cultures were performed with succinate as sole carbon source or with a mixture of glucose and succinate (Figure 5). In all these cultures, a  $k_{L,a}$  value of 90  $\text{h}^{-1}$  was imposed. The traces of glucose (0.3  $\text{g L}^{-1}$ ) initially present in the culture in which succinate should be the sole carbon source were brought by the inoculum. In all the cultures, bacterial growth was noticed only before glucose exhaustion. This growth stopped after 1, 4, or 5 h in presence of 4.1  $\text{g L}^{-1}$  succinate, 4.9  $\text{g L}^{-1}$  succinate plus 5  $\text{g L}^{-1}$  glucose, or 4.9  $\text{g L}^{-1}$  succinate plus 10.8  $\text{g L}^{-1}$  glucose, respectively. In all the conditions, succinate was consumed simultaneously to glucose. The succinate consumption ceased with the exhaustion of glucose when no glucose was initially added in the culture medium, whereas the succinate was still slowly metabolized until the end of the culture



**FIGURE 2** Influence of the volumetric mass transfer coefficient ( $k_L a$ ) on (A) the maximal specific growth rate, (B) the maximal specific glucose consumption rate (■), and the maximal specific lactate (○), succinate (●), and acetate (☆) production rate by *C. glutamicum* 2262



**FIGURE 3** Influence of the volumetric mass transfer coefficient ( $k_L a$ ) on the yields of lactate (○), succinate (●), and acetate (☆), from glucose



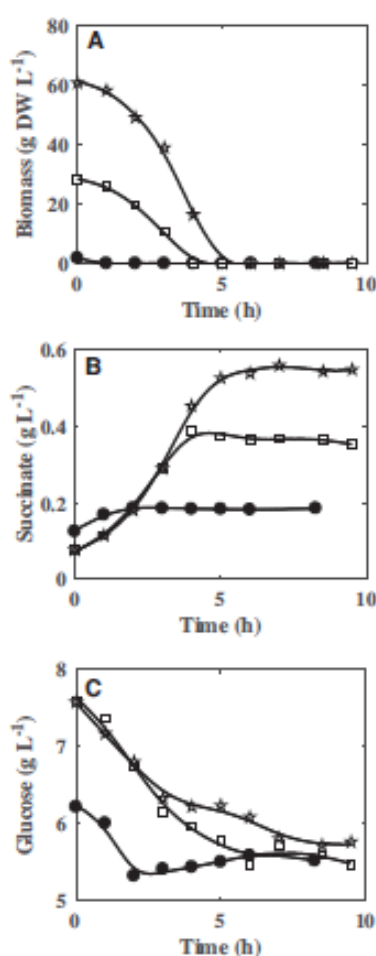
**FIGURE 4** Dependence of succinate production by *C. glutamicum* 2262, on the residual glucose concentration for the different  $k_L a$  conditions. The values of  $k_L a$  were 0.6 (○), 5 (■), 11 (☆), 15 (▶), 20 (◆), 31 (◀), 44 (●), 77 (□), 90 (★), and 118  $\text{h}^{-1}$  (◇)

in the two other conditions. However, this organic acid was clearly not able to sustain the growth of *C. glutamicum* when it remained the only available carbon molecule in the culture medium (Figure 5A,B).

### 3.3 | Succinate production by *C. glutamicum* 2262 in a one-step process

As demonstrated above, the succinate synthesis in *C. glutamicum* is impacted by the oxygenation level and the residual glucose concentration. In addition to these two parameters, it was previously shown that the succinate production might be limited by the dissolved  $\text{CO}_2$  sustainability due to the crucial role of anaplerotic enzymes in the succinic acid biosynthetic pathway [6]. Therefore, to evaluate the potential of *C. glutamicum* 2262 to produce the succinate, a fed-batch culture was performed by applying the one-step process with, successively, aerobic, optimized transition and anaerobic phases previously developed with a *ldhA* deleted strain of *C. glutamicum* 2262 [15]. The culture started with an initial volume of 1.2 L MCGC medium (containing  $85.5 \text{ g L}^{-1}$  glucose and  $14.1 \text{ g L}^{-1}$   $\text{NaHCO}_3$ ). During the anaerobic phase, eight additions of 50 mL glucose ( $630 \text{ g L}^{-1}$ ) and 50 mL  $\text{NaHCO}_3$  ( $84 \text{ g L}^{-1}$ ) were performed. Under aerobic conditions (until 6 h of culture), glucose was metabolized to biomass and no production of organic acid was observed (Figure 6). During the transition phase (from 6 to 10 h of culture), *C. glutamicum* kept growing and reached a maximal mass of about 18 g DW (about  $16 \text{ g DW L}^{-1}$ ). Few amounts of organic acids were produced. At the end of this phase, the growth stopped whereas a residual glucose concentration of about  $30.9 \text{ g L}^{-1}$  was measured. At the beginning of the anaerobic phase, the first pulse of glucose and bicarbonate solution was done. A rapid increase in the organic acid production was observed while the biomass concentration decreased to reach a final concentration of  $3.87 \text{ g DW L}^{-1}$  ( $7.5 \text{ g DW}$ ). The glucose concentration remained higher than  $9 \text{ g L}^{-1}$  except at 24 and





**FIGURE 5** Kinetics of biomass concentration (A), succinate (B), and glucose (C) consumptions during cultures of *C. glutamicum* 2262 in unbaffled shake flask at a  $k_L a$  value of  $90 \text{ h}^{-1}$  and with initial concentrations of  $4.1 \text{ g L}^{-1}$  succinate and no glucose ( $\bullet$ ),  $4.9 \text{ g L}^{-1}$  succinate plus  $5 \text{ g L}^{-1}$  glucose ( $\square$ ), and  $4.9 \text{ g L}^{-1}$  succinate plus  $10.8 \text{ g L}^{-1}$  glucose ( $\blacktriangle$ )

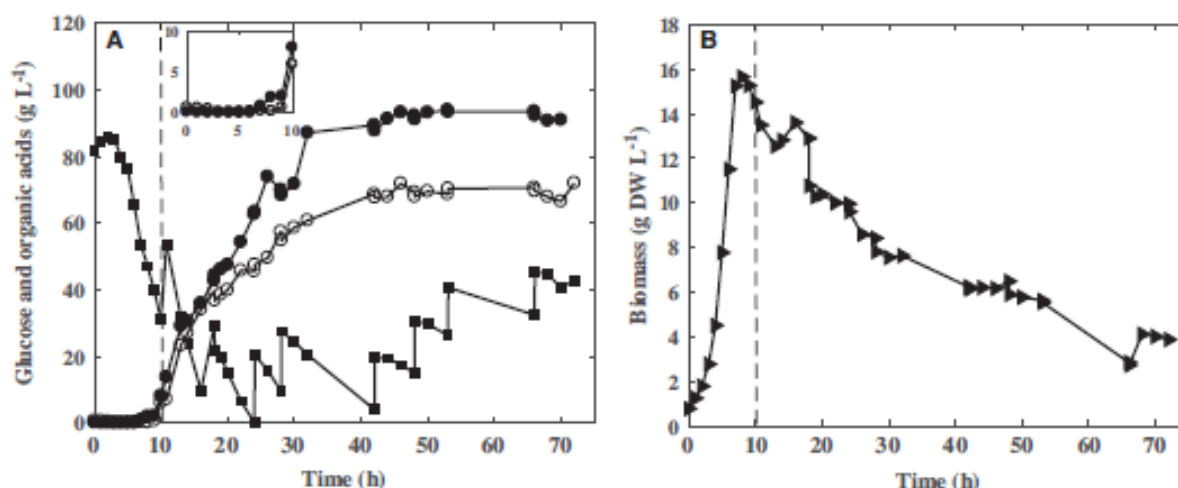
42 h. Under these conditions, *C. glutamicum* 2262 produced mainly lactate and succinate with a succinate to lactate ratio of about 1 mole per mole. At the end of the culture,  $1.1 \text{ g L}^{-1}$  of pyruvate were produced and no acetate was detected (data not shown). After the fifth pulse, the organic acid production reached a plateau with a maximal concentration of succinate and lactate of about  $93.6 \text{ g L}^{-1}$  ( $793 \text{ mM}$ ) and  $70.7 \text{ g L}^{-1}$  ( $785 \text{ mM}$ ), respectively. The glucose was accumulated to  $42.8 \text{ g L}^{-1}$  at the end of the culture.

#### 4 | DISCUSSION

To date, the succinate production using *C. glutamicum* was mainly performed with genetically modified strains. It is

generally assumed that the deletion of *ldhA* (lactate dehydrogenase encoding gene) is the minimal genetic modification to achieve the succinate overproduction with this bacterium. The absence of NADH cofactors re-oxidation, consequently to the lack of lactate dehydrogenase, drives the carbon flux towards the succinate synthesis pathway in which the NADH re-oxidation occurs at the malate dehydrogenase and succinate dehydrogenase levels. Up to now, only one publication used a wild-type strain, *C. glutamicum* ATCC13032, to investigate the influence of  $\text{CO}_2$  availability on the succinate production with a focus on modification in the intracellular carbon fluxes induced by this  $\text{CO}_2$  supplementation [12]. In the present study, the potential of a wild-type strain of *C. glutamicum* in terms of succinate production was investigated.

Under deprived oxygen or anaerobic conditions, *C. glutamicum* metabolized glucose to produce organic acids, mainly lactate, succinate and acetate [4,6]. In this study, organic acid production was clearly shown to be related to the culture medium oxygenation (Figure 1). The final concentration of lactate, which is the main fermentation end-product, was maximal when  $k_L a$  value was set between  $5$  and  $20 \text{ h}^{-1}$ . The optimal succinate production corresponded to  $k_L a$  of  $5 \text{ h}^{-1}$  and below. For  $k_L a$  values between  $31$  and  $77 \text{ h}^{-1}$ , the production of lactate and succinate decreased, whereas the production of acetate was maximal. For a  $k_L a$  value higher than  $77 \text{ h}^{-1}$ , the biomass production was improved (Figure 1). A similar sequence in the organic acid production, according to the oxygen transfer conditions, was previously observed with other strains of *C. glutamicum*. Based on simulations using a genome-scale metabolic model, Shinfuku et al. [23] highlighted the influence of oxygenation on the metabolism of *C. glutamicum* ATCC13032. Whereas for sufficient oxygen availability (aerobiosis), the glucose was converted to biomass and  $\text{CO}_2$ , the decrease in oxygen transfer rate induced the acetate synthesis then, the lactate production and for the lowest oxygen transfer conditions the succinate synthesis [23]. Using a microtiter plate-based cultivation, Käß et al. [24] confirmed this impact of oxygenation on the metabolism of *C. glutamicum* ATCC13032 but also on the one of the L-lysine producer *C. glutamicum* DM1933. With *C. glutamicum* ATCC13032, for maximum oxygen transfer rates,  $\text{OTR}_{\text{max}}$ , from  $5.7$  to  $3.27 \text{ mM h}^{-1}$  (corresponding to  $k_L a$  values between  $25$  and  $14 \text{ h}^{-1}$  considering an oxygen saturation of the medium at  $0.232 \text{ mM}$ ), an increase in the organic acid production (lactate, succinate, and acetate) was observed [24]. Concerning biomass synthesis, the growth of *C. glutamicum* DM1933 was highly limited for  $\text{OTR}_{\text{max}}$  lower than  $14 \text{ mM h}^{-1}$  (corresponding to  $k_L a$  value of  $60 \text{ h}^{-1}$ ). Further increase in  $\text{OTR}_{\text{max}}$  had no beneficial effect on the growth of this strain. Similarly, with *C. glutamicum* 2262, the most significant effect of oxygenation level on the maximal specific growth ( $\mu_{\text{max}}$ ) was noticed for  $k_L a$  values inferior to  $44 \text{ h}^{-1}$  (Figure 2). The behavior of



**FIGURE 6** Fed-batch culture of *C. glutamicum* 2262. Kinetics of (A) glucose (■), succinate (●), lactate (○) concentrations, and (B) biomass concentration. The dashed vertical line indicates the beginning of the anaerobic phase. The insert graph in part (A) presents the kinetics of organic acids corresponding to the transition phase (between 4 and 10 h culture)

*C. glutamicum* 2262 was very close to the one of its related strain *C. glutamicum* 2262 $\Delta$ *ldhA* designed for the succinate production. With this last strain, an organic acid production related to the oxygenation level was also observed. The maximal succinate and acetate production corresponded to  $k_L a$  values between 10 and 19 h<sup>-1</sup>, and between 19 and 33 h<sup>-1</sup>, respectively, and a similar relationship between the  $k_L a$  and the maximal biomass concentration was measured [18]. Only a reduction in the conversion yields of glucose into organic acids was determined with *C. glutamicum* 2262. This could be explained by the lack of the metabolic pathway for lactate synthesis in *C. glutamicum* 2262 $\Delta$ *ldhA* and, consequently, the need for this last strain to increase the succinate and acetate synthesis to maintain its intracellular redox balance.

It was reported that *C. glutamicum* was able to grow under anaerobic or deprived oxygen conditions, only by nitrate respiration [4,6]. However, it was recently demonstrated that in anaerobic conditions and even in the absence of nitrate, *C. glutamicum* can grow on glucose, fructose, sucrose, and ribose by mixed acid fermentation [9]. In the present work, a residual growth was measured under highly limited oxygen conditions accompanied with organic acid production, during the cultures in shake flasks, performed at different  $k_L a$  conditions. This could be attributed to the ability of *C. glutamicum* to simultaneously realize fermentation and aerobic respiration under micro-aerobic conditions [25].

While glucose is considered as one of the preferential glucose for *C. glutamicum* growth, it was also reported that *C. glutamicum* was able to grow on a variety of other sugars or organic acids [3,26–28] as a single or combined carbon and/or energy source. It was, however, reported that *C. glutamicum* ATCC 13032 was not able to grow on C4-dicarboxylates as succinate, fumarate, and malate,

as sole carbon source [29,30]. On the contrary, a weak growth of *C. glutamicum* R was observed during cultures on succinate as the sole carbon source [31]. *Corynebacterium glutamicum* 2262 exhibited the same behavior as *C. glutamicum* ATCC13032 as no growth was noticed in the present study when succinate was the sole carbon molecule in the culture medium. Interestingly, a stop in the production and a re-assimilation of the produced succinate, concomitant with a lower threshold glucose concentration of 9 g L<sup>-1</sup> (50 mM; Figure 4), was observed in most of cultures performed in micro-aerobic conditions, in shake flask. It was demonstrated that DccT, also called DcsT [31], and DctA were the only transporters for C4-dicarboxylates in *C. glutamicum* ATCC 13032 [29,30]. The expression of DccT encoding gene depended on the growth phase, being maximal in the exponential phase (early growth phase). Moreover, it was shown that an initial concentration of 9 g L<sup>-1</sup> glucose exerted a repression on *dcsT* transcription [31]. Similarly, repression of DctA homologs, identified in *E. coli* [32] and *Pseudomonas aeruginosa* [33], were measured for 7.2 and 9.9 g L<sup>-1</sup> glucose, respectively. Thus, similar regulations of *dccT* and *dctA* in *C. glutamicum* 2262 could explain the re-assimilation of succinate at a lower threshold of glucose concentration.

The influence of the transition phase from the aerobic to anaerobic phase on succinic acid production was previously investigated with genetically engineered strains of *C. glutamicum* [15] or *E. coli* [17]. It was reported that the progressive deoxygenation based on a controlled dissolved oxygen concentrations (DOC) or gas flow rates, enhanced the succinate production by *C. glutamicum* 2262 $\Delta$ *ldhA* [15]. Martínez et al. [17] suggested that the presence of a micro-aerobic phase at the end of the growth phase facilitated the bacterium to adjust its metabolic behavior by expressing genes necessary



**TABLE 1** Performances of succinate production processes using various microorganisms and substrates

Strains	Substrates	Process description	Concentration (g L <sup>-1</sup> )	Productivity (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	References
<i>C. glutamicum</i> 2262	Glucose	Fed-Batch	93.6	1.42	This work
<i>C. glutamicum</i> BOL-3/pAN6-gap	Glucose	Fed-Batch	146	2.48	[14]
<i>A. succinogenes</i> BE-1	Glucose	Fed-Batch	145	1.3	[41]
<i>A. succinogenes</i> 130z	Glucose	Batch	67.2	0.8	[43]
<i>A. succiniciproducens</i>	Glucose	Batch	50.3	2.1	[44]
<i>A. succiniciproducens</i>	Whey lactose	Fed-Batch	34.7	1.02	[45]
<i>A. succinogenes</i> 130Z	Wheat hydrolysates	Batch	64.2	1.19	[40]
Recombinant <i>E.coli</i>	Food waste hydrolysate	Batch	29.9	0.48	[46]
<i>A. succinogenes</i>	Food waste hydrolysate	Batch	24.1	0.29	[46]
<i>C. glutamicum</i> BL-1/pVWEcl-glpFKD	Glycerol	Fed-batch	9.3	0.42	[47]
<i>Y. lipolytica</i> H222-AZ2	Glycerol	Fed-batch	25	0.15	[48]
<i>Y. lipolytica</i> PGC01003	Crude glycerol	Fed-Batch	160.2	0.4	[42]
<i>A. succinogenes</i>	Spent sulphite liquor	Batch	6.2	0.09	[49]

for the organic acid production during the anaerobic phase. Similarly, an upregulation of the gene encoding the glycolytic, fermentative enzymes, and enzymes of the reductive branch of the TCA cycle (*ldh*, *mdh*, and *pck*) was observed during a transition phase from aerobic to anaerobic conditions in *C. glutamicum* ATCC13032 [25]. Moreover, CO<sub>2</sub> was described as a limiting substrate for the synthesis of succinate in several works [6,12,34,35]. In the present study, in order to evaluate the impact of process parameters control on the succinate production of *C. glutamicum* 2262, the optimized transition developed by Kaboré et al. [15] was applied during a fed-batch culture with feedings of glucose combined with bicarbonate addition. Although the glucose residual concentration decreased under 9 g L<sup>-1</sup> at 24 and 42 h of culture, no stop in the succinate production was measured. This difference compared to batch cultures in flask could be explained by the oxygenation level. Whereas the batch cultures were performed in micro-aerobic condition, during the fed-batch culture, succinate production occurred during an anaerobic phase. This suggests that succinate consumption could be influenced by the oxygenation of the culture medium. As substrate of succinate dehydrogenase, succinate is involved in the respiratory chain of *C. glutamicum* [36]. This could explain the dependence of succinate consumption on oxygen availability. After the fifth pulse, the organic acid production reached a plateau despite the presence of residual glucose. This could be probably attributed to an inhibition by fermentation end-products. Indeed, it was proved that, in *C. glutamicum*, glucose consumption and succinate production were significantly inhibited by the accumulation of extracellular succinate [37]. Using this process, 93.6 g L<sup>-1</sup> (793 mM) of succinate with a conversion yield of 0.91 mol mol<sup>-1</sup> glucose (0.6 g g<sup>-1</sup>) were

produced. The lactate final concentration (785 mM / 70.7 g L<sup>-1</sup>) was similar to the succinate final titer. Without genetic modification and by optimizing the process parameters, a wild-type strain of *C. glutamicum* was then able to produce one of the highest concentration of succinate (93.57 g L<sup>-1</sup>) reported in the literature (Table 1) [38,39]. Indeed, several studies proved the ability of some prokaryotic and eukaryotic microbial strains (wild-type or mutant strains) to overproduce this organic acid, from pure (glucose, glycerol, etc.) or complex carbon sources (wastes, hydrolysates, etc.) [40]. The only non-genetically modified bacterium producing a higher concentration of succinate than *C. glutamicum* 2262 was *Actinobacillus succinogenes* BE-1, isolated from bovine rumen, with a final concentration of 145 g L<sup>-1</sup> succinate. Such a concentration was reached using a fed-batch culture coupled with an in situ product removal [41]. To date, the highest concentration reported in the scientific literature was achieved with a genetically modified strain of *Yarrowia lipolytica* PGC01003, using optimized process conditions [41]. This mutant strain overproduced succinate, using crude glycerol as carbon source. This yeast was able to produce 160 g L<sup>-1</sup> succinate during a fed-batch culture, with a productivity of 0.4 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> [42]. Considering *C. glutamicum*, the highest succinate concentration was also obtained from a genetically engineered strain, *C. glutamicum* R deleted for *ldhA* gene and in which pyruvate carboxylase activity was overexpressed [13]. Using a fed-batch process (feeding of glucose and carbonate), this strain produced 146 g L<sup>-1</sup> succinate with a productivity of 2.48 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, which was higher than the one reported for *Y. lipolytica* PGC01003 [6,7].

In this study, we demonstrated that the level of oxygenation and the availability of glucose were critical parameters

for growth and organic acids production by *C. glutamicum*. A lower threshold glucose concentration, about  $9 \text{ g L}^{-1}$ , was identified for the stop of succinate production. Then, based on the understanding of the physiological behavior of *C. glutamicum* 2262 in the context of a controlled microaerobiosis, an efficient process for the production of organic acids including succinic acid was proposed. This work demonstrated that, for some molecules of interest, naturally synthesized by the selected microbial catalyst, an accurate control of the process parameters could be as efficient as a genetic engineering methodology. Of course, some improvements of the proposed process are possible, for example, by combining the production on bioreactor with an online extraction of the end-fermentation products.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors have declared no conflict of interest.

## REFERENCES

1. Becker, J., Wittmann, C., Bio-based production of chemicals, materials and fuels – *Corynebacterium glutamicum* as versatile cell factory. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2012, 23, 631–640.
2. Zahoor, A., Lindner, S. N., Wendisch, V. F., Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* aimed at alternative carbon sources and new products. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2012, 3, e201210004.
3. Dominguez, H., Nezonet, C., Lindley, N. D., Cacaïgn, M., Modified carbon flux during oxygen limited growth of *Corynebacterium glutamicum* and the consequences for amino acid overproduction. *Biotechnol. Lett.* 1993, 15, 449–454.
4. Okino, S., Inui, M., Yukawa, H., Production of organic acids by *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2005, 68, 475–480.
5. Wendisch, V. F., Bott, M., Eikmanns, B. J., Metabolic engineering of *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* for biotechnological production of organic acids and amino acids. *Curr. Opin. Microbiol.* 2006, 9, 268–274.
6. Inui, M., Murakami, S., Okino, S., Kawaguchi, H. et al., Metabolic analysis of *Corynebacterium glutamicum* during lactate and succinate productions under oxygen deprivation conditions. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2004, 7, 182–196.
7. Nishimura, T., Vertès, A. A., Shinoda, Y., Inui, M. et al., Anaerobic growth of *Corynebacterium glutamicum* using nitrate as a terminal electron acceptor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007, 75, 889–897.
8. Takeno, S., Ohnishi, J., Komatsu, T., Masaki, T. et al., Anaerobic growth and potential for amino acid production by nitrate respiration in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007, 75, 1173–1182.
9. Michel, A., Koch-Koerfges, A., Krumbach, K., Brocker, M. et al., Anaerobic growth of *Corynebacterium glutamicum* via mixed-d acid fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 2015, 81, 7496–7508.
10. Sauer, M., Porro, D., Mattanovich, D., Branduardi, P., Microbial production of organic acids: expanding the markets. *Trends Biotechnol.* 2008, 26, 100–108.
11. Werpy, T., Petersen, G. (Eds.), *Top Value Added Chemicals from Biomass: Volume I—Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas*, Pacific Northwest National Laboratory and National Renewable Energy Laboratory, US Department of Energy, 2004.
12. Radoš, D., Turner, D. L., Fonseca, L. L., Carvalho, A. L. et al., Carbon flux analysis by  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance to determine the effect of  $\text{CO}_2$  on anaerobic succinate production by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2014, 80, 3015–3024.
13. Okino, S., Noburyu, R., Suda, M., Jojima, T. et al., An efficient succinic acid production process in a metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2008, 81, 459–464.
14. Litsanov, B., Brocker, M., Bott, M., Toward homosuccinate fermentation: Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for anaerobic production of succinate from glucose and formate. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012, 78, 3325–3337.
15. Kabore, A.-K., Olmos, E., Fick, M., Blanchard, F. et al., Aerobiosis-anaerobiosis transition has a significant impact on organic acid production by *Corynebacterium glutamicum*. *Process Biochem.* 2017, 52, 10–21.
16. Byun, T.-G., Zeng, A.-P., Deckwer, W.-D., Reactor comparison and scale-up for the microaerobic production of 2,3-butanediol by *Enterobacter aerogenes* at constant oxygen transfer rate. *Bioprocess Eng.* 1994, 11, 167–175.
17. Martínez, I., Bennett, G. N., San, K.-Y., Metabolic impact of the level of aeration during cell growth on anaerobic succinate production by an engineered *Escherichia coli* strain. *Metab. Eng.* 2010, 12, 499–509.
18. Kabore, A. K., Olmos, E., Blanchard, F., Fick, M. et al., Impact of gas-liquid mass transfer on organic acids production by *Corynebacterium glutamicum* in unbaffled shake flasks. *Biochem. Eng. J.* 2015, 101, 237–247.
19. Conrady, M., Lemoine, A., Limberg, M. H., Oldiges, M. et al., Carboxylic acid consumption and production by *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol. Prog.* 2019, 35, e2804.
20. Delaunay, S., Gourdon, P., Lapujade, P., Mailly, E. et al., An improved temperature triggered process for glutamate production with *Corynebacterium glutamicum*. *Enzyme Microb. Tech.* 1999, 25, 762–768.
21. Seletzky, J. M., Noak, U., Fricke, J., Welk, E. et al., Scale-up from shake flasks to fermenters in batch and continuous mode with *Corynebacterium glutamicum* on lactic acid based on oxygen transfer and pH. *Biotechnol. Bioeng.* 2007, 98, 800–811.
22. Mehmood, N., Olmos, E., Goergen, J.-L., Blanchard, F. et al., Oxygen supply controls the onset of pristinamycin production by *Streptomyces pristinaespiralis* in shaking flasks. *Biotechnol. Bioeng.* 2011, 108, 2151–2161.
23. Shinfuku, Y., Sorpitorn, N., Sono, M., Furusawa, C. et al., Development and experimental verification of a genome-scale metabolic model for *Corynebacterium glutamicum*. *Microb. Cell Factories* 2009, 8, 43.
24. Kaß, F., Prasad, A., Tillack, J., Moch, M. et al., Rapid assessment of oxygen transfer impact for *Corynebacterium glutamicum*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2014, 37, 2567–2577.
25. Lange, J., Münch, E., Müller, J., Busche, T. et al., Deciphering the adaptation of *Corynebacterium glutamicum* in transition from aerobiosis via microaerobiosis to anaerobiosis. *Genes* 2018, 9, 297.



26. Baritugo, K.-A. G., Kim, H. T., David, Y. C., Choi, J. H. et al., Recent advances in metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* as a potential platform microorganism for biorefinery: *Corynebacterium glutamicum* strains as industrial microorganisms for biorefinery. *Biofuels Bioprod. Biorefining* 2018, 12, 899–925.
27. Cacaig, M., Monnet, C., Lindley, N. D., Batch kinetics of *Corynebacterium glutamicum* during growth on various carbon substrates: use of substrate mixtures to localise metabolic bottlenecks. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1993, 40, 526–530.
28. Wendisch, V. F., de Graaf, A. A., Sahm, H., Eikmanns, B. J., Quantitative determination of metabolic fluxes during cointilization of two carbon sources: Comparative analyses with *Corynebacterium glutamicum* during growth on acetate and/or glucose. *J. Bacteriol.* 2000, 182, 3088–3096.
29. Youn, J.-W., Jolkver, E., Kramer, R., Marin, K. et al., Characterization of the dicarboxylate transporter DctA in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 2009, 191, 5480–5488.
30. Youn, J.-W., Jolkver, E., Kramer, R., Marin, K. et al., Identification and characterization of the dicarboxylate uptake system DctT in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 2008, 190, 6458–6466.
31. Teramoto, H., Shirai, T., Inui, M., Yukawa, H., Identification of a gene encoding a transporter essential for utilization of C4 dicarboxylates in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Env. Microbiol.* 2008, 74, 5290–5296.
32. Davies, S. J., Golby, P., Omrani, D., Broad, S. A. et al., Inactivation and regulation of the aerobic C4-dicarboxylate transport (*dctA*) Gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1999, 181, 5624–5635.
33. Valentini, M., Storelli, N., Lapouge, K., Identification of C4-dicarboxylate transport systems in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* 2011, 193, 4307–4316.
34. Lee, P. C., Lee, W. G., Kwon, S., Lee, S. Y. et al., Succinic acid production by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*: effects of the H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> supply and glucose concentration. *Enzyme Microb. Technol.* 1999, 24, 549–554.
35. Lu, S., Eiteman, M. A., Altman, E., Effect of CO<sub>2</sub> on succinate production in dual-phase *Escherichia coli* fermentations. *J. Biotechnol.* 2009, 143, 213–223.
36. Bott, M., Niebisch, A., The respiratory chain of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* 2003, 104, 129–153.
37. Chung, S.-C., Park, J.-S., Yun, J., Park, J. H., Improvement of succinate production by release of end-product inhibition in *Corynebacterium glutamicum*. *Metab. Eng.* 2017, 40, 157–164.
38. Ferone, M., Raganati, F., Olivieri, G., Marzocchella, A., Bioreactors for succinic acid production processes. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2019, 39, 571–586.
39. Pateraki, C., Patsalou, M., Vlysidis, A., Kopsahelis, N. et al., *Acetivibrio succinogenes*: advances on succinic acid production and prospects for development of integrated biorefineries. *Biochem. Eng. J.* 2016, 112, 285–303.
40. Koutinas, A. A., Vlysidis, A., Pleissner, D., Kopsahelis, N. et al., Valorization of industrial waste and by-product streams via fermentation for the production of chemicals and biopolymers. *Chem. Soc. Rev.* 2014, 43, 2587–2627.
41. Li, Q., Wang, D., Hu, G., Xing, J. et al., Integrated bioprocess for high-efficiency production of succinic acid in an expanded-bed adsorption system. *Biochem. Eng. J.* 2011, 56, 150–157.
42. Gao, C., Yang, X., Wang, H., Rivero, C. P. et al., Robust succinic acid production from crude glycerol using engineered *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol. Biofuels* 2016, 9, 179.
43. Guettler, M. V., Jain, M. K., Soni, B. K., Process for making succinic acid, microorganisms for use in the process and methods of obtaining the microorganisms. *U.S. Patent 5723322*, 1998.
44. Glassner, D. A., Datta R., Process for the production and purification of succinic acid. *U.S. Patent 5143834*, 1992.
45. Samulov, N. S., Datta, R., Jain, M. K., Zeikus, J. G., Whey fermentation by *Anaerobiospirillum succiniciproducens* for production of a succinate-based animal feed additive. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999, 65, 2260–2263.
46. Sun, Z., Li, M., Qi, Q., Gao, C. et al., Mixed food waste as renewable feedstock in succinic acid fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2014, 174, 1822–1833.
47. Litsanov, B., Brocker, M., Bott, M., Glycerol as a substrate for aerobic succinate production in minimal medium with *Corynebacterium glutamicum*. *Microb. Biotechnol.* 2013, 6, 189–195.
48. Jost, B., Holz, M., Aurich, A., Barth, G. et al., The influence of oxygen limitation for the production of succinic acid with recombinant strains of *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015, 99, 1675–1686.
49. Alexandri, M., Papapostolou, H., Vlysidis, A., Gardeli, C. et al., Extraction of phenolic compounds and succinic acid production from spent sulphite liquor: valorisation of spent sulphite liquor for value-added applications. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2016, 91, 2751–2760.

## SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

**How to cite this article:** Briki A, Kaboré K, Olmos E, et al. *Corynebacterium glutamicum*, a natural overproducer of succinic acid? *Eng Life Sci.* 2020;20:205–215. <https://doi.org/10.1002/elsc.201900141>

### 3. Contributions de l'article

Cette étude montre que la réponse physiologique de *C. glutamicum* dépend non seulement du niveau d'oxygénation, mais aussi de la concentration en glucose résiduel. En se basant sur ces deux paramètres clés, une culture en mode semi-continu a été réalisée, en appliquant une stratégie de transition de l'aérobiose à l'anaérobiose précédemment établie avec une souche de *C. glutamicum* génétiquement modifiée (Kaboré et al., 2015). Cette étude montre ainsi qu'une souche non modifiée génétiquement de *C. glutamicum* est capable de produire des concentrations en succinate (793 mM), similaires aux concentrations obtenues chez des producteurs naturels de succinate, en optimisant les conditions opératoires du procédé de production de cet acide organique.

Lors de cultures en fiole, réalisées dans différentes conditions de transfert d'oxygène ( $k_{LA}$  entre 0,6 et 118 h<sup>-1</sup>), un effet important du niveau d'oxygénation a été mesuré. Même si les 3 acides organiques sont produits simultanément dans les conditions étudiées et que le lactate reste l'acide organique majoritairement produit, des différences ont été mesurées en ce qui concerne les concentrations produites. En effet, (i) les concentrations les plus élevées en succinate sont obtenues pour les  $k_{LA}$  les plus faibles, jusque 5 h<sup>-1</sup>, (ii) les concentrations les plus fortes en lactate sont obtenues pour des  $k_{LA}$  entre 5 et 31 h<sup>-1</sup>, (iii) les concentrations les plus importantes d'acétate correspondent aux  $k_{LA}$  entre 31 et 77 h<sup>-1</sup> et (iv) les  $k_{LA}$  élevés (> 90 h<sup>-1</sup>) favorisent la production de biomasse. Toutefois, une accumulation uniquement transitoire des acides organiques a été observée à certaines valeurs de  $k_{LA}$ . Comme attendu, la consommation des acides précédemment accumulés est dépendante de la concentration en glucose résiduel. Cependant, concernant le succinate, la reconsommation de ce dernier est observée lorsque la concentration en glucose atteint une valeur seuil d'environ 50 mM (9 g/L). Il a également été montré aussi que le succinate semble n'être utilisé que comme co-substrat par *C. glutamicum*. De façon beaucoup plus classique, les ré-assimilations de lactate et acétate, quant à elles, sont déclenchées suite à la déficience en glucose.

D'autre part, un procédé mono-étape, tri-phasique composé d'une phase de croissance en aérobiose, d'une phase de transition et d'une phase de production de succinate en anaérobiose, a été appliqué à *C. glutamicum* 2262 lors d'une fermentation semi-continue avec alimentation par une série de pulses de glucose et de bicarbonate de sodium. Cette stratégie basée sur (1) l'optimisation de la stratégie de désoxygénation, (2) le maintien de la concentration résiduelle en glucose au-delà de la valeur seuil de 50 mM de glucose et (3) l'apport en CO<sub>2</sub>, a permis d'améliorer la production de succinate par cette souche sauvage. Dans ces conditions, la

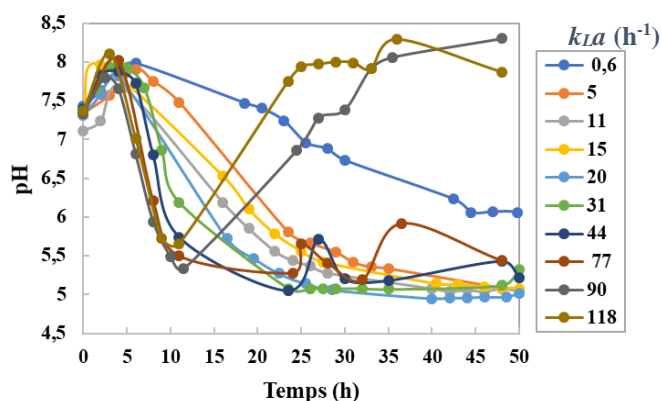
production de succinate qui était faible dans le cas des cultures en fiole, est devenue équimolaire à celle du lactate. La concentration maximale en succinate et en lactate obtenue à la fin de la culture est de 793 mM (94 g/L) et 785 mM (71 g/L) respectivement. Cette concentration en succinate est parmi les concentrations les plus élevées reportées dans la littérature.

Cette première partie de nos travaux a permis d'identifier des paramètres clés influençant la croissance et la production des acides organiques chez *C. glutamicum* 2262. Dans la suite de ce chapitre, sont présentées des données complémentaires concernant (i) l'évolution du pH au cours des différentes cultures en fiole et (ii) la compréhension du rôle physiologique du succinate chez *C. glutamicum* 2262.

## 4. Résultats complémentaires

### 4.1. Variation du pH au cours des cultures en fiole

Un suivi du pH a été effectué au cours des cultures en fiole, pour les différentes conditions de  $k_{LA}$  testées (0,6 ; 5 ; 11 ; 20 ; 31 ; 44 ; 77 ; 90 et 118  $\text{h}^{-1}$ ) (Figure III.2). Il faut rappeler que le pH n'a pas été régulé au cours de ces cultures.



**Figure III.2** : évolution du pH au cours des cultures de *C. glutamicum* 2262 en fiole non chicanée, réalisées sous différentes conditions de transfert d'oxygène  $k_{LA}$ .

Une variation importante du pH est mesurée au cours des différentes cultures. Le pH initial de la culture est d'environ 7,4. Dans toutes les cultures, une augmentation du pH jusqu'à 8 a été observée pendant les premières heures de la culture (entre 3 et 6 h). Celle-ci peut être attribuée au déclenchement de la croissance et de la consommation des acides organiques synthétisés lors de la préculture (lactate et succinate principalement). Cette variation du pH (entre 7,4 et 8) correspond à la gamme de pH optimal de la croissance de *C. glutamicum* (Michel et al., 2015). Après quelques heures, la production des acides organiques est déclenchée, accompagnée par une diminution nette du pH. Pour des  $k_{LA}$  entre 5 et 77  $\text{h}^{-1}$ , la valeur minimale du pH obtenue est d'environ 5. Mais, la croissance est stoppée à pH d'environ 6. Ceci est en accord avec des travaux précédents ayant montré qu'en anaérobiose, *C. glutamicum* n'est capable de croître que sur une gamme limitée de pH, entre 6,5 et 8 (Michel et al., 2015) alors qu'elle est capable de croître sur une gamme du pH plus importante (entre 4 et 10) en aérobiose grâce à la régulation du pH via la chaîne respiratoire (export des protons) (Follmann et al., 2009). La vitesse de consommation de glucose est fortement influencée par la diminution du pH (diminution de moitié lorsque le pH passe de 7 à 5,7) (Rados et al., 2014). Ceci peut expliquer l'arrêt de la consommation de glucose à la fin des cultures avec des  $k_{LA}$  faibles et donc l'arrêt de la production des acides organiques (figure 1 de la publication). Mais, dans le cas des  $k_{LA}$  les plus élevés (90 et 118  $\text{h}^{-1}$ ), une ré-assimilation de la totalité des trois acides organiques précédemment produits, est mesurée. Cette reconsommation engendre une



augmentation du pH ainsi qu'une croissance marginale de *C. glutamicum* avec ces acides organiques comme seules sources de carbone et d'énergie présentes à ce moment de la culture.

#### 4.2. Le succinate est-il un co-substrat carboné et / ou énergétique ?

Il a été montré que le succinate est un co-substrat obligatoire, consommé par *C. glutamicum* simultanément au glucose et dans des conditions de limitation en oxygène. Il semble donc, pertinent de préciser si la fonction du succinate est uniquement énergétique ou ce dernier peut être une source de carbone et d'énergie. Pour cela, différentes cultures, en fiole non chicanée, ont été réalisées en ajoutant, initialement, différentes concentrations en glucose et/ou en succinate dans le milieu de culture (Tableau III.1). Pour l'ensemble de ces cultures, il a été choisi d'appliquer les mêmes conditions d'oxygénation, avec un  $k_{La}$  d'environ  $90 \text{ h}^{-1}$ , condition favorable à la croissance. Dans le tableau III.1, sont reportées les concentrations maximales en biomasse obtenues ainsi que les vitesses spécifiques maximales de croissance et les rendements de conversion du glucose en biomasse.

**Tableau III.1 :** Concentrations maximales en biomasse obtenues au cours des cultures de *C. glutamicum* 2262 en fiole non chicanée réalisées avec un coefficient de transfert d'oxygène de  $90 \text{ h}^{-1}$  en ajoutant différentes concentrations initiales de glucose et de succinate. Les rendements de conversion du glucose en biomasse ( $Y_{X/\text{glu}}$ ) et les vitesses spécifiques maximales de croissance ( $\mu$ ) ont été calculés. Les valeurs de l'écart-type de  $X_{\text{max}}$  et du coefficient de détermination ( $R^2$ ) pour le calcul de  $\mu_{\text{max}}$  sont indiquées.

Substrats (mM)		Production de biomasse		
Glucose	Succinate	<sup>(1)</sup> $X_{\text{max}}$ (g/L)	<sup>(2)</sup> $Y_{X/\text{glu}}$ (%)	$\mu_{\text{max}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )
34	0	$2,78 \pm 0,07$	$41 \pm 3$ <sup>(3)</sup>	$0,38 (0,991^{(4)})$
	5,5	$2,94 \pm 0,08$	46	$0,45 (0,9872)$
	20	$3,00 \pm 0,07$	47	$0,44 (0,9929)$
	64	$3,23 \pm 0,02$	49	$0,44 (0,9948)$

<sup>(1)</sup> : la concentration maximale en biomasse est présentée par une moyenne et un écart-type des valeurs obtenues pendant la phase stationnaire de croissance.

<sup>(2)</sup> : rendement carboné de la conversion du glucose en biomasse (en %).

<sup>(3)</sup> : moyenne et écart-type de trois répétitions.

<sup>(4)</sup> : coefficient de détermination ( $R^2$ ) pour la courbe  $(\text{Ln}(X) - \text{Ln}(X_0)) = f(t)$ .

Les résultats présentés dans ce tableau montrent que la présence de succinate comme co-substrat n'a pas d'effet sur la croissance. En effet, malgré une légère augmentation de la vitesse spécifique de croissance en présence de succinate ( $\mu \approx 0,44 \text{ h}^{-1}$ ), comparée à celle obtenue en présence de glucose seul ( $\mu = 0,38 \text{ h}^{-1}$ ), cette vitesse reste constante en présence des deux substrats carbonés, quelle que soit la concentration initiale en succinate. De plus, les concentrations maximales en biomasse obtenues avec les différentes cultures réalisées (entre  $2,78$  et  $3,23 \text{ g/L}$ ) sont similaires ainsi que les rendements de conversion de glucose en biomasse. Ceci suggère que le succinate joue essentiellement un rôle de source d'énergie.

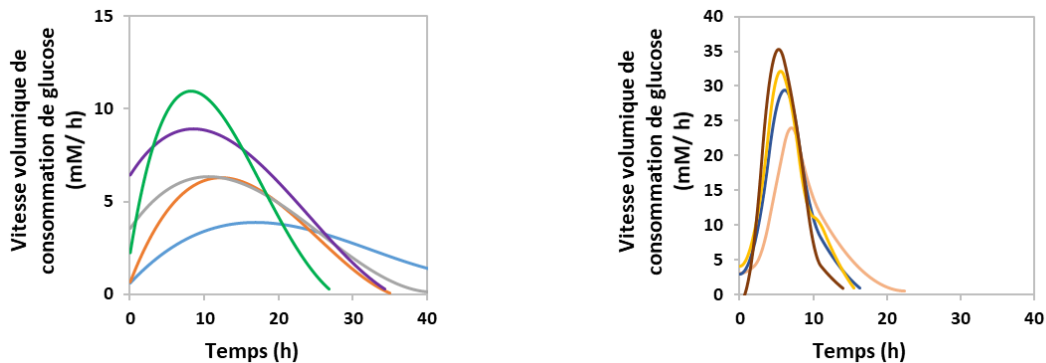
### **4.3.Étude de l'impact du ratio OUR/GUR sur la production d'acides organiques par *C. glutamicum* en culture en fiole**

Lorsqu'on diminue l'apport en oxygène, *C. glutamicum* adapte son métabolisme en changeant la répartition des flux carbonés entre les voies métaboliques utilisées. Une production maximale des acides organiques en fonction du niveau d'apport en oxygène a été décrite précédemment avec *C. glutamicum* 2262 ainsi qu'avec une souche mutante, *C. glutamicum* 2262  $\Delta$ ldhA (Kaboré et al., 2015). Comme nous venons de le voir, la production des acides organiques dépend également de la disponibilité de glucose. C'est particulièrement vrai pour le succinate dont la production est stoppée et une re-consommation déclenchée à partir d'une concentration seuil en glucose d'environ 50 mM et un coefficient de transfert d'oxygène supérieur à 11 h<sup>-1</sup>. Cette influence de l'apport en oxygène et en glucose a précédemment été étudiée par Shinfuku et al. (2009) qui ont caractérisé le comportement de *C. glutamicum* ATCC13032 en ajustant le rapport entre la vitesse de consommation de glucose (GUR) et la vitesse de consommation en oxygène (OUR) qui, dans des conditions limitantes peut être assimilée à la vitesse de transfert en oxygène et donc corrélée au  $k_{La}$ . Cette étude a été réalisée essentiellement à l'aide d'un modèle métabolique développé par Shinfuku et al. (2009) et seules quelques expérimentations ont été réalisées pour valider les résultats théoriques obtenus. Des ratios seuils ont été identifiés pour la production des différents acides organiques. Ainsi, la production de succinate correspond aux ratios les plus faibles, inférieurs à 0,4 (Shinfuku et al., 2009). Jusqu'à présent, nous avons utilisé la concentration en glucose résiduel ainsi que le  $k_{La}$  comme paramètres de culture permettant de caractériser le comportement physiologique de *C. glutamicum* 2262 lors de la synthèse d'acides organiques. Il nous a donc semblé intéressant de vérifier si le ratio OUR/GUR pouvait être un paramètre plus pertinent pour caractériser ce comportement.

#### Détermination du ratio OUR/GUR au cours d'une culture en fiole

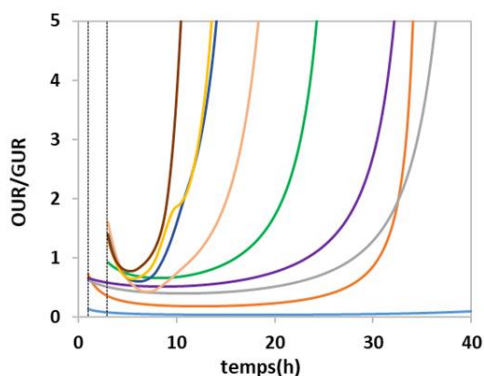
Lors des cultures en fiole, la limitation en oxygène est auto-induite par la croissance bactérienne, et la consommation d'oxygène nécessaire à cette dernière, lorsque les mêmes conditions de transfert en oxygène sont conservées tout au long des expériences. Kaboré et al. (2015) ont montré que la limitation en oxygène est atteinte après quelques minutes pour des  $k_{La}$  faibles et aux alentours de 2 h de culture pour des  $k_{La}$  de l'ordre de 77 h<sup>-1</sup>. Dans ces conditions de limitation en oxygène, la vitesse volumique de consommation d'oxygène dépend seulement de la valeur de  $k_{La}$  imposée, ce qui implique une vitesse constante durant

la culture ( $OUR = k_{La} \times O_2^{sat}$ ). Par conséquent, l'évolution temporelle du ratio OUR/GUR est liée uniquement à la variation de la vitesse volumique de consommation de glucose (Figure III.3).



**Figure III.3 :** évolution temporelle de la vitesse volumique de consommation de glucose (GUR) pour les cultures en fiole de *C. glutamicum* 2262 à différentes valeurs de  $k_{La}$ . Les valeurs de  $k_{La}$  imposées sont  $0,6 \text{ h}^{-1}$  (—),  $5 \text{ h}^{-1}$  (—),  $11 \text{ h}^{-1}$  (—),  $20 \text{ h}^{-1}$  (—),  $31 \text{ h}^{-1}$  (—),  $44 \text{ h}^{-1}$  (—),  $77 \text{ h}^{-1}$  (—),  $90 \text{ h}^{-1}$  (—) et  $118 \text{ h}^{-1}$  (—).

La figure III.4 présente l'évolution temporelle du ratio OUR/GUR lors des cultures de *C. glutamicum* 2262 avec différents  $k_{La}$ . Le calcul du ratio OUR/GUR a été fait dans les conditions de limitation en oxygène. De ce fait, une partie des courbes correspondant à la première phase de culture, sans limitation en oxygène a été supprimée. La durée de cette première phase a été estimée à une heure pour des  $k_{La}$  faibles ( $0,6, 5, 11$  et  $20 \text{ h}^{-1}$ ) et à 3 heures pour les autres conditions de  $k_{La}$  ( $31, 44, 77, 90$  et  $118 \text{ h}^{-1}$ ).

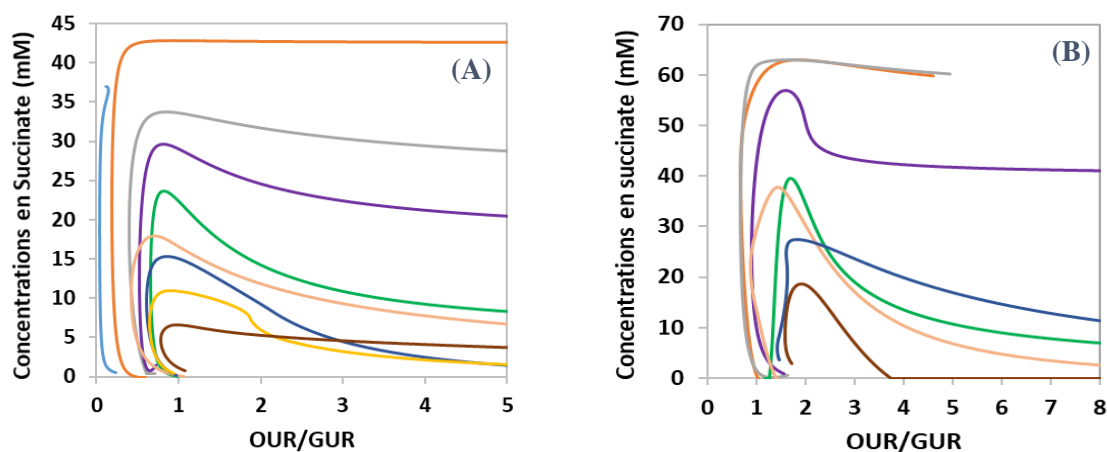


**Figure III.4 :** évolution temporelle du ratio OUR/GUR pour les cultures en fiole de *C. glutamicum* 2262 à différentes valeurs de  $k_{La}$ . Les valeurs de  $k_{La}$  imposées sont  $0,6 \text{ h}^{-1}$  (—),  $5 \text{ h}^{-1}$  (—),  $11 \text{ h}^{-1}$  (—),  $20 \text{ h}^{-1}$  (—),  $31 \text{ h}^{-1}$  (—),  $44 \text{ h}^{-1}$  (—),  $77 \text{ h}^{-1}$  (—),  $90 \text{ h}^{-1}$  (—) et  $118 \text{ h}^{-1}$  (—).

Comme le montre la figure III.4, une faible variation du ratio est observée tout au long de la culture avec des  $k_{La}$  faibles (entre  $0,6$  et  $20 \text{ h}^{-1}$ ) tant que la vitesse volumique de consommation de glucose est non négligeable (Figure III.3). Pour des  $k_{La}$  élevés (entre  $77$  et  $118 \text{ h}^{-1}$ ), une consommation rapide du glucose est accompagnée par une variation importante de GUR et donc du ratio OUR/GUR au cours du temps.

### Impact du ratio OUR/GUR sur la production de succinate

Afin de vérifier l'impact de ce ratio sur la production de succinate, l'évolution de la concentration en succinate a été représentée en fonction du ratio OUR/GUR lors des cultures en fiole de *C. glutamicum* 2262 (figure III.5.A). Des données expérimentales de cultures en fiole de *C. glutamicum* 2262 $\Delta$ ldhA, obtenues lors de l'étude de Kaboré (Kaboré, 2015; Kaboré et al., 2015), ont été aussi utilisées pour étudier cet impact (Figure III.5.B).



**Figure III.5 :** Évolution de la concentration en succinate produite en fonction du ratio OUR/GUR pour des cultures en fiole de *C. glutamicum* 2262 (A) et de *C. glutamicum* 2262 $\Delta$ ldhA (B), en imposant différents coefficients de transfert d'oxygène. Les valeurs de  $k_{La}$  imposées sont 0,6 h<sup>-1</sup> (—), 5 h<sup>-1</sup> (—), 11 h<sup>-1</sup> (—), 20 h<sup>-1</sup> (—), 31 h<sup>-1</sup> (—), 44 h<sup>-1</sup> (—), 77 h<sup>-1</sup> (—), 90 h<sup>-1</sup> (—) et 118 h<sup>-1</sup> (—).

La production de succinate par *C. glutamicum* 2262 correspond aux ratios OUR/GUR les plus faibles (figure III.5). Suite à une faible augmentation de ce ratio pendant la phase de production, un accroissement rapide de la concentration en succinate avec le ratio OUR/GUR est observé. Pour *C. glutamicum* 2262, il apparaît que la production de succinate s'arrête à partir d'un ratio d'environ 0,8. Une baisse de la concentration en succinate avec l'augmentation de la valeur OUR/GUR, observée dans certaines conditions d'oxygénation, traduit une re-consommation du succinate. Comme précédemment avec la concentration en glucose (50 Mm), un ratio de 0,81 est donc identifié comme un seuil entre la production et la consommation de succinate. Ce ratio seuil est plus élevé que celui avait été simulé pour *C. glutamicum* ATCC13032 et qui était de l'ordre de 0,4 (Shinfuku et al., 2009). Cependant, expérimentalement, ces mêmes auteurs avaient mesuré une production de succinate jusqu'à un ratio de 1,59, ce qui est plus élevé que le seuil identifié dans notre étude. Il est intéressant de souligner qu'un ratio seuil de 1,77 a également été identifié lors des cultures avec la souche mutante, *C. glutamicum* 2262 $\Delta$ ldhA. Il ne semble pas illogique que la valeur seuil de OUR/GUR soit supérieure chez cette souche par rapport à *C. glutamicum* 2262. En effet, la production de lactate est substituée par la production de succinate et d'acétate afin de

permettre une réoxydation des cofacteurs réduits au même niveau que ce qui était réalisée par la LDH chez la souche sauvage.

Contrairement au succinate, la consommation de lactate et acétate n'est déclenchée qu'en limitation en glucose (GUR très faible voire nulle). Il est donc difficile de suivre l'évolution de la concentration de ces deux acides organiques en fonction du ratio OUR/GUR. Ceci suggère que ce ratio n'est pas le bon paramètre pour suivre les cinétiques de production/consommation de lactate et acétate par *C. glutamicum* au cours des cultures discontinues en fiole.

Notre étude a confirmé, expérimentalement, l'existence d'un ratio OUR/GUR seuil pouvant expliquer l'arrêt de la production de succinate dans le cas de cultures en fiole avec une souche sauvage et une souche mutante de *C. glutamicum* 2262. Cependant, la principale difficulté de cette étude est de maintenir dans le temps une valeur donnée du ratio OUR/GUR en raison, notamment, des variations des vitesses de consommation de glucose (GUR). De plus, cette étude a permis d'étudier l'impact du ratio OUR/GUR dans un nombre limité de conditions en raison de l'impossibilité de contrôler, à un niveau choisi, l'oxygénation du milieu et donc l'OUR. Celle-ci est imposée par la croissance des bactéries. Aussi, afin de maîtriser au mieux les vitesses volumiques, GUR et OUR, et d'étendre le nombre de conditions testées, des cultures en mode continu ont été réalisées.

#### 4.4.Étude de l'impact du ratio OUR/GUR sur la réponse physiologique de *C. glutamicum* en culture continue

Afin d'augmenter le nombre de ratios OUR/GUR testés, différentes vitesses d'agitation ont été appliquées afin d'imposer différentes vitesses de consommation d'oxygène. De même, en faisant varier le taux de dilution, en dissociant l'apport du glucose des autres composants du milieu de culture et en modifiant la concentration en glucose dans la solution d'alimentation, différentes valeurs de vitesses de consommation de glucose ont pu être imposées. Les différentes conditions opératoires sont reportées dans le tableau III.3.

##### 4.4.1. Détermination du $k_{LA}$ pour chaque condition opératoire

Afin de calculer l'OUR, dans les différents états stationnaires étudiés, le  $k_{LA}$  a été déterminé par les deux méthodes de désoxygénation – réoxygénation dynamique et statique. Les valeurs obtenues avec les différentes conditions d'aération testées sont reportées dans le tableau III.2.

**Tableau III.2** : Valeurs des coefficients de transfert volumétrique d'oxygène ( $k_{LA}$ ) déterminées par les méthodes statique et dynamique. Les écarts types ont été précisés.

Vitesse d'agitation (rpm)	$k_{LA}$ (h <sup>-1</sup> )	
	déterminé par la méthode statique	déterminé par la méthode dynamique
900	181 ± 9	190 ± 4
700	149 ± 13	141 ± 9
500	76 ± 6	71 ± 3
300	23±1	25±0,5
200	17 ± 0,51	15*

\* : la mesure n'a été effectuée qu'une seule fois.

Les 2 méthodes permettent d'obtenir des valeurs qui apparaissent cohérentes entre elles. Les valeurs obtenues par méthode dynamique seront utilisées par la suite pour calculer l'OUR à chaque état stabilisé.

**Tableau III.3 :** Tableau récapitulatif des conditions opératoires d'agitation, de taux de dilution et de débit d'alimentation en glucose et en sels, appliquées lors d'une culture continue à double alimentation, avec *C. glutamicum* 2262. La concentration résiduelle en glucose et les valeurs du pourcentage d'O<sub>2</sub> dissous et en CO<sub>2</sub> à la sortie de bioréacteur ont été mesurées dans les différentes conditions opératoires. Les vitesses volumiques de consommation de glucose (GUR) et d'oxygène (OUR) ainsi que le rapport entre les deux ont été calculés.

Conditions	Vitesses d'agitation (rpm)	O <sub>2</sub> dissous (%)	CO <sub>2</sub> (%) sortie	D <sup>(1)</sup> (h <sup>-1</sup> )	Q sels <sup>(2)</sup> (L/h)	Q glu <sup>(2)</sup> (L/h)	[glu] <sup>(3)</sup> (g/L)	[glu] <sup>(4)</sup> <sub>res</sub>	GUR (mM/h)	OUR (mM/h)	OUR/GUR
1	900	64,06	1,27	0,093	0,075	0,018	100	0	<b>10,09</b>	<b>12,47</b>	<b>1,24</b>
2		63,40	1,27	0,195	0,173	0,022		0	<b>12,34</b>	<b>12,71</b>	<b>1,03</b>
3		72,13	0,86	0,197	0,181	0,017		0	<b>9,18</b>	<b>9,67</b>	<b>1,05</b>
4	700	49,77	0,83	0,198	0,182			0	<b>9,11</b>	<b>12,93</b>	<b>1,42</b>
5	500	0	0,37	0,197	0,181			0	<b>9,23</b>	<b>12,84</b>	<b>1,39</b>
6	300	0	0,01	0,193	0,176			0,32	<b>8,86</b>	<b>4,59</b>	<b>0,52</b>
7	500	0	0,35	0,239	0,205	0,034		0	<b>18,63</b>	<b>12,84</b>	<b>0,69</b>
8		0	0,30	0,230	0,196		150	0,27	<b>27,92</b>	<b>12,84</b>	<b>0,46</b>
9		0	0,25	0,236	0,203		250	12,44	<b>30,25</b>	<b>12,84</b>	<b>0,42</b>
10		0	0,32	0,270	0,236		75	0	<b>14,11</b>	<b>12,84</b>	<b>0,91</b>
11	200	0	0,00	0,231	0,197	2,46		<b>10,97</b>	<b>2,75</b>	<b>0,25</b>	

<sup>(1)</sup> : taux de dilution

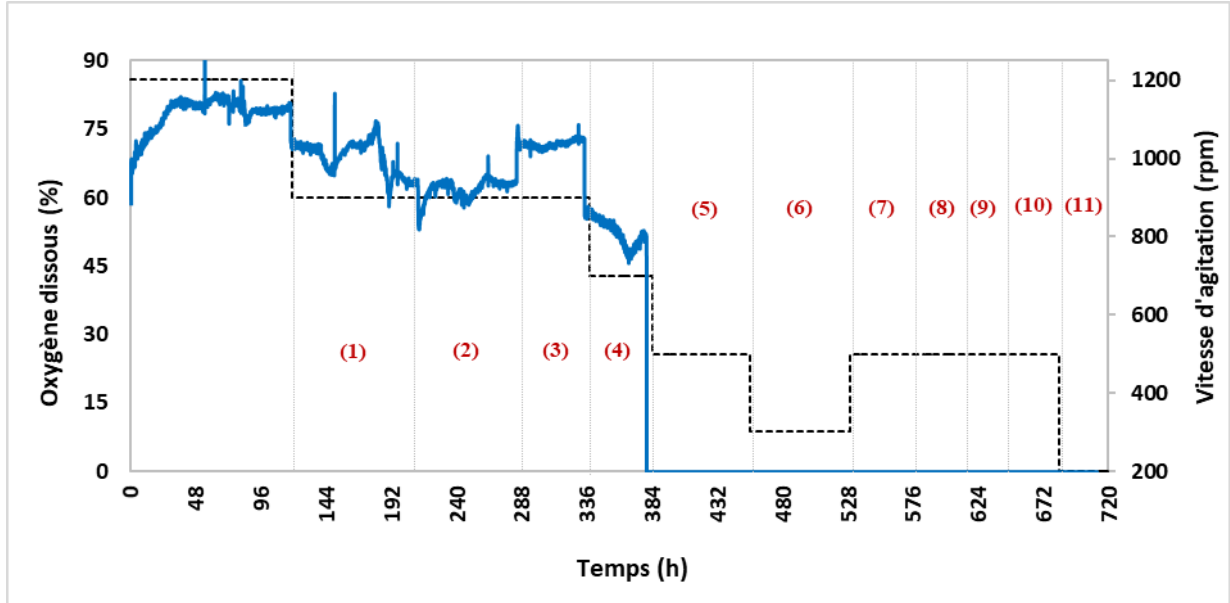
<sup>(2)</sup> : débit d'alimentation en solution de sels et en solution de glucose respectivement

<sup>(3)</sup> : concentration de glucose dans la solution d'alimentation

<sup>(4)</sup> : [glu]<sub>res</sub> : concentration en glucose résiduel

#### 4.4.2. Suivi cinétique de la culture continue de *C. glutamicum* 2262

L'évolution de l'O<sub>2</sub> dissous mesuré au cours de la totalité de la culture est présentée figure III.6.

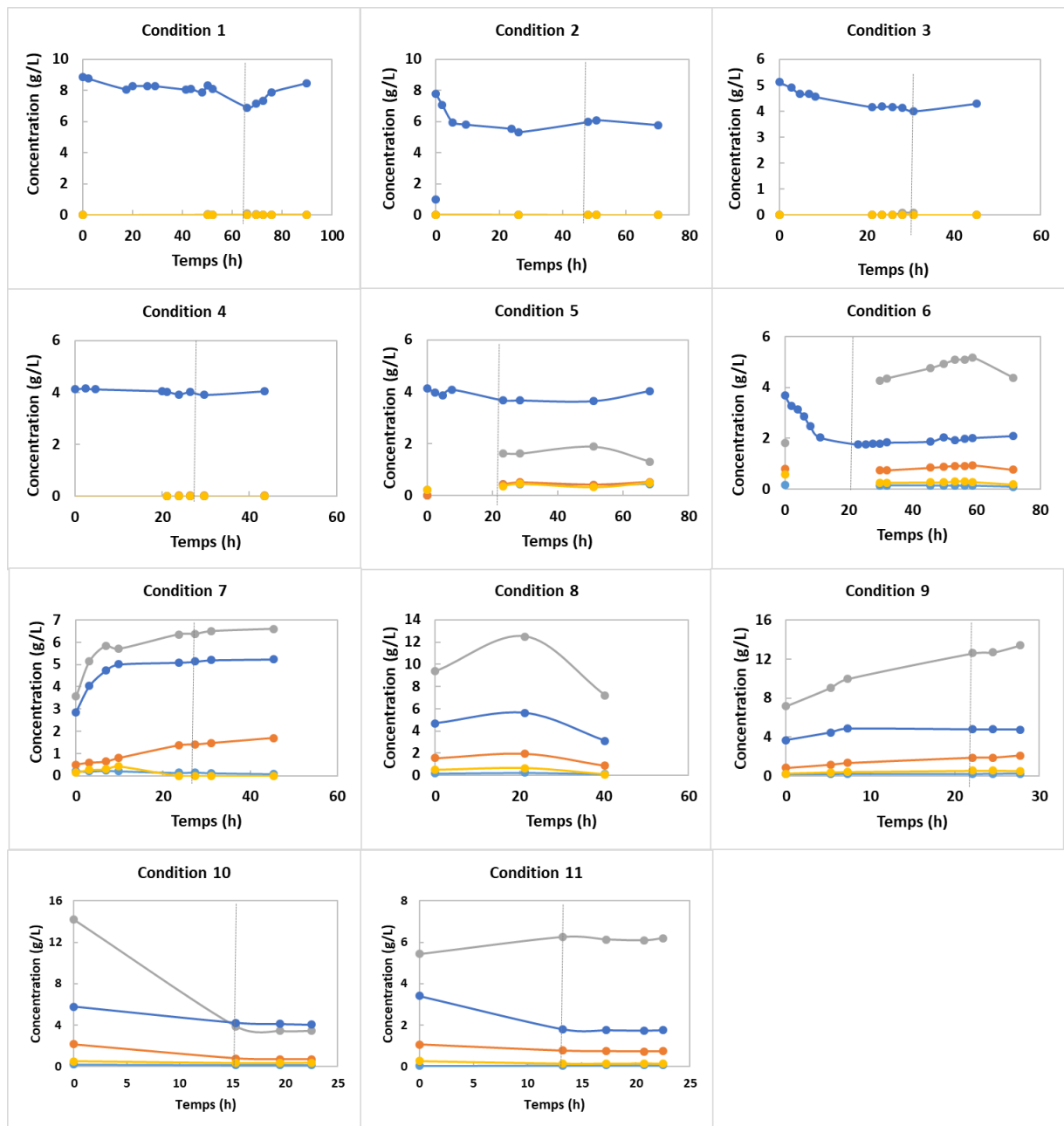


**Figure III.6 :** Évolution temporelle de l'oxygène dissous (en pourcentage de la saturation), au cours de la culture continue de *C. glutamicum* 2262. La courbe en pointillé représente les vitesses d'agitation imposées. Les pointillés verticaux correspondent aux limites de chaque condition opératoire appliquée, présentées dans le tableau III.2.

Durant la culture, différentes vitesses d'agitation ont été testées. Dans le cas des vitesses d'agitation les plus élevées (entre 1200 et 700 rpm), le pourcentage d'O<sub>2</sub> dissous dans le milieu de culture reste supérieur à 50 % (Figure III.6, Tableau III.3). Lors de ces conditions opératoires (conditions 1 à 4), pour lesquelles aucune limitation en oxygène n'est mesurée, *C. glutamicum* 2262 se trouve donc en conditions aérobies. Pour des vitesses d'agitation inférieures à 500 rpm, le pourcentage en O<sub>2</sub> dissous dans le milieu de culture est nul montrant une limitation de l'apport en O<sub>2</sub> (conditions 5 à 11) (Figure III.6, Tableau III.3). Les bactéries se trouvent donc en microaérobiose.

La synthèse de biomasse et des acides organiques (lactate, acétate et succinate) a été suivie au cours du temps. Les résultats sont reportés dans la figure III.7. Pour une question de clarté, chaque condition est présentée séparément.





**Figure III.7 :** Cinétiques des concentrations en biomasse (bleu), en lactate (gris), en acétate (jaune) et en succinate (orange) pour les différentes conditions opératoires réalisées au cours de la culture continue de *C. glutamicum* 2262. Les détails de chaque condition opératoire sont reportés dans le tableau III.3. Le trait vertical marque le début de l'état stationnaire.

Pour chaque condition opératoire, il a été considéré que l'état stationnaire était atteint après environ 5 temps de passage. Néanmoins, afin de valider cette hypothèse, le coefficient de variation de la concentration en biomasse a été calculé pour chaque état stabilisé présumé sauf pour la condition 8 où un seul prélèvement a été réalisé lors de la phase stationnaire suite à un problème technique (tableau III.4).

**Tableau III.4 :** Moyenne, écart type et coefficient de variation (CV) de la concentration en biomasse à l'état stabilisé pour les différentes conditions opératoires testées au cours de la culture continue avec *C. glutamicum* 2262.

Conditions	Biomasse	
	Moyenne (g/L)	CV (%) <sup>(2)</sup>
<b>1</b>	7,54 ± 0,63 <sup>(1)</sup>	8,33
<b>2</b>	5,94 ± 0,16	2,77
<b>3</b>	4,15 ± 0,1	2,51
<b>4</b>	3,97 ± 0,07	1,78
<b>5</b>	3,75 ± 0,18	4,88
<b>6</b>	1,95 ± 0,11	5,44
<b>7</b>	5,17 ± 0,07	1,30
<b>8</b>	5,62	-
<b>9</b>	5,14 ± 0,004	0,07
<b>10</b>	4,02 ± 0,09	2,35
<b>11</b>	1,76 ± 0,01	0,56

<sup>(1)</sup> : écart-type

<sup>(2)</sup> : coefficient de variation

Pour chaque série de mesures, le coefficient de variation est compris entre 0 et 8 %. Il reste donc toujours inférieur à 10 % c'est-à-dire en-dessous du seuil défini dans d'autres travaux pour considérer que l'état stationnaire est effectivement atteint (Shinfuku et al., 2009).

En aérobiose (conditions 1 à 4), aucune production d'acides organiques n'est mesurée. Comme attendu, ces derniers sont synthétisés lorsque l'apport en oxygène est limitant (conditions 5 à 11). Dans toutes ces conditions, le lactate est l'acide organique majoritaire.

Les valeurs de concentration mesurées ainsi que les vitesses calculées pour chaque état stabilisé ont ensuite été comparées entre elles pour évaluer l'impact des conditions d'oxygénation et d'alimentation en glucose sur la physiologie de *C. glutamicum* 2262.

#### 4.4.3. Analyse physiologique de *C. glutamicum* 2262 en fonction de l'apport en oxygène et en glucose

Pour certaines conditions opératoires, qui correspondent toutes à des conditions de culture en microaérobiose, aux vitesses d'agitation les plus faibles (200 et 300 rpm pour les conditions 6 et 11, respectivement) ou aux concentrations initiales les plus élevées en glucose (150 et 250 g/L avec les conditions 8 et 9, respectivement), le glucose apporté n'est pas entièrement consommé (Tableau III.3).

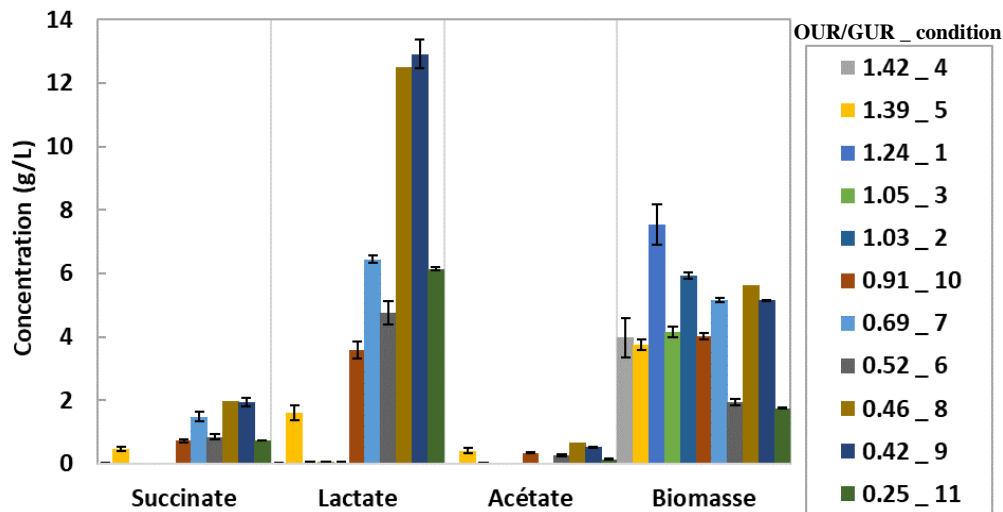
A partir des conditions opératoires imposées, des données de  $k_{La}$  (tableau III.2) et des concentrations résiduelles en glucose et en oxygène, l'OUR et la GUR ont été calculées

(Tableau III.3). Alors que des valeurs très similaires sont obtenues pour un même  $k_{LA}$ , lorsque celui-ci est de l'ordre de  $200 \text{ h}^{-1}$ , correspondant à une vitesse d'agitation de 900 rpm, des OUR différentes sont calculées pour les 3 conditions testées (Tableau III.3). En aérobiose (conditions 1 à 4), l'OUR dépend à la fois du coefficient de transfert d'oxygène et de la concentration en oxygène dissous dans le milieu. La consommation de ce dernier dépend de la concentration en biomasse, qui est aussi influencée par la disponibilité en glucose. Or, la condition 3 correspond à la plus faible concentration en biomasse obtenue pour un  $k_{LA}$  de  $200 \text{ h}^{-1}$  (Tableau III.4). Ceci pourrait expliquer la différence observée entre les valeurs d'OUR à la vitesse d'agitation de 900 rpm.

En revanche, dans le cas de la microaérobiose (conditions 5 à 11), la vitesse volumique de consommation d'oxygène dépend uniquement de  $k_{LA}$ . Cela explique les valeurs d'OUR très similaires pour une même vitesse d'agitation donc pour un même  $k_{LA}$  (Tableau III.3).

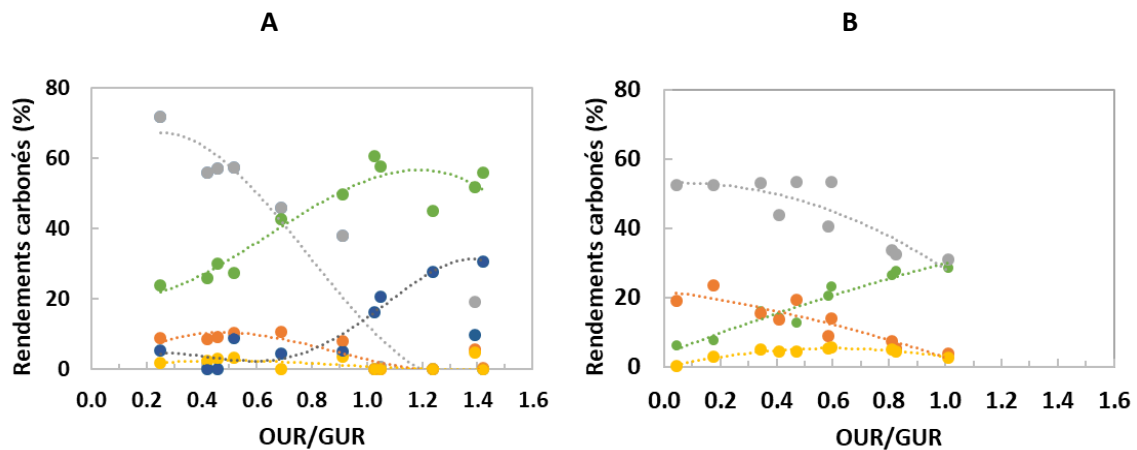
Il apparaît que, considérés indépendamment, ni l'OUR ni le GUR ne semblent être de bons indicateurs d'un environnement nutritionnel favorable à la production d'acides organiques par *C. glutamicum* 2262. En effet, l'absence de synthèse d'acides organiques est notée pour une GUR comprise entre 9,11 et 10,34 mM/h et une OUR entre 9,67 et 12,93 mM/h. La synthèse d'acides organiques est généralement obtenue avec des GUR plus élevées mais aussi plus faibles. Alors que des OUR légèrement plus forts que ceux de l'intervalle précédent autorisent également la production d'acides organiques. Le ratio OUR/GUR semble, à ce titre, plus intéressant. En effet, la phase d'aérobiose, sans production d'acides organiques correspond globalement à des ratios OUR/GUR supérieurs à 0,9 (Tableau III.3).

Pour chaque condition opératoire, à l'état stabilisé, la moyenne des concentrations en biomasse, lactate, succinate ou acétate a été calculée (figure III.8).



**Figure III.8 :** Concentrations en biomasse, succinate, lactate et acétate, mesurées à l'état stabilisé pendant les différentes conditions opératoires, correspondant à différents ratio OUR/GUR, testées au cours de la culture continue de *C. glutamicum* 2262. La légende à droite indique la valeur des ratios OUR/GUR et les numéros des conditions opératoires présentées dans le tableau III.3.

A partir de ces concentrations, mais aussi celles du CO<sub>2</sub> produit (Tableau III.3), les rendements carbonés de conversion du glucose ont pu être établis pour chaque condition de culture (figure III.9.A).



**Figure III.9 :** évolution des rendements carbonés de conversion du glucose en biomasse, CO<sub>2</sub> et acides organiques en fonction du ratio OUR/GUR, déterminés à partir des données expérimentales obtenues au cours des cultures en mode continu (A) et discontinu (B). Succinate (●), lactate (●), acétate (●), biomasse (●) et CO<sub>2</sub> (●).

Lors de la culture en mode continu, en aérobiose,  $OUR/GUR > 0,9$ , le glucose est converti majoritairement en biomasse (55 %) avec 25 % en CO<sub>2</sub> (figure III.9.A). Cependant, il est à noter que le bilan carboné global est d'environ 80 %, ce qui peut être dû à la présence d'autres métabolites, non quantifiés, pendant la phase d'aérobiose ou bien à une imprécision de la mesure du CO<sub>2</sub> en sortie du réacteur

En microaérobiose,  $OUR/GUR < 0,9$ , le glucose est majoritairement converti en acide lactique et succinique ainsi qu'en biomasse, acide acétique et  $CO_2$  (figure III.9.A). Les conditions de limitation en oxygène testées au cours de cette culture continue, correspondent à des ratios entre 0,25 et 0,9. Une variation faible des rendements de conversion du glucose en succinate (entre 7,9 et 10,7 %, Figure III.9.A) a été observée pendant cette phase de microaérobiose. Le rendement maximal d'environ 10,7 % est obtenu avec un ratio de 0,69. Par contre, une augmentation nette du rendement de conversion du glucose en lactate a été observée en diminuant le ratio  $OUR/GUR$  pour atteindre 72 % avec le ratio  $OUR/GUR$  le plus faible (0,25). Le rendement de conversion du glucose en acétate reste, pour sa part, quelle que soit la condition de microaérobiose considérée (figure III.9.A).

Les résultats obtenus au cours de cette culture continue confirment, expérimentalement, la pertinence du ratio  $OUR/GUR$  pour caractériser l'impact de l'apport en oxygène et en glucose sur la physiologie de *C. glutamicum* 2262. Par conséquent, ce ratio a également été utilisé pour décrire le comportement de *C. glutamicum* 2262 lors des cultures discontinues réalisées précédemment (Figure III.9.B). Comme ces dernières ont toutes été réalisées dans des conditions de limitation en oxygène, une seule phase, correspondant à la phase de production des acides organiques, est mise en évidence, pour des ratios inférieurs à 1,01. Même si les évolutions des différents rendements de conversion du glucose présentent des allures similaires entre les modes de culture, le lactate restant toujours l'acide organique majoritairement produit, par exemple, des différences sont notées concernant la valeur de certains rendements. Ainsi, le carbone du glucose se retrouve davantage dans la biomasse lors des conditions testées en mode continu que lors de celles réalisées en mode discontinu. À l'inverse, le rendement de conversion du glucose en succinate est plus élevé lors des cultures discontinues (figures III.9.A et III.9.B). Le mode de culture mais aussi, sans doute, la régulation de paramètres tels que le pH semblent donc impacter la synthèse de cet acide organique. Il est également possible la désoxygénation progressive du milieu de culture, en mode discontinu, soit favorable à la synthèse de succinate.

Les travaux de Shinfuku et al. (2009) avaient simulé la production préférentielle séquentielle du succinate, du lactate, de l'acétate et de la biomasse en fonction du rapport  $OUR/GUR$  (figure I.22). Cependant, cette production séquentielle n'avait pas été complètement validée expérimentalement par ces auteurs puisque seules 2 mesures expérimentales, une en anaérobiose et une en microaérobiose, pour un  $OUR/GUR$  de 0,21, avait été réalisées. Nos travaux qui ont permis, à la fois, d'augmenter le nombre de valeurs expérimentales de

OUR/GUR et d'élargir la gamme de ratios testés, ne confirment que partiellement les simulations de Shinfuku et al. (2009). Ainsi, le lactate est bien l'acide organique majoritairement produit en microaérobiose et les basses valeurs du rapport OUR/GUR favorisent la production de succinate et de lactate alors que les valeurs les plus hautes sont favorables à la synthèse de biomasse. Par contre, avec un apport limitant en oxygène, le lactate, le succinate et l'acétate sont toujours produits simultanément. Ce n'était pas le cas dans la simulation de Shinfuku et al. (2009) puisque la production d'acétate n'était pas simulée pour les valeurs les plus basses de OUR/GUR. De même, les rendements de conversion du glucose en acétate expérimentaux sont beaucoup plus faibles que ceux qui avaient été simulés.

## 5. Conclusion du chapitre 3

Ce chapitre a été consacré à une étude expérimentale de l'adaptation physiologique de *C. glutamicum* vis-à-vis de changements des conditions environnementales. Dans une première partie, des cultures en fiole ont été réalisées, en imposant différentes conditions de transfert d'oxygène ( $k_{LA}$ ) afin d'identifier les paramètres influençant la production des acides organiques. Il a pu être montré (Briki et al., 2020) que la réponse physiologique de cette bactérie est fortement influencée par le niveau d'oxygénation. Une production séquentielle des acides organiques et de la croissance a été identifiée. La production de succinate correspond préférentiellement aux  $k_{LA}$  les plus faibles ( $< 5 \text{ h}^{-1}$ ). En augmentant le coefficient de transfert d'oxygène ( $k_{LA}$  entre 5 et  $20 \text{ h}^{-1}$ ), la production de lactate devient plus importante. Pour des valeurs de  $k_{LA}$  entre 31 et  $77 \text{ h}^{-1}$ , la conversion de glucose est davantage orientée vers la production d'acétate dont la production optimale est obtenue à  $77 \text{ h}^{-1}$ . Contrairement à la production des acides organiques, la croissance est plus importante aux  $k_{LA}$  les plus élevés ( $> 90 \text{ h}^{-1}$ ). Comme attendu la réponse physiologique de *C. glutamicum* dépend non seulement de niveau d'oxygénation mais aussi de la disponibilité de glucose. Des accumulations transitoires des acides organiques ont été observées. Celles-ci concernent le lactate et l'acétate qui sont réassimilés en fin de culture, lorsque la disponibilité en glucose devient limitante. Il est à noter que la ré-assimilation de succinate est déclenchée à une concentration seuil en glucose (50 mM). Il a aussi été suggéré que le succinate soit un co-substrat énergétique.

Dans un second temps, prenant en compte l'impact de niveau d'oxygénation et la disponibilité de glucose, un procédé semi-continu a été réalisé pour évaluer la capacité de la souche sauvage, *C. glutamicum* 2262, pour la production de succinate. Une stratégie de désoxygénation progressive a été appliquée pour la transition de l'aérobiose à l'anaérobiose. Une alimentation en  $\text{NaHCO}_3$  et en glucose a été réalisée pendant la phase d'anaérobiose afin de maintenir la concentration en glucose résiduel supérieure à 50 mM. Une production importante de succinate, équimolaire au lactate, a été mesurée lors de cette phase. La concentration obtenue à la fin de ce procédé (793 mM) est parmi les concentrations les plus élevées enregistrées dans la littérature. La stratégie appliquée, en maîtrisant les deux paramètres clés que sont la cinétique de transition de l'anaérobiose à l'aérobiose et la concentration résiduelle en glucose, a donc permis de montrer la capacité d'une souche sauvage de *C. glutamicum* à produire une quantité importante de succinate, comparable à celles produites par des producteurs naturels de cet acide organique.

Cette étude a aussi permis de confirmer la pertinence du ratio OUR/GUR pour décrire l'impact de ces deux paramètres clés sur le comportement de *C. glutamicum* 2262. En plus de la concentration seuil en glucose résiduel (50 mM), un ratio OUR/GUR seuil a été identifié permettant de différencier la phase de production de celle de consommation du succinate chez les deux souches étudiées (0,81 et 1,77 avec *C. glutamicum* 2262 et 2262 $\Delta$ ldhA, respectivement).

L'application d'une gamme large de ratios OUR/GUR à *C. glutamicum* 2262, obtenus soit en cultures discontinues soit en culture continue, a permis de confirmer les orientations du métabolisme de cette bactérie en fonction de la disponibilité en oxygène ou en glucose. Ainsi, le lactate, le succinate et l'acétate sont produits simultanément en microaérobiose, qui a été définie pour des ratios inférieurs à environ 1. Au-delà, de cette valeur, une croissance maximale sans production des acides organiques a été observée, notamment lors de la culture continue. L'orientation la plus importante du métabolisme de *C. glutamicum* 2262 vers la production de succinate a été obtenue lors d'une culture discontinue, avec un rendement carboné maximal de conversion de glucose en succinate (23 %), pour un ratio OUR/GUR faible, de 0,17.

Cette étude expérimentale a permis d'évaluer l'impact du niveau d'oxygénation et de la disponibilité en glucose, sur la réponse physiologique de *C. glutamicum*. Dans une seconde partie de notre travail, nous avons cherché à élaborer des modèles cinétiques permettant de prédire au mieux la croissance et la production des acides organiques dans différentes conditions de culture.



# Chapitre 4

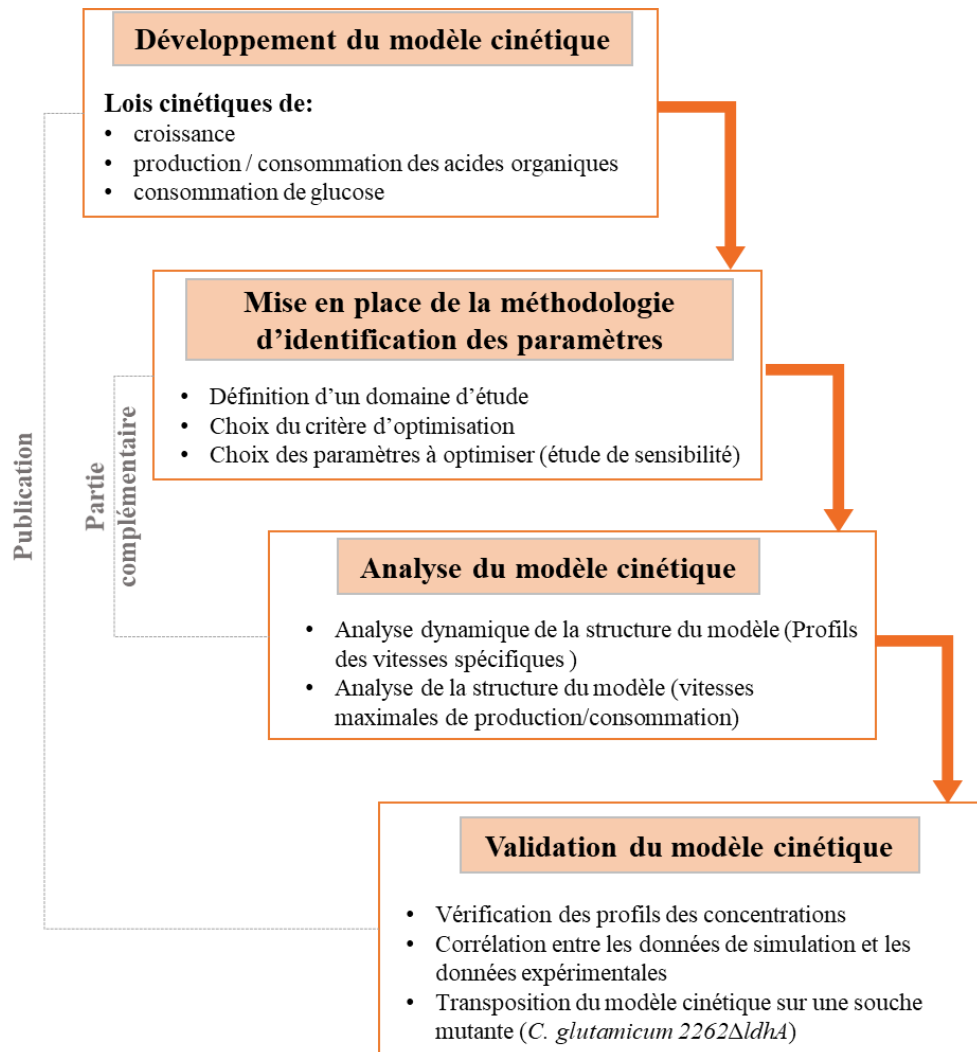
---

## **IV. Chapitre 4 : Modélisation cinétique de la réponse physiologique de *C. glutamicum* en limitation en oxygène : confirmation et quantification de l'impact du niveau d'oxygénation et de la disponibilité de glucose**

### **1. Introduction**

Selon le niveau d'oxygénation, une production préférentielle des acides organiques a été montrée chez *C. glutamicum* 2262 (Briki et al., 2020) et chez *C. glutamicum* 2262 $\Delta$ ldhA, (Kaboré et al., 2015). Lors d'une déficience en glucose, une re-consommation de lactate (uniquement dans le cas de *C. glutamicum* 2262) et d'acétate, produits au début de la culture, a été observée avec ces deux souches. Toutefois, nous avons montré que le succinate était aussi consommé à partir d'une concentration seuil en glucose (9 g L<sup>-1</sup>) et un  $k_{LA}$  de 11 h<sup>-1</sup>.

L'objectif de cette partie du travail de thèse est de développer un modèle cinétique capable de prédire et de quantifier le comportement de *C. glutamicum* en réponse aux changements des conditions environnementales (figure IV.1). Dans un premier temps, en prenant en compte à la fois l'impact du niveau d'oxygénation et de la disponibilité en glucose, un modèle cinétique a été développé pour décrire les cinétiques de croissance, de production et de consommation des acides organiques et de consommation de glucose. Ce modèle repose sur un bilan matière des principaux composés du milieu et de la biomasse, adossé à des modèles cinétiques de production/consommation, pondéré par des effets seuils des deux substrats, glucose et oxygène. Ensuite, pour chaque condition opératoire, les paramètres du modèle ont été identifiés par un algorithme génétique diploïde (AGD). Puis, ce modèle a été généralisé, en intégrant des corrélations entre les paramètres simulés et le  $k_{LA}$ . Finalement, afin de vérifier la robustesse du modèle cinétique, ce dernier a été transposé à la souche mutante, *C. glutamicum* 2262 $\Delta$ ldhA. Les résultats de cette première partie sont présentés sous forme d'une publication. Pour mener cette étude, des étapes préliminaires de mise au point, aboutissant à une modélisation fiable et robuste ont été nécessaires. Ces étapes sont décrites dans une partie complémentaire de l'article.



**Figure IV.1** : Stratégie de l'étude de modélisation cinétique de *C. glutamicum* dans des conditions de limitation en oxygène

## 2. Projet de publication: A kinetic model to predict the effect of the oxygenation level and glucose concentration on the physiological response of *Corynebacterium glutamicum*

### Abstract

*Corynebacterium glutamicum* is an important industrial amino acids producer. According to the oxygenation level, it can produce several organic acids with marginal growth on glucose, among which succinate. A kinetic model was proposed for the *C. glutamicum* growth and several organic acids production during batch cultures, in order to understand its physiological response to change of oxygenation level and glucose availability. The growth rate was described by a modified Monod model accounting for glucose consumption or produced organic acids consumption. A modified Luedeking-Piret model, was used to describe the various organic acids production. The balance equations for the organic acids contained both production and consumption terms. Glucose and oxygen limitations were described by adapted logistic functions. During model building, identified kinetic parameters showed a close relationship with the  $k_{LA}$  value. This relationship was depicted by secondary black box models and embedded in our primary model. The resulting generalized model predicted very well the experimental kinetics and observations under a very large variety of  $k_{LA}$  conditions. It confirmed the effect of glucose and oxygenation level on the behavior of *C. glutamicum*. It allows to highlight a sequential consumption of glucose and organic acids. Using the same methodology, a similar model was developed to describe the behavior of a mutant strain of *C. glutamicum* ( $\Delta ldhA$  strain) towards oxygenation level. With the same excellent agreement between experimental and predicted concentrations, results confirmed that our models can be applied to various strains and to a large experimental domain of  $k_{LA}$  values. It thus allows to better understand the behavior of two strains of *C. glutamicum*, (a wild type one and a  $\Delta ldhA$  mutant one) towards the oxygenation level and can be a good basis to monitor succinate production.

*Keywords:* *Corynebacterium glutamicum*; organic acids; oxygen limitation; kinetic modeling

### 2.1. Introduction

Succinate is one of the 12 top bio-based building blocks. Several strategies have been developed to produce this di-acid using wild type or genetically designed overproducing microbial strains. *Corynebacterium glutamicum* has already been used as a powerful producer in the industrial production of amino acids as L-glutamate and L-Lysine (Becker and Wittmann, 2012; Takeno et al., 2007; Zahoor et al., 2012). This bacterium can also naturally produce different organic acids, such as lactate, succinate, acetate and pyruvate, under deprived oxygen and anaerobic conditions (Briki et al., 2020; Dominguez et al., 1993; Inui et al., 2004; Kaboré et al., 2015;

Okino et al., 2008b, 2005). It was demonstrated that the oxygenation level had a strong effect on the physiological response of *C. glutamicum*. Based on cultures in shake flasks with wild type (Briki et al., 2020) and mutant strains of *C. glutamicum*, specific  $k_{LA}$  ranges were identified for the cell growth on the one side and the organic acids production on the other side (Kaboré et al., 2015). As far as growth was concerned, the maximal biomass concentration and growth rate were obtained at the highest oxygenation level. In parallel, Michel et al. (2015) showed that a marginal growth on glucose was observed, in anaerobic conditions, during organic acids production. However, other studies demonstrated that it can anaerobically grow only in the presence of nitrate (Nishimura et al., 2007; Takeno et al., 2007). As far as organic acids production was concerned, in contrast to growth, it took place at the lowest oxygenation levels; in micro-aerobic and anaerobic conditions. Indeed, the maximal succinate production was observed for specific  $k_{LA}$  between 0.6 and 5 h<sup>-1</sup>. By further increasing the  $k_{LA}$  value, the succinate production rate decreased, and the production of lactate, which was the main end-product fermentation, and acetate increased until reaching a maximum at  $k_{LA}$  value of about 31 and 77 h<sup>-1</sup>, respectively (Briki et al., 2020). Similarly, the optimal organic acids production by a *ldhA* deleted strain of *C. glutamicum* 2262 corresponded to  $k_{LA}$  values between 10 and 19 h<sup>-1</sup> for succinate and between 19 and 33 h<sup>-1</sup> for acetate (Kaboré et al., 2015). Bacterial growth and organic acid production are thus antagonistic and organic acid productions were sequential.

The carbon source of such growing and producing phases has been regularly studied. Glucose was mostly used. It is well known as the preferential substrate for *C. glutamicum* growth and organic acid production. Besides, it was also demonstrated that *C. glutamicum* is able to grow on a variety of other sugars (fructose, sucrose,...) or organic acids (lactate, pyruvate, acetate) (Baritugo et al., 2018; Cocaign et al., 1993; Dominguez et al., 1993; Wendisch et al., 2000) as a single or combined source of carbon and/or energy. *Corynebacterium glutamicum* can metabolize simultaneously glucose with other sugars or organic acids such as lactate, acetate or pyruvate during batch culture. It exhibits then a monophasic growth on these substrate mixtures (Dominguez et al., 1997). However, using a mixture of glucose and glutamate, diauxic growth and sequential consumption of carbon sources were described (Kramer et al. 1990).

In a recent paper (Briki et al., 2020), it was proved that the residual glucose concentration is a critical parameter for the organic acids production, during batch cultures performed under deprived oxygen conditions. The succinate production ceased when glucose concentration decreased down to a threshold concentration of about 9 g L<sup>-1</sup> (50 mM). Below this glucose threshold, succinate was consumed as energetic co-substrate (Briki et al., 2020), which was

involved in the respiratory chain of *C. glutamicum* (Bott and Niebisch, 2003; Lancaster and Kröger, 2000). No growth on succinate as the only carbon source was observed, except with a spontaneous mutant isolated for its ability to grow in succinate minimal medium and a *dccT* overexpressed strain of *C. glutamicum* (Youn et al., 2009, 2008). Furthermore, *C. glutamicum* also consumed lactate and acetate previously produced as carbon and/or energy source only in the case of glucose depletion (Briki et al., 2020). Similarly, many papers (Dominguez et al., 1993, Käß et al., 2014, Conrady et al., 2019) related that *C. glutamicum* consumed simultaneously some organic acids (lactate, succinate and acetate) produced at the beginning of the culture when sufficient oxygen was available. The relationship between alternative carbon sources, glucose concentration and oxygenation was thus not completely elucidated. Nevertheless, in order to control the succinate production by *C. glutamicum*, it is essential to understand and quantify the switch between organic acids production and consumption according to the glucose and oxygen availability.

Due to the complexity of the micro-organism, an experimental approach observing concentration profiles might not be suitable to capture underlying parallel or sequential phenomena. A modelling approach might be preferred to capture and describe the physiological response of cells to a change in the environmental conditions. For this study, the experimental results of a series of nine previous batch cultures of *C. glutamicum* 2262 in shake flasks were exploited. Each culture was conducted with the same initial glucose concentrations and various stirring rate namely various  $k_{LA}$ . During such batch cultures, the above-mentioned phenomena were observed. So, this work aimed at developing a kinetic model which is able to predict the kinetics of growth, substrates consumption and organic acids production in order to confirm the effect of the two critical parameters, oxygenation and glucose concentration, on the behavior of *C. glutamicum*. In a first step, a kinetic model based on mass balance equations was proposed and kinetic parameters were identified from experimental data. Relationships between each kinetic parameter and the  $k_{LA}$  value were then identified as secondary models allowing to generalize the developed kinetic models. In a third and final step, the resulting model was transposed to the *ldhA* deleted strain of *C. glutamicum*, to check generalization ability.

## Abbreviation list

<b>ag*</b>	numerical coefficient	<b>dimensionless</b>
<b>ag0</b>	numerical coefficient	<b>dimensionless</b>
<b>G*</b>	threshold glucose concentration	<b>g L<sup>-1</sup></b>
<b>K<sub>A</sub></b>	acetate saturation constant	<b>g L<sup>-1</sup></b>
<b>K<sub>G</sub></b>	glucose saturation constant	<b>g L<sup>-1</sup></b>
<b>K<sub>L</sub></b>	lactate saturation constant	<b>g L<sup>-1</sup></b>
<b>k<sub>La</sub></b>	Volumetric mass transfer coefficient	<b>h<sup>-1</sup></b>
<b>K<sub>s</sub></b>	succinate saturation constant	<b>g L<sup>-1</sup></b>
<b>m<sup>A</sup></b>	specific acetate uptake rate	<b>h<sup>-1</sup></b>
<b>m<sup>G</sup></b>	specific glucose uptake rate	<b>h<sup>-1</sup></b>
<b>m<sup>L</sup></b>	specific lactate uptake rate	<b>h<sup>-1</sup></b>
<b>m<sup>S</sup></b>	specific succinate uptake rate	<b>h<sup>-1</sup></b>
<b>μ<sup>G</sup><sub>max</sub></b>	maximum specific rate of growth on glucose	<b>h<sup>-1</sup></b>
<b>μ<sup>LA</sup><sub>max</sub></b>	maximum specific rate of growth on lactate and acetate	<b>h<sup>-1</sup></b>
<b>μ<sup>A</sup><sub>max</sub></b>	maximum specific rate of growth on acetate	<b>h<sup>-1</sup></b>
<b>n</b>	degree of oxygen limitation/inhibition	<b>dimensionless</b>
<b>OUR</b>	oxygen uptake rate	<b>mmol (g DW)<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup></b>
<b>OUR<sub>min</sub></b>	minimum oxygen uptake rate	<b>mmol (g DW)<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup></b>
<b>q<sub>A</sub></b>	specific acetate production rate	<b>g (g DW)<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup></b>
<b>q<sub>L</sub></b>	specific lactate production rate	<b>g (g DW)<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup></b>
<b>q<sub>S</sub></b>	specific succinate production rate	<b>g (g DW)<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup></b>
<b>X<sub>max</sub></b>	maximal biomass concentration	<b>g L<sup>-1</sup></b>
<b>Y<sup>X</sup><sub>A/G</sub></b>	acetate yield coefficient on glucose	<b>g g<sup>-1</sup></b>
<b>Y<sup>X</sup><sub>A/X</sub></b>	growth-associated acetate production parameter	<b>g g<sup>-1</sup></b>
<b>Y<sup>X</sup><sub>L/G</sub></b>	lactate yield coefficient on glucose	<b>g g<sup>-1</sup></b>
<b>Y<sup>X</sup><sub>L/X</sub></b>	growth-associated lactate production parameter	<b>g g<sup>-1</sup></b>
<b>Y<sup>X</sup><sub>S/G</sub></b>	succinate yield coefficient on glucose	<b>g g<sup>-1</sup></b>
<b>Y<sup>X</sup><sub>S/X</sub></b>	growth-associated succinate production parameter	<b>g g<sup>-1</sup></b>
<b>Y<sup>X</sup><sub>X/A</sub></b>	biomass yield coefficient on acetate	<b>g g<sup>-1</sup></b>
<b>Y<sup>X</sup><sub>X/G</sub></b>	biomass yield coefficient on glucose	<b>g g<sup>-1</sup></b>
<b>Y<sup>X</sup><sub>X/L</sub></b>	biomass yield coefficient on lactate	<b>g g<sup>-1</sup></b>
<b>α<sup>A</sup></b>	nongrowth-associated acetate production parameter	<b>h<sup>-1</sup></b>
<b>α<sup>L</sup></b>	nongrowth-associated lactate production parameter	<b>h<sup>-1</sup></b>
<b>α<sup>S</sup></b>	nongrowth-associated succinate production parameter	<b>h<sup>-1</sup></b>
<b>μ</b>	specific growth rate	<b>h<sup>-1</sup></b>
<b>A</b>	Acetate concentration	<b>g L<sup>-1</sup></b>
<b>G</b>	Glucose concentration	<b>g L<sup>-1</sup></b>
<b>L</b>	Lactate concentration	<b>g L<sup>-1</sup></b>
<b>LA</b>	Lactate and Acetate concentration	<b>g L<sup>-1</sup></b>
<b>S</b>	Succinate concentration	<b>g L<sup>-1</sup></b>

## 2.2. Materials and methods

### 2.2.1. Kinetic models

The microbial culture can be described by kinetic models of growth ( $dX/dt$ ), product formation ( $dP/dt$ ) and substrate consumption ( $dS/dt$ ). Usually, the growth rate was described by the Monod model (Eq. 1), which presents the influence of the substrate limitation. To consider the product inhibition, the Monod model can be modified as the equation 2 (Han and Levenspiel, 1988). Sometimes, the microbial growth was limited not by the substrate, but by the biomass concentration. In such a case, a logistic equation (Eq. 3) can be used.

$$\frac{dX}{dt} \times \frac{1}{X} = \mu = \mu_{max} \times \frac{[Substrate]}{K_{Substrate} + [Substrate]} \quad \text{Eq. 1}$$

$$\frac{dX}{dt} \times \frac{1}{X} = \mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S} \left( 1 - \frac{[Product]}{[Product]_{max}} \right)^n \quad \text{Eq. 2}$$

$$\frac{dX}{dt} = \mu_m X \left( 1 - \frac{X}{X_m} \right) \quad \text{Eq. 3}$$

In the same way, the product formation was often assumed to be proportional to the growth rate. For some microorganisms, the product formation rates also depend on the biomass concentration and follow a Luedeking-Piret model (Eq. 4) (Luedeking and Piret, 1959) which was originally developed for the formation of lactic acid by *Lactobacillus delbrucckii*.

$$\frac{d[Product]}{dt} = Y_{Product/X} \frac{dX}{dt} + \alpha X \quad \text{Eq. 4}$$

With  $[Product]$  and  $X$ , the product and biomass concentration, and where parameters  $Y_{Product/X}$  and  $\alpha$  correspond, respectively, to growth and non-growth associated product formation.

### 2.2.2. Parameters identification

In this study, a general form to predict the microbial growth and the evolution of organic acids and glucose concentrations under limited oxygen and substrate conditions was proposed. The parameters of the proposed models were estimated using a diploid genetic algorithm, by minimizing the discrepancy between the experimental and simulated data (the optimization criterion). These parameters corresponded to the real physiological kinetic parameters and we thus used apparent values calculated from the experimental data as initial guess for the identification step.



### 2.2.2.1. Optimization criterion

For minimizing the difference between the experimental and simulated data, a relative error was used as optimization criterion.

$$J = \sum_{j=1}^q \left( \sum_{i=1}^p (Y_{ij}^{exp} - Y_{ij}^{mod})^2 / (\text{Max}(Y_j^{exp}))^2 \right) \text{ Eq. 5}$$

Where p and q denote the number of the experimental data points and the number of process variables (glucose, biomass, lactate, succinate or acetate), respectively.  $Y_{ij}^{exp}$  and  $Y_{ij}^{mod}$  represent the experimental (exp) and simulated (mod) concentration of the  $j^{\text{th}}$  variable in the  $i^{\text{th}}$  experimental point. The simulated concentrations of biomass and organic acids were predicted by solving the corresponding differential equations proposed, using a Matlab integration method, based on a modified Rosenblock formula of order 2 (ODE23s).

### 2.2.2.2. Optimization Method: diploid genetical-evolutionary algorithm DGA

In this study, a stochastic optimization method; a diploid genetical-evolutionary algorithm DGA was used. This algorithm was based on the Darwin theory for the natural evolution. This algorithm was a real encoding Diploid Genetical-evolutionary Algorithm developed in our laboratory. Though individuals are coded by real encoding, it uses both a homozygote and heterozygote population which allows to combine convergence properties on a discrete space (heterozygote crossing) and continuous space (homozygote crossing). The principle of the diploid genetic, which was precisely described by (Perrin et al., 1997), is resumed below.

#### Principle

An initial population was created by generating, in the search domain, N random individuals with each one corresponding to a possible set of model parameter set. For each individual, the differential model was solved out to predict the concentration profiles and compute the resulting error between modeled and experimental data (criterion). Individuals were compared to each other and sorted according to their error value. Using an elitist selection, only the  $p_E\%$  best individuals (with lowest error) were kept in the next generation as parent individuals. The population of the next generation was then completed in creating enough new individuals resulting from random homozygote or heterozygote cross-over (with a probability  $p_{HH}$ ) or mutation (with a probability  $p_M$ ) of the parent individuals. After each cross-over, it was checked that the new individual was at least as good as the worst surviving parent. The completed new population was then sorted again and the termination criteria was checked. In this study, the

main termination criterion was based on the dispersion of the error  $\epsilon_J$  values between the best and the worst individual. The latter had to be lower than a given tolerance level. This sequence was repeated until the termination criteria was satisfied. The initial random population thus evolved along generations and converged towards an optimal population where the first individual was kept as optimal parameters set.

### Settings algorithm parameters

The genetic algorithm parameters were set at the same values for all identifications: the population size was set to  $N=2500$  individuals, the mutation rate  $p_{Mut}=0.05$ , the homozygote ratio  $p_{HH}=0.5$ , the threshold for elimination  $p_e=1/3$  and accuracy of the solution  $\epsilon_J=10^{-3}$ .

### Kinetics parameters domain

The search domain, corresponding to the minimal and maximal value of each parameter, should be fixed. We used the theoretical yield as maximal value for the yield conversion of glucose on biomass and product. For the other parameters, their limits were based on literature data or on preliminary simulations (Tableau IV.1).

**Tableau IV.1** : Minimal and maximal of model parameters

Parameters	Min	Max
$\mu_{max}^G$	0.05	0.7
$Y_{L/X}^X$	1	14.5
$Y_{A/X}^X$	0	1
$Y_{S/X}^X$	0.5	7
$Y_{X/G}^X$	0.2	0.5
$Y_{L/G}^X$	0	1
$Y_{A/G}^X$	0	0.66
$Y_{S/G}^X$	0	1.11
$\alpha^L$	0	0.06
$A^A$	0	0.03
$\alpha^S$	0	0.04

Parameters	Min	Max
$m^L$	0	0.06
$m^G$	0	0.08
$m^S$	0	0.035
$m^A$	0	0.01
$\mu_{max}^L$	0	0.3
$1/Y_{X/A}^X$	1	10
$1/Y_{X/L}^X$	1	10
$n$	0.5	2.5
$G^*$	7	10
$ag^*$	0.5	1
$ago$	0.5	3

## 2.3. Results and discussion

In order to understand and control the compartment of *C. glutamicum* according to the oxygenation level and the availability of glucose in the medium, a kinetic model was developed. It was based on the different measurements during 9 cultures in unbaffled shake flasks performed at different  $k_{LA}$  values (0.6, 5, 11, 20, 31, 44, 77, 90 and 118 h<sup>-1</sup>), where biomass, glucose and organic acids concentration were measured (Briki et al., 2020). The kinetics were described by a cell growth equation ( $\mu$ ), a product formation equation ( $q_{\text{product}}$ ) and a substrate utilization equation ( $q_{\text{Substrate}}$ ).

### 2.3.1. Model development

To prepare for the development of the kinetic models, some hypothesis have been proposed based on the literature and previous results of batch cultures of *C. glutamicum* 2262 in unbaffled shake flasks (Briki et al., 2020).

#### 2.3.1.1. Growth model

A linear relationship between the maximal biomass concentration and the  $k_{LA}$  value was previously observed. The cell growth was essentially limited by the oxygenation level. At highest  $k_{LA}$  values (between 90 and 118 h<sup>-1</sup>), *C. glutamicum* consumed lactate and acetate previously produced as carbon source when glucose was exhausted (Briki et al., 2020). The bacterial growth was thus assumed to depend on glucose according to a Monod-type kinetic  $\mu^G$  and on lactate and acetate with co-substrate kinetic  $\mu^{LA}$ .

$$\mu^G = \mu_{max}^G * \frac{G}{k_g + G} \quad \text{Eq. 6}$$

$$\text{and } \mu^{LA} = \mu_{max}^{LA} * \frac{L}{k_L + L} * \frac{A}{k_A + A} \quad \text{Eq. 7}$$

For the substrate saturation coefficient, values from literature were used:  $k_g$  and  $k_L$  were set at 0.0072 and 0.0045 g L<sup>-1</sup>, respectively (Seletzky et al., 2007).

To consider the effect of glucose concentration on the growth rate, a logistic function  $\varphi_G(G)$  such as  $\varphi_G(G) = 0$ , when  $G > 0$  and  $\varphi_G(G) = 1$ , when  $G = 0$ , was introduced. It allowed to define the carbon source for growth either as glucose or as lactate and acetate. The following logistic function (Eq.8) was thus added to the model to consider regulated sequential uptake of substrates:

$$\varphi_G(G) = \frac{1}{\exp(a_{G_0} * G)} \quad \text{Eq. 8}$$

To consider the limiting effect of oxygen on bacterial growth, a modified Levenspiel equation was proposed using the ratio of the minimal specific oxygen uptake rate ( $OUR_{min}$ ) to the specific oxygen uptake rate ( $OUR$ ) during the culture ( $1 - \varphi_{O_2}$ ) (with  $\varphi_{O_2} = \left(\frac{OUR_{min}}{OUR}\right)^n$ ). Under limited oxygen conditions, the specific oxygen uptake rate can be estimated by the Eq. 9:

$$OUR = \frac{k_{La} * O_2^*}{X} \quad \text{Eq. 9}$$

$$OUR_{min} = \frac{k_{La} * O_2^*}{X_{max}} \quad \text{Eq. 10}$$

The above ratio can thus be simplified as:

$$\frac{OUR_{min}}{OUR} = \frac{X}{X_{max}} \quad \text{Eq. 11}$$

The final kinetic equation for specific growth rate under oxygen limitation and potential glucose depletion is given below:

$$\frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = \mu = \left( \mu_{max}^G * \frac{G}{k_G + G} * (1 - \varphi_G(G)) + \mu_{max}^{LA} * \frac{L}{k_L + L} * \frac{A}{k_A + A} * \varphi_G(G) \right) * \left( 1 - \left( \frac{X}{X_{max}} \right)^n \right) \quad \text{Eq. 12}$$

### 2.3.1.2. Succinate production/consumption model

Under deprived oxygen condition, *C. glutamicum* metabolized glucose for the growth and the production of organic acids as lactate, succinate and acetate. The production rate of these organic acids can be described by the Luedeking-Piret equation (Eq. 4), which considered the production associated to growth ( $Y_{S/X}^x \mu$ ) and dissociated from growth ( $\alpha^S$ ).

In contrast to the growth rate, the maximal production rate of the organic acids was obtained at the lowest  $k_{La}$  value. This impact can be presented by the limiting oxygen term  $\varphi_{O_2}$ .

In addition, a transient accumulation of organic acids was observed according to the residual glucose concentration (Briki et al., 2020). Succinate consumption started below a threshold glucose concentration of about 9 g.L<sup>-1</sup> (50 mM). According to the literature, succinate, which is a co-substrate, was only consumed as energy source (for maintenance  $m_s$ ) under oxygen limitation. Based on these observations, the specific succinate formation rate ( $q_S^{prod}$ ) was modeled using a modified Luedeking-Piret equation (Eq. 13) in which a consumption term ( $q_S^{cons}$ ) was added (Eq. 14). In order to distinguish succinate production and succinate

consumption steps, a second logistic function  $\varphi_G^S(G)$  (Eq. 16), based on the residual glucose concentration and the threshold glucose concentration, was added.

$$q_S^{prod} = (Y_{S/X}^x * \mu + \alpha^S) * \varphi_{O_2} \quad \text{Eq.13}$$

$$q_S^{cons} = m^S * \frac{S}{k_S+S} * \frac{G}{k_g+G} \quad \text{Eq.14}$$

The succinate mass balance thus yields:

$$\frac{1}{X} \frac{dS}{dt} = (Y_{S/X}^x * \mu + \alpha^S) * \varphi_{O_2} * \varphi_G^S(G) - \left( m^S * \frac{S}{k_S+S} * \frac{G}{k_g+G} \right) \quad \text{Eq. 15}$$

In which  $\varphi_G^S(G)$  is a logistic function defined as:

$$\varphi_G^S(G) = \left( \frac{1}{1 + \exp(a_{G^*} * (G^* - G))} \right) \quad \text{Eq. 16}$$

$$\begin{cases} \varphi_G^S(G) = 1 & \text{if } G > G^* \\ \varphi_G^S(G) = 0 & \text{if } G \leq G^* \end{cases}$$

The succinate uptake term ( $q_S^{cons}$ ) followed a Monod-type model, considering glucose and succinate as co-energetic substrate. We supposed that the succinate saturation coefficient  $k_S$  was the same as glucose ( $k_G = k_S$ ).

### 2.3.1.3. Lactate and acetate production/consumption model

In case of glucose deficiency, *C. glutamicum* consumed the lactate and acetate previously produced. It was shown that for  $k_{LA}$  values lower than  $77 \text{ h}^{-1}$ , lactate and acetate were used as energy source whereas above  $90 \text{ h}^{-1}$ , these products were consumed as energy and carbon source.

The consumption/production equation for lactate was thus built on three contributions: a Luedeking-Piret model to describe the production rate (Eq. 17), a maintenance model (Eq. 18) to describe the consumption as energy source and a Monod-derived model (Eq. 19) for the consumption as energy and carbon source.

$$q_L^{prod} = (Y_{L/X}^X * \mu + \alpha^l) * \varphi_{O_2} \quad \text{Eq. 17}$$

$$q_L^{cons1} = \left( m^L * \frac{L}{k_L+L} \right) \quad \text{Eq. 18}$$

$$q_L^{cons2} = \frac{1}{Y_{X/L}^x} * \mu * (1 - \varphi_{O_2}) \quad \text{Eq. 19}$$

For the consumption term as carbon source, limiting oxygen effect on growth was also depicted by a modified Levenspiel equation ( $1 - \varphi_{O_2}$ ). As indicated above, the same logistic function  $\varphi_G(G)$  was used to consider the glucose limitation.

The lactate mass balance equation is:

$$\frac{1}{X} \frac{dL}{dt} = (Y_{L/X}^X * \mu + \alpha^l) * \varphi_{O_2} * (1 - \varphi_G(G)) - \left( m^L * \frac{L}{k_L + L} \right) - \frac{1}{Y_{X/L}^X} * \mu * (1 - \varphi_{O_2}) * \varphi_G(G)$$

Eq. 20

As lactate, the kinetic model of acetate (Eq. 21) was described by three terms: production, consumption as energy source or, energy and carbon source:

$$\frac{1}{X} \frac{dA}{dt} = (Y_{A/X}^X * \mu + \alpha^A) * \varphi_{O_2} * (1 - \varphi_G(G)) - \left( m^A * \frac{A}{k_A + A} \right) - \frac{1}{Y_{X/A}^X} * \mu * (1 - \varphi_{O_2}) *$$

$\varphi_G(G)$  Eq.21

#### 2.3.1.4. Glucose consumption

In this study, the glucose was used as the main carbon and energy source. It was metabolized to synthesize biomass, organic acids and for cell maintenance ( $\varphi_G(G) = 0$ ). As indicated above, a transitory organic acid production was observed according to the residual glucose concentration. When all the glucose was consumed ( $\varphi_G(G) = 1$ ), the lactate and acetate production was stopped. However, the stop of the succinate production was concomitant with a threshold glucose concentration of about 9 g L<sup>-1</sup> ( $\varphi_G^S(G) = 0$ ).

The specific glucose consumption rate was then modeled by the following equation (Eq. 22):

$$\frac{1}{X} \frac{dG}{dt} = - \left( \frac{1}{Y_{X/G}^X} * \mu + \frac{1}{Y_{L/G}^X} * q_L + \frac{1}{Y_{A/G}^X} * q_A + m^G \right) * (1 - \varphi_G(G)) - \frac{1}{Y_{S/G}^X} * q_S * \varphi_G^S(G)$$

Eq. 22

To have a generic model, the differential equations developed for the growth rate (Eq. 12) and the organic acids (Eq. 15, Eq. 20, Eq.21) were incorporated in a single model to describe the glucose consumption rate (Eq. 22). Therefore, the logistic functions ( $\varphi_G(G)$  and  $\varphi_G^S(G)$ ) were added to consider only the organic acid production phase.

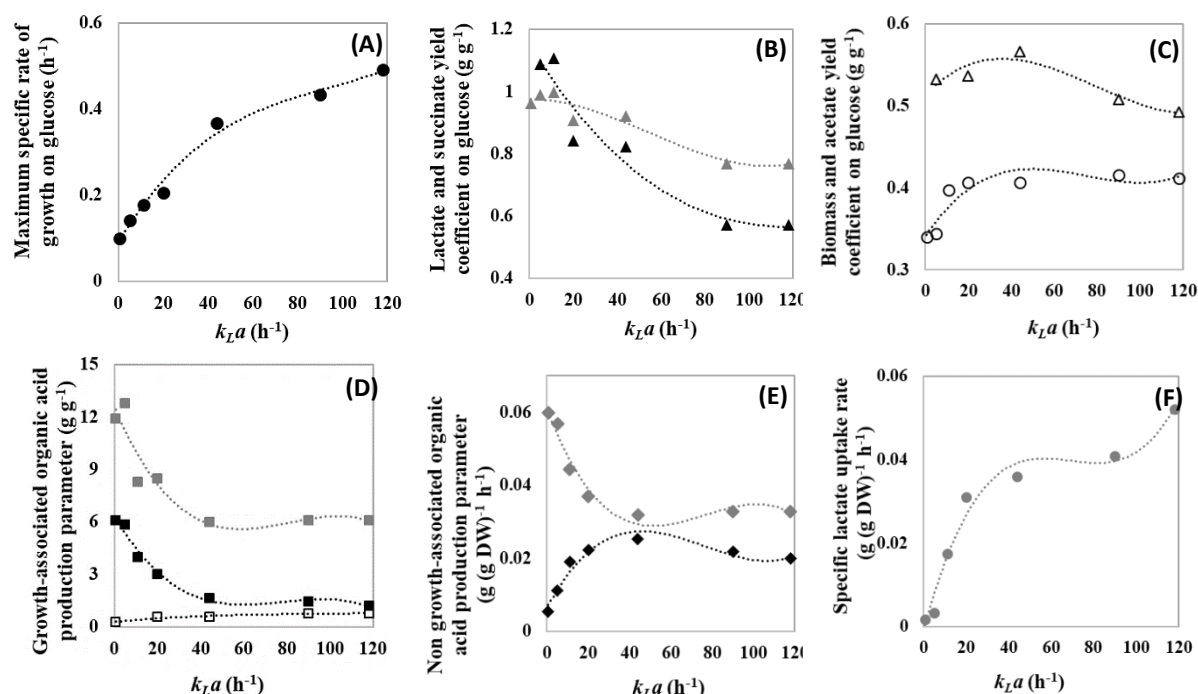
#### 2.3.2. Identification of model parameters

The proposed primary model, involving (Eq. 12, 15, 20, 21 and 22), contained 23 numerical and kinetic parameters. The maximal biomass concentration ( $X_{max}$ ) was set at the experimental maximal biomass concentration. The DGA algorithm was used to estimate these parameters,

using an optimization criterion J (Eq. 5). A preliminary sensitivity analysis (data not shown) was performed in order to identify the sensitivity and the variation impact of each parameter on the model prediction. It showed that numerical parameters ( $n$ ,  $G^*$ ,  $a_{G^*}$  and  $a_{G0}$ ) were insensitive for the different culture conditions. The values of these insensitive parameters are presented in Tableau IV.2. So, for the rest of study, the values of these parameters were set and only the remaining 18 kinetic parameters were identified. The optimal values and numerical standard deviations of the kinetics parameters estimated for each culture condition are reported in Table S1 (Annexe 7). Figure IV.2 presents the evolution of some kinetic parameters (variable parameters) with respect to  $k_{La}$  values.

**Tableau IV.2 :** Constant numerical parameters

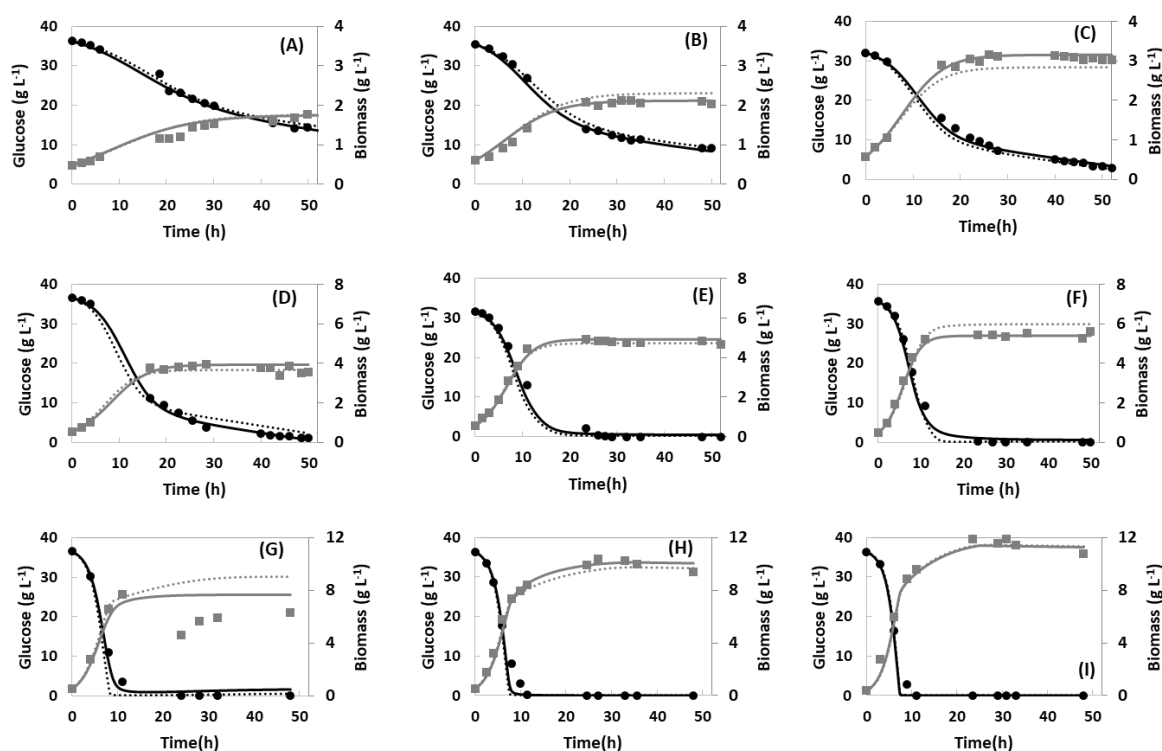
	<i>C. glutamicum</i> 2262	<i>C. glutamicum</i> 2262 $\Delta$ ldhA
<b>n</b>	1.329 (0.263)	1.240 (0.176)
<b>G*</b>	9.105 (0.088)	9.155 (0.173)
<b>a<sub>G*</sub></b>	0.750 (0.014)	0.738 (0.032)
<b>a<sub>G0</sub></b>	2.213	2.331 (0.585)



**Figure IV.2 :** Evolution of some kinetic parameters of the primary model: (A)  $\mu_{max}^G$  ( $\bullet$ ), (B)  $Y_{L/G}^X$  ( $\blacktriangle$ ) et  $Y_{S/G}^X$  ( $\blacktriangle$ ), (C)  $Y_{X/G}^X$  ( $\circ$ ) et  $Y_{A/G}^X$  ( $\Delta$ ), (D)  $Y_{L/X}^X$  ( $\blacksquare$ ),  $\mu_{A/X}^X$  ( $\square$ ) et  $Y_{S/X}^X$  ( $\blacksquare$ ), (E)  $\alpha^A$  ( $\blacklozenge$ ) et  $\alpha^L$  ( $\blacklozenge$ ) et (F)  $m^L$  ( $\bullet$ ), as a function of  $k_{La}$  value

The simulation resulting from the optimal parameters of the primary proposed model were compared to the corresponding experimental data for each culture condition, with increasing  $k_{LA}$  values ranging from 0.6 to 118 h<sup>-1</sup> (figures IV.3, IV.4 and IV.5). To evaluate the accuracy of the proposed model, a linear regression was established between the simulated and experimental data and thus a coefficient determination ( $R^2$ ) was calculated for each  $k_{LA}$  condition (Tableau IV.5).

### Biomass concentration prediction



**Figure IV.3 :** Time profiles of biomass (■) and glucose (●) concentrations during cultures in un baffled shake flasks of *C. glutamicum* 2262 performed at different  $k_{LA}$  values : (A) 0.6 h<sup>-1</sup>, (B) 5 h<sup>-1</sup>, (C) 11 h<sup>-1</sup>, (D) 20 h<sup>-1</sup>, (E) 31 h<sup>-1</sup>, (F) 44 h<sup>-1</sup>, (G) 77 h<sup>-1</sup>, (H) 90 h<sup>-1</sup>, and (I) 118 h<sup>-1</sup>. Experimental data (symbols) and simulated data by primary (solid line) and generalized (dashed line) model were plotted on each figure.

Figure IV.3 shows that the predicted biomass are in total accordance with the corresponding experimental profiles for any  $k_{LA}$  value ranging between 0.6 and 118 h<sup>-1</sup>. The  $R^2$ , calculated for the growth model under different  $k_{LA}$  conditions, were higher than 0.95, except for 77 h<sup>-1</sup> where the  $R^2$  was about 0.821, due probably to the imprecised experimental data (Tableau IV.5).

As the model perfectly fitted the experimental data, the variations of the parameters with respect to  $k_{LA}$  introduced a new sight of the behavior of *C. glutamicum*. The simulation results showed that the specific growth rate was strongly impacted by the lowest  $k_{LA}$  values whereas it was less impacted for  $k_{LA}$  values higher than 44 h<sup>-1</sup>. The maximal specific growth rate varied between



0.1 and 0.37 h<sup>-1</sup> for  $k_{LA}$  values between 0.6 and 44 h<sup>-1</sup> and it increased until 0.49 h<sup>-1</sup> for 118 h<sup>-1</sup> (Figure IV.2.A). These results confirmed the impact of the oxygenation level on the growth rate (Eq.12). As previously described, for  $k_{LA}$  values higher than 90 h<sup>-1</sup>, when glucose was exhausted, the lactate and acetate previously produced were consumed as energy and carbon source (Briki et al., 2020). The simulation results confirmed this observation since a weak growth was observed despite the glucose deficiency. The estimated maximal specific growth rate, on lactate and acetate, were 0.08 and 0.11 h<sup>-1</sup>, at  $k_{LA}$  values of 90 and 118 h<sup>-1</sup>, respectively, with a constant biomass yield coefficient on lactate ( $Y_{X/L}^X$ ) and acetate ( $Y_{X/A}^X$ ) of about 0.23 and 0.94 g DW g<sup>-1</sup>, respectively (Table S1, Annexe 7).

Regarding the kinetic modeling for *C. glutamicum* growth in the literature, models were often based on Monod model or Levenspiel model. A modified Monod model was used to describe the inhibition of *C. glutamicum* growth by L-glutamic acid (Khan et al., 2005). Shen et al. (2015) used a modified Levenspiel model (logistic function) to describe the growth of this bacterium during bioflocculant synthesis. They considered not only the effect of the maximal biomass concentration (biomass self-inhibition) but also, the influence of the initial glucose concentration on the growth of *C. glutamicum* CCTCC201005. We combined the Levenspiel model with a Monod model and logistic function. Interestingly, our model is able to predict the time profile of biomass concentration under different  $k_{LA}$  conditions, and seems to perfectly describe the effect of the oxygen limitation and the residual glucose concentration on the growth rate of *C. glutamicum* 2262.

#### Glucose concentration and maintenance prediction

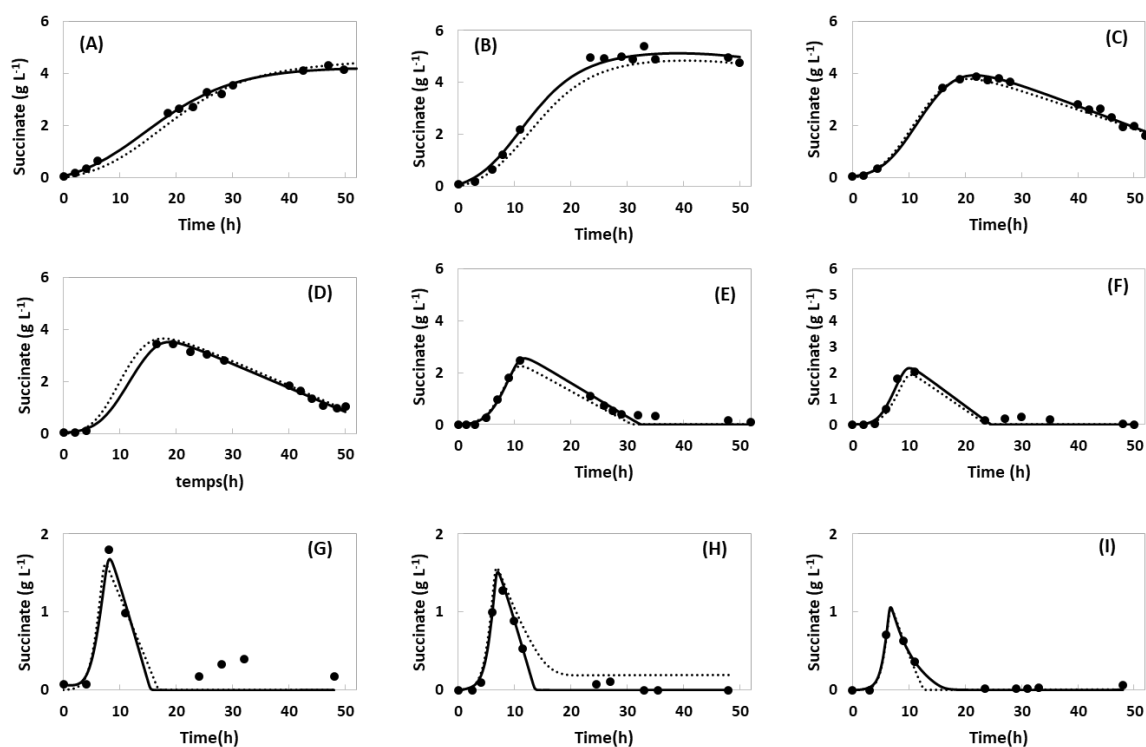
In this study, the glucose consumption was estimated by affecting the different organic acid production or growth terms by the glucose to organic acids or biomass conversion yield. In all cultures, the initial glucose concentration was about 35 g L<sup>-1</sup>. The simulation results showed an excellent agreement between the simulated and experimental data (Figure IV.3), with R<sup>2</sup> higher than 0.99 for most of the  $k_{LA}$  conditions (Tableau IV.5). As shown by Table S1 (Annexe 7) and Figures IV.2.B and C, the glucose to organic acids or to biomass conversion yields were weakly impacted by the oxygenation level. The maximal glucose to biomass conversion yield ( $Y_{X/G}^X$ ) varied from 0.34 to 0.42 g DW g<sup>-1</sup>. Similar effect of the oxygenation level, related to OTR<sub>max</sub>, on *C. glutamicum* DM1933 growth was previously observed (Käß et al., 2014). The calculated values of the substrate to biomass conversion yield were close to those estimated using our model. It was demonstrated that, for *C. glutamicum* DM1933, the growth rate was not impacted

by oxygenation for  $OTR_{max}$  higher than  $15 \text{ mM h}^{-1}$  (corresponding to a  $k_{LA}$  value of about  $64 \text{ h}^{-1}$ ).

As mentioned above, the glucose was used not only as carbon source but also for energy requirement. The specific glucose consumption rate as maintenance term,  $m^G$ , was lower, about  $0.008 \text{ g (g DW)}^{-1} \text{ h}^{-1}$  for  $k_{LA}$  ranging from  $0.6$  to  $44 \text{ h}^{-1}$ , than for  $k_{LA}$  values between  $90$  and  $118 \text{ h}^{-1}$ . In these conditions, the highest  $m^G$  ( $0.061 \text{ g (g DW)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) was reached. This value was lower than that found by Shen et al. (2015) ( $m^G = 0.0835$ ), during fermentation process of bioflocculant with *C. glutamicum* CCTCC201005. Though at the same order of magnitude, the difference might be due to the oxygenation level or the unavailability of other energy sources.

In addition to growth, under deprived oxygen conditions, *C. glutamicum* produced lactate, succinate and acetate. A production/consumption equation was developed for each of these organic acid.

#### Succinate concentration prediction

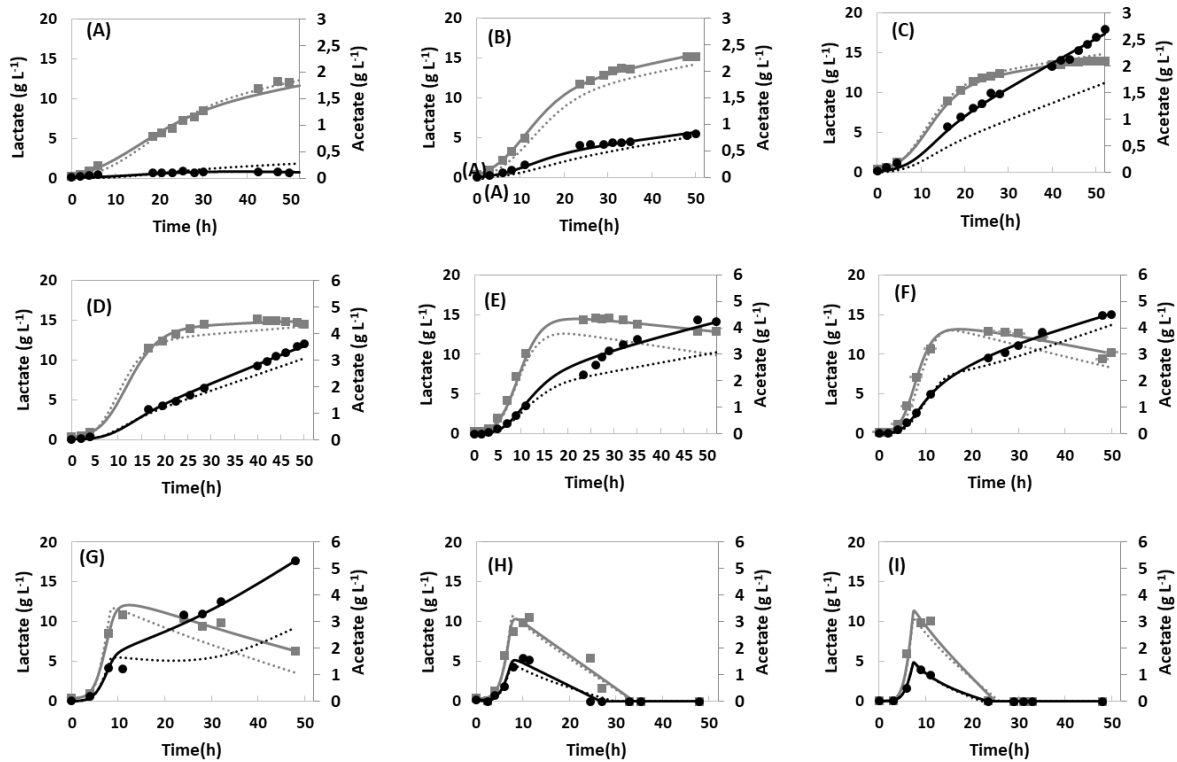


**Figure IV.4** : Time profiles of succinate concentration (●) during cultures in un baffled shake flasks of *C. glutamicum* 2262 performed at different  $k_{LA}$  values: (A)  $0.6 \text{ h}^{-1}$ , (B)  $5 \text{ h}^{-1}$ , (C)  $11 \text{ h}^{-1}$ , (D)  $20 \text{ h}^{-1}$ , (E)  $31 \text{ h}^{-1}$ , (F)  $44 \text{ h}^{-1}$ , (G)  $77 \text{ h}^{-1}$ , (H)  $90 \text{ h}^{-1}$ , and (I)  $118 \text{ h}^{-1}$ . Experimental data (symbols) and simulated data by primary (solid line) and generalized (dashed line) model were plotted on each figure.

For the different culture conditions, the primary model correctly simulated the time profiles of succinate concentrations (Figure IV.4). These results were confirmed by determination

coefficient which were higher than 0.95 for the different  $k_{LA}$  values, except for  $77 \text{ h}^{-1}$  (0.89) (Tableau IV.5). Interestingly, this model is able to predict the behavior of *C. glutamicum* by changing the succinate production/consumption kinetic according to the  $k_{LA}$  value and the residual glucose concentration. In addition to the comparison between the experimental and simulated data, the variation of the kinetic parameters as function of the  $k_{LA}$  value was studied, allowing to characterize and to quantify the effect of the two factors on the behavior of *C. glutamicum*. It was proved that the succinate consumption started from a threshold glucose concentration of about  $9 \text{ g L}^{-1}$  (Briki et al., 2020). Interestingly, the same threshold ( $9.105 \text{ g L}^{-1}$ , Tableau IV.2) was identified with the primary model proposed for *C. glutamicum* 2262. It is noteworthy that the specific succinate consumption rate ( $m^S$ ) was constant, about  $0.026 \text{ g (gDW)}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (Table S1, Annexe 7) and independent of the oxygenation level. This specific rate could be representative of the energy needs, provided by the succinate, for the maintenance of *C. glutamicum* (Bott and Niebisch, 2003). As expected, the succinate yield from biomass was negatively affected by the oxygenation level. The maximal yield ( $6.09 \text{ g (gDW)}^{-1}$ ) was obtained at the low  $k_{LA}$  value of  $5 \text{ h}^{-1}$  (Table S1, Annexe 7, and Figure IV.2.B). When increasing the  $k_{LA}$  value, this yield decreased and reached a plateau. Similarly, the glucose to succinate maximal conversion yields ( $1.1 \text{ g g}^{-1}$ ) corresponded to the  $k_{LA}$  values of 5 and  $11 \text{ h}^{-1}$  (Table S1, Annexe 7, and Figure IV.2.B). This value is close to the maximal theoretical yield (Tableau IV.1). Simulations showed also, that *C. glutamicum* is able to produce the succinate without significant growth. The specific succinate production rate, non-associated to growth, ( $\alpha^S$ ) was maximal ( $0.031 \text{ g (g DW)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) for the lowest  $k_{LA}$  values ( $0.6$  and  $5 \text{ h}^{-1}$ ), corresponding to the optimal condition for the production of this organic acid, whereas a lower rate was obtained for  $k_{LA}$  higher than  $11 \text{ h}^{-1}$  (Table S1, Annexe 7). These kinetic parameters associated to the succinate production/consumption equation, described and thus confirmed the influence of both the oxygenation level and the glucose availability, especially the threshold glucose concentration, on the succinate production

## Lactate and acetate concentration prediction



**Figure IV.5 :** Time profiles of lactate (■) and acetate (●) concentrations during cultures in unbaffled shake flasks of *C. glutamicum* 2262 performed at different  $k_{LA}$  values: (A)  $0.6 \text{ h}^{-1}$ , (B)  $5 \text{ h}^{-1}$ , (C)  $11 \text{ h}^{-1}$ , (D)  $20 \text{ h}^{-1}$ , (E)  $31 \text{ h}^{-1}$ , (F)  $44 \text{ h}^{-1}$ , (G)  $77 \text{ h}^{-1}$ , (H)  $90 \text{ h}^{-1}$ , and (I)  $118 \text{ h}^{-1}$ . Experimental data (symbols) and simulated data by primary (solid line) and generalized (dashed line) model were plotted on each figure.

Similarly, the model predicted well the profiles of lactate and acetate concentration during cultures performed at different  $k_{LA}$  conditions (Figure IV.5), for both production and consumption steps, with  $R^2$  higher than 0.93, except for acetate at a  $k_{LA}$  of  $0.6 \text{ h}^{-1}$  ( $R^2=0.8$ ) (table IV.5). The lactate was produced mainly at the lowest  $k_{LA}$  values. The substrate to lactate maximal conversion yields ( $1 \text{ g g}^{-1}$ ) was reached to the  $k_{LA}$  values of  $5$  and  $11 \text{ h}^{-1}$  (Table S1, annexe 7, and Figure IV.2.B) which corresponded to the maximal theoretical yield (Tableau IV.1). As shown in Table S1 (Annexe 7) and Figure IV.2.D, the maximal lactate yield from biomass ( $12.80 \text{ g (g DW)}^{-1}$ ) was obtained at a  $k_{LA}$  value of  $5 \text{ h}^{-1}$ .

These parameters proved also, the ability of *C. glutamicum* to produce lactate during the stationary phase with a maximal specific production rate (non-associated to growth,  $\alpha^L$ ), of about  $0.06 \text{ g (g DW)}^{-1} \text{ h}^{-1}$  at  $k_{LA}$  value of  $0.6 \text{ h}^{-1}$  and  $5 \text{ h}^{-1}$  (Table S1, Annexe 7, and Figure IV.2.E). This value was higher than the one associated to succinate production ( $\alpha^S = 0.026 \text{ g (g DW)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). The difference between the two parameters ( $\alpha^L$  and  $\alpha^S$ ) was expected because lactate

was the main product of *C. glutamicum* 2262 under deprived-oxygen conditions. For the  $k_{LA}$  values of 0.6 and 5 h<sup>-1</sup>, the specific lactate consumption rate ( $m^L$ ) was seemingly neglected. Indeed, the different lactate parameters ( $\alpha^L$ ,  $Y_{L/X}^X$ ,  $m^L$ ) were strongly impacted by the lowest  $k_{LA}$  values (between 0.6 and 44 h<sup>-1</sup>). Above 44 h<sup>-1</sup>, these parameters reached a plateau. Under these last conditions, the specific lactate consumption rate ( $m^L$ ) was maximal whereas the specific lactate production rate (non-associated to growth,  $\alpha^L$ ) was minimal (Table S1, annexe 7, and Figure IV.2.E and F).

In contrast to lactate and succinate, the main amount of acetate was produced during the stationary growth phase. The specific production rate, non-associated to growth, ( $\alpha^A$ ) increased rapidly from 0.005 to 0.019 g g<sup>-1</sup>DW h<sup>-1</sup> for  $k_{LA}$  values from 0.6 to 11 h<sup>-1</sup>. Above 20 h<sup>-1</sup>, this rate reached a plateau, with a maximum of 0.025 g g<sup>-1</sup>DW h<sup>-1</sup> (Table S1, annexe 7, and Figure IV.2.E). The acetate yield from biomass ( $Y_{A/X}^X$ ) was less impacted by the oxygenation level. It varied between 0.56 and 0.92 for  $k_{LA}$  value between 5 and 118 h<sup>-1</sup> (Table S1, annexe 7, Figure IV.2.D). It is noteworthy that the acetate concentration, during the exponential growth phase, was significantly lower than the lactate and succinate concentrations under the different  $k_{LA}$  conditions. This can explain, on the one hand, the significant difference between the growth-associated acetate and lactate/succinate production parameters ( $Y_{L/X}^X$ ,  $Y_{S/X}^X$  and  $Y_{A/X}^X$ ) and, on the other hand, the low sensitivity of the parameters associated to acetate production/consumption ( $Y_{A/X}^X$ ,  $\alpha^A$ ) and thus the slight variation of these parameters. As succinate, the specific consumption rate of acetate was constant ( $m^A = 0.005$  g (g DW)<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>). As previously mentioned, for the highest  $k_{LA}$  values, 90 and 118 h<sup>-1</sup>, lactate and acetate were consumed as carbon and energy source, with a constant conversion yield on biomass of 0.229 g DW g<sup>-1</sup> lactate and 0.939 g DW g<sup>-1</sup> acetate. As previously for growth and succinate production/consumption, the proposed lactate and acetate production/consumption equations are able to describe the experimental phenomenon and confirmed the effect of the oxygenation level and the simultaneous consumption of lactate and of acetate when glucose was exhausted (Eq. 20 and 21).

### Model analysis

Very good agreement was found between experimental and predicted results. It is noteworthy that the developed model was able to simulate growth, lactate, succinate and acetate production, as well as glucose consumption for a large range of culture conditions (Figures IV.3, 4 and 5). This model is thus able to describe the effect of the oxygenation level and the availability of glucose on the behavior of *C. glutamicum*. In this first part of the study, the developed model provided 19 kinetic parameters, which were assumed to be close to “real” physiological parameters in contrast to other studies which referred to “apparent” values of kinetic parameters. As a consequence, systematic comparison of our parameters with values from literature was not feasible for the most of the kinetic parameters. Moreover, to date, there was no model describing the organic acid production and consumption by *C. glutamicum* in the literature. Therefore, in order to evaluate the reliability of the proposed model and its kinetic and numerical parameters, a statistical analysis (standard deviation and coefficient determination) was achieved. An estimated standard deviation was calculated for each parameter using the different values of this parameter obtained with the optimal population (2500 values). They are presented for each  $k_{LA}$  condition in Table S1 (Annexe 7). Most of these statistical parameter values were between  $10^{-5}$  and  $10^{-7}$ , which was still lower than the imposed value (the accuracy of solution, about  $10^{-3}$ ). In addition, an analysis of the structure of the model was performed (data not shown). It showed that each term contributing to production or consumption in the proposed equations had a significant value during, at least, one period of the culture. The results confirmed the relevance of the model structure as well as the significance of each contribution.

#### 2.3.3. Model generalization: using a secondary model for estimated parameters

The dependence of the optimized kinetic parameters was therefore fitted as a secondary model. A cubic polynomial relation between the estimated parameters and the  $k_{LA}$  value was used. The polynomial coefficients and the corresponding determination coefficient are reported in Tableau IV.3.

**Tableau IV.3 :** The coefficients of polynomial relationships between the kinetic parameters used in the primary model and the  $k_{La}$  value.  $R^2$  corresponded to the determination coefficient.

	$k_{La}^3$	$k_{La}^2$	$k_{La}^1$	$k_{La}^0$	$R^2$
$X^*_{max}$	$-2.45 \cdot 10^{-6}$	$2.91 \cdot 10^{-4}$	$8.54 \cdot 10^{-2}$	1.87	0.993
$\mu^G_{max}$	$2.748 \cdot 10^{-7}$	$-7.662 \cdot 10^{-5}$	$8.584 \cdot 10^{-3}$	$9.172 \cdot 10^{-2}$	0.988
$Y^X_{L/X}$	$-1.617 \cdot 10^{-5}$	$3.937 \cdot 10^{-3}$	$-2.949 \cdot 10^{-1}$	$1.261 \cdot 10^{+1}$	0.893
$Y^X_{A/X}$	$3.421 \cdot 10^{-7}$	$-1.02 \cdot 10^{-4}$	$1.14 \cdot 10^{-2}$	$2.925 \cdot 10^{-1}$	0.936
$Y^X_{S/X}$	$-1.230 \cdot 10^{-5}$	$2.893 \cdot 10^{-3}$	$-2.143 \cdot 10^{-1}$	6.369	0.982
$Y^X_{X/G}$	$2.634 \cdot 10^{-7}$	$-5.931 \cdot 10^{-5}$	$3.955 \cdot 10^{-3}$	$3.406 \cdot 10^{-1}$	0.843
$Y^X_{L/G}$	$3.499 \cdot 10^{-7}$	$-5.727 \cdot 10^{-5}$	$1.192 \cdot 10^{-4}$	$9.756 \cdot 10^{-1}$	0.924
$Y^X_{A/G}$	$2.015 \cdot 10^{-7}$	$-4.8 \cdot 10^{-5}$	$2.666 \cdot 10^{-3}$	$5.140 \cdot 10^{-1}$	0.889
$Y^X_{S/G}$	$-1.209 \cdot 10^{-7}$	$7.018 \cdot 10^{-5}$	$-1.158 \cdot 10^{-2}$	1.153	0.928
$\alpha^L$	$-9.537 \cdot 10^{-8}$	$2.188 \cdot 10^{-5}$	$-1.494 \cdot 10^{-3}$	$6.087 \cdot 10^{-2}$	0.967
$\alpha^A$	$7.220 \cdot 10^{-8}$	$-1.652 \cdot 10^{-5}$	$1.061 \cdot 10^{-3}$	$6.547 \cdot 10^{-3}$	0.943
$m^L$	$1.357 \cdot 10^{-7}$	$-2.818 \cdot 10^{-5}$	$1.888 \cdot 10^{-3}$	$-9.262 \cdot 10^{-4}$	0.976

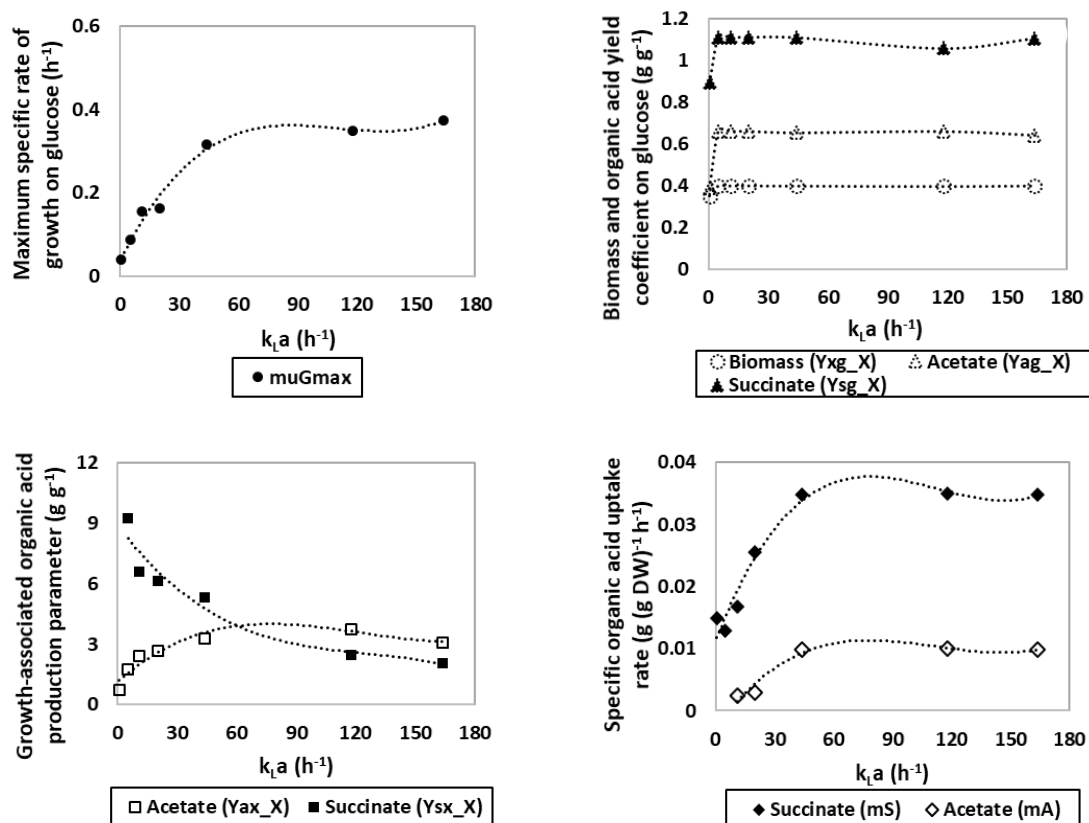
$X^*_{max}$  : experimental data

Except for  $Y^X_{X/G}$ , the determination coefficients were all higher than 0.88 and higher than 0.92 for most of kinetic parameters. In order to assess the degradation of model prediction capability when this secondary model was introduced in the primary kinetic model, the concentration profiles were simulated and compared to experimental data. The biomass, glucose and organic acids concentrations simulated by this generalized model, are presented with dashed lines on Figures IV.3, 4 and 5. The modeled concentrations are still in excellent agreement with experiment results, with a  $R^2$  higher than 0.97 for most of the culture conditions for the different culture variables (Tableau IV.5). However, for some cultures (with  $k_{La}$  value of 11, 31, 44 and  $77 \text{ h}^{-1}$ ), discrepancies between the experimental and simulated data for acetate production were observed. Due to the low acetate concentration in these cultures, it was difficult to assess if this discrepancy is significant.

#### 2.3.4. Transposition of the primary model on a mutant strain of *C. glutamicum*

In order to check the reliability of the developed model, a similar structure was used to predict the growth and organic acids production by a mutant strain of *C. glutamicum* 2262. In this study, we used the experimental data from Kaboré et al. (2015), using *C. glutamicum* 2262 $\Delta ldhA$ . The model was therefore adapted by eliminating the differential equation of the specific lactate production rate ( $q_L$ ) and the conversion yield of glucose in lactate ( $Y^X_{L/G}$ ). As

for the wild type strain, the remaining 17 kinetic parameters were first identified using the DGA algorithm. A preliminary simulation showed that the numerical parameters ( $n$ ,  $G^*$ ,  $a_{G^*}$ ,  $a_{G0}$ ) were also constant (Table IV.2). The values of these numerical parameters suggested that the oxygenation level and the availability of glucose could have a similar effect on the 2 strains of *C. glutamicum*. Among these invariable parameters, the threshold glucose concentration ( $G^*$ ) was identified at  $9.155 \text{ g L}^{-1}$ . Interestingly, the same threshold glucose value, similar to the experimental one, was obtained with the models proposed to the two studied strains. The optimized parameters were used to predict the time profiles of concentrations of biomass, glucose and organic acids. Then, as for the wild type strain, a cubic polynomial was used to depict the dependence of kinetic parameters on  $k_{LA}$  values. The predictions of the mutant strain model were then compared with the experimental data. Concentrations profiles are presented by Figures S1, S2 and S3 (Annexes 9, 10 and 11) and the optimized kinetic parameters are presented in Table S2 (Annexe 8), and Figure IV.6. Predicted results once again showed a very good agreement with experimental ones and  $R^2$  was calculated to be higher than 0.9 for most of the  $k_{LA}$  conditions (Tableau IV.5).



**Figure IV.6 :** Evolution of some kinetic parameters of primary model for growth, glucose consumption and organic acids production/consumption by *C. glutamicum* 2262 $\Delta$ ldhA, as a function of  $k_{LA}$  values.



The simulation results showed that the developed model is able to predict the effect of the oxygenation level and the availability of glucose on the bacterial growth. A strong impact on the specific maximal growth rate (between 0.039 and 0.317 h<sup>-1</sup>) was observed for the  $k_{LA}$  values from 0.6 to 44 h<sup>-1</sup>. When increasing the  $k_{LA}$  value, a lower impact was observed (Table S2, Annexe 8, Figure IV.6). The same effect of the oxygenation level was observed as with *C. glutamicum* 2262. However, the value of this estimated parameter was slightly lower than that obtained with *C. glutamicum* 2262. It is may be due to the lack of lactate synthesis in *C. glutamicum* 2262 $\Delta$ ldhA. Once again, most of estimated kinetic parameters of the proposed production/consumption equations for succinate and acetate (Eq. 15 and 21) were influenced by the oxygenation level, namely by the  $k_{LA}$  value. As showed by Figure IV.6 and table S2 (Annexe 8), the growth-associated succinate and acetate production parameters depend on the  $k_{LA}$  value. As estimated with the wild type strain, the maximal growth-associated succinate ( $Y_{S/X}^X = 9.245 \text{ g (g DW)}^{-1}$ ) and acetate ( $Y_{A/X}^X = 3.299 \text{ g (g DW)}^{-1}$ ) production parameters were obtained at  $k_{LA}$  value of 5 h<sup>-1</sup> and higher than 44 h<sup>-1</sup>, respectively. For *C. glutamicum* 2262 $\Delta$ ldhA, the value of  $Y_{S/X}^X$  was 1.5 to 2 folds higher than those obtained by the wild type strain, whereas the  $Y_{A/X}^X$  was 3 to 6 folds higher. It is noteworthy that the lactate production by the wild type strain was probably replaced by the acetate or succinate synthesis. This could explain the difference of these parameter values between the two strains. As shown above, *C. glutamicum* kept producing organic acid without growth. In the light of the estimated kinetic parameters, the same phenomenon was observed with the mutant strain (Table S2, Annexe 8). The non-growth associated succinate and acetate production parameters ( $\alpha^S$  and  $\alpha^A$ ) were maximal at  $k_{LA}$  values of 0.6 and between 11 and 20 h<sup>-1</sup>, respectively. For  $k_{LA}$  values higher than 11 h<sup>-1</sup>, the  $\alpha_S$  reached a plateau to 0.009 g (g DW)<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. The optimal value of  $\alpha^A$  (between 0.2 and 0.23 g (g DW)<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) was obtained for  $k_{LA}$  values between 11 and 33 (the value at 33 h<sup>-1</sup>, not shown). As shown by Kaboré et al., (2015), the optimal acetate production corresponded to  $k_{LA}$  values between 19 and 33 h<sup>-1</sup>. The evolution of these parameters ( $Y_{S/X}^X$ ,  $Y_{A/X}^X$ ,  $\alpha^S$  and  $\alpha^A$ ), according to the  $k_{LA}$  value, confirmed the preferential organic acid production according the oxygenation conditions, described by Kaboré et al. (2015).

The proposed model is able to predict the consumption of organic acids as energy sources, under deprived oxygen conditions. The succinate and acetate consumption terms were represented by  $m^S$  and  $m^A$ . In contrast to the wild type strain, in the mutant strain modeln these two parameters were influenced by the  $k_{LA}$  value. When increasing the  $k_{LA}$  value,  $m^S$  and  $m^A$  increased and a maximum was reached at  $k_{LA}$  of 44 h<sup>-1</sup> ( $m^S = 0.35 \text{ g (g DW)}^{-1} \text{ h}^{-1}$  and  $m^A = 0.01$

g (g DW)<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>). The glucose consumption rate for maintenance, as energy source, was optimal (0.41 g (g DW)<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) at the lowest  $k_{LA}$  value (0.6 h<sup>-1</sup>). Then, for the mutant strain, organic acids, in particular succinate, were the main energy sources for  $k_{LA}$  values higher than 0.6 h<sup>-1</sup> whereas it was glucose at 0.6 h<sup>-1</sup>. Moreover, for  $k_{LA}$  from 77 h<sup>-1</sup>,  $\mu_{max}^A$  and  $Y_{X/A}^X$  confirmed that acetate was consumed as energy and carbon source, when the glucose was depleted. The maximal specific growth rate of *C. glutamicum* 2262 $\Delta$ ldhA on acetate was between 0.123 and 0.145 h<sup>-1</sup>, with a biomass coefficient yield on acetate ( $Y_{X/A}^X$ ) of 0.3 and 0.48 g (g DW)<sup>-1</sup>, for  $k_{LA}$  values between 118 and 164 h<sup>-1</sup>, respectively (Table S2, Annexe 8).

For all the culture conditions with the mutant strain, the glucose was used as the sole carbon source at the beginning of the culture, with the same initial concentration. As shown Figure IV.6, the conversion yields to biomass ( $Y_{X/G}^X$ ), succinate ( $Y_{S/G}^X$ ) and acetate ( $Y_{A/G}^X$ ) were maximal and independent on the  $k_{LA}$  value, namely 0.4, 1.1 and 0.6 g g<sup>-1</sup> of glucose, respectively (Table S2, Annexe 8). On the contrary, these yields were maximal, in the case of *C. glutamicum* 2262, only for the lowest  $k_{LA}$  values. This difference could be due to the increased production of succinate and acetate in *C. glutamicum* 2262 $\Delta$ ldhA due to the lack of lactate synthesis.

The primary model applied to the mutant strain appeared to be able to predict the concentration profiles measured during *C. glutamicum* 2262 $\Delta$  cultures. These results confirmed the proposed hypothesis and, thus, the effect of the oxygenation level and the residual glucose concentration on the comportment of *C. glutamicum* 2262 $\Delta$ ldhA.

**Tableau IV.4 :** Coefficients of polynomial relationship between the kinetic parameters of *C. glutamicum* 2262 $\Delta$ ldhA and the  $k_{LA}$  value and corresponding determination coefficient R<sup>2</sup>.

	$k_{LA}^3$	$k_{LA}^2$	$k_{LA}^1$	$k_{LA}^0$	R <sup>2</sup>
$X_{max}$	-1.27E-06	-1.00E-04	1.15E-01	1.39	0.997
$Y_{A/X}^X$	2.230E-06	-8.258E-04	8.756E-02	1.143E+00	0.921
$Y_{S/X}^X$	-2.492E-06	9.503E-04	-1.307E-01	8.884E+00	0.930
$\mu_{max}^G$	2.741E-07	-9.054E-05	9.525E-03	3.759E-02	0.984
$m^A$	1.283E-08	-4.318E-06	4.402E-04	-2.801E-03	0.952
$m^S$	2.379E-08	-8.041E-06	8.217E-04	1.124E-02	0.961

As for the wild type strain of *C. glutamicum*, a relationship between the estimated parameters for *C. glutamicum* 2262 $\Delta$ ldhA model and the  $k_{LA}$  values was described by a cubic polynomial. The polynomial coefficients are reported in Tableau IV.4. The determination coefficients (R<sup>2</sup>)

for the correlation between the estimated parameters and the  $k_{La}$  value, were all higher than 0.92 (Tableau IV.5). The secondary model was then embedded in the primary model. The resulting predictions were also in excellent agreement with both the predicted data using the primary model and with the raw experimental data, leading to  $R^2$  higher than 0.89 for the most cases, except with acetate concentration (Tableau IV.5).

In the light of these results, the structure of the generalized model turned out to be suitable for the description of both the wild type and the mutant strain, yielding very good predicting performances for a large range of aeration conditions and glucose limitation.

**Tableau IV.5 :** Coefficient determination between the experimental and the simulated values of biomass, glucose, lactate, succinate and acetate concentrations, using the primary and generalized model, under different  $k_{LA}$  conditions. WT: *C. glutamicum* 2262,  $\Delta dhA$ : *C. glutamicum* 2262 $\Delta dhA$ .

		Biomass		Glucose		Succinate		Acetate		Lactate
		WT	$\Delta dhA$	WT	$\Delta dhA$	WT	$\Delta dhA$	WT	$\Delta dhA$	WT
0.6	primary model	0.950	0.763	0.992	0.955	0.993	0.896	0.800	0.488	0.987
	generalized model	0.974	0.899	0.994	0.980	0.982	0.927	0.662	0.431	0.993
5	primary model	0.975	0.946	0.997	0.975	0.992	0.981	0.987	0.967	0.999
	generalized model	0.991	0.964	0.995	0.985	0.988	0.979	0.939	0.930	0.995
11	primary model	0.994	0.972	0.995	0.954	0.995	0.982	0.995	0.955	0.998
	generalized model	0.992	0.963	0.988	0.905	0.993	0.961	0.992	0.951	0.998
20	primary model	0.978	0.976	0.999	0.959	0.994	0.986	0.997	0.975	0.998
	generalized model	0.981	0.994	0.986	0.892	0.996	0.977	0.996	0.952	0.996
31	primary model	0.992	0.925	0.993	0.926	0.966	0.978	0.981	0.936	0.997
	generalized model	0.995	0.882	0.983	0.912	0.952	0.857	0.977	0.967	0.995
44	primary model	0.996	0.899	0.995	0.910	0.959	0.306	0.997	0.710	0.995
	generalized model	0.978	0.938	0.996	0.934	0.944	0.744	0.997	0.537	0.983
77	primary model	0.821	0.897	0.996	0.924	0.890	0.907	0.979	0.691	0.987
	generalized model	0.758	0.948	0.955	0.840	0.890	0.868	0.766	0.643	0.818
90/118 <sup>(1)</sup>	primary model	0.988	0.901	0.971	0.960	0.984	0.775	0.939	0.795	0.930
	generalized model	0.991	0.906	0.968	0.954	0.933	0.780	0.909	0.801	0.945
118/164	primary model	0.988	0.804	0.996	0.999	0.953	0.861	0.989	0.688	0.982
	generalized model	0.987	0.802	0.996	0.997	0.979	0.883	0.996	0.734	0.967

<sup>(1)</sup>:  $k_{LA} = 90 \text{ h}^{-1}$  for the wild type and  $118 \text{ h}^{-1}$  for the mutant strain.

## 2.4. Conclusion

Based on experimental observations of batch cultures of *C. glutamicum* 2262 in shake flasks, a primary kinetic model was developed to describe the growth and organic acids production during cultures performed at different oxygenation levels, characterized by  $k_{LA}$  values ranging from 0.6 to 118 h<sup>-1</sup>. The resulting model considered the combined effect of oxygenation level and the availability of glucose on the physiological response of *C. glutamicum*. It assumed both the production and the possible consumption of organic acids depending on glucose availability and oxygenation conditions. An excellent agreement was found between the experimental and simulated data while a correlation between the model parameters and the  $k_{LA}$  values was observed. The effect of oxygenation level on each kinetic parameter was then described by a secondary model under the form of third order polynomials. Such polynomial models were then embedded into the primary model to yield a generalized model. This model confirmed the effect of the oxygenation level on the growth and on the organic acids production by *C. glutamicum* 2262. The primary model was then successfully extended to a *ldhA* deleted strain of *C. glutamicum* 2262. The two generalized models exhibited the same excellent prediction capability and allowed for quantifying the kinetic differences between strains. The developed models in this study, are useful to characterise the compartment of *C. glutamicum* according to the oxygenation level and thus to predict the kinetics of growth, substrate consumption and organic acids production. But, these models fitted different batch cultures under deprived oxygen conditions, with only an initial glucose concentration of 35 g L<sup>-1</sup>. It would be now of interest to verify the applicability of these models with different initial glucose concentrations and different oxygenation levels (aerobiosis, micro-aerobiosis and anaerobiosis) and to apply a multicriteria dynamic optimization.

### 3. Contributions de l'article

Cette étude avait comme objectif de développer un modèle cinétique permettant de prédire les cinétiques de croissance et de la production des acides organiques par *C. glutamicum* 2262 dans différentes conditions de culture (niveaux d'oxygénation et concentrations en glucose résiduel), et donc, de comprendre la réponse physiologique de cette bactérie aux changements des paramètres de culture.

La première partie, a porté sur le développement de ce modèle cinétique, en se basant sur des observations expérimentales décrites dans le chapitre 3. Cinq équations s'appuyant sur les bilans matière de la biomasse, du glucose et des trois acides organiques ont été proposées. Des modèles cinétiques de croissance de la biomasse, de consommation de glucose et de production/consommation des trois acides organiques (lactate, succinate et acétate) y ont été intégrés. Pour chaque équation, des fonctions logistiques, mettant en évidence l'impact de la concentration seuil en glucose résiduel, et des termes de limitation en oxygène ont été ajoutés. Les équations proposées pour les trois acides organiques présentent non seulement des termes de production mais aussi de (re)consommation de ces acides organiques comme sources énergétiques ou sources combinées de carbone et d'énergie.

La deuxième partie, décrit l'identification des paramètres cinétiques et numériques du modèle proposé pour chaque condition expérimentale. Les simulations résultantes ont montré que le modèle proposé prédit parfaitement ces cinétiques dans différentes conditions d'oxygénation. Ce modèle est capable de décrire le comportement de *C. glutamicum* 2262 dans un environnement variant de riche à déficient en oxygène ( $k_{La}$  entre 118 et 0,6 h<sup>-1</sup>) ou de concentration en glucose. D'autre part, une bonne corrélation entre les valeurs estimées de chaque paramètre cinétique du modèle et le  $k_{La}$  a été observée. Cela permet de confirmer et surtout de quantifier l'impact du niveau d'oxygénation sur la croissance et la production/consommation des acides organiques par cette bactérie. Ces corrélations, représentées par des polynômes cubiques (modèles secondaires), ont été intégrées dans le modèle proposé (modèle primaire) aboutissant à un modèle généralisé sur une large gamme des niveaux d'oxygénation ( $k_{La}$  entre 0,6 et 118 h<sup>-1</sup>). Les simulations de ce modèle généralisé ont une nouvelle fois montré un très bon accord entre les concentrations en biomasse, glucose et acides organiques, simulées et expérimentales.

Afin de vérifier la pertinence de la structure de ce modèle cinétique, le modèle primaire a été adapté *C. glutamicum* 2262 $\Delta$ ldhA. La même démarche qu'avec la souche sauvage, a été appliquée (identification des paramètres, simulations des concentrations et modélisation de

l'effet du  $k_{La}$  sur les paramètres cinétiques pour une généralisation du modèle). Une nouvelle fois, une très bonne concordance entre les concentrations expérimentales et les concentrations simulées par le modèle primaire ainsi que le modèle généralisé ont été constatées. Comme pour la souche sauvage, le modèle primaire proposé et le modèle généralisé permettent de comprendre et de prédire la réponse physiologique dans des conditions de limitation en oxygène ( $k_{La}$  entre 0,6 et 164 h<sup>-1</sup>) et/ou en substrat carboné (glucose).

Dans la suite de ce chapitre, des compléments, présentés succinctement ou absents dans le projet de publication ci-dessus, portant sur la mise au point de l'identification des paramètres du modèle ainsi que sur l'analyse approfondie du modèle développé sont présentés.

#### 4. Analyses du modèle cinétique

L'analyse du modèle cinétique proposé est réalisée à plusieurs niveaux dans cette étude : (1) une analyse préliminaire permettant de mettre en place la méthodologie de l'identification des paramètres du modèle et (2) une analyse de sa structure.

Les étapes préliminaires sont :

- Le choix du domaine d'étude de chaque paramètre du modèle (nécessaire pour l'identification des paramètres par l'AGD) en se basant sur les données de littérature et des simulations préliminaires.
- Le choix du critère d'optimisation, utilisé pour l'identification des paramètres du modèle par l'AGD.
- L'étude de sensibilité permettant d'évaluer l'impact de la variation de chaque paramètre sur la prédiction du modèle.

Une analyse approfondie de la structure du modèle a ensuite été réalisée pour s'assurer de la cohérence des résultats, au-delà de la seule comparaison des profils de concentrations observés et modélisés. Elle s'appuie sur une étude des contributions des vitesses spécifiques locales aux vitesses spécifiques globales de croissance et de production et/ou de consommation des acides organiques.

##### 4.1. Choix du domaine des paramètres du modèle cinétique

Le modèle cinétique proposé dans cette étude regroupe 4 paramètres qualifiés de numériques (associés à des fonctions logistiques) et 18 paramètres cinétiques (associés aux différents modèles cinétiques). Pour identifier ces paramètres, l'algorithme génétique diploïde a besoin des bornes du domaine de recherche de chaque paramètre. Ces bornes ont été fixées, en se basant sur les données de la littérature et les rendements apparents expérimentaux. Les valeurs maximales des vitesses spécifiques de croissance de *C. glutamicum* sur glucose ( $\mu_{\max}^G$ ) et lactate/acétate ( $\mu_{\max}^{LA}$ ) ont été estimées par des valeurs déterminées expérimentalement (0,7 et 0,59, respectivement) au cours de cultures en batch en aérobiose (Cocaign et al., 1993; Cocaign-Bousquet et al., 1996; Cocaign-Bousquet and Lindley, 1995; Kaboré et al., 2015). De même, le rendement maximal de conversion de glucose en biomasse ( $Y_{X/G}^X$ ) a été estimé à 0,67 g biomasse  $g^{-1}$  glucose (Cocaign et al., 1993). Les bornes maximales des rendements de



conversion de glucose en acides organique ( $Y_{L/G}^X$ ,  $Y_{A/G}^X$  et  $Y_{S/G}^X$ ) ont été fixées sur la base des rendements maximaux théoriques. Pour les autres paramètres cinétiques liés à la production ou consommation des acides organiques ( $Y_{L/X}^X$ ,  $Y_{A/X}^X$ ,  $Y_{S/X}^X$ ,  $\alpha^L$ ,  $\alpha^A$ ,  $\alpha^S$ ,  $m^L$ ,  $m^A$  et  $m^S$ ), les valeurs maximales ont été estimées en se basant sur nos propres données expérimentales. Les rendements de production des acides organiques ( $Y_{L/X}^X$ ,  $Y_{A/X}^X$  et  $Y_{S/X}^X$ ) déterminés expérimentalement correspondent à la production apparente. Pour tenir compte de la différence entre les rendements numériques du modèle et les rendements apparents, la borne maximale de chaque paramètre a été estimée à deux fois la valeur maximale expérimentale déterminée. D'autre part, les bornes minimales ont été fixées à 0 pour tous les paramètres cinétiques.

Le même domaine de recherche a été utilisé pour identifier les paramètres du modèle pour les conditions opératoires, *i.e.* pour chaque valeur expérimentale du  $k_{La}$ . Après une série de simulations, nous avons constaté que la valeur maximale estimée pour certains paramètres était beaucoup plus faible que celle imposée (le domaine). Donc, afin d'éviter la convergence vers un optimum local, en utilisant un domaine large, ainsi que pour gagner du temps pour l'identification des paramètres, nous avons choisi de réduire les valeurs maximales imposées dans le domaine pour certains paramètres ( $\alpha^L$ ,  $\alpha^A$ ,  $\alpha^S$ ,  $m^S$ ,  $m^L$ ,  $\mu_{max}^L$ ,  $n$ ,  $G^*$ ,  $ag^*$  et  $ag_0$ ). De même, des bornes minimales de certains paramètres ont été modifiées ( $\mu_{max}^G$ ,  $Y_{L/X}^X$ ,  $Y_{S/X}^X$ ,  $Y_{X/G}^X$ ,  $n$ ,  $G^*$ ,  $ag^*$  et  $ag_0$ ; Tableau IV.6). Le domaine de recherche finalement utilisé pour l'optimisation des paramètres est présenté dans le tableau ci-dessous.

**Tableau IV.6** : les valeurs maximales et minimales des paramètres du modèle cinétique

Paramètres		Min	Max
Cinétiques	$\mu_{max}^G$	0,05 <sup>(*)</sup>	0,7
	$Y_{L/X}^X$	1 <sup>(*)</sup>	14,5
	$Y_{A/X}^X$	0	1
	$Y_{S/X}^X$	0,5 <sup>(*)</sup>	7
	$Y_{X/G}^X$	0,2 <sup>(*)</sup>	0,5
	$Y_{L/G}^X$	0	1
	$Y_{A/G}^X$	0	0,66
	$Y_{S/G}^X$	0	1,11
	$\alpha^L$	0	0,06
	$\alpha^A$	0	0,03
	$\alpha^S$	0	0,04

Paramètres		Min	Max
Cinétiques	$m^L$	0	0,06
	$m^G$	0	0,08
	$m^S$	0	0,035
	$m^A$	0	0,01
	$\mu_{max}^L$	0	0,3
	$1/Y_{X/A}^X$	1	10
	$1/Y_{X/L}^X$	1	10
	Numérique	$n$	0,5
$G^*$		7	10
$ag^*$		0,5	1
$ag_0$		0,5	3

<sup>(\*)</sup> : les bornes modifiées

## 4.2. Choix du critère d'optimisation

Dans cette étude, les paramètres ont été identifiés par l'algorithme génétique diploïde, en minimisant l'écart entre les données expérimentales et celles simulées par le modèle. Deux critères d'optimisation ( $J_{rel}$  et  $J_{max}$ ) ont été envisagés.

$$J_{max} = \sum_{j=1}^q \left( \sum_{i=1}^p (Y_{ij}^{exp} - Y_{ij}^{mod})^2 / (Max(Y_j^{exp}))^2 \right) \quad \text{Eq.1}$$

$$J_{rel} = \sum_{j=1}^q \left( \sum_{i=1}^p \left( (Y_{ij}^{exp} - Y_{ij}^{mod})^2 / (Y_j^{exp})^2 \right) \right) \quad \text{Eq.2}$$

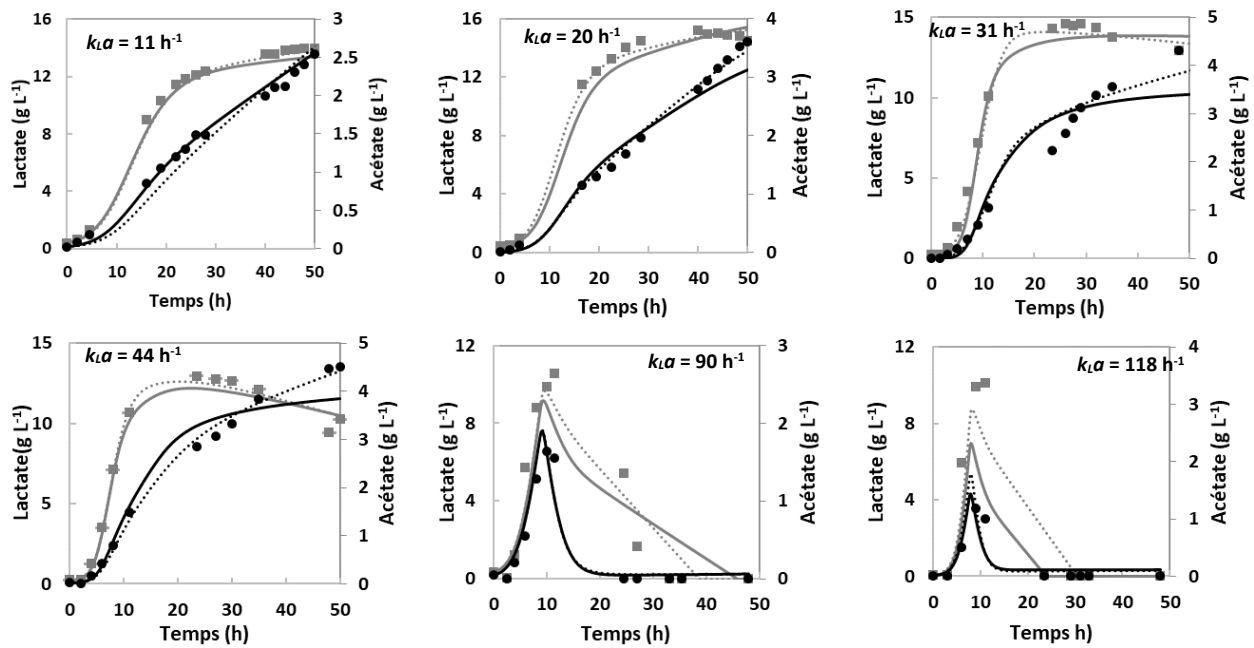
avec p et q correspondant au nombre de points expérimentaux et au nombre de variables d'état du modèle (concentration en glucose, biomasse, lactate, succinate et acétate), respectivement.  $Y_{ij}^{exp}$  et  $Y_{ij}^{mod}$  représentent les données expérimentales (exp) et simulées (mod) de la j<sup>ème</sup> variable au i<sup>ème</sup> point expérimental. Le critère  $J_{max}$  représente l'erreur relative à la concentration maximale de l'expérience alors que le critère  $J_{rel}$  correspondant à l'erreur relative à la concentration en chaque point expérimental.

Les paramètres ont été identifiés pour chaque condition de  $k_{La}$ , en utilisant ces deux critères ( $J_{rel}$  et  $J_{max}$ ), avec une population de 2500 individus. Des comparaisons des valeurs de ces paramètres ont été réalisées, pour les différentes conditions de  $k_{La}$ , afin de vérifier et évaluer l'impact du critère d'optimisation sur la prédiction et la fiabilité du modèle cinétique (Annexe 12). Comme les valeurs des paramètres ne sont pas du même ordre de grandeur, un coefficient de variation (CV (%)) a été calculé pour comparer les valeurs de ces paramètres dans les différentes conditions de  $k_{La}$ . Les valeurs de ce coefficient sont présentées dans Tableau IV.7.

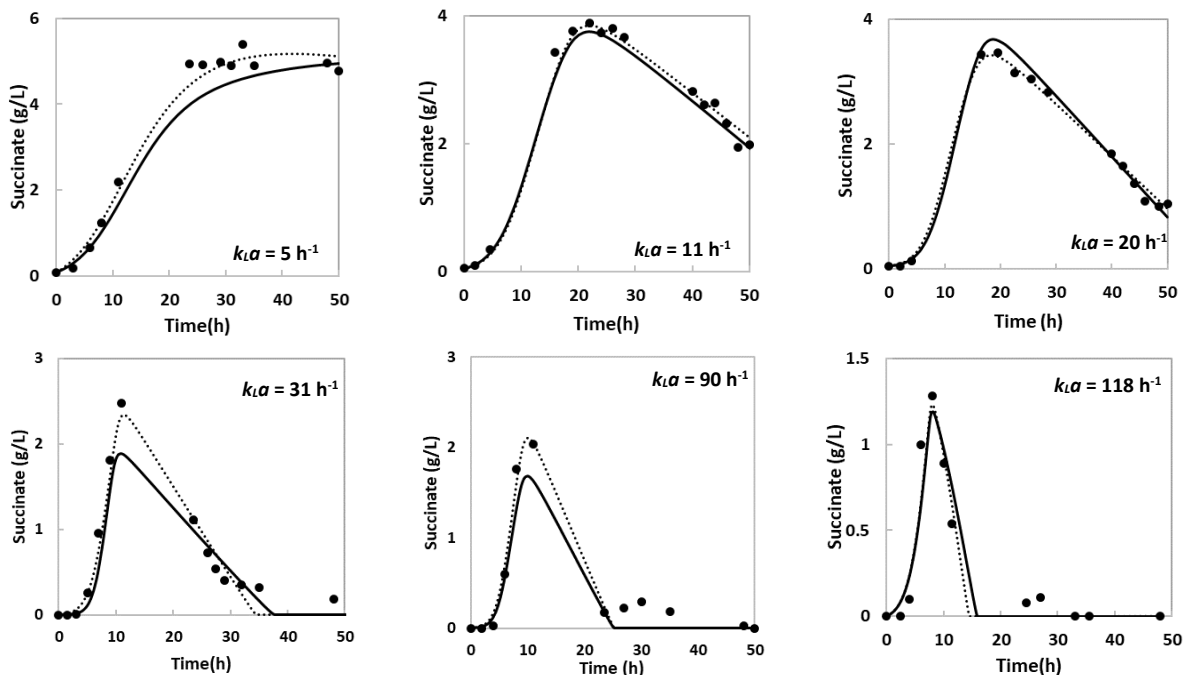
**Tableau IV.7 :** Les coefficients de variation des valeurs des paramètres du modèle obtenues dans différentes conditions de  $k_{LA}$ , en utilisant les deux critères d'optimisation ( $J_{rel}$  et  $J_{max}$ ). Les coefficients de variation supérieurs à 10 % sont indiqués en rouge.

$k_{LA}$	Coefficient de variation (%)							
	0,6	5	11	20	31	44	90	118
$\mu_{max}^G$	3,85	9,28	3,30	6,27	2,83	3,22	3,71	0,83
$Y_{L/X}^X$	2,08	6,30	2,01	1,11	7,61	12,80	12,77	15,46
$Y_{A/X}^X$	3,84	3,01	41,15	16,92	64,91	16,97	12,25	9,26
$Y_{S/X}^X$	7,50	8,63	4,03	12,48	0,17	35,14	10,72	1,18
$Y_{X/G}^X$	0,78	16,27	0,49	3,67	2,71	6,05	5,40	5,73
$Y_{L/G}^X$	0,77	0,58	1,22	5,50	0,15	3,82	11,27	30,39
$Y_{A/G}^X$	24,81	1,07	6,43	1,12	0,61	4,02	0,13	30,54
$Y_{S/G}^X$	0,92	0,53	7,42	0,78	1,25	2,62	44,65	1,36
<b>n</b>	5,59	22,00	6,13	5,78	43,75	7,42	1,22	0,01
$\alpha^L$	21,80	5,96	8,17	11,30	19,71	30,99	24,40	8,56
$\alpha^A$	72,21	26,10	23,63	10,61	18,26	14,60	78,87	179,89
$\alpha^S$	36,89	28,37	13,48	0,72	23,65	31,91	85,73	19,58
$m^G$	111,79	156,85	48,80	31,43	166,38	85,12	0,37	1,29
$m^S$	11,93	104,30	5,35	15,56	34,29	21,96	0,16	8,74
$m^L$	18,92	88,65	20,63	15,81	142,68	41,09	10,27	12,77
$\mu_{max}^L$							140,53	128,38
$1/Y_{A/X}^X$							2,60	4,22
$1/Y_{L/X}^X$							48,61	48,43

La moitié (51 %) des coefficients de variation sont inférieurs à 10 %, dont 66 % sont même inférieurs à 5 %. Les coefficients supérieurs à 10 % sont indiqués en rouge. Ces derniers correspondent principalement aux termes de maintenance ( $m^G$ ,  $m^S$  et  $m^L$ ), aux paramètres de la production d'acétate et de succinate non associée à la croissance ( $\alpha^L$ ,  $\alpha^A$  et  $\alpha^S$ ) et aux paramètres liés à la consommation de lactate comme source carbonée ( $\mu_{max}^L$  et  $1/Y_{X/L}^X$ ). D'autre part, en se basant sur les profils des concentrations de certaines variables (lactate, acétate et succinate), un écart a été observé entre les concentrations obtenues avec  $J_{max}$  et celles obtenues avec  $J_{rel}$  dans certaines conditions de  $k_{LA}$  (figures IV.7 et 8). Dans le cas du succinate, les écarts les plus élevés ont été observés avec les  $k_{LA}$  de 5, 31 et 44  $h^{-1}$  (Figure IV.8). Ceci pourrait être expliqué par le manque de données expérimentales notamment à proximité des concentrations maximales. Ce manque de données fiables pourrait impacter un critère qui s'appuie, par définition, sur ces valeurs maximales comme  $J_{max}$ . Pour le lactate, comme prévu, les valeurs de  $\mu_{max}^L$  et  $1/Y_{X/L}^X$  sont différentes et les différences les plus importantes correspondent aux  $k_{LA}$  les plus élevés (90 et 118  $h^{-1}$ ) où les concentrations en lactate sont les plus faibles (Figure IV.7).



**Figure IV.7 :** Profils de concentration d'acétate (noir) et lactate (gris) au cours des cultures en fiole de *C. glutamicum* 2262, réalisées dans différentes conditions de  $k_L a$  : concentrations expérimentales (points) et concentrations simulées par le modèle cinétique en utilisant les critères d'optimisation  $J_{rel}$  (courbe continue) et  $J_{max}$  (courbe pointillée).



**Figure IV.8 :** Profils de concentration de succinate au cours des cultures en fiole de *C. glutamicum* 2262, réalisées dans différentes conditions de  $k_L a$  : concentrations expérimentales (points) et concentrations simulées par le modèle cinétique en utilisant les critères d'optimisation  $J_{rel}$  (courbe continue) et  $J_{max}$  (courbe pointillée).

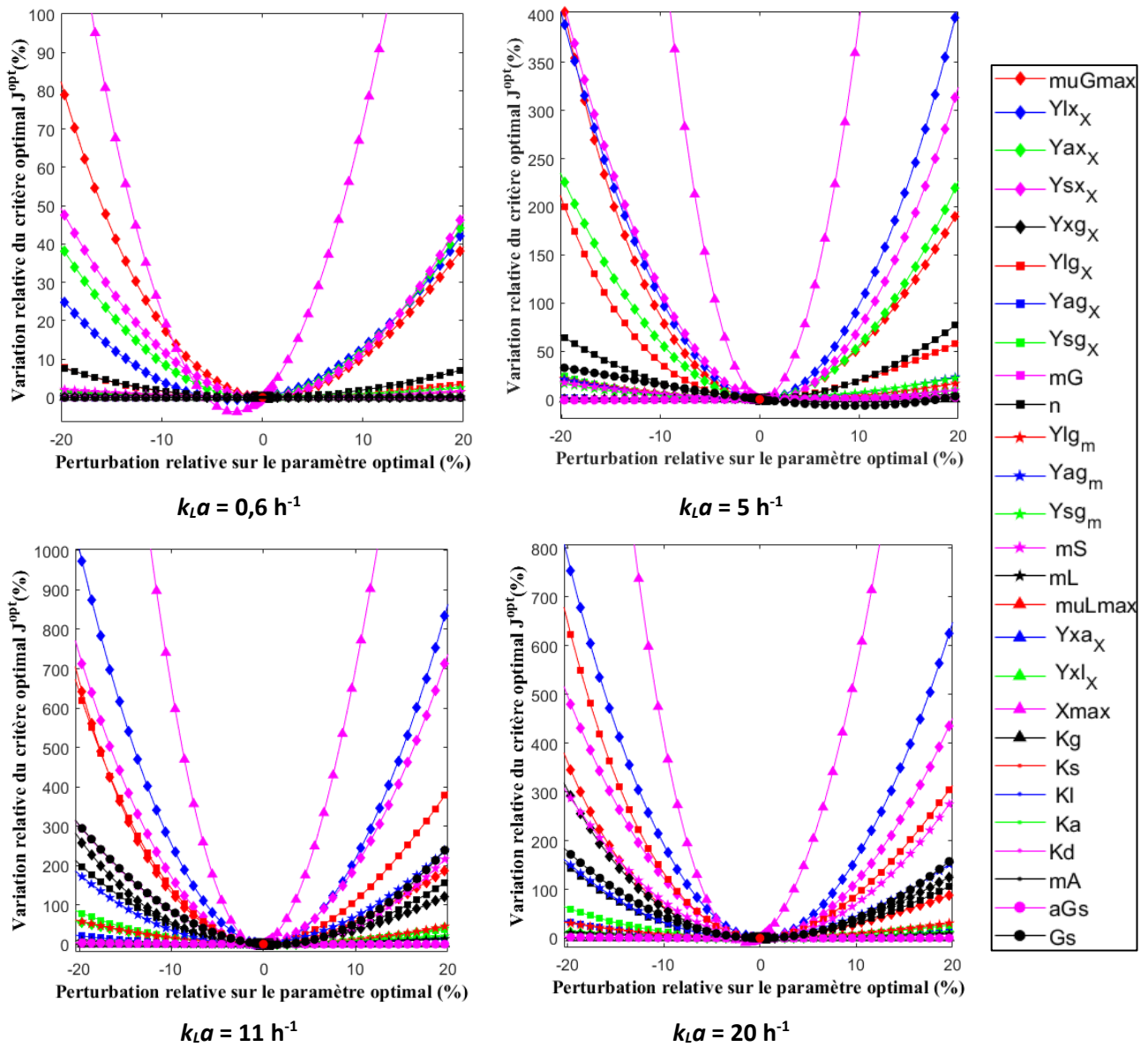
Le choix du critère a donc un impact sur les valeurs des paramètres du modèle cinétique. Mais, ces écarts sur les paramètres ne se traduisent pas par des écarts énormes sur l'estimation des cinétiques de croissance et de production/consommation des acides organiques. En fait, la

différence entre les valeurs trouvées à l'aide de deux critères d'optimisation pourrait être due au phénomène de compensation entre les deux termes de production et consommation présents dans chaque équation décrivant la variation des concentrations des acides organiques. Cette compensation pourrait engendrer une convergence vers des optima locaux. Ces optima pourraient être ainsi obtenus à cause d'un manque de sensibilité du critère par rapport à certains paramètres du modèle.

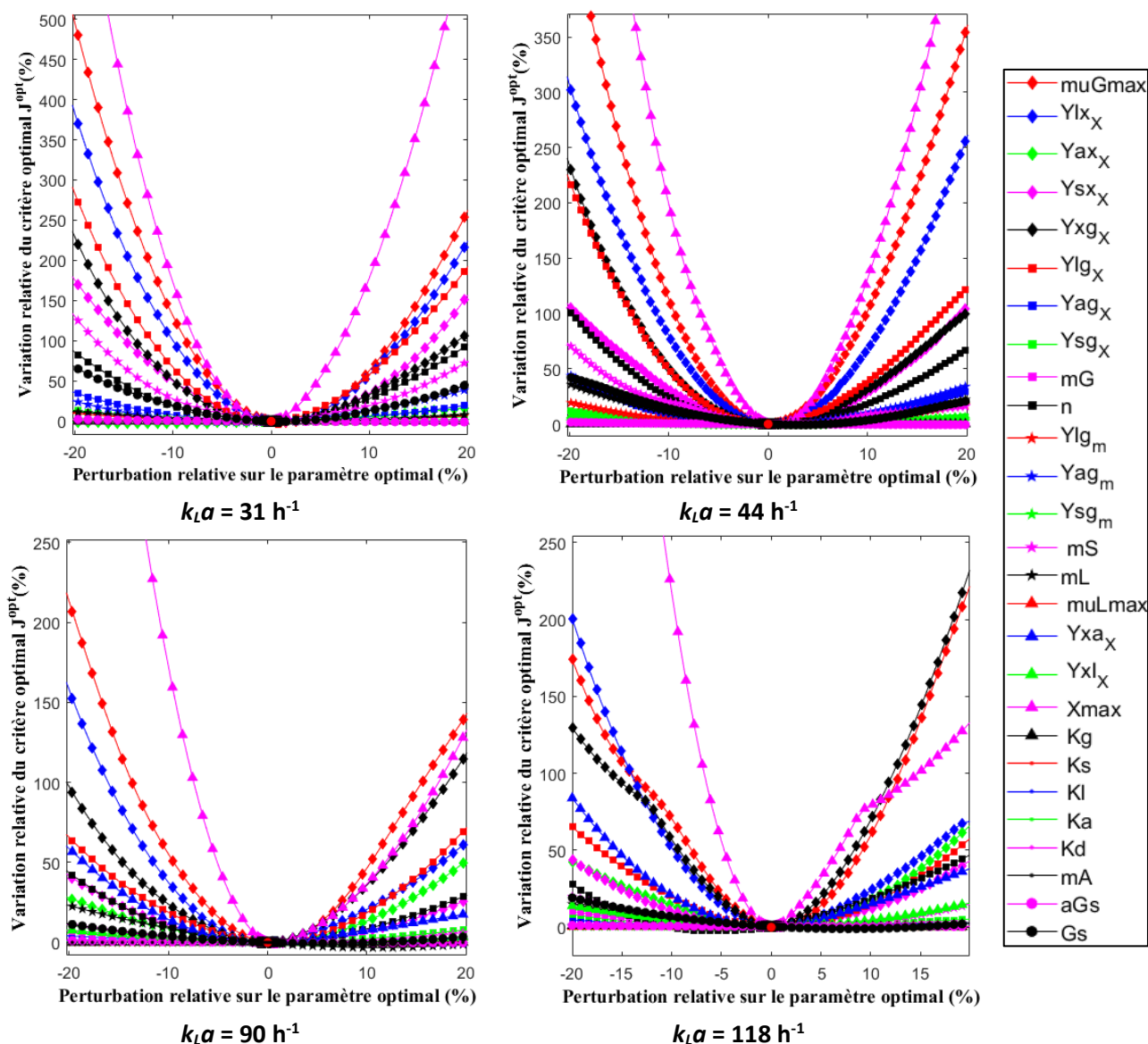
Nous avons finalement basé notre choix de critère sur la qualité globale de l'identification (corrélations entre les concentrations expérimentales et celles simulées par le modèle) ainsi que le temps de calcul. Le critère  $J_{\max}$  a été retenu pour la suite de l'étude.

### **4.3. Choix des paramètres à optimiser : étude de sensibilité**

Une étude de sensibilité du critère  $J_{\max}$  à chaque paramètre a été menée pour chaque condition d'oxygénation afin d'évaluer l'effet de variation de la valeur optimale de chaque paramètre sur le critère d'optimisation et donc sur la prédiction des concentrations en biomasse, glucose et acides organiques. Pour cela, la valeur de chaque paramètre a été modulée entre  $-20\%$  et  $+20\%$  de sa valeur optimale. La sensibilité a été exprimée sous la forme d'une variation relative du critère autour de l'optimum ( $\Delta J_{opt}$ ). Les résultats de cette étude sont reportés Figures IV.9 et 10, en représentant ( $\Delta J_{opt}$ ) en fonction du pourcentage de variation de la valeur de chaque paramètre.



**Figure IV.9 :** Étude de sensibilité du modèle cinétique aux variations de ses paramètres. L'étude cinétique a été réalisée dans différentes conditions de  $k_L a$  (0,6 ; 5 ; 11 et 20  $\text{h}^{-1}$ ).



**Figure IV.10 :** Étude de sensibilité du modèle cinétique aux variations de ses paramètres. L'étude cinétique a été réalisée dans différentes conditions de  $k_La$  (31 ; 44 ; 90 et 118  $\text{h}^{-1}$ ).

Les résultats de cette étude montrent que les paramètres identifiés sont quasiment tous optimaux. En effet, une légère diminution du critère est observée quand on perturbe  $X_{max}$  ou  $G_s$ . Mais, la sensibilité du modèle dépend fortement du niveau d'oxygénation ( $k_La$ ). Les paramètres ont été présentés par ordre de sensibilité décroissante. Le paramètre le plus sensible est la concentration maximale en biomasse ( $X_{max}$ ). Il est utile de préciser que la valeur de  $X_{max}$  utilisée pour les simulations est la concentration maximale « expérimentale ». Les autres paramètres influençant le plus le modèle sont  $\mu_{Gmax}^G$  et  $Y_{LX}^X$ . Pour  $k_La = 5 \text{ h}^{-1}$ , le modèle est également sensible à  $Y_{Lg}^X$  et  $n$ . Les autres paramètres impactant le critère sont ensuite  $Y_{X/G}^X$ ,  $m^S$  et  $G^S$ , dans le cas des  $k_La$  de 11 et 20  $\text{h}^{-1}$  (Figure IV.9) mais cette sensibilité diminue

quand  $k_{La}$  augmente (Figure IV.10). Dans des conditions d'oxygénation élevées ( $k_{La}$  de 90 et 118  $\text{h}^{-1}$ ), le modèle est également sensible aux paramètres  $Y_{A/X}^X$  et  $Y_{X/A}^X$ , liés à la production et à la consommation d'acétate comme source de carbone pendant la phase de croissance. Les paramètres les moins sensibles ( $n$ ,  $G^S$ ,  $a_{GS}$  et  $a_{G0}$ ) ont été considérés comme des constantes pour la suite de cette étude. Davantage de détails sur les paramètres constants ont été présentés dans le projet de publication.

## 5. Analyse structurelle du modèle cinétique

La pertinence de la structure du modèle a été évaluée en analysant les vitesses spécifiques simulées. Il s'agit ici d'étudier, non seulement les vitesses spécifiques globales de croissance, de production ou consommation des acides organiques mais aussi la contribution de chaque terme du modèle dans ces vitesses spécifiques globales.

### Structure du modèle cinétique proposé

Dans le modèle proposé, chaque production ou consommation est la contribution de plusieurs phénomènes qui ne sont pas « apparents » et dont seule la résultante globale est observable. À titre d'illustration, la vitesse spécifique de croissance des bactéries, est la contribution des vitesses spécifiques de croissance sur glucose et sur les autres acides organiques (lactate et acétate). Ces contributions sont détaillées dans le sous-ensemble (1). La vitesse spécifique de production des acides organiques est subdivisée en deux contributions ; une production liée à la croissance ( $q_{AO}^{prod1}$ ) et une production dissociée de la croissance ( $q_{AO}^{prod2}$ ). Ainsi, des termes de consommation des acides organiques comme source énergétique  $q_{AO}^{cons1}$  ou carbonée  $q_{AO}^{cons2}$  ont été ajoutés dans le modèle de consommation de ces acides organiques. Les différentes contributions aux vitesses spécifiques globales sont définies dans des sous-ensembles d'équations (1), (2) ; (3) et (4), correspondant, respectivement, à : la biomasse, au succinate, lactate et glucose. La cinétique de production et de consommation d'acétate est décrite par les mêmes équations que le lactate (même termes de production et de consommation).



$$(1) \begin{cases} \mu^G = \mu_{max}^G * \frac{G}{k_g+G} * (1 - \varphi_G(G)) * (1 - \varphi_{O_2}(X)) \\ \mu^{LA} = \mu_{max}^{LA} * \frac{L}{k_L+L} * \frac{A}{k_A+A} * \varphi_G(G) * (1 - \varphi_{O_2}(X)) \\ \frac{1}{X} \times \frac{dX}{dt} = \mu = \mu^G + \mu^{LA} \end{cases}$$

Avec les fonctions logistiques  $\varphi_G(G) = \frac{1}{\exp(a_{G_0} * G)}$  et  $\varphi_{O_2}(X) = \left(\frac{OUR_{min}}{OUR}\right)^n$

$$(2) \begin{cases} q_S^{prod1} = Y_{S/X}^x * \mu * \varphi_G^S(G) * \varphi_{O_2}(X) \\ q_S^{prod2} = \alpha^S * \varphi_G^S(G) * \varphi_{O_2}(X) \\ q_S^{cons} = -m^S * \frac{S}{k_S+S} * \frac{G}{k_G+G} \\ \frac{1}{X} \times \frac{dS}{dt} = q_S = q_S^{prod1} + q_S^{prod2} + q_S^{cons} \end{cases}$$

Avec la fonction logistique  $\varphi_G^S(G) = \left(\frac{1}{1+\exp(a_{G^*} * (G^*-G))}\right)$

$$(3) \begin{cases} q_L^{prod1} = Y_{L/X}^x * \mu * (1 - \varphi_G(G)) * \varphi_{O_2}(X) \\ q_L^{prod2} = \alpha^L * (1 - \varphi_G(G)) * \varphi_{O_2}(X) \\ q_L^{cons1} = -\left(m^L * \frac{L}{k_L+L}\right) \\ q_L^{cons2} = -\frac{1}{Y_{X/L}^x} * \mu * \varphi_G(G) * (1 - \varphi_{O_2}(X)) \\ \frac{1}{X} \times \frac{dL}{dt} = q_L = q_L^{prod1} + q_L^{prod2} + q_L^{cons1} + q_L^{cons2} \end{cases}$$

$$(4) \begin{cases} q_G^X = -\frac{1}{Y_{X/G}^x} * \mu * (1 - \varphi_G(G)) \\ q_G^S = -\frac{1}{Y_{S/G}^x} * q_S * \varphi_G^S(G) \\ q_G^L = -\frac{1}{Y_{L/G}^x} * q_L * (1 - \varphi_G(G)) \\ q_G^A = -\frac{1}{Y_{A/G}^x} * q_A * (1 - \varphi_G(G)) \\ q_G^m = -m^G * (1 - \varphi_G(G)) \\ q_G = q_G^X + q_G^S + q_G^L + q_G^A + q_G^m \end{cases}$$

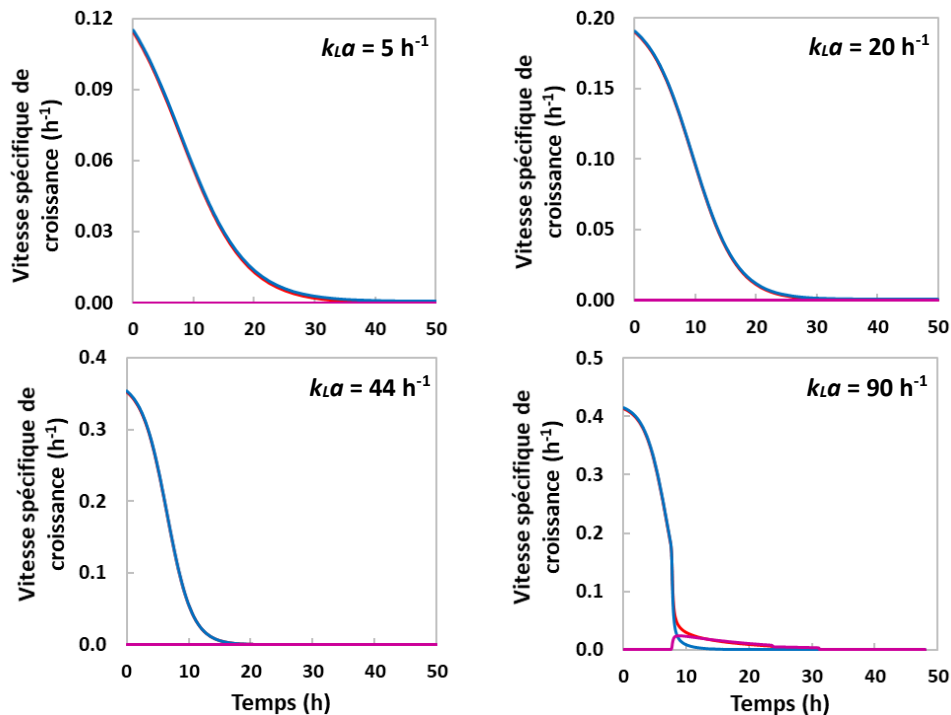
### Calcul de la contribution des différents phénomènes aux vitesses spécifiques globales de production ou de consommation

Utilisant les paramètres identifiés par l'AGD, des profils de chaque terme dans les sous-ensembles (1), (2), (3) et (4) ont été simulés dans différentes conditions de  $k_{LA}$ . Comme montré précédemment, des gammes de  $k_{LA}$  ont été identifiées pour la production optimale et la consommation des acides organiques : (1)  $k_{LA}$  entre 0,6 et 5 h<sup>-1</sup> : production optimale de succinate, (2)  $k_{LA}$  entre 11 et 20 h<sup>-1</sup> : production optimale de lactate et consommation de succinate, (3)  $k_{LA}$  entre 31 et 77 h<sup>-1</sup> : production optimale d'acétate et consommation de succinate et lactate, (4)  $k_{LA} \geq 90$  h<sup>-1</sup> production optimale de biomasse et consommation des trois acides organiques. Dans cette partie, nous avons donc choisi de présenter les contributions et les vitesses spécifiques globales ( $\mu, q_S, q_L, q_A$  et  $q_G$ ) obtenues dans une seule condition de  $k_{LA}$  de chaque intervalle (5, 20, 44 et 90 h<sup>-1</sup>). L'évolution de ces vitesses au cours du temps est représentée dans les figures IV.11, 12, 14 et 15.

Les pourcentages de contribution de chaque terme de production ou de consommation dans la vitesse globale de production ou de consommation ont été calculés. Cette contribution correspond à la contribution maximale en utilisant la valeur maximale de chaque terme. Elle a été déterminée pour les différents acides organiques dans les différentes conditions de  $k_{LA}$ . Dans le cas du glucose, la contribution de chaque terme de consommation de glucose, pour la production de lactate ( $q_G^L$ ), succinate ( $q_G^S$ ), acétate ( $q_G^A$ ), biomasse ( $q_G^X$ ) et maintenance ( $q_G^m$ ), dans la vitesse globale de consommation de glucose  $q_G$  a été calculée.

### Analyse de la structure de l'équation décrivant la vitesse spécifique de croissance

La figure IV.11 présente l'évolution des vitesses spécifiques de croissance de *C. glutamicum* 2262 à partir du glucose,  $\mu^G$ , et des acides organiques,  $\mu^{LA}$ , ainsi que la vitesse spécifique globale de croissance,  $\mu$ .

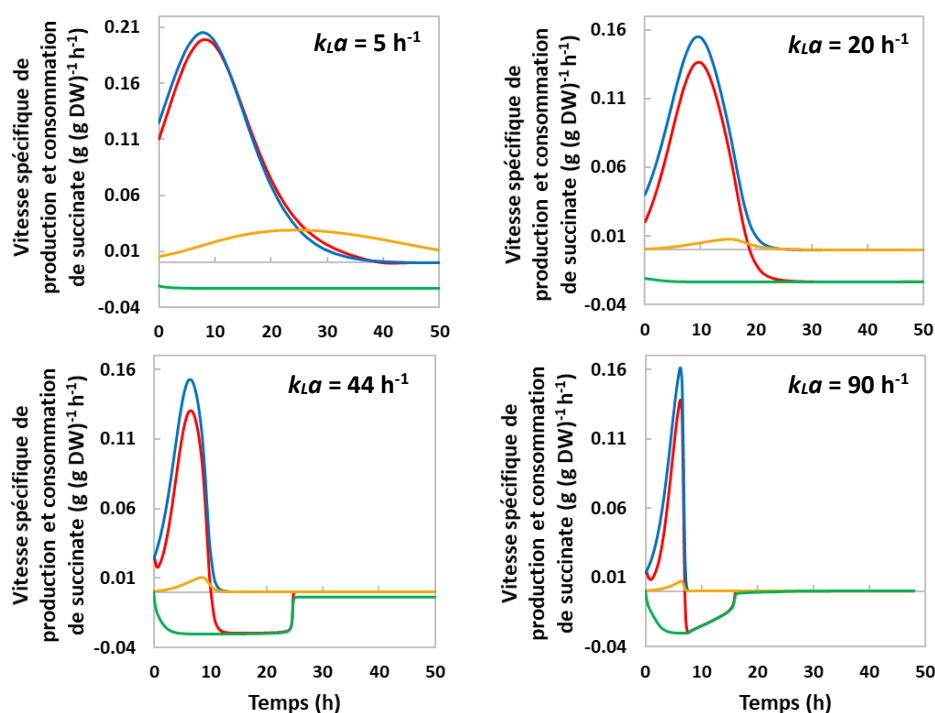


**Figure IV.11 :** Évolution des vitesses spécifiques de croissance de *C. glutamicum* 2262 au cours des cultures en fiole réalisées dans différentes conditions de  $k_{LA}$  : vitesses spécifiques de croissance sur glucose (—), sur acide organique (—) et globale (—).

Le glucose est la seule source carbonée consommée par *C. glutamicum* pour des  $k_{LA}$  inférieurs à  $77 \text{ h}^{-1}$  alors qu'une croissance marginale sur des acides organiques ( $\mu^{LA}$  non nulle) a été observée en fin de culture pour les  $k_{LA}$  les plus élevées (90 et  $118 \text{ h}^{-1}$ ). Ceci est cohérent avec les observations expérimentales.

Il a été montré expérimentalement que le changement de comportement de *C. glutamicum* dépend à la fois de niveau d'oxygénation et de la concentration en glucose résiduel. Dans le modèle cinétique proposé, l'impact de ces deux paramètres est exprimé par le modèle de Levenspiel ( $1 - \varphi_{O_2}(X)$ ) et la fonction logistique  $\varphi_G(G)$ , respectivement. Les profils temporels de ces deux termes dans les différentes conditions de  $k_{LA}$  sont présentées figure IV.15.B. Pour chaque condition de  $k_{LA}$ , le produit  $(\varphi_G(G)) * (1 - \varphi_{O_2}(X))$  a été étudié afin de vérifier l'activation ou non du deuxième terme de croissance ( $\mu^{LA}$ ). Il est ainsi possible de visualiser le moment et la manière dont ces fonctions logistiques agissent sur la croissance, les productions et consommations dans le modèle.

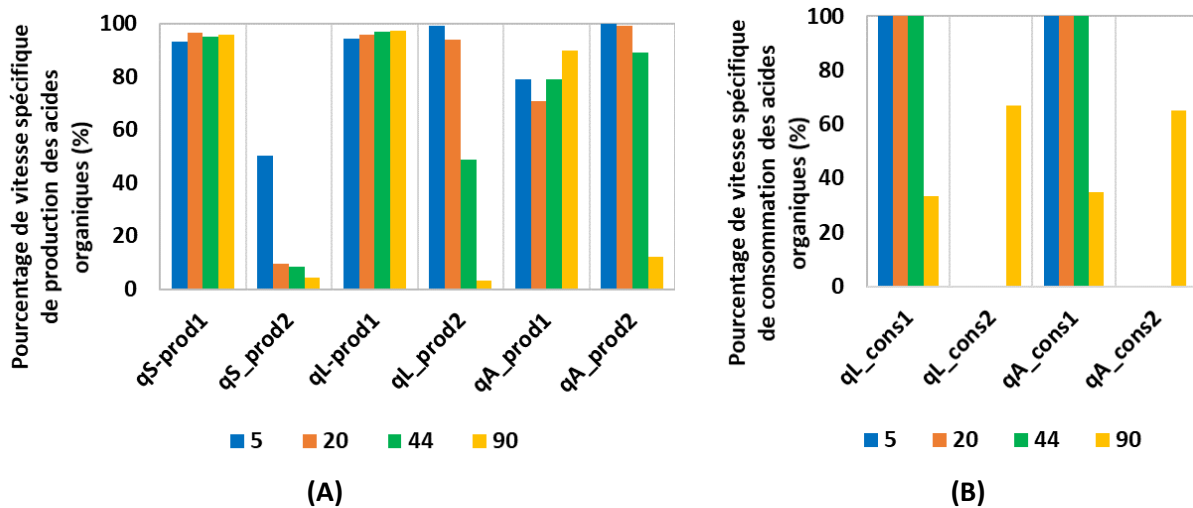
Analyse de la structure de l'équation décrivant la vitesse spécifique de production / consommation des acides organiques



**Figure IV.12 :** Évolution des vitesses spécifiques de production et consommation de succinate au cours des cultures en fiole de *C. glutamicum* 2262, réalisées dans différentes conditions de  $k_{La}$  : vitesses spécifiques de production liée à la croissance (—), non liée à la croissance (—), globale (—) et vitesse spécifique de consommation (—).

La figure IV.12 présente l'évolution de chaque terme de production et de consommation de succinate ainsi que sa vitesse spécifique globale dans différentes conditions de  $k_{La}$  (5, 20, 44 et 90 h<sup>-1</sup>). La production de succinate apparaît majoritairement liée à la croissance ( $q_S^{prod1}$ ). Le deuxième terme de production de cet acide organique ( $q_S^{prod2}$ ) est négligeable comparé à  $q_S^{prod1}$ , sauf dans le cas de cultures avec un  $k_{La}$  faible (0,6 et 5 h<sup>-1</sup>). Dans ces conditions, correspondant aux conditions optimales de production de succinate, la vitesse spécifique de la production non liée à la croissance ( $q_S^{prod2}$ ) représente 50 % de la vitesse spécifique globale de production ( $q_S^{prod}$ ) au début de la phase stationnaire de croissance et 100 % à la fin de la culture. La vitesse  $q_S^{prod1}$  représente plus de 93 % de la vitesse  $q_S^{prod}$ , au début des différentes cultures étudiées ( $k_{La}$  entre 0,6 et 118 h<sup>-1</sup>) (Figure IV.13.A). La contribution de chaque terme de production de succinate ( $q_S^{prod1}$  et  $q_S^{prod2}$ ) est donc importante pendant une phase déterminée de la croissance et au moins pour une condition de  $k_{La}$ . D'autre part, un seul terme de consommation de succinate comme source énergétique ( $q_S^{cons}$ ) (terme de maintenance) a été

ajouté dans l'équation  $q_S$ . La transition entre la production et la consommation de succinate a été exprimée par la fonction logistique ( $\varphi_G^S(G)$ ) qui prend en compte la concentration seuil en glucose ( $G^S$ ) pour l'arrêt de la production. Les valeurs de cette fonction ont été déterminées pour chaque condition de  $k_{LA}$  pour vérifier si les termes de production sont activés ou pas. Les valeurs de cette fonction logistique varient entre 0 et 1 (figure IV.15.B). Elle est notamment égale à 0 à la fin de la culture ( $G < G^S$ ) pour des  $k_{LA}$  supérieurs à  $5 \text{ h}^{-1}$ , ce qui confirme la désactivation rapide des termes de production à partir de la concentration seuil  $G^S$ .

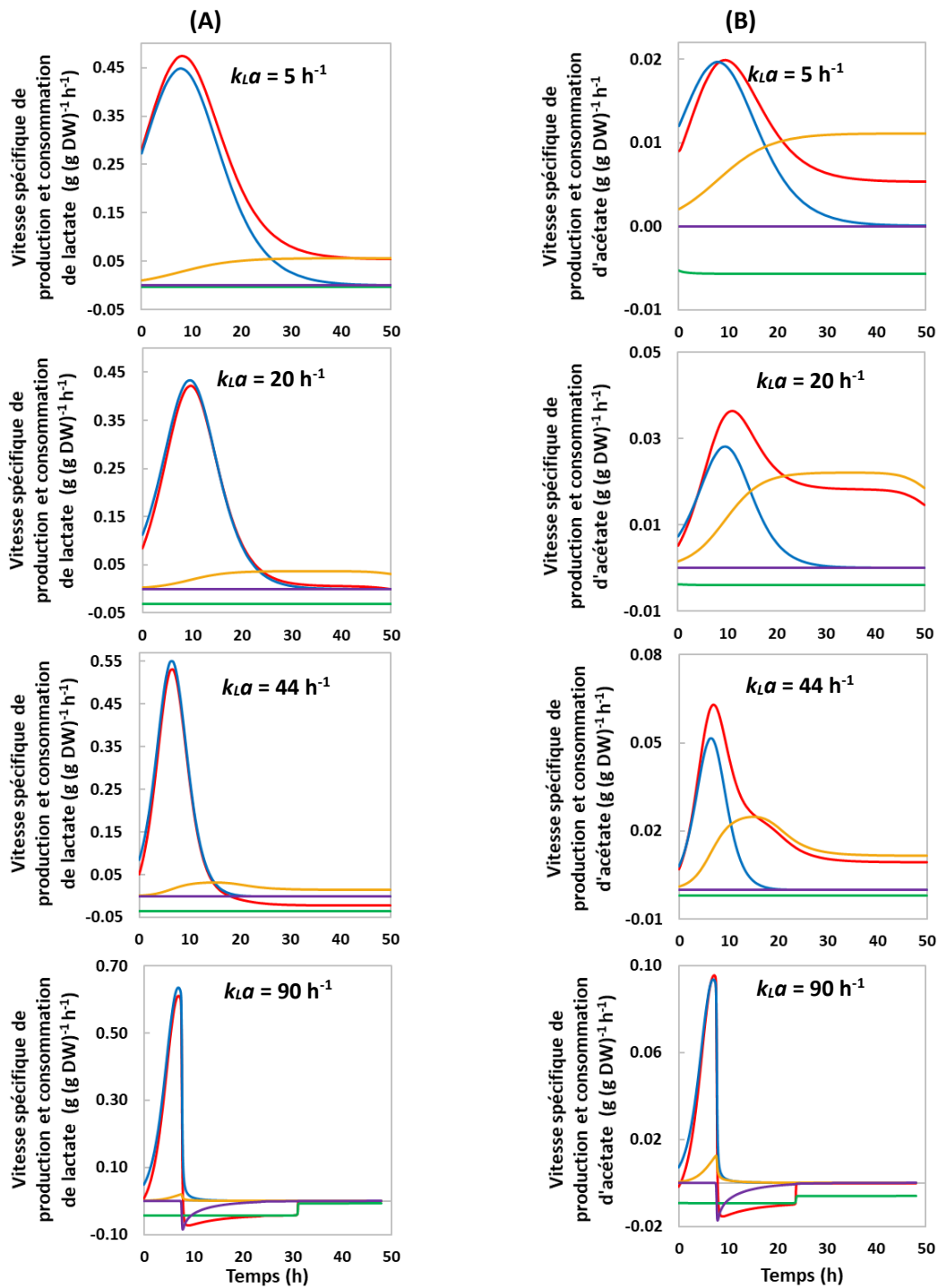


**Figure IV.13 :** (A) Pourcentages de contribution des vitesses spécifiques de production liée (prod1) et non liée (prod 2) à la croissance dans la vitesse spécifique globale de production de lactate (L), de succinate (S) ou d'acétate (A). (B) Pourcentages de contribution à la vitesse spécifique de consommation de lactate (L) ou acétate (A) comme source énergétique (cons1) ou source carbonée (cons2) dans leur vitesse spécifique globale de consommation respective.

La production de lactate et acétate a aussi été modélisée par le modèle de Luedeking-Piret avec les deux termes de production liée à la croissance ( $q_L^{prod1}$  et  $q_A^{prod1}$ ) et non liée à la croissance ( $q_L^{prod2}$  et  $q_A^{prod2}$ ). Comme dans le cas du succinate, la production majoritaire de lactate au début de la culture est liée à la croissance ( $q_L^{prod1}$ ) avec une contribution maximale supérieure à 94 % à la vitesse spécifique globale de production ( $q_L^{prod}$ ), pour les différentes conditions de  $k_{LA}$  (Figures IV.13.A et IV.14.A). Les contributions les plus élevées de la production non liée à la croissance ( $q_L^{prod2}$ ), correspondant à 100 % de  $q_L^{prod}$ , ont été obtenues à la fin des cultures correspondant aux conditions optimales de production de cet acide organique ( $k_{LA}$  entre 5 et 20  $\text{h}^{-1}$ ) (Figures IV.13.A et IV.14.A). La figure IV.14.B montre que la contribution du terme de production d'acétate non liée à la croissance ( $q_A^{prod2}$ ) dans la vitesse spécifique de production  $q_A^{prod}$  est plus importante que celle calculée dans le cas du lactate et du succinate. La contribution maximale de ce terme (89 - 100 %) a été obtenue au début de la phase stationnaire pour des valeurs de  $k_{LA}$  de 5, 20 et 44  $\text{h}^{-1}$  (Figure IV.13.A). La vitesse maximale de production

liée à la croissance de cet acide organique  $q_A^{prod1}$  représente 70 – 80 % de la vitesse de production pour des  $k_{La}$  inférieurs à 44 h<sup>-1</sup> et 90 % pour les  $k_{La}$  de 90 et 118 h<sup>-1</sup>. Comme attendue, une contribution importante des deux termes de production de lactate et acétate est calculée pour la plupart des conditions de  $k_{La}$  correspondant aux conditions optimales de production de ces deux acides organiques.

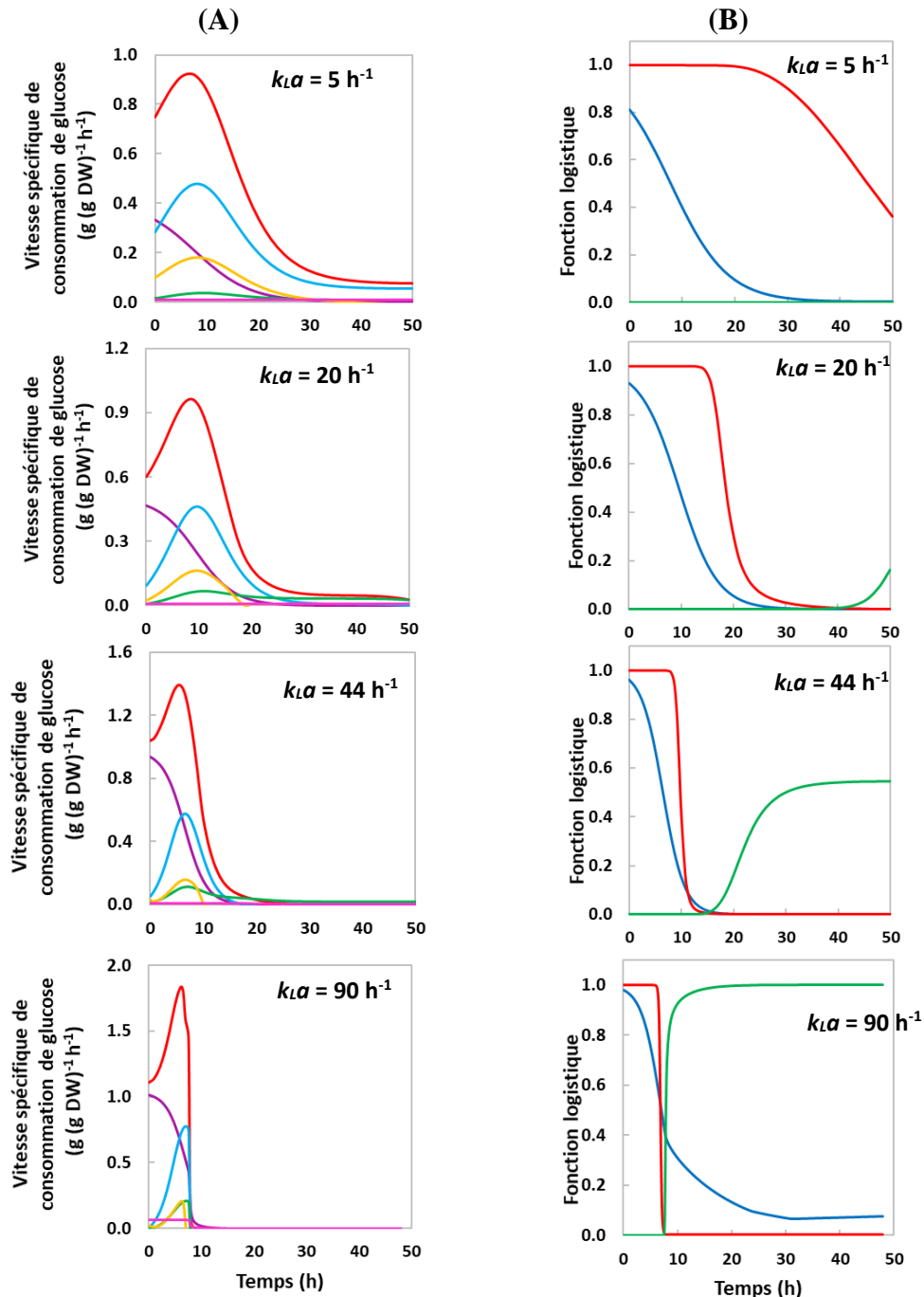
D'autre part, le modèle prend en considération la consommation de ces deux acides organiques comme source énergétique et carbonée. La consommation de ces deux acides organiques comme source énergétique est présentée par les termes de maintenance ( $q_L^{cons1}$  et  $q_A^{cons1}$ ) dont les valeurs sont constantes tout au long de la culture, pour les différentes conditions de  $k_{La}$  (Figures IV.14.A et IV.14.B). Les vitesses de consommation comme source carbonée ( $q_L^{cons2}$  et  $q_A^{cons2}$ ) sont nulles pour des  $k_{La}$  entre 0,6 et 44 h<sup>-1</sup> alors que des vitesses non nulles ont été obtenues à la fin des cultures avec  $k_{La}$  90 et 118 h<sup>-1</sup> (Figures IV.14.A et B). Dans ces dernières conditions, la contribution maximale de  $q_A^{cons2}$  et  $q_L^{cons2}$  à la vitesse spécifique globale de consommation ( $q_A^{cons}$  et  $q_L^{cons}$ ) (environ 66 %) est plus importante que celle de  $q_A^{cons1}$  et  $q_L^{cons1}$  (environ 34 %) (Figure IV.13.B). Comme dans le cas de la vitesse de croissance, l'activation des deux termes de consommation  $q_L^{cons2}$  et  $q_A^{cons2}$  est bien contrôlée par le produit  $\varphi_G(G) * (1 - \varphi_{O_2}(X))$ .



**Figure IV.14 :** Évolution des vitesses spécifiques de production et consommation de lactate (A) et d'acétate (B) au cours des cultures en fiole de *C. glutamicum* 2262, réalisées dans différentes conditions de  $k_L a$  : vitesses spécifiques de production liée à la croissance (—), non liée à la croissance (—), globale (—) et vitesse spécifique de consommation pour la maintenance (—) et pour la croissance (—).

Analyse de la structure de l'équation décrivant la vitesse spécifique de consommation de glucose

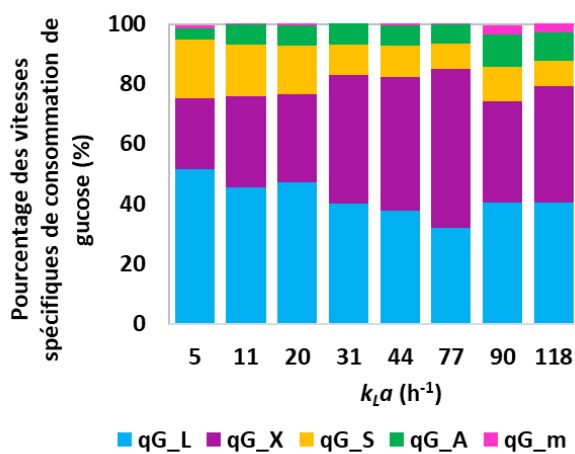
La figure IV.15.A représente les profils temporels de la vitesse spécifique globale de consommation de glucose  $q_G$  et ceux de chaque contribution ( $q_G^X, q_G^S, q_G^L$  et  $q_G^A$ ) à cette vitesse globale au cours des cultures réalisées avec  $k_{LA}$  5, 20, 44 et 90  $h^{-1}$ .



**Figure IV.125 :** (A) Évolution des vitesses spécifiques de consommation de glucose : globale (—), et associées à la production de lactate (—), à la production de succinate (—), à la production d'acétate (—) et à la croissance (—) au cours des cultures en fiole de *C. glutamicum* 2262, réalisées dans différentes conditions de  $k_{LA}$  (5, 20 44 et 90  $h^{-1}$ ). (B) : Évolution des valeurs des fonctions logistiques  $\varphi_G(G)$  (—),  $\varphi_G^S(G)$  (—) et la fonction de limitation en oxygène ( $1 - \varphi_{O_2}(X)$ ) (—) au cours du temps dans différentes conditions de  $k_{LA}$  (5, 20 44 et 90  $h^{-1}$ ).



Selon le niveau d'oxygénation, une production préférentielle des acides organiques et de la biomasse a été observée en se basant sur les profils de concentrations. Ceci est traduit par différentes valeurs et contributions de chaque terme associé à la production des acides organiques, à la croissance et à la maintenance, selon les valeurs de  $k_{LA}$ . La vitesse maximale de consommation de glucose  $q_G^{max}$  est synchronisée avec la production des trois acides organiques (Figure IV.15.A). La consommation de glucose associée à la croissance semble découplée de cette production d'acides organiques et a été enregistrée au début de la culture, correspondant à la phase de croissance maximale.



**Figure IV.16 :** Pourcentages des vitesses spécifiques de consommation de glucose associées à : la maintenance (■), la production d'acétate (■), la production de succinate (■), la croissance (■) et la production de lactate (■), par rapport à la vitesse spécifique maximale globale de la consommation de glucose.

À partir de ces profils, une contribution relative a été déterminée pour les différentes conditions de  $k_{LA}$  (Figure IV.16). Cette contribution relative est évaluée en prenant comme référence l'instant  $t_{q_G^{max}}$  et la valeur  $q_G^{max}$  de la vitesse spécifique maximale de consommation de glucose. Cette référence correspond donc à la période de production maximale d'acide organique (lactate, succinate et acétate) et non de croissance maximale. La vitesse spécifique de consommation en glucose associée à la production de lactate ( $q_G^L$ ) est plus importante (38 – 50 %). Ceci s'explique par la production majoritaire de lactate dans les différentes conditions de  $k_{LA}$ . Pour des  $k_{LA}$  faibles ( $= 5 h^{-1}$ ), correspondant aux conditions optimales de la production de succinate, la contribution maximale du terme  $q_G^S$  est environ 20 %. Plus le  $k_{LA}$  augmente, plus ce pourcentage diminue jusqu'à environ 9 % pour  $k_{LA} 118 h^{-1}$ . En revanche, l'augmentation du niveau d'oxygénation est accompagnée par une augmentation de la contribution du terme associé à la croissance ( $q_G^X$ ). Cette contribution varie entre 23 et 53 %. Pour l'acétate, la contribution du terme associé à sa production est faible (entre 4 et 11 %) pour les différentes conditions de  $k_{LA}$ . La contribution la plus faible correspond au terme associé à la maintenance

avec une contribution maximale de 3%. Ceci peut être expliqué par l'utilisation des acides organiques comme source énergétique.

Des analyses préliminaires ont été réalisées pour la mise en point de la méthodologie d'identification des paramètres du modèle développé. En se basant sur des simulations préliminaires, ces études ont permis de choisir un critère d'optimisation approprié ( $J_{\max}$ ), d'affiner le domaine utilisé. L'étude de sensibilité a permis d'identifier les paramètres les plus influençants du modèle et, surtout, a permis de définir comme constants les paramètres les moins influençants. De plus, une analyse structurelle du modèle a été réalisée en analysant les profils des vitesses et la contribution de chaque terme dans les vitesses globales. Cette étude a montré que la contribution de chaque terme est importante (supérieure à 50 %) pour au moins une des conditions de culture étudiées, justifiant ainsi sa présence dans le modèle. Afin d'avoir un modèle le plus générique possible, à savoir valable sur une large gamme de  $k_La$ , tous ces termes ont donc été maintenus dans le modèle. Ces études complémentaires confortent ainsi la fiabilité du modèle développé qui se base essentiellement sur les profils temporels des concentrations.

## 6. Conclusions du chapitre

Cette étude de modélisation cinétique a permis de développer un modèle cinétique décrivant la réponse physiologique d'une souche sauvage de *C. glutamicum* vis-à-vis du changement des conditions opératoires (niveau d'oxygénation et disponibilité en glucose). Ce modèle cinétique prend en considération à la fois la croissance sur glucose et acides organiques, montrant une consommation séquentielle de glucose et acides organiques selon la disponibilité en glucose et le niveau d'oxygénation. De plus, il présente des équations décrivant non seulement la production des acides organiques (lactate, succinate et acétate) mais aussi leur consommation comme source énergétique ou carbonée en fonction de la concentration en glucose résiduel et de la valeur de  $k_{LA}$ . L'impact de ces deux paramètres a été présenté par des fonctions logistiques. Les paramètres du modèle ont été identifiés par un algorithme génétique diploïde. Au préalable, des étapes de mise au point de la méthodologie de l'identification des paramètres (choix de critère d'optimisation et de domaine d'étude) ont été réalisées. Ainsi, une étude de sensibilité a montré que la prédiction par modèle est plus sensible aux variations des paramètres cinétiques que des paramètres numériques. Le degré de sensibilité du modèle aux variations de ces paramètres dépend non seulement du type de paramètre étudié mais aussi du niveau d'oxygénation. De plus, comme le modèle proposé est un modèle générique sur une large gamme de  $k_{LA}$  (entre 0,6 et 118 h<sup>-1</sup>), décrivant tous les phénomènes observés expérimentalement au cours des cultures en batch de *C. glutamicum* 2262, sa structure a été analysée en évaluant la contribution de chaque terme de production ou de consommation dans les vitesses globales de production ou de consommation. Une contribution importante de chaque terme présent dans le modèle, a été prouvée pour au moins une condition de  $k_{LA}$  étudiée. Puis, en comparant les concentrations expérimentales et celles simulées par le modèle (en utilisant les paramètres identifiés par l'AGD), une excellente concordance a été observée pour les différentes variables de processus (biomasse, glucose, lactate, succinate et acétate) obtenues à différentes conditions de  $k_{LA}$ . De même, une bonne corrélation a été observée et identifiée entre les paramètres cinétiques du modèle et  $k_{LA}$ . Cela a permis de confirmer et quantifier l'impact du niveau d'oxygénation sur le comportement de *C. glutamicum* 2262. Ces corrélations, appelées modèles secondaires, ont été intégrées dans le modèle proposé aboutissant à un modèle généralisé. Comme le modèle initial, ce modèle généralisé prédit parfaitement les cinétiques de croissance, de production/consommation des acides organiques et de consommation de glucose.

Dans un second temps, le modèle proposé a été transposé à une souche mutante, *C. glutamicum* 2262 $\Delta$ ldhA, afin de vérifier sa pertinence. Après une adaptation du modèle initial pour intégrer les spécificités de la souche mutante, la même méthodologie a été appliquée : identification des paramètres pour chaque  $k_La$  et généralisation du modèle initial en intégrant les modèles secondaires. Ces 2 modèles permettent de modéliser les cinétiques de croissance, la consommation de glucose et la production/consommation de succinate et acétate. Une très bonne concordance entre les concentrations simulées et celles obtenues expérimentalement au cours des cultures en fiole réalisées dans différentes conditions de  $k_La$  a également été observée.

Le modèle cinétique développé dans cette étude est donc capable de prédire les cinétiques de croissance, la consommation de glucose et la production/consommation d'acides organiques au cours des cultures batch. Il est intéressant de noter que la fiabilité du modèle a été vérifiée pour deux souches de *C. glutamicum* et toujours sur une large gamme de  $k_La$ . Mais, le modèle a été établi pour une seule concentration initiale en glucose, utilisée pour les différentes conditions de  $k_La$ . Il serait intéressant d'élargir la gamme de concentration initiale pour vérifier si la robustesse du modèle est maintenue. Le modèle est néanmoins déjà disponible pour mettre en place une démarche d'optimisation dynamique et multicritère visant à produire de manière optimale biomasse et succinate en utilisant la concentration en glucose et le  $k_La$  comme variables de commande.

Les travaux de ce chapitre ont permis d'étudier le comportement de *C. glutamicum* à l'échelle macro-cinétique (macroscopique). Pour mieux comprendre la réponse physiologique de *C. glutamicum* 2262 au changement du niveau d'oxygénation et de la disponibilité de glucose, il est apparu pertinent d'étudier les flux intracellulaires lors de ces cultures, en particulier les flux de la voie de synthèse de succinate. Cette étude est l'objet du chapitre suivant.

# Chapitre 5

---

## **V. Chapitre 5 : Développement d'un modèle métabolique simplifié de *C. glutamicum* : étude et compréhension de son comportement à l'échelle extra- et intracellulaire**

### **1. Introduction**

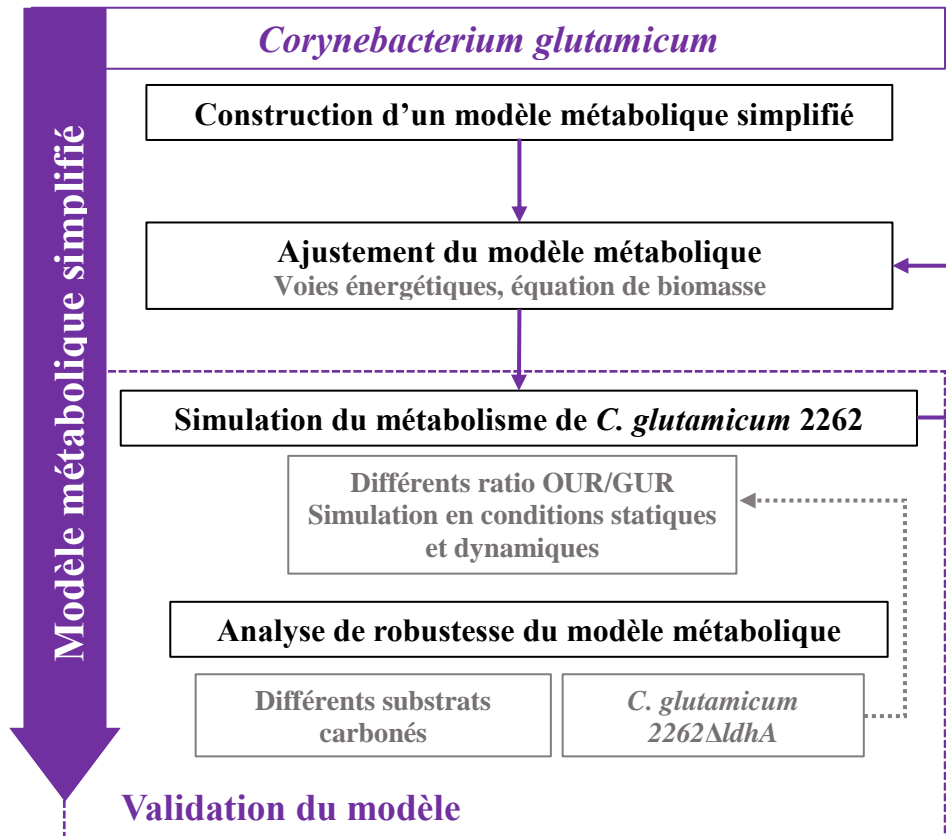
Outre la modélisation cinétique, la modélisation métabolique est une autre méthode largement utilisée pour étudier le fonctionnement des microorganismes. Cette méthode permet, non seulement, la prédiction de la production de certaines molécules d'intérêt (flux extracellulaires) mais aussi d'identifier et comprendre les voies intracellulaires aboutissant à la synthèse de ces molécules et donc au final de proposer des stratégies d'optimisation de la production.

Dans le cas de *C. glutamicum*, différents modèles métaboliques, complexes et simplifiés, ont été proposés pour prédire la production d'acides aminés, comme la lysine et la valine. Se basant sur ces modèles, différentes stratégies ont ainsi été proposées pour améliorer la production de ces acides aminés (Mei et al., 2016; Vallino and Stephanopoulos, 1994). Parmi ces modèles, certains ont aussi été utilisés pour la prédiction de la croissance en aérobiose. En revanche, peu de modèles ont été proposés pour la production des acides organiques. Shinfuku et al. (2009) ont construit un modèle complexe pour prédire le comportement de cette bactérie dans des conditions de limitation en oxygène. Il a été montré que ce modèle est capable de prédire la croissance et la production des acides organiques pour certaines conditions opératoires. Comme évoqué dans les précédents chapitres, une production maximale préférentielle des acides organiques a été identifiée selon le niveau d'oxygénation. Ainsi, un modèle cinétique proposé dans le présent travail prédit parfaitement ce comportement au cours des cultures en batch. Il semble donc intéressant de décrire plus en détail le métabolisme intracellulaire de cette bactérie dans ces conditions opératoires optimisées.

La première étape de cette partie du travail a consisté à construire un modèle métabolique simplifié pour *C. glutamicum*. Puis, ce modèle a été utilisé pour prédire le comportement de cette bactérie dans différentes conditions d'oxygénation et d'alimentation en glucose. Afin d'améliorer la prédiction de ce modèle, les voies énergétiques ont été ajustés en supprimant certaines réactions métaboliques. Trois équations de biomasse différentes ont été testées afin d'évaluer l'effet de ces dernières sur la fiabilité du modèle. Ensuite, des simulations, en conditions

stationnaires et dynamiques, du comportement de *C. glutamicum* 2262 ont été réalisées. Enfin, la robustesse du modèle a été analysée dans un premier temps en prédisant le métabolisme de croissance de *C. glutamicum* à partir d'acides organiques et, dans un second temps, en prédisant le comportement de *C. glutamicum* 2262 $\Delta$ ldhA dans différentes conditions d'oxygénation.

La stratégie suivie pour cette étude de modélisation métabolique est présentée dans la figure suivante :



**Figure V.1 :** Les étapes de construction et de validation d'un modèle métabolique simplifié pour *C. glutamicum* 2262.

## 2. Construction d'un modèle métabolique simplifié

La construction d'un modèle métabolique robuste est subdivisée en trois étapes principales : (1) la construction d'un réseau métabolique, (2) la conversion de ce réseau en une représentation mathématique et (3) la vérification de la robustesse du modèle proposé.

### 2.1. Réseau métabolique de *C. glutamicum*

Comme le premier objectif de ce travail est de créer un modèle métabolique simplifié, seules les informations considérées comme essentielles sont décrites dans ce réseau métabolique. Il est constitué du métabolisme central de *C. glutamicum*, de certaines réactions du métabolisme énergétique ainsi que des réactions de transport de substrats carbonés et énergétiques vers le cytoplasme et de métabolites intracellulaires en excès vers le milieu extérieur. Le choix des réactions de ce modèle a été basé sur d'autres modèles de *C. glutamicum* reportés dans la littérature (Mei et al., 2016; Shinfuku et al., 2009) et des bases de données comme KEGG et BioCyc.

#### 2.1.1. Métabolisme central

Le métabolisme central est représenté par les principales voies cataboliques et anaboliques. Il est constitué des voies principales comme la glycolyse (13 réactions), la voie des pentoses phosphate (8 réactions) et le cycle de Krebs (11 réactions) permettant de synthétiser les précurseurs nécessaires pour la production de biomasse (Annexe 1). De plus, comme l'objectif du modèle est de prédire la production des acides organiques, en particulier du succinate, les principales voies anaérobiques (PEP ou Pyruvate carboxylase et PEP carboxykinase) responsables de la production de cet acide organique en microaérobiose ont été ajoutées au modèle. Lors de la carboxylation de pyruvate ou PEP, *C. glutamicum* utilise le bicarbonate comme source de groupement carboxyle. Pour cela, une réaction d'équilibration entre  $\text{HCO}_3$  et  $\text{CO}_2$  a été ajoutée. Deux réactions de conversion du malate en pyruvate, catalysées par l'enzyme malique et la malate déshydrogénase 2, ont également été ajoutées comme voies anaérobiques. Le réseau métabolique proposé contient aussi le cycle du glyoxylate, nécessaire lors d'une croissance sur acétate. Cette voie est représentée dans le modèle par les réactions catalysées par l'isocitrate lyase et la malate synthase.

#### 2.1.2. Métabolisme énergétique

La difficulté majeure dans la construction d'un réseau métabolique simplifié est le choix des réactions impliquées dans le métabolisme énergétique. Considérant que le modèle métabolique



doit décrire la croissance et la production des acides organiques, nous avons choisi quelques réactions du métabolisme énergétique de *C. glutamicum*. *Corynebacterium glutamicum* est une bactérie aéro-anaérobie facultative ce qui implique que, selon le niveau d'oxygénation, cette bactérie adapte son métabolisme énergétique : respiration aérobie, respiration anaérobie en présence de nitrate et fermentation. Sa respiration aérobie est constituée de deux phases : un ensemble de réactions d'oxydo-réduction générant un potentiel électrochimique membranaire et une phosphorylation oxydative catalysée par l'ATPase. En se basant sur les données de la littérature et les bases de données métaboliques de cette bactérie (BioCyc, (Bott and Niebisch, 2003)), nous avons choisi d'incorporer dans le modèle les réactions catalysées par la NADH déshydrogénase (R\_ndh), la pyruvate quinone oxydoréductase (R\_pqo), la succinate déshydrogénase (R\_sdhCAB), la lactate déshydrogénase (R\_ldh) et la malate quinone oxydoréductase (R\_mqo) (Annexe 4). En revanche, les autres réactions impliquées dans la chaîne respiratoire comme les réactions d'oxydation du Glycérol-3P et de la L-Proline ne sont pas prises en compte étant donné que le modèle simplifié ne présente pas les voies de synthèse des acides aminés. Pour la deuxième phase de la respiration, le transfert des électrons peut être réalisé par des systèmes des cytochromes. Chez *C. glutamicum*, deux types de cytochromes existent : le cytochrome bd et le super-complexe cytochrome bc<sub>1</sub>-aa<sub>3</sub>. Certaines études de mutants privés de l'un des deux systèmes cytochromes chez *C. glutamicum* montrent que le super-complexe cytochrome bc<sub>1</sub>-aa<sub>3</sub> est prédominant en excès d'oxygène alors que la cytochrome bd oxydase qui présente une affinité élevée à l'oxygène, est plus utilisée dans des conditions de limitation en oxygène. Le modèle devant être utilisé essentiellement pour simuler le métabolisme de *C. glutamicum* en conditions micro-aérobies, seul le cytochrome bd a été pris en considération (Annexe 4). De plus, des réactions d'équilibration entre les différents cofacteurs présents dans le modèle, comme le NAD/NADH, NADP/NADPH et la vitamine ubiquinone UQ/UQH<sub>2</sub>, ont été intégrées dans ce réseau métabolique (R\_sdhA\_2, R\_tdh2 et R\_nadtrhd) (Annexe 4).

Outre les réactions impliquées dans la respiration, les voies de synthèse des acides lactique et acétique ont été ajoutées dans le réseau métabolique. La production de lactate est représentée par la réaction R\_ldh, catalysée par la lactate déshydrogénase. Pour la production d'acétate, en plus de la réaction R\_pqo impliquée dans la chaîne respiratoire, nous avons ajouté une deuxième voie impliquant l'ACCOA (R\_eutD et R\_ackA) (Annexe 3).

### 2.1.3. Réactions de transport

Ces réactions représentent le processus de passage de métabolites de l'intérieur de la cellule vers le milieu extracellulaire ou inversement. Chez *C. glutamicum*, il existe différents mécanismes de transport permettant l'entrée ou la sortie de métabolites. Certains mécanismes ne nécessitent pas d'énergie ; il s'agit de transports passifs. Le transport se fait selon un gradient de concentration ou électrochimique. Pour d'autres métabolites, le transport est facilité par une protéine telle que la perméase qui permet de transporter certains sucres. Un troisième type de mécanisme peut être utilisé pour le transport de métabolites, le transport actif. Ce type de mécanisme nécessite de l'énergie pour transporter la molécule contre le gradient électrochimique ; c'est le cas du système ABCt pour le transport de phosphate inorganique (ABCt\_Pi) (Annexe 5). Dans le réseau métabolique créé, la plupart des réactions de transport des métabolites sont passives (Annexe 5). Pour le transport des sucres (glucose, saccharose ou fructose), des réactions de transport par le système phospho-transférase (PTS) ont été ajoutées.

### 2.2. Modèle métabolique sous format SBML

Une fois le réseau métabolique construit, il a été converti au format SBML (System Biology Markup Language) qui est un format standard de base des données métaboliques. Ce modèle est constitué principalement de deux parties : la liste des métabolites et la liste des réactions. Comme certains métabolites peuvent se situer dans le cytoplasme ou dans le milieu extérieur (milieu de culture), la compartimentation doit être indiquée pour chaque métabolite de chaque réaction du modèle. Dans le modèle proposé, en plus des réactions métaboliques, une équation artificielle, appelée « Réaction de biomasse », présentant les précurseurs nécessaires à la production de 1 g de biomasse, a été ajoutée.

#### Équation de biomasse

La biomasse est représentée par la somme pondérée des métabolites, correspondant aux précurseurs nécessaires pour la multiplication cellulaire. Ces métabolites sont synthétisés via le métabolisme central (Figure V.2).

0,205 G6P[c] + 0,308 F6P[c] + 0,129 G3P[c]	Glycolyse
+ 1,295 3PG[c] + 0,652 PEP[c] + 2,604 PYR[c]	Glycolyse
+ 0,879 R5P[c] + 0,268 E4P[c]	Voie des pentoses phosphate
+ 3,177 ACCOA[c] + 1,68 OAA[c] + 1,224 AKG[c]	Cycle de Krebs
+ 16,429 NADPH[c] + 47,7 ATP[c]	Voie énergétique
→ 3,654 CO2[c] + 3,177 COA[c] + 16,429 NADP[c] + 47,7 ADP[c] + 47,7 Pi[c]	Coproduits

**Figure V.2 :** équation de biomasse pour *C. glutamicum* MH20-B22 (Marx et al., 1996a)

Les coefficients stœchiométriques de cette réaction s'expriment en mmol de précurseur par gramme de biomasse. Nous avons choisi d'utiliser, dans un premier temps, l'équation de biomasse de Marx et al. (1996a) car elle est la plus utilisée dans la littérature.

Le modèle initialement proposé dans cette étude (modèle initial) est constitué de **100 réactions** et de **75 métabolites**. Ce modèle est détaillé en annexes 3, 4 et 5.

### 2.3.Vérification du modèle initial dans différentes conditions d'oxygénation

Suite à la construction du modèle métabolique simplifié, il a été nécessaire de vérifier sa robustesse en réalisant, notamment, des simulations dans différentes conditions d'oxygénation : aéro-anaérobiose et microaérobiose.

#### 2.3.1. Méthodologie de simulation des flux

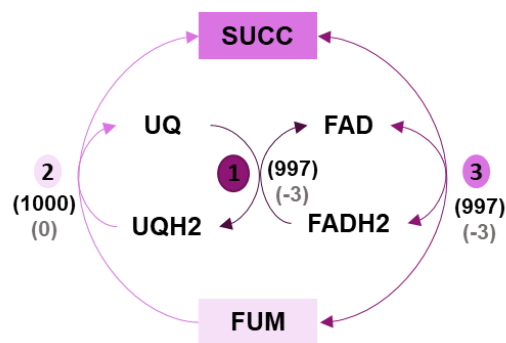
Le modèle métabolique proposé est un modèle sous-déterminé, autrement dit le nombre de réactions (des inconnus / des flux des réactions) est supérieur au nombre des métabolites (équations). Pour résoudre l'ensemble des équations représentant les variations des métabolites au cours du temps, nous avons choisi la méthode de résolution FBA. Le problème est ainsi formulé sous la forme d'un problème d'optimisation d'un critère, soumis à un ensemble de contraintes qui décrivent un équilibre pseudo-stationnaire pour chaque métabolite. Ce type de problème d'optimisation peut être résolu par une méthode de programmation linéaire. Cette méthode de résolution a été utilisée pour optimiser le flux de la réaction de biomasse (vitesse spécifique de croissance) sous différentes conditions d'oxygénation et d'apport en glucose, pour toutes les simulations présentées dans ce chapitre. Pour cette étape de vérification, le flux de consommation de glucose a été fixé à 7 mmol/ g DW/ h. Le flux d'apport d'oxygène est variable.

Les simulations FBA du modèle proposé ont été réalisées sous Matlab en utilisant Cobra Toolbox. Ce logiciel a la possibilité d'utiliser différents solveurs pour la programmation linéaire. Au début de cette étude, trois solveurs (glpk, matlab et gurobi) ont été testés. Des simulations préliminaires ont également été réalisées avec un autre logiciel, OptFlux. Les résultats obtenus avec les deux solveurs, matlab et glpk, et avec OptFlux sont similaires, exceptés quelques écarts observés en anaérobiose. En revanche, des résultats différents ont été obtenus avec le solveur gurobi. Ceux-ci pourraient être dû à des problèmes numériques, en particulier à une compatibilité imparfaite entre ce solveur et le logiciel COBRA.

Comme évoqué précédemment, des écarts entre les résultats obtenus avec le solveur matlab et glpk ont été observés dans des conditions d'absence d'oxygène. En fait, en utilisant le solveur matlab, une discontinuité a été observée ( $Ex_{O_2} = 0$  mmol/ g DW/ h) pour les flux de certaines réactions du modèle en passant de la microaérobiose à l'anaérobiose stricte (Tableau V.1). Pour vérifier s'il s'agissait d'un problème numérique ou pas, une valeur de type réel ( $Ex_{O_2} = 10^{-9}$  mmol/ g DW/ h) a été attribuée aux deux bornes du flux d'échange d'oxygène, à la place de 0 (type entier). Suite à ce remplacement, une absence de la discontinuité a été observée (Tableau V.1), confirmant qu'il s'agissait d'un problème numérique.

**Tableau V.1** : Flux d'oxygène et des acides organiques simulés par la méthode FBA à l'aide du logiciel COBRA, avec le solveur matlab.

	<b>(mmol/gDW/h)</b>		
<b>Ex_O<sub>2</sub></b>	<b>0.05</b>	<b>10<sup>-9</sup></b>	<b>0</b>
<b>Ex_Llac</b>	8.05	7.955	0
<b>Ex_Succ</b>	2.874	3.249	8.55
<b>Ex_Ac</b>	0	0	2.65



**Figure V.3 :** Flux simulés par le modèle métabolique initial en utilisant le solveur glpk (en gris) et matlab (en noir) (en mmol / gDW/ h). Les valeurs représentent les flux de la réaction R\_shdA\_2 (1), la réaction R\_sdhCAB (2) et la réaction R\_sucfum\_r (3).

Nous avons également constaté que les flux de certaines réactions, obtenus avec le solveur matlab atteignaient leur borne maximale de flux imposée (Figure V.3, Annexe 3 et 4). Ce problème est souvent rencontré pour des flux construisant un cycle (Lularevic et al., 2019). Comme montré figure V.3, les trois réactions, R\_shdA\_2, R\_sdhCAB et R\_sucfum, forment un cycle dont les produits de l'une des réactions sont consommés par les autres réactions. Pour la suite de ce travail, nous avons donc choisi d'utiliser le solveur glpk qui est le plus utilisé pour la résolution FBA des modèles métaboliques et qui ne conduit pas à des résultats aberrants.

Pour la suite de cette étude, les simulations ont été réalisées par la méthode de résolution FBA à l'aide du logiciel COBRA Toolbox et du solveur de programmation linéaire « glpk »

### 2.3.2. Simulation en aérobiose et anaérobiose

La première étape de vérification a consisté à simuler à l'aide du modèle métabolique proposé, le comportement de *C. glutamicum* 2262 en aérobiose et en anaérobiose. Dans les deux cas, le flux de consommation de glucose a été fixé à 7 mmol/ g DW/ h. Pour l'anaérobiose, l'apport en oxygène a été fixé à 0 mmol/ g DW/ h. La vérification a été réalisée au niveau extracellulaire et intracellulaire.

#### 2.3.2.1. Flux extracellulaires

Les flux extracellulaires du substrat et des produits, simulés par le modèle proposé, sont reportés dans le tableau V.2. Ce tableau présente aussi certaines données de la littérature pour comparaison.

**Tableau V.2 :** Résolution FBA du modèle métabolique initial de *C. glutamicum* en conditions aérobies et anaérobies. Les rendements de conversion du glucose en biomasse, CO<sub>2</sub>, et acides organiques, obtenus dans le présent travail et lors de précédentes études sont présentés en pourcentages, entre parenthèses.

Biomasse (h <sup>-1</sup> )	Production (mmol / g DW/ h)				Références
	CO <sub>2</sub>	Lactate	Succinate	Acétate	
<b>Aérobiose (Ex_O<sub>2</sub> = 11.88 mmol / g DW/ h)</b>					
0,7 (65 %)	15,02 (35 %)				<b>Ce travail</b>
(53 <sup>(1)</sup> %, 62 <sup>(2)</sup> %)	(39 <sup>(1)</sup> %, 38 <sup>(2)</sup> %)				(Shinfuku et al., 2009)
(53 <sup>(1)</sup> %, 66 <sup>(2)</sup> %)	-				(Shirai et al., 2007)
<b>Anaérobiose (Ex_O<sub>2</sub> = 0 mmol / g DW/ h)</b>					
0,21 (19 %)	1,12 (3 %)	10,65 (76 %)	0,22 (2 %)	0	<b>Ce travail</b>
(10 <sup>(1)</sup> %, 18 <sup>(2)</sup> %)	(- <sup>(1)</sup> %, 0 <sup>(2)</sup> %)	(65 <sup>(1)</sup> %, 68 <sup>(2)</sup> %)	(9 <sup>(1)</sup> %, 13 <sup>(2)</sup> %)	(2 <sup>(1)</sup> %, 1 <sup>(2)</sup> %)	(Shinfuku et al., 2009)

<sup>(1)</sup> : données expérimentales

<sup>(2)</sup> : données de simulation

Les résultats des simulations montrent que le glucose n'est converti qu'en biomasse (65 %) et CO<sub>2</sub> (35 %) dans le cas d'un excès en oxygène. Ces rendements carbonés, modélisés dans ces conditions d'oxygénation, sont proches des valeurs expérimentales obtenues au cours de la culture continue (55 % en biomasse et 25 % en CO<sub>2</sub>) (chapitre 3). Ils sont similaires à ceux reportés dans précédentes études (Mei et al., 2016; Shinfuku et al., 2009) (Tableau V.2). En anaérobiose, le modèle simule, en plus de la production de biomasse et de CO<sub>2</sub>, la production de lactate et de succinate. Il est admis que le lactate est le produit majoritaire du métabolisme de *C. glutamicum* à partir de glucose en anaérobiose (Käb et al., 2014; Okino et al., 2005; Shinfuku et al., 2009), ce qui est simulé par le modèle proposé (76 % du flux carboné consommé). Mais, dans le cas du succinate, le flux de production de succinate simulé (2 %) est inférieur à ceux trouvés dans des études précédentes. Selon Shinfuku et al. (2009), le rendement carboné de conversion du glucose en succinate est de l'ordre de 13 % ou 9 %, *in vivo* ou *in silico*, respectivement. De plus, une différence au niveau des flux de production d'acétate a été constatée entre les résultats de simulation et les données de Shinfuku et al. (2009).

Le modèle proposé est donc capable de simuler la production de biomasse en aérobiose alors qu'en anaérobiose, des différences ont été constatées dans le cas de la prédiction de la production

de succinate et acétate. Afin de comprendre ce comportement, nous avons étudié la répartition des flux carbonés intracellulaires.

### 2.3.2.2. Répartition des flux carbonés intracellulaires

Les flux intracellulaires de certaines réactions du modèle, simulés en aérobiose et en anaérobiose sont reportés dans le tableau V.3 et dans la figure V.4. Le tableau V.3 présente les flux intracellulaires des réactions correspondant à l'entrée des différentes voies du métabolisme central en aérobiose ainsi que les valeurs de ces flux obtenues dans d'autres études (expérimentales ou issues de modélisation).

**Tableau V.3 :** Comparaison des flux intracellulaires de réactions du métabolisme de *C. glutamicum*, simulés par le modèle « initial » avec ceux reportés dans la littérature. Les résultats de flux intracellulaires issus de la littérature correspondent à des données expérimentales et des données de simulation par d'autres modèles. Les flux sont présentés en pourcentage par rapport au flux de glucose.

Voie PPP	Voie anaplérotique		cycle de Krebs	Références
	G6P – Ru5P	PEP - OAA	PYR - OAA	
<b>Modélisation</b>				
0	0	0	62	<b>modèle initial (ce travail)</b>
37	19	0	53	(Mei et al., 2016)
47	30	0	65	
61	40	0	51	(Kjeldsen and Nielsen, 2009b)
84	48	0	38	
69	41	0	46	(Vallino and Stephanopoulos, 1994)
<b>Expérimentale</b>				
40	37	0	109	(Mei et al., 2016)
36	-	12	31	(Marx et al., 1997)
20	63		27	(Dominguez et al., 1998)
27	77	-	95	(Petersen et al., 2000)
45	38		62	(Rollin et al., 1995)

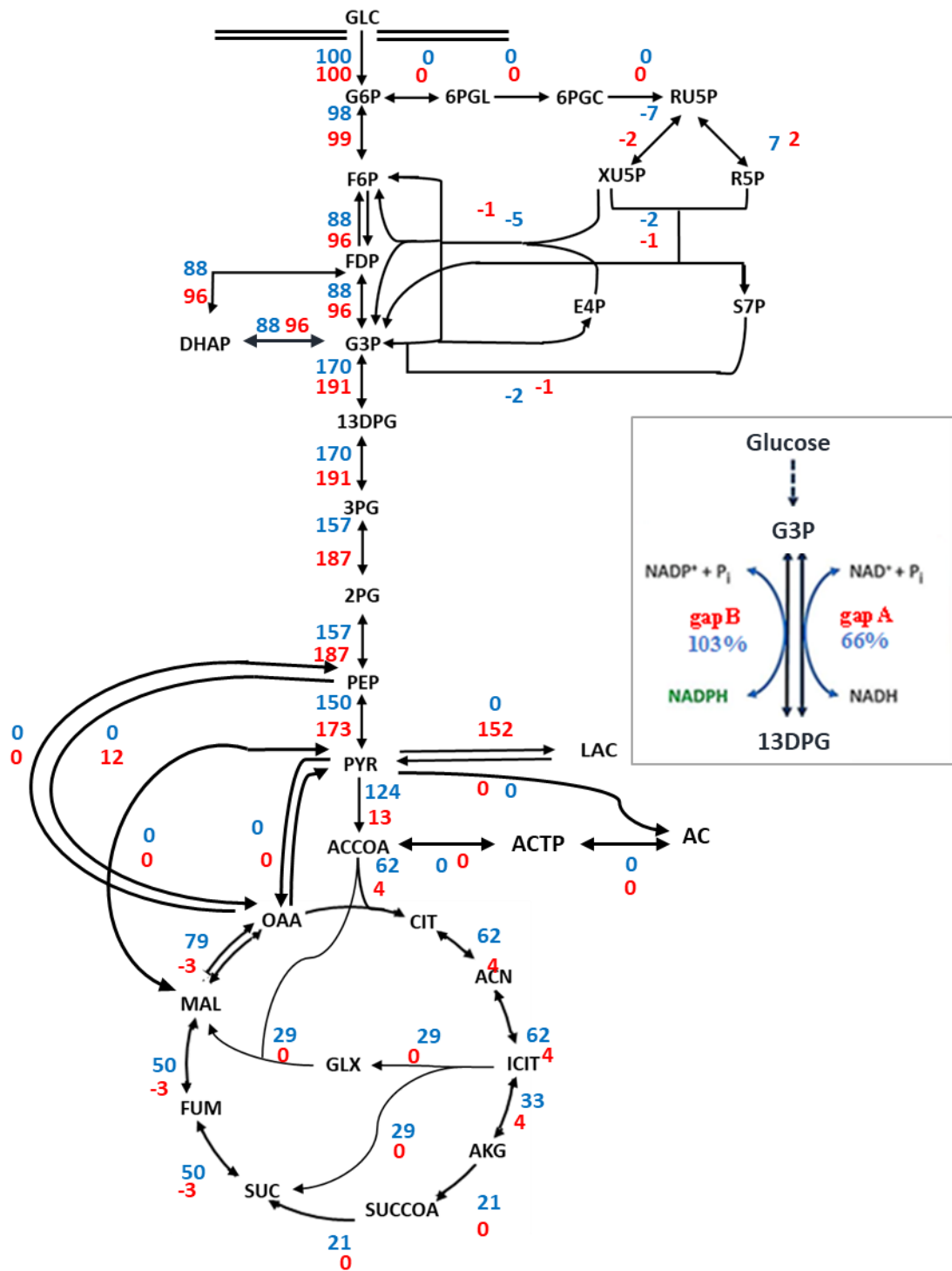
\* : flux de R\_gltA

La figure V.4 présente les flux intracellulaires, simulés en aérobiose et en anaérobiose, à travers le métabolisme central. Tout le glucose pénètre dans le cytoplasme de *C. glutamicum* via le système phospho-transférase (PTS) (100 % du flux de consommation de glucose). Ceci est cohérent avec les données de la littérature qui ont montré que le système PTS est le transporteur principal de glucose chez cette bactérie et que la contribution d'autres transporteurs comme le

système perméasique n'a été enregistré que dans des conditions d'excès en glucose engendrant une croissance élevée (Cocaign-Bousquet et al., 1996; Gourdon et al., 2003; Parche et al., 2001). En comparant les résultats de simulation de ces flux intracellulaires avec les données de la littérature, un écart important a été constaté au niveau de certaines réactions, en particulier celles impliquées dans la voie des pentoses phosphate et les voies anaplérotiques (Tableau V.3). Chez *C. glutamicum*, la voie des pentoses phosphate est la principale voie de production du cofacteur NADPH<sub>2</sub> (Cocaign-Bousquet et al., 1996; Dominguez et al., 1998). Or, les flux simulés par le modèle, à travers la partie oxydative de cette voie, sont nuls, ce qui pourrait être dû à l'intervention d'une autre voie de production de ce cofacteur telle que la réaction R\_gapB (Figure V.4). De même, les flux simulés pour les réactions des voies anaplérotiques sont nuls. Comme montré figure V.4, l'OAA, nécessaire pour l'approvisionnement du cycle de Krebs, est produit via la voie du glyoxylate. Néanmoins, d'après plusieurs études, la pyruvate carboxylase et la PEP carboxylase sont les deux enzymes responsables de la génération de l'oxaloacétate dans ces conditions opératoires (glucose/excès en oxygène) (Eikmanns et al., 1989; Inui et al., 2004; Park et al., 1997b; Petersen et al., 2000; Peters-Wendisch et al., 1997). De même, il a été montré que la voie du glyoxylate est inactive lors d'une croissance de *C. glutamicum* sur les carbohydrates comme le glucose (Gerstmeir et al., 2003; Inui et al., 2004). Donc, bien que macroscopiquement, le modèle soit capable de prédire la production de biomasse en aérobiose, l'analyse au niveau intracellulaire montre que l'utilisation de certaines voies est limitée dans ces conditions d'oxygénation, ce qui est en contradiction avec les données de la littérature.

En anaérobiose, les résultats de simulation montrent que la voie anaplérotique catalysée par la PEP carboxylase est active ainsi que la branche réductrice du cycle de Krebs. Ces deux voies représentent les voies principales de production de succinate chez *C. glutamicum* en anaérobiose ou microaérobiose. Un faible pourcentage du flux de glucose passe par la branche réductrice du cycle de Krebs et donc par la voie de synthèse de succinate (3 %) alors que 152 % sont utilisés par la voie de synthèse de lactate, ce qui est cohérent avec l'analyse des flux extracellulaires. Ces résultats restent toutefois différents des données expérimentales de Shinufuku et al. (2009) selon lesquels 130 %, 13 % et 5% du flux de glucose ont été utilisés, en anaérobiose, par la voie de synthèse de lactate, succinate et acétate, respectivement. Ainsi, pour vérifier si le modèle simule une production limitée de succinate et d'acétate également en microaérobiose, des simulations ont été faites en variant le flux d'oxygène.

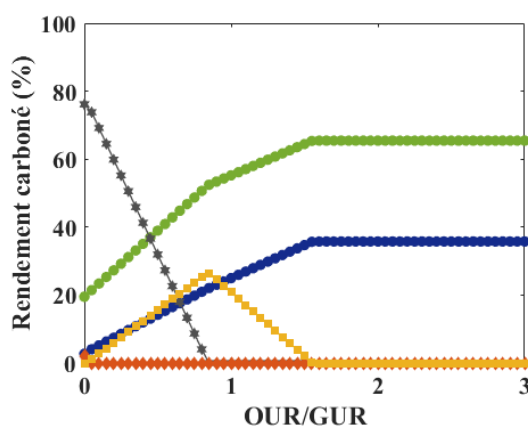




**Figure V.4 :** Modélisation des flux intracellulaires de *C. glutamicum*, par le modèle initial, en condition aérobie (en bleu) et en anaérobiose (en rouge). Les valeurs négatives de certains flux indiquent une réaction inverse.

### 2.3.3. Simulation en microaérobiose

Lors de la phase de transition de l'aérobiose à l'anaérobiose, *C. glutamicum* adapte son métabolisme en changeant l'utilisation des voies métaboliques, ce qui permet d'établir l'équilibre redox intracellulaire. L'influence du niveau d'oxygénation sur le comportement de cette bactérie a été étudié par Shinfuku et al. (2009), en se basant sur des données expérimentales et de simulations du modèle métabolique iYS432. La répartition des flux carbonés a été reportée en fonction du ratio OUR/GUR. Pour vérifier la robustesse du modèle initial proposé, nous avons comparé nos résultats à ceux de cette étude. Des simulations ont été réalisées en variant l'apport en oxygène entre 0 mmol / g DW/ h (anaérobiose) et 21 mmol/ g DW/ h (aérobiose) permettant d'avoir des ratios OUR/GUR compris entre 0 et 3. Les résultats de ces simulations sont présentés par des rendements de conversion du glucose en produits carbonés en fonction du ratio OUR/GUR (Figure V.5).



**Figure V.5 :** Modélisation de l'impact du rapport OUR/GUR sur les rendements carbonés de conversion du glucose en lactate (\*), succinate (◆), acétate (■), biomasse (●) et CO<sub>2</sub> (●). Les flux ont été simulés par le modèle initial.

L'étude de Shinfuku et al. (2009) met en évidence cinq phases différentes selon les ratios OUR/GUR (Figure I.22). Cependant, le modèle initialement proposé dans notre étude prédit seulement trois phases : (1) une phase de production maximale de biomasse, à partir OUR/GUR de 1,6 , (2) une phase marquée par la production d'acétate, pour un OUR/GUR compris entre 0,85 et 1,6 et (3) une phase de production de lactate pour un OUR/GUR inférieur à 0,85. Le modèle initial est incapable de prédire la production de succinate que ce soit en micro-aérobiose ou en anaérobiose alors que, les données expérimentales (voir chapitre 3) et de la littérature prouvent que *C. glutamicum* est capable de produire des quantités importantes de succinate dans des conditions de limitation en oxygène.

Les résultats obtenus au cours de cette étape initiale de validation du modèle montre qu'il présente des limitations/lacunes pour décrire certains flux de matière intracellulaires, en particulier au niveau de la voie des pentoses phosphate et des voies anaplérotiques impliquées dans la synthèse du succinate. Pour résoudre ce problème, deux solutions sont envisageables, soit l'ajustement du métabolisme énergétique en ajoutant ou en supprimant certaines réactions métaboliques, importantes mais omises dans la première version du modèle, soit l'adaptation de l'équation de la biomasse.

## 2.4. Ajustement du modèle

### 2.4.1. Ajustement du métabolisme énergétique

Dans le modèle initial, il existe différentes réactions impliquant le NADPH et, en particulier, la réaction de phosphorylation du glycéraldéhyde-3P (GAP) en 1,3-biphosphoglycérate (1,3BPG). Celle-ci peut être catalysée par deux enzymes distinctes : la glyceraldéhyde-3P déshydrogénase A (Gap A) et la glyceraldéhyde-3P déshydrogénase B (Gap B). La réaction catalysée par l'enzyme Gap B permet de réduire le NADP en NADPH, c'est la réaction annotée gap B dans le modèle (Figure V.4). La deuxième enzyme permet de réduire le cofacteur NAD en NADH (réaction gap A) (Figure V.4). D'autre part, les résultats de la simulation du modèle initial montrent que le cofacteur NADP est majoritairement réduit par la réaction gap B (103 % du flux de glucose). Cette réaction fournit donc une part importante du besoin en NADPH pour la croissance bactérienne ce qui peut expliquer que le modèle ne nécessite pas le fonctionnement de la voie des pentoses phosphate pour le soutien des besoins en NADPH. Cependant, il a été montré (Omumasaba et al., 2004) que Gap A était indispensable pour la croissance de *C. glutamicum* sur glucose comme seule source de carbone et d'énergie et que l'absence de Gap B n'avait pas d'effet sur la croissance de cette bactérie dans ces conditions. Le modèle initial a donc été modifié en conséquence, en supprimant la réaction catalysée par Gap B. En absence de cette réaction, en aérobiose et avec un taux de consommation de glucose de 7 mmol/ g DW/ h, le flux d'entrée dans la voie des pentoses phosphate passe à environ 59 % (4,10 mmol/gDW/h) (Annexe 13.a). Cet ajustement a aussi permis d'améliorer le flux dans la voie anaplérotique, en particulier dans la réaction R\_ppc (29 %, Annexe 13.a). Ces pourcentages sont cohérents avec des résultats reportés par des études précédentes (Tableau V.3). Cependant, en se basant sur les résultats de simulations en aérobiose et en anaérobiose (Annexe 13.b), les flux extracellulaires de production de biomasse et d'acides organiques simulés par le modèle initial, avec ou sans R\_gapB, ne sont pas significativement différents. Donc, même si la modification appliquée au modèle a permis d'obtenir un flux à travers la voie des pentoses phosphate proche de ceux

précédemment décrits, le flux de production de succinate reste toujours éloigné de celui précédemment décrit par Shinfuku et al (2009). D'autre part, dans le modèle, il existe deux réactions d'équilibre entre les cofacteurs NADH et NADPH (R\_tdh2 et R\_nadtrhd). Le flux de l'une de ces deux réactions, catalysée par la NADP transhydrogénase (R\_tdh2), est toujours nul quelles que soient les conditions opératoires testées. De plus, il a été précédemment suggéré qu'il n'y avait pas d'activité NADP transhydrogénase chez *C. glutamicum* (Yamauchi et al., 2014). Nous avons donc choisi de la supprimer du modèle.

Le modèle ajusté (Tableau V.4), c'est-à-dire le modèle sans la réaction R\_gapB et R\_tdh2, a été conservé pour la suite du travail.

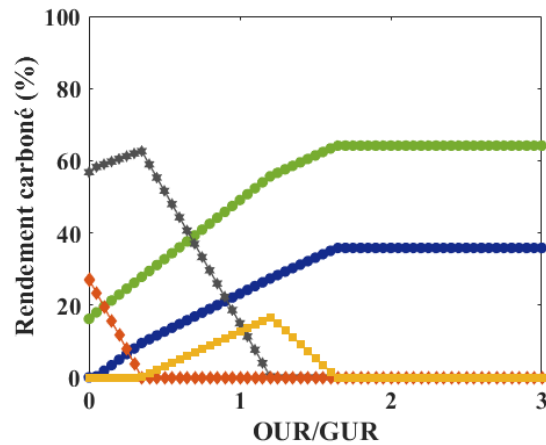
**Tableau V.4 :** Caractéristiques du modèle métabolique ajusté de *C. glutamicum*

Modèle métabolique ajusté				
Réactions (98)			Métabolites (75)	
Intracellulaires	Transport	Échange	Intracellulaires	Extracellulaires
56	23	19	53	22

Afin de vérifier les ajustements appliqués sur le métabolisme énergétique, le modèle ajusté a été utilisé pour simuler le comportement de *C. glutamicum* en aérobiose, en anaérobiose et en microaérobiose. Les flux extracellulaires de production de biomasse et des acides organiques, simulés en aérobiose et en anaérobiose, sont reportés dans le tableau V.5. La répartition des rendements carbonés selon les ratios OUR/GUR est présentée figure V.6.

**Tableau V.5 :** Résolution FBA du modèle ajusté de *C. glutamicum* 2262 en conditions aérobies et anaérobies

Modèle métabolique ajusté		
	Aérobiose	Anaérobiose
<b>Consommation</b> (mmol/gDW/h)		
<b>Glucose</b>	7	
<b>O<sub>2</sub></b>	11.49	0
<b>Production</b> (mmol/gDW/h)		
<b>Biomasse (h<sup>-1</sup>)</b>	0.69	0.18
<b>CO<sub>2</sub></b>	15.05	-0.53
<b>Lactate</b>	0	8.05
<b>Succinate</b>	0	2.87
<b>Acétate</b>	0	0



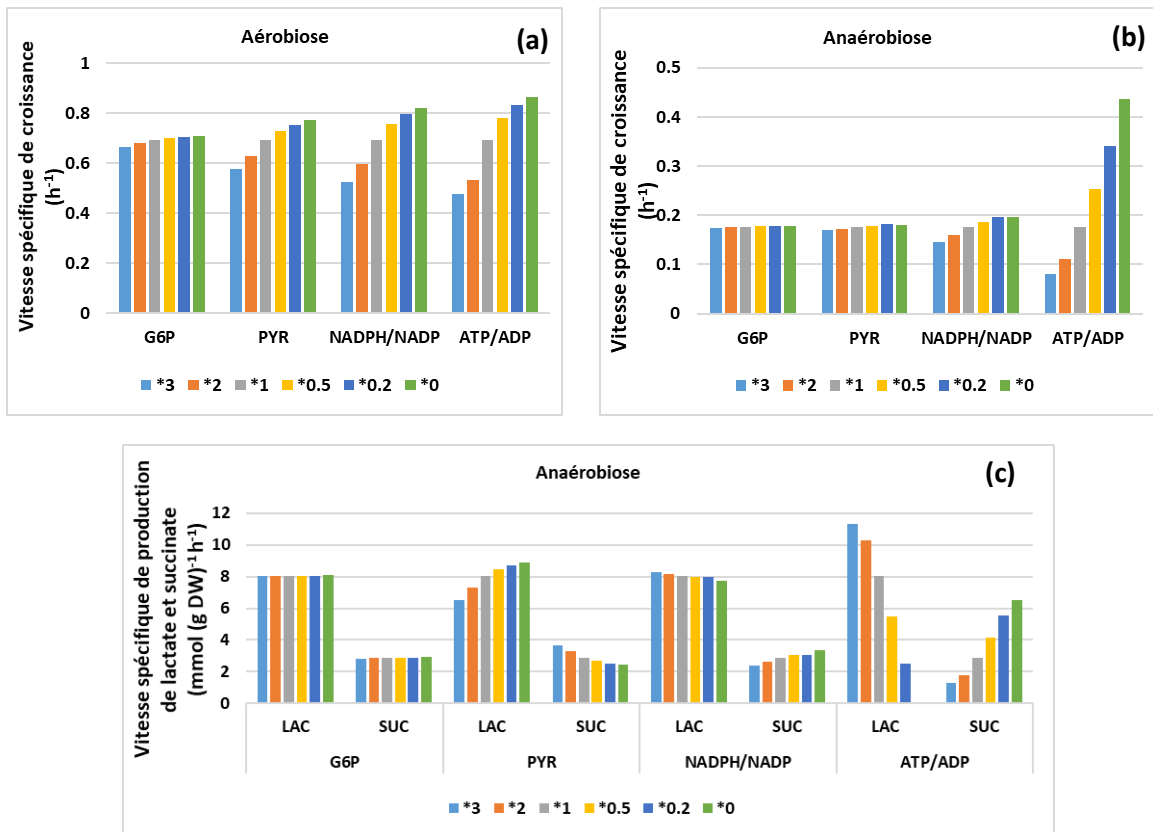
**Figure V.6 :** Modélisation de l'impact du rapport OUR/GUR sur les rendements carbonés de conversion du glucose en lactate (\*), succinate (◇), acétate (■), biomasse (●) et CO<sub>2</sub> (●). Les flux ont été simulés par le modèle ajusté.

En comparant les résultats des simulations par le modèle initial avec ceux obtenus avec le modèle ajusté, nous avons constaté que les flux extracellulaires simulés en aérobiose sont similaires pour les deux modèles. Mais, le modèle ajusté simule mieux la production des acides organiques en anaérobiose et microaérobiose. En particulier, il est à noter que ce modèle est capable de prédire la production de succinate en microaérobiose (pour des ratios OUR/GUR faibles). Les résultats de ces simulations seront discutés plus en détails, plus loin dans la partie « Simulation stationnaire ».

#### 2.4.2. Ajustement de l'équation de production de biomasse

La réaction de production de biomasse du modèle ajusté a été établie à partir d'une culture continue de *C. glutamicum* MH20-22B (Marx et al., 1996a). À partir des besoins en acides aminés, Marx et al. (1996) ont déterminé les besoins en métabolites et en cofacteurs de cette souche. Mais, ces besoins peuvent varier d'une souche à l'autre ainsi que selon les conditions opératoires. Une analyse de sensibilité du modèle à chaque coefficient de l'équation de la biomasse a donc été menée, pour différentes conditions d'oxygénation, afin d'évaluer l'influence des coefficients stœchiométriques de cette équation sur la prédiction des flux de croissance et de production des acides organiques. Le domaine de perturbation des coefficients stœchiométriques dans cette analyse varie de -100 % (multiplication par un facteur 0) à +200 % (multiplication par un facteur 3).

L'étude de la sensibilité a été effectuée pour une alimentation de glucose fixée à 7 mmol/ g DW/ h. Deux cas d'oxygénation ont été étudiés ; l'aérobiose (apport en oxygène maximale d'environ 38 mmol/gDW/h) et l'anaérobiose (apport en oxygène nul). Les résultats sont présentés dans la figure V.7.



**Figure V.7 :** Évolution des vitesses spécifiques de production de biomasse en aérobiose (a) et des vitesses spécifiques de production de biomasse (b), de lactate et de succinate (c) en anaérobiose, simulées par le modèle ajusté, en multipliant le coefficient stœchiométrique de certains précurseurs de la biomasse par un facteur 0 (—), 0,2 (—), 0,5 (—), 1 (—), 2 (—), ou 3 (—).

En aérobiose, le changement de la valeur de la majorité des coefficients stœchiométriques attribués à chacun des précurseurs nécessaires à la synthèse de biomasse n'a pas d'influence notable sur le flux de production de biomasse et de CO<sub>2</sub> (Figure V.7.a). Seule la diminution du coefficient du pyruvate induit une augmentation du flux de synthèse de biomasse jusqu'à 0,77 g / g DW/ h lorsque le pyruvate est supprimé de l'équation de la biomasse. Par contre, la diminution des coefficients de l'ATP et du NADPH engendre une augmentation plus importante du flux de production de biomasse d'environ 20 et 15 % avec un coefficient de 9,54 et 3,26 mmol /g DW respectivement (au lieu de 47,7 et 16,29 mmol/ g DW).

En anaérobiose, seuls les résultats de l'étude de sensibilité pour la production de succinate, de lactate et de biomasse sont présentés (Figure V.7.b et V.7.c). Dans ces conditions, seul le coefficient de l'ATP influence la production de biomasse. Une réduction d'un facteur 5 des besoins en ATP engendre une augmentation du flux de la production de biomasse (0,34 g/ g DW/ h) d'un facteur deux par rapport au coefficient initial (0,17 mmol/gDW/h). Les synthèses de lactate et de succinate dépendent également significativement du coefficient de l'ATP. En effet, la diminution du coefficient de l'ATP se traduit par une augmentation du flux de synthèse de

succinate. Une réduction d'un facteur 5 de ce coefficient augmente le flux de synthèse de ce métabolite jusqu'à 5,55 mmol/ g DW/ h (contre 2,87 mmol/ g DW/ h avec le coefficient initial) alors que le flux de production de lactate diminue jusqu'à 2,51 mmol/ g DW/ h (contre 8,05 mmol/ g DW/ h avec le coefficient initial). De plus, la production de ces deux acides organiques dépend du coefficient du pyruvate. La diminution des besoins en pyruvate pour la croissance augmente le flux de ce métabolite dans la voie de production de lactate et, par voie de conséquence, diminue la production de succinate. Cette étude de sensibilité montre au final que le coefficient stœchiométrique de l'ATP est le levier principal de modulation de la production de la biomasse, du succinate et du lactate.

Certaines modifications du modèle métabolique initialement proposé, ont permis d'améliorer la simulation de comportement de *C. glutamicum* dans différentes conditions d'oxygénation. Ces modifications ont permis non seulement une meilleure validation des flux extracellulaires simulés (production de succinate) mais aussi des flux intracellulaires (voie des pentoses phosphate et voies anaplerotiques). Ce modèle ajusté a donc été conservé pour la suite de ce travail. L'étude de sensibilité du modèle aux coefficients stœchiométriques des précurseurs dans l'équation de biomasse, a montré que certains coefficients, et en particulier celui de l'ATP, influencent énormément la prédiction de la croissance et de la production des acides organiques par le modèle métabolique proposé. Pour cette raison, dans la suite de ce travail, l'utilisation de trois équations de biomasse différentes issues de la littérature (Annexe 1) dans le modèle ajusté (Tableau V.4) a été comparée lors de simulations du comportement de *C. glutamicum* sous différentes conditions d'oxygénation.

### **3. Validation du modèle ajusté**

#### **3.1. Simulation du métabolisme de *C. glutamicum* sous différents ratios OUR/GUR**

Des simulations ont été réalisées par le modèle ajusté dans différentes conditions d'oxygénation et d'alimentation en glucose et en évaluant chacune des trois équations de biomasse. Par la suite, le modèle ajusté précédemment utilisé sera appelé modèle ajusté 1, le modèle ajusté utilisant l'équation de biomasse issue de travaux de Coccagn-Bousquet et al. (1996) sera appelé modèle ajusté 2 et celui utilisant l'équation de biomasse issue de travaux de Coccagn-Bousquet et Lindley (1995) sera nommé modèle ajusté 3 (Annexe 1).

### 3.1.1. Simulation de la production de biomasse et des acides organiques en conditions stationnaires

Les résultats de simulations ont été comparés, dans un premier temps, avec des données de simulation issues de la littérature et, dans un second temps, avec des données expérimentales (voir chapitre 3 et Shinfuku et al., 2009).

#### 3.1.1.1. Comparaison des flux extracellulaires simulés par les trois modèles ajustés

##### Comparaison avec des données de simulation (Shinfuku et al., 2009)

La production de biomasse et des acides organiques par *C. glutamicum* 2262 a été simulée par les trois modèles ajustés en imposant un flux d'alimentation en glucose à 7 mmol / g DW/ h. L'apport en oxygène a été varié entre 0 et 21 mmol / g DW/ h. La répartition des rendements carbonés en fonction des ratios OUR/GUR est présentée dans l'Annexe 14. Le tableau V.6 reporte les rendements maximaux de production de biomasse et des acides organiques ainsi que les ratio OUR/GUR correspondant au déclenchement et à l'arrêt de la production de l'un des produits (biomasse ou acides organiques).

**Tableau V.6 :** Comparaison des intervalles de rapport OUR/GUR obtenus à partir des trois modèles métaboliques ajustés et du modèle de Shinfuku et al. (2009) pour la production de biomasse, de CO<sub>2</sub>, de lactate, de succinate et d'acétate. Les pourcentages des rendements carbonés maximaux sont présentés entre parenthèses.

	OUR/GUR	Modèle ajusté 1	Modèle ajusté 2	Modèle ajusté 3	Shinfuku et al., 2009
<b>Biomasse CO<sub>2</sub></b>	<b>Min</b> <sup>(1)</sup>	0	0	0	0
	<b>Opt</b> <sup>(2)</sup>	> 1,65 (64 %, 36 % <sup>(4)</sup> )	> 1,3 (80 %, 20 %)	1,55 (67 %, 33 %)	> 2 (62 %, 38 %)
	<b>Max</b> <sup>(3)</sup>	1,65	1,3	1,55	2
<b>Lactate</b>	<b>Min</b>	0	0	0	0
	<b>Opt</b>	0,35 (63 %)	0 (42 %)	0,1 (49 %)	0 (68 %)
	<b>Max</b>	1,2	1,15	1,3	1,3
<b>Succinate</b>	<b>Min</b>	0	0	0	0
	<b>Opt</b>	0 (27 %)	0 (36 %)	0 (36 %)	0,1 (≈ 25 %)
	<b>Max</b>	0,35	0,65	0,65	0,4
<b>Acétate</b>	<b>Min</b>	0,35	0,6	0,6	0,4
	<b>Opt</b>	1,2 (17 %)	1,1 (7 %)	1,3 (10 %)	1,3 (20 %)
	<b>Max</b>	1,65	1,3	1,55	2

<sup>(1)</sup> : ratio OUR/GUR qui correspond au début de la phase de production d'un produit.

<sup>(2)</sup> : ratio OUR/GUR qui correspond à la fin de la phase de production d'un produit.

<sup>(3)</sup> : ratio OUR/GUR qui correspond au rendement maximal de la production d'un produit.



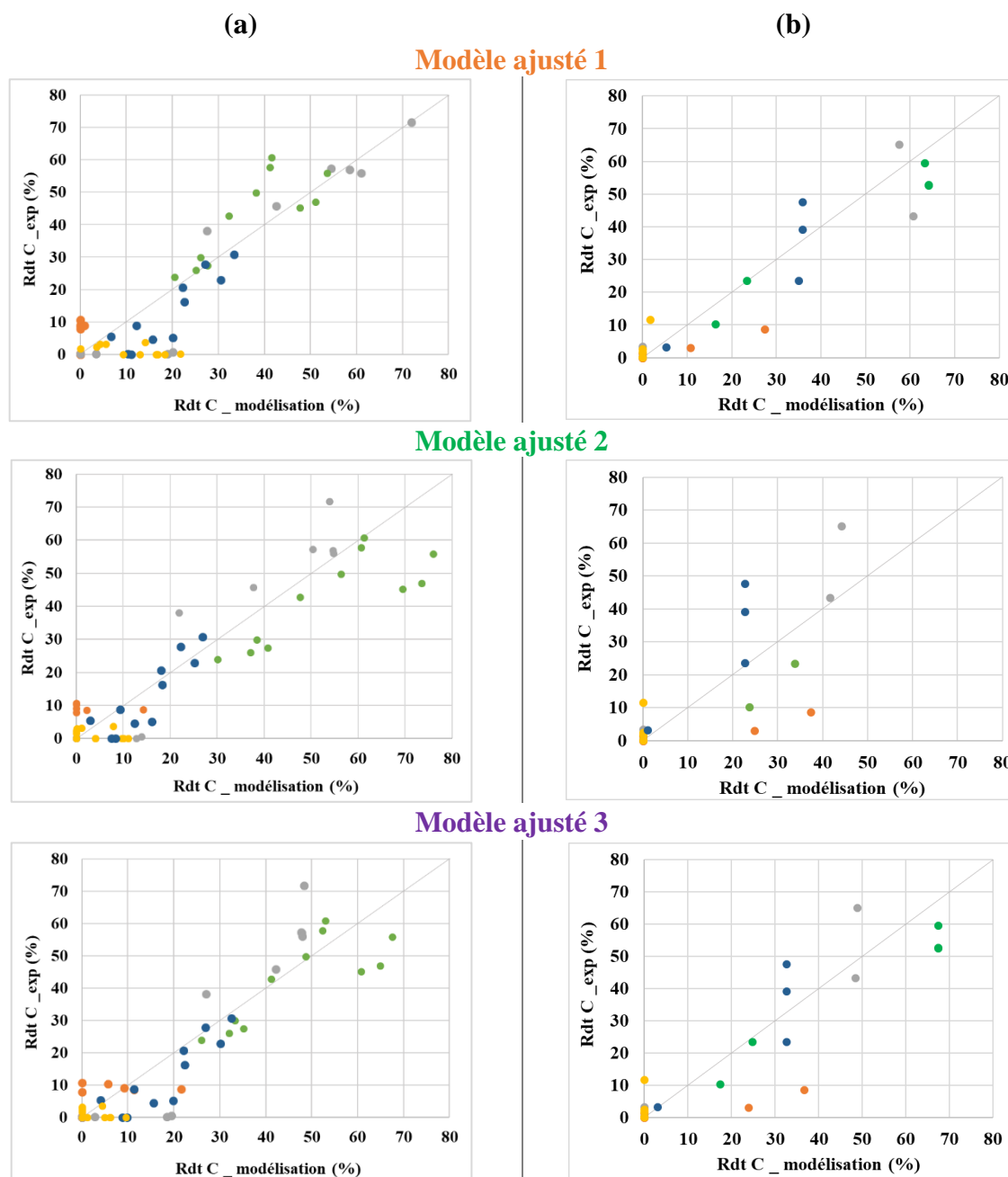
---

<sup>(4)</sup>: la première et la deuxième valeur correspondent au rendement maximal de la production de biomasse et de CO<sub>2</sub> respectivement.

Quelle que soit l'équation de biomasse utilisée, le modèle ajusté est capable de prédire le même comportement de *C. glutamicum* que celui décrit par le modèle complet iYS432 (Shinfuku et al., 2009) (Tableau V.6 et Annexe 14). Cependant, même si quatre des cinq phases métaboliques identifiées par Shinfuku et al. (2009) ont été bien retrouvées, la cinquième phase ( $0 < \text{OUR/GUR} < 0,1$ , Figure I.22) est absente. Shinfuku et al. (2009) ont expliqué la présence de cette dernière, par l'activation de l'enzyme malique qui permet de convertir le malate en pyruvate, transformé par la suite en lactate. En outre, alors que les simulations avec les modèles ajustés 1 et 3 sont proches de celles obtenues par le modèle de Shinfuku et al. (2009), des écarts plus importants ont été observés avec le modèle ajusté 2. Il est à noter que les modèles ajustés 1 et 3 sont capables de simuler les mêmes flux de production de biomasse, de succinate, de lactate et d'acétate que le modèle de Shinfuku et al. (2009) alors que celui-ci est un modèle complet contrairement aux modèles ajustés proposés (Tableau V.6).

#### Comparaison avec des données expérimentales

Les trois modèles ajustés ont également été utilisés pour simuler les rendements carbonés de conversion du glucose en biomasse et en acides organiques lors de cultures en mode continu de *C. glutamicum*. Les valeurs expérimentales des vitesses de consommation en glucose et en oxygène mesurées à chaque état stationnaire ont été imposées lors des différentes simulations. Une comparaison entre les résultats de simulation et les données expérimentales est présentée figure V.8. De plus, les comparaisons des rendements carbonés simulés par les trois modèles, comparés deux à deux sont présentées dans l'annexe 15.



**Figure V.8 :** Comparaison entre les rendements carbonés obtenus par simulation par les trois modèles ajustés (1 à 3) et (a) les données expérimentales obtenues au cours d’une culture continue de *C. glutamicum* 2262 et (b) celles obtenues lors de l’étude de Shinfuku et al. (2009): biomasse (●), CO<sub>2</sub> (●), lactate (●), succinate (●) et acétate (●).

Les rendements carbonés de conversion du glucose en biomasse, CO<sub>2</sub> et lactate, simulés par les trois modèles ajustés sont proches de ceux obtenus au cours de culture continue réalisée au cours de ce travail. Ce n’est pas le cas pour le succinate et l’acétate (Figure V.8.a). Il s’avère que, selon les modèles, la production des acides organiques, en particulier de succinate, est limitée aux ratios OUR/GUR les plus faibles (inférieurs à 0,35 et 0,65 dans le cas des modèles 1 et 3, respectivement) alors qu’expérimentalement, la production de succinate a été mesurée pour des

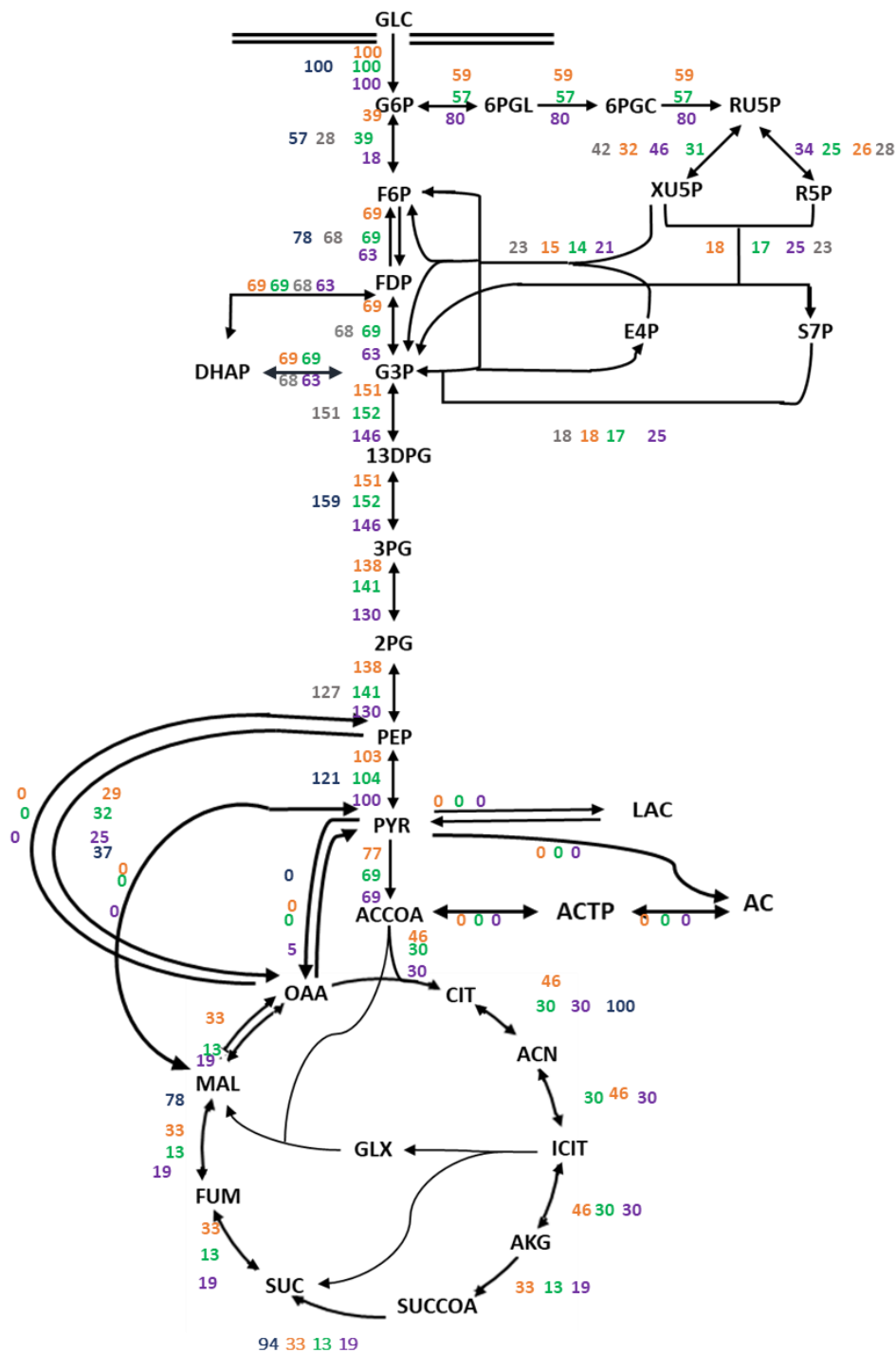
ratios allant jusqu'à 1,58 (chapitre 3). Une tendance similaire a été observée en comparant les résultats simulés par les 3 modèles ajustés et les résultats expérimentaux issus de la littérature (Shinfuku et al., 2009).

#### 3.1.1.2. Comparaison des flux intracellulaires simulés par les trois modèles

La figure V.9 présente les flux intracellulaires (en pourcentages molaires par rapport au flux de consommation de glucose), simulés par les trois modèles ajustés, en aérobiose.

Les principales voies métaboliques sont activées dans le cas de la simulation de la croissance de *C. glutamicum* 2262, en aérobiose, par les 3 modèles ajustés. Cependant, les pourcentages du flux de la voie des pentoses phosphate déterminés par les trois modèles ajustés sont différents. Les flux simulés par les modèles 1 et 2, à travers la phase oxydative de cette voie sont similaires (59 et 57 %, respectivement) alors que ceux obtenus par le modèle 3 sont plus importants, environ 80 % du flux de glucose consommé. Malgré ces différences, ces valeurs restent cohérentes avec les données de la littérature. En effet, des écarts importants peuvent être relevés dans la littérature que ce soit pour des données expérimentales ou issues de modélisations (entre 27 et 84 %) (Tableau V.3).

D'autre part, les flux de la glycolyse, des voies anaérobiques et du cycle de Krebs, simulés par les trois modèles ajustés, sont similaires et cohérents avec les données de la littérature (Bartek et al., 2011; Mei et al., 2016) (Tableau V.3, Figure V.9). En effet, les flux de certaines étapes de la glycolyse et de la voie des pentoses phosphates ( $R_{pgi}$ ,  $R_{pfkA}$ ,  $R_{gapA}$ ,  $R_{rpi}$ ,  $R_{rpe}$ ,  $R_{tal}$ ,  $R_{tk1}$  et  $R_{tk2}$ ) simulés sont très proches de ceux trouvés par l'étude de Bartek et al. (2011) (Figure V.9). Certains écarts, entre les trois modèles ajustés, ont été enregistrés au niveau de métabolites qui sont impliqués dans l'équation de biomasse. Ainsi, selon le modèle 3, les voies anaérobiques catalysées par la PEP carboxylase et la Pyruvate carboxylase sont activées pour la synthèse de l'oxaloacétate, alors que dans le cas des modèles 1 et 2, seul le PEP est converti en oxaloacétate. Par ailleurs, les flux de conversion du pyruvate en acétyl-COA sont moins importants que celui obtenu expérimentalement, environ 123 % (Figure V.9) (Mei et al., 2016). Cet écart pourrait être expliqué par le système de transport de glucose vers le cytoplasme. En effet, selon les modèles ajustés, le glucose est totalement transporté par le système PTS qui nécessite la consommation de PEP, ce qui limite le flux de conversion de PEP vers le pyruvate.

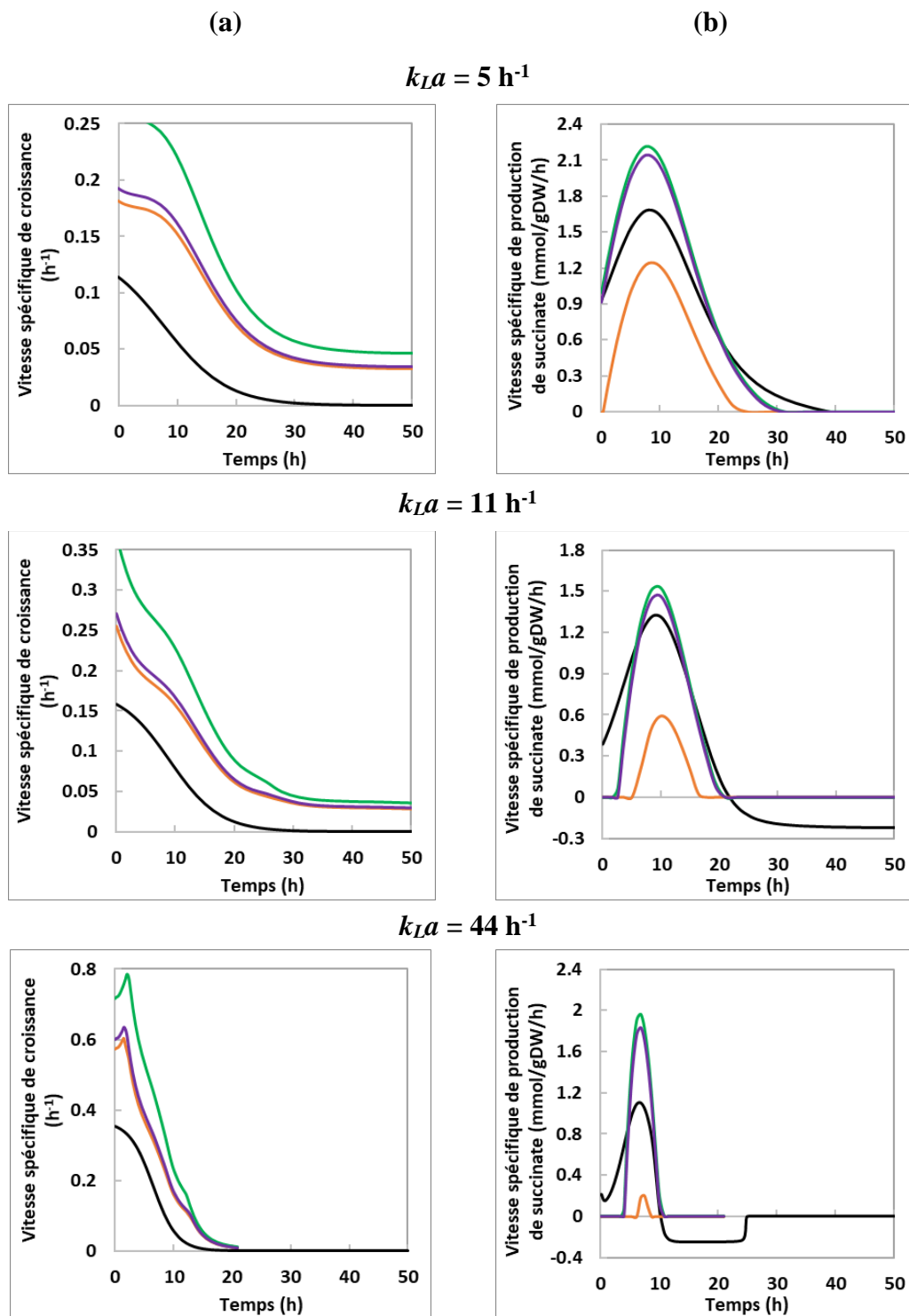


**Figure V.9** : Distribution des flux intracellulaires au sein du métabolisme de *C. glutamicum* : flux simulés par modèle ajusté 1 en orange, modèle ajusté 2 en vert, modèle ajusté 3 en violet, modèle de Bartek et al. (2011) en gris et modèle de Mei et al. (2017) en bleu. Les valeurs représentent les pourcentages molaires de la consommation de glucose qui a été fixée à 7 mmol/ g DW/ h.

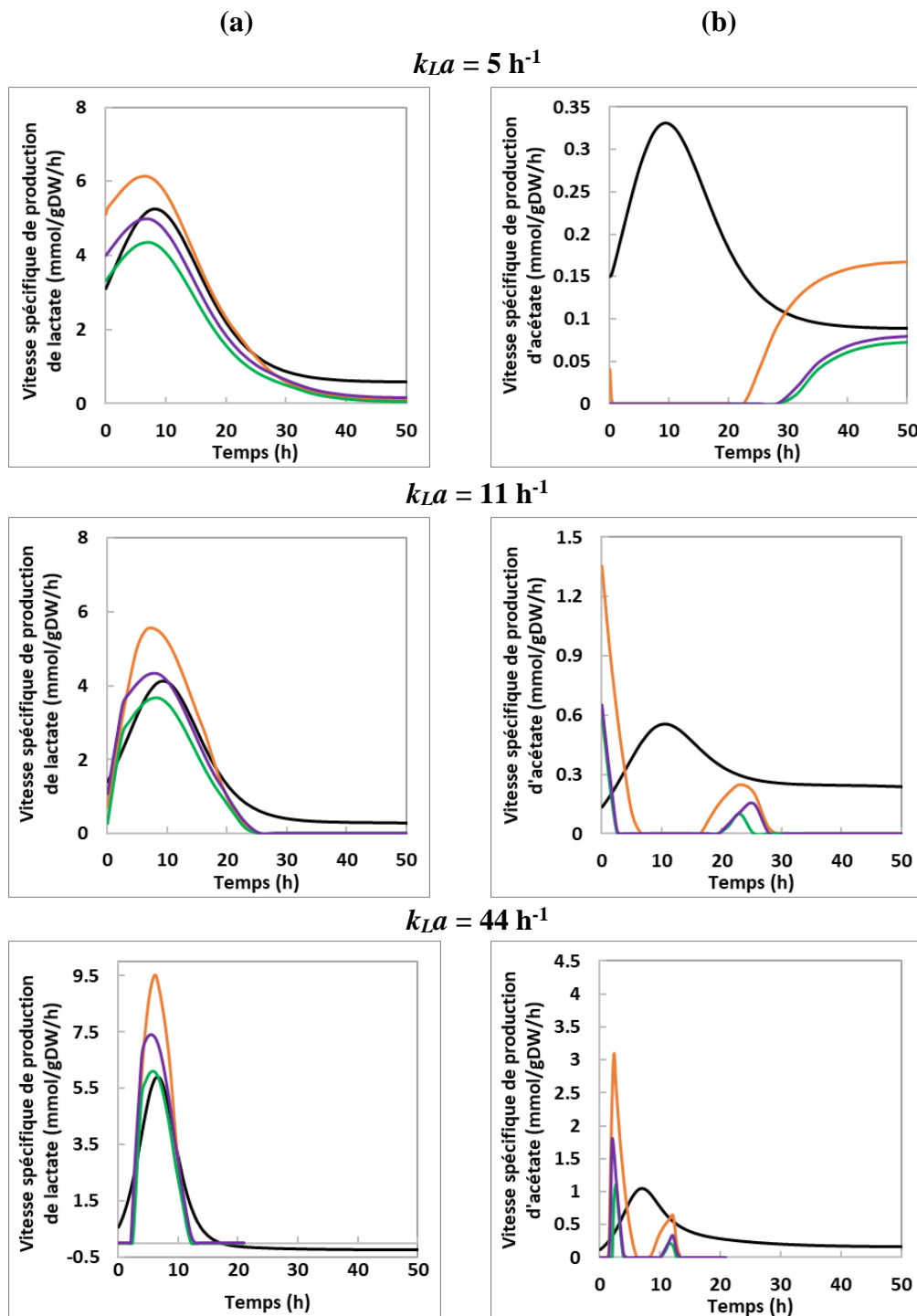
Lors de cultures en mode discontinu ou semi-continu, la réponse physiologique de *C. glutamicum* varie au cours du temps en raison de l'évolution de son environnement nutritionnel. Dans la suite de l'étude, nous avons utilisé les 3 modèles ajustés pour simuler le comportement de cette bactérie au cours d'une culture batch en utilisant les flux de consommation de glucose et d'oxygène, simulés par le modèle cinétique établi précédemment (chapitre 4).

### 3.1.2. Simulation de la production de la biomasse et des acides organiques en conditions dynamiques

Pour réaliser ces simulations en conditions dynamiques, nous avons utilisé les données des cultures en mode discontinu de *C. glutamicum* 2262, réalisées dans différentes conditions d'oxygénation (chapitre 3). Dans le chapitre 4, il a été montré que le modèle cinétique proposé est capable de parfaitement prédire la croissance et la production des acides organiques. Nous avons donc utilisé les vitesses spécifiques de croissance, de consommation de glucose et de production des acides organiques simulées par ce modèle cinétique. Les simulations FBA par les trois modèles ajustés ont été réalisées en imposant, à chaque instant, les vitesses de consommation de glucose et d'oxygène simulées par le modèle cinétique. Les résultats de simulation des vitesses de croissance et des flux de production des trois acides organiques sont présentés dans la figure V.10.



**Figure V.10 :** Évolution des vitesses spécifiques de croissance (a) et de production de succinate (b) lors d'une culture en fiole de *C. glutamicum* 2262, avec un  $k_{La}$  de 5, 11 ou 44  $\text{h}^{-1}$  : vitesses simulées par le modèle ajusté 1 (—), 2 (—) ou 3 (—) et par le modèle cinétique (—).



**Figure V.11** : Évolution des vitesses spécifiques de production de lactate (a) et d'acétate (b) lors d'une culture en fiole de *C. glutamicum* 2262, avec un  $k_{LA}$  de 5, 11 ou 44  $\text{h}^{-1}$  : vitesses simulées par le modèle ajusté 1 (—), 2 (—) ou 3 (—) et par le modèle cinétique (—).

Les figures V.10 et V.11 présentent l'évolution des vitesses spécifiques de croissance et de production des acides organiques, simulées par les trois modèles métaboliques ajustés et par le modèle cinétique, au cours du temps, pour des valeurs de  $k_{LA}$  de 5, 11 et 44  $\text{h}^{-1}$ . Ces résultats

montrent que les flux de la production de biomasse simulés par les trois modèles métaboliques, quelle que soit la valeur de  $k_{LA}$ , sont plus élevés (d'un facteur de 1,5 - 2) que ceux simulés par le modèle cinétique. Par contre, dans le cas de la production de lactate et succinate, les flux simulés par le modèle métabolique sont proches de ceux simulés par le modèle cinétique pour certaines conditions de  $k_{LA}$ . Pour le succinate, les modèles 2 et 3 simulent plus précisément sa production dans des conditions de  $k_{LA}$  faible (5 et 11 h<sup>-1</sup>) que le modèle 1. Ceci a été confirmé par des valeurs importantes du coefficient de détermination ( $R^2 = 0,98$  et  $0,75$  avec un  $k_{LA}$  de 5 et 11 h<sup>-1</sup>, respectivement) d'une régression linéaire entre les données de simulation obtenues par le modèle métabolique ou par le modèle cinétique, correspondant à la phase de production (première bissectrice :  $[AO]_{\text{métabolique}} = [AO]_{\text{cinétique}}$ ) (Tableau V.7). Ces coefficients sont plus importants (entre 0,83 et 0,93) dans le cas de la prédiction de la production de lactate par les trois modèles, pour les différentes conditions de  $k_{LA}$ . En revanche, ces trois modèles sont moins précis dans le cas de l'acétate (Figure V.11.b). La différence de précision des trois modèles pourrait être due à la limitation de la prédiction de la production de chaque acide organique pour certaines gammes de ratios OUR/GUR. En effet, en prenant l'exemple de la production de succinate à  $k_{LA}$  de 44 h<sup>-1</sup>, les ratios OUR/GUR expérimentaux varient entre 3 et 0,32, entre 0 et 10 h de la culture (correspondant à la phase de production de cet acide organique) (Annexe 16). Ainsi, le modèle 1 qui déclenche la synthèse de succinate pour un OUR/GUR inférieur à 0,35, sous-estime significativement la durée de production et donc la quantité de succinate produit.

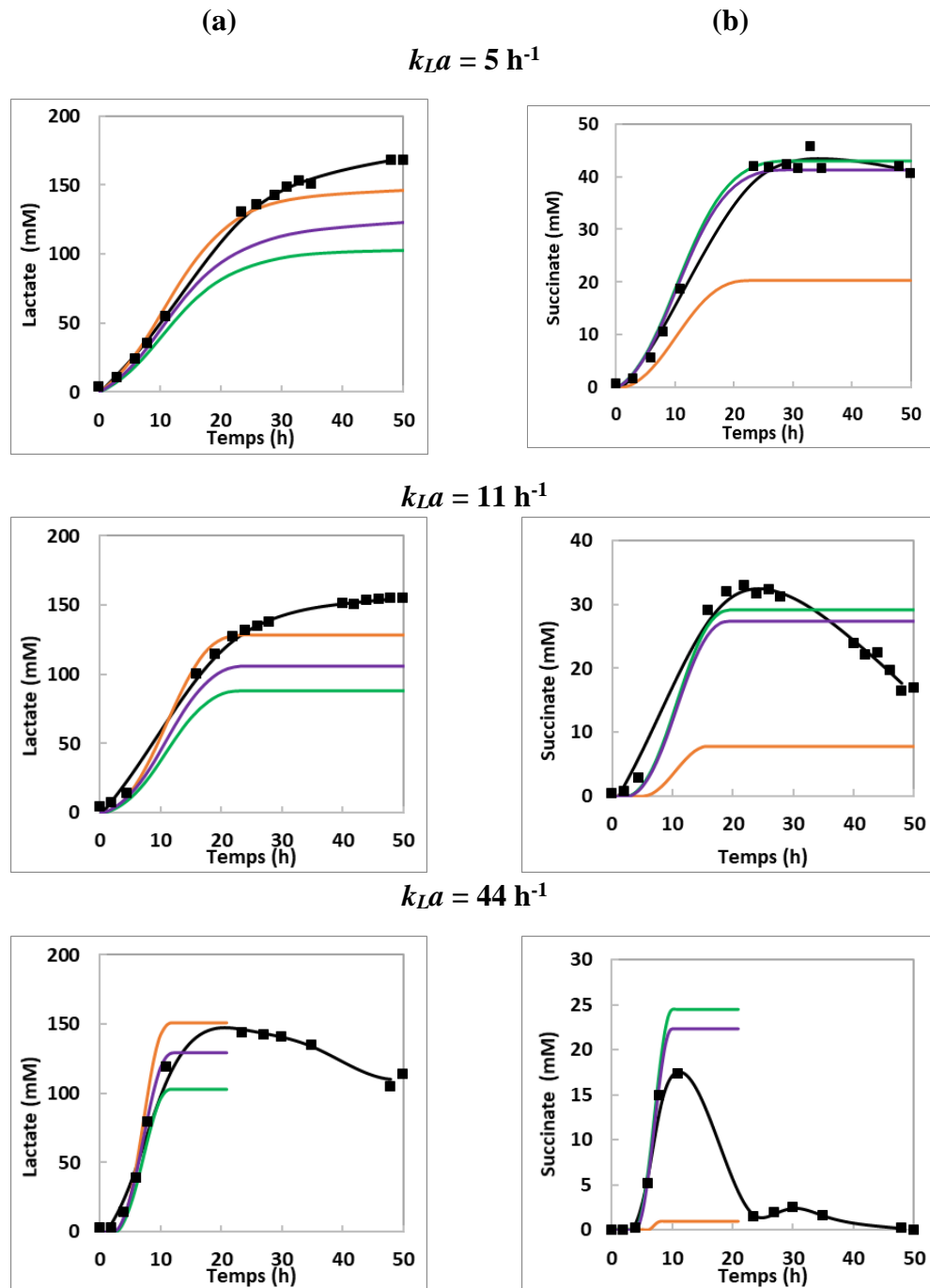
**Tableau V.7** : Valeurs des coefficients de détermination ( $R^2$ ) d'une régression linéaire entre les résultats de simulation de la production de lactate et succinate par les trois modèles métaboliques ajustés et les flux simulés par le modèle cinétique, pour les différentes conditions de  $k_{LA}$ .

Valeur de $k_{LA}$	Lactate			Succinate		
	5 h <sup>-1</sup>	11 h <sup>-1</sup>	44 h <sup>-1</sup>	5 h <sup>-1</sup>	11 h <sup>-1</sup>	44 h <sup>-1</sup>
<b>Modèle ajusté 1</b>	0,90	0,92	0,85	0,71	0,51	0,26
<b>Modèle ajusté 2</b>	0,93	0,90	0,83	0,98	0,75	0,66
<b>Modèle ajusté 3</b>	0,92	0,91	0,85	0,98	0,73	0,65

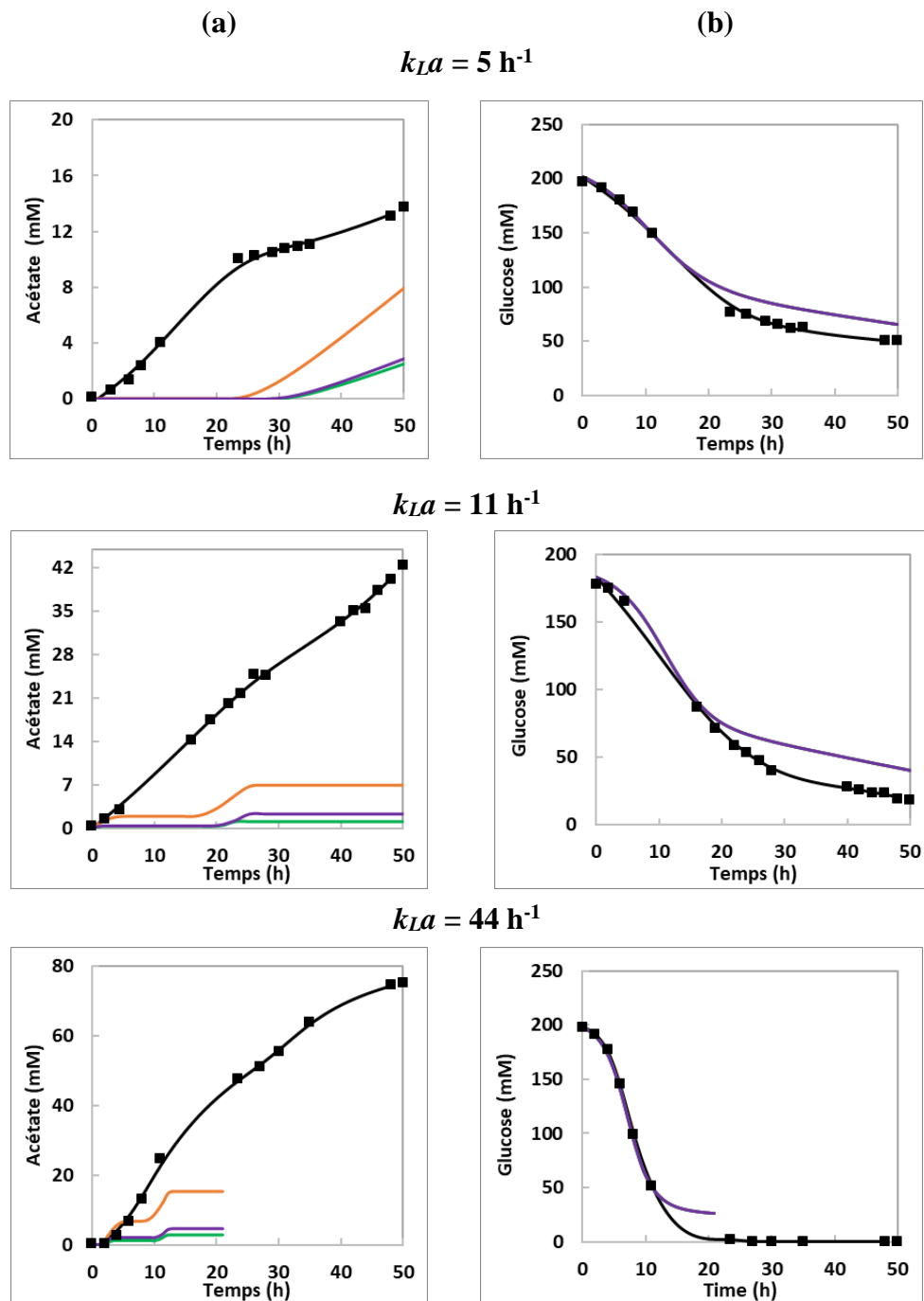
D'autre part, afin d'évaluer l'impact de l'écart observé entre les flux simulés par les modèles métabolique et le modèle cinétique, nous avons choisi de simuler, en plus des profils de vitesses, les profils de concentrations. Pour cela, à l'aide du principe de conservation de la matière en mode discontinu, les flux simulés ont été convertis en concentrations. Pour déterminer ces profils de concentration à partir des vitesses spécifiques, nous avons choisi d'utiliser les concentrations



en biomasse simulées par le modèle cinétique. Les vitesses spécifiques de croissance simulées par les modèles métaboliques ajustés, apparaissant surestimés (Figure V.10.a).



**Figure V.12 :** Évolution des concentrations en lactate (a) et succinate (b) lors d'une culture en fiole de *C. glutamicum* 2262, avec un  $k_{La}$  de 5, 11 ou 44 h<sup>-1</sup> : concentrations simulées par le modèle ajusté 1 (—), 2 (—) ou 3 (—), par le modèle cinétique (—) et données expérimentales (■).



**Figure V.13 :** Évolution des concentrations en acétate (a) et glucose (b) lors d'une culture en fiole de *C. glutamicum* 2262, avec un  $k_{LA}$  de 5, 11 ou 44 h<sup>-1</sup> : concentrations simulées par le modèle ajusté 1 (—), 2 (—) ou 3 (—), par le modèle cinétique (—) et données expérimentales (■).

Les figures V.12 et V.13 présentent l'évolution temporelle des concentrations en lactate, succinate et acétate, et en glucose résiduel au cours de cultures en mode discontinu pour des valeurs de  $k_{LA}$  de 5, 11 ou 44 h<sup>-1</sup>. Les cinétiques de production des différents acides organiques sont cohérentes avec l'évolution des flux au cours du temps. Ces résultats confirment que le

modèle métabolique ajusté, quelle soit l'équation de biomasse employée, est globalement capable de prédire la production de lactate dans les différentes conditions d'oxygénation étudiées. Comparés aux résultats de simulation en conditions stationnaires, les résultats de simulation en conditions dynamiques montrent que les modèles ajustés 2 et 3 sont aussi capables de prédire très précisément la production de succinate pour des niveaux d'oxygénation faibles ( $k_{La}$  de 5 et 11  $h^{-1}$ ). En revanche, quel que soit le type de simulation, stationnaire ou dynamique, les flux de production d'acétate sont en désaccord avec les données expérimentales et les données issues de la littérature.

### 3.1.3. Discussion : comparaison des trois équations de biomasse

Les résultats des simulations, qu'elles soient réalisées en conditions stationnaires ou dynamiques, montrent des différences significatives entre les trois modèles ajustés. Les modèles 2 et 3 sont capables de prédire les flux de production des acides organiques ce qui n'est pas le cas pour le modèle 1 où une forte sous-estimation de la production de succinate a parfois été observée. Un écart important a été observé entre les flux simulés par le modèle 2 et le modèle 3 dans le cas de la production de biomasse. Ceci pourrait être expliqué par la différence entre les coefficients stœchiométriques des deux équations de biomasse considérées dans chaque modèle. En effet, l'étude de sensibilité du modèle aux coefficients stœchiométriques des métabolites de l'équation de biomasse a montré que l'ATP est le principal levier dans la prédiction de la biomasse et des acides organiques. La diminution du coefficient d'ATP induit une nette augmentation de la prédiction de flux de biomasse et de succinate, mais aussi une diminution du flux de lactate (Figure V.7). La diminution du coefficient d'ATP de 41 à 29 mmol/ g DW (modèle 3 et 2 respectivement, Annexe 1) induit une augmentation du flux de production de biomasse de 0,68 à 0,82  $h^{-1}$  (de 64 % à 80 % du flux de glucose), en aérobiose. Par contre, en anaérobiose, les mêmes flux de succinate ont été obtenus avec les deux modèles. Ceci pourrait être dû à la présence de NADH dans l'équation de biomasse. En effet, l'étude de sensibilité a été réalisée sur l'équation de biomasse 1 qui ne présente que l'ATP et NADPH comme précurseur énergétique. Mais, dans les équations 2 et 3, le NADH a été intégré en plus de l'ATP et du NADPH (Annexe 1). Comme ce cofacteur est impliqué dans la voie de production du lactate et du succinate, il pourrait constituer un levier important de la détermination du flux de ces deux acides organiques. Ceci a été vérifié avec l'étude de sensibilité du modèle ajusté aux coefficients stœchiométriques de l'équation 3 (Annexe 17). La diminution du coefficient de l'ATP entraîne effectivement une

augmentation du flux de succinate alors que l'augmentation du coefficient du NADH induit une diminution du flux de synthèse de ce métabolite. Ces deux effets antagonistes pourraient donc expliquer la similarité des flux de succinate simulés par les modèles 2 et 3 (8,23 et 8,55 mmol/ g DW/ h, respectivement, correspondant à un rendement d'environ 36 %, voir Tableau V.6).

En se basant sur les simulations en conditions stationnaires et dynamiques, le modèle ajusté 3 apparaît comme le plus performant pour la simulation de la production de biomasse et des acides organiques, du lactate et du succinate notamment, selon les conditions d'oxygénation (Tableau V.6). Il a été conservé pour la suite de l'étude.

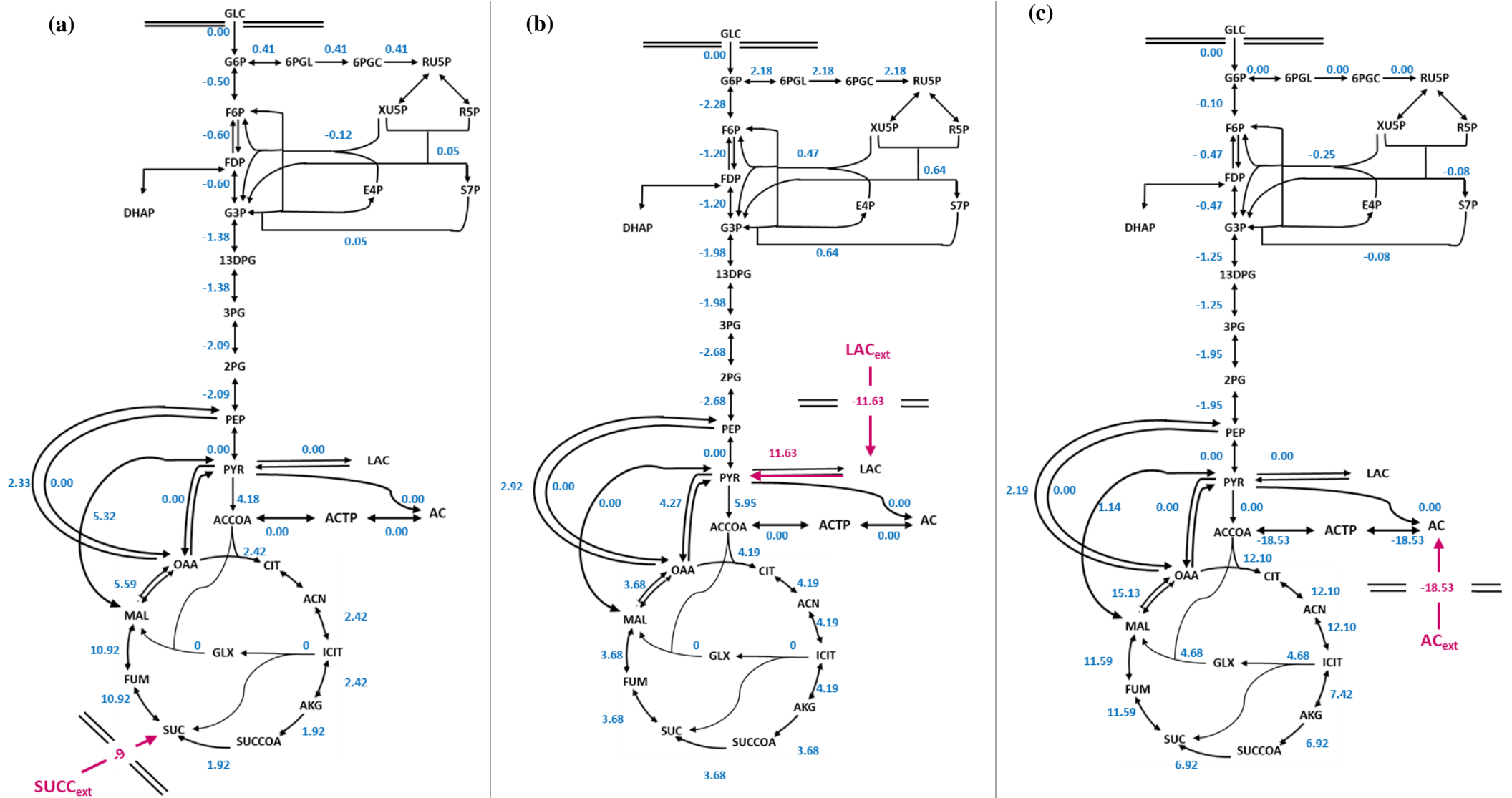
### 3.2. Analyse de robustesse du modèle ajusté 3

La première étape de notre étude a consisté à simuler le métabolisme de *C. glutamicum* 2262, lors de cultures avec du glucose comme seule source de carbone et d'énergie. Afin d'évaluer la robustesse de ce modèle, deux étapes d'analyse ont ensuite été réalisées :

- ❖ Simulation du comportement de *C. glutamicum* 2262 avec d'autre substrats carbonés
- ❖ Simulation du comportement de *C. glutamicum* 2262 $\Delta$ ldhA, dans différentes conditions d'oxygénation et d'alimentation en glucose.

#### 3.2.1. Utilisation d'acides organiques comme substrats carbonés

Il a été montré que *C. glutamicum* 2262 était capable d'utiliser le lactate et l'acétate, comme source carbonée et énergétique. Comme discuté dans les chapitres 3 et 4, le succinate peut aussi être un co-substrat du glucose, consommé par cette bactérie comme source énergétique. Le premier objectif de cette partie du travail a donc été d'évaluer la capacité du modèle métabolique proposé à prédire le métabolisme du lactate, du succinate et de l'acétate chez *C. glutamicum*, en aérobiose. Pour cela, des simulations ont été réalisées, en aérobiose, en imposant le flux de consommation de l'acide organique en question (flux d'échange : Ex\_LAC, Ex\_SUC ou Ex\_AC). La distribution des flux au niveau du métabolisme central obtenue pour chaque simulation, est présentée dans la figure V.14. Le second objectif a été d'évaluer le comportement de cette bactérie, mais cette fois-ci, vis-à-vis du changement de flux de consommation des différents acides organiques et du flux de consommation d'oxygène (OUR) (Figures V.15, 16 et 17).



**Figure V.14** : Modélisation des flux intracellulaires du métabolisme de *C. glutamicum* 2262 en conditions aérobies à l'aide du modèle ajusté 3 en considérant le succinate (a), le lactate (b) et l'acétate (c) comme substrats. Les valeurs négatives de certaines réactions représentent des flux étant dans le sens inverse de ces réactions. Le flux de consommation de chaque acide organique imposé permet d'avoir un flux de production de biomasse de 0,47 h<sup>-1</sup>.

## Distribution des flux carbonés dans le cas de croissance en aérobiose sur des acides organiques

Afin de comparer la distribution des flux dans un métabolisme utilisant le lactate, le succinate ou l'acétate comme substrat carboné, nous avons imposé des flux de consommation pour chaque acide organique aboutissant au même flux de production de biomasse ( $\mu = 0,47 \text{ h}^{-1}$ ). Les résultats de simulation (Figure V.15) montrent que les trois acides organiques sont catabolisés via le cycle de Krebs, la gluconéogenèse, certaines voies anaplérotiques, la voie des pentoses phosphate et la voie du glyoxylate, afin de produire les précurseurs nécessaires à la synthèse de biomasse. Les principales voies métaboliques dont les fonctionnements dépendent de l'acide organique consommé, sont reportées dans le tableau V.8.

**Tableau V.8** : État de fonctionnement des voies métaboliques dans le métabolisme du glucose, de l'acétate, du lactate et du succinate.

Voies	Enzymes	Substrats			
		Acétate	Lactate	Succinate	Glucose
<b>PEP/PYR</b>					
<b>PEP --&gt; PYR</b>	Pyruvate kinase	✗	✗	✗	✗*
<b>PYR --&gt; PEP</b>	PEP synthase	✗	✗	✗	✗
<b>Voies anaplérotiques</b>					
<b>MAL --&gt; PYR</b>	Enzyme malique	✓	✗	✓	✗
	Malate déshydrogénase	✓	✗	✗	✗
<b>OAA --&gt; PEP</b>	PEP carboxykinase	✓	✓	✓	✗
<b>PEP --&gt; OAA</b>	PEP carboxylase	✗	✗	✗	✓
<b>PYR --&gt; OAA</b>	PYR carboxylase	✗	✓	✗	✓
<b>Shunt glyoxylique</b>					
<b>ICIT --&gt; SUCC</b>	Isocitrate lyase	✓	✗	✗	✗
<b>ACCOA --&gt; MAL</b>	Malate synthase	✓	✗	✗	✗
<b>Voie des pentoses phosphate</b>					
<b>G6P --&gt; RU5P</b>	-	✗	✓	✓	✓

\* : la conversion de PEP en PYR est liée au transport de glucose par le système PTS.

✓ : active

✗ : non active

Dans le cas de la croissance de *C. glutamicum* sur acétate, des modifications ont été observées dans le métabolisme intracellulaire comparativement au métabolisme sur glucose. L'acétate transporté est catabolisé en ACCOA via la voie catalysée par l'acétate kinase et la phospho-

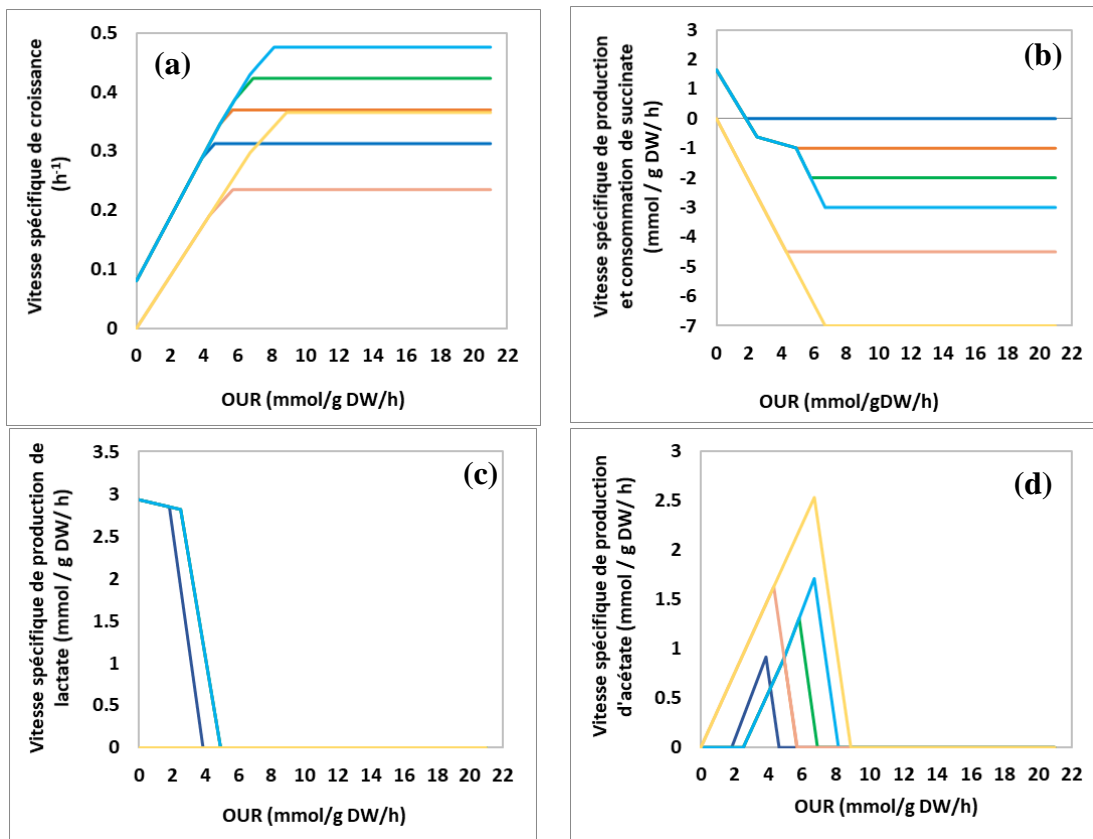
transacétylase. Une partie de l'ACCOA est ensuite utilisée pour la synthèse de biomasse alors que le reste se divise entre le cycle de Krebs et le shunt glyoxylique. Il est à noter que ce dernier est activé (flux d'environ 4.68 mmol /g DW/ h avec un apport en acétate de 18.53 mmol / g DW/ h), ce qui est en accord avec d'autres études qui ont prouvé que cette voie n'est activée que dans le cas de croissances sur acétate (Gerstmeir et al., 2003; Wendisch et al., 1997). Ainsi, Noack et al. (2017) ont montré que dans le cas d'une croissance sur cet acide organique, les concentrations en malate synthase et en isocitrate lyase, catalysant cette voie, sont beaucoup plus élevées que pour d'autres substrats carbonés (glucose, lactate...). Dans le cycle de Krebs, au niveau de l'OAA, une partie du flux est convertie en PEP et emprunte la gluconéogenèse. La conversion de l'OAA en PEP est catalysée par la PEP carboxykinase, contrairement au cas d'une croissance sur glucose où la réaction inverse est activée (PEP -- > OAA catalysée par la PEP carboxylase). Par ailleurs, une partie du flux, au niveau du malate, est convertie en PYR à l'aide de l'enzyme malique qui est désactivée dans le cas d'une croissance sur glucose. Cette voie permet non seulement de générer la quantité de pyruvate nécessaire pour la production de biomasse mais aussi le cofacteur NADPH, ce qui pourrait expliquer non activé de la voie des pentoses phosphate. Ceci suggère que la voie catalysée par l'enzyme malique est la principale source de NADPH dans le cas d'une croissance sur acétate. La totalité de ces observations sont cohérentes avec l'étude de Noack et al. (2017) qui montre que les gènes codant les enzymes de la voie du glyoxylate, l'enzyme malique et la PEP carboxykinase sont surexprimées dans ces conditions.

Par ailleurs, des simulations ont été réalisées en imposant des flux de consommation de lactate. Le lactate transporté est catabolisé en pyruvate à l'aide de la lactate : quinone déshydrogénase. Ceci est en accord avec de précédentes études qui ont démontré que cette enzyme est essentielle pour la consommation de lactate (Cocaign et al., 1993; Noack et al., 2017; Stansen et al., 2005). Une fois le lactate converti en pyruvate, le flux passe pratiquement par les mêmes voies que dans le cas d'une croissance sur acétate (cycle de Krebs, gluconéogenèse, voies anaplérotiques), sauf quelques exceptions. Contrairement au cas de la croissance sur acétate, le shunt glyoxylique, la conversion du malate en pyruvate, sont non actifs alors que la voie des pentoses phosphate est active. Nous avons constaté que si la voie des pentoses phosphate est désactivée, l'enzyme malique est activée (et inversement), ce qui suggère que l'une des deux voies est une alternative à la seconde pour la génération de NADPH. De plus, le pyruvate est converti, à l'aide de la pyruvate carboxylase, en OAA qui est transformé en PEP par la PEP carboxykinase. Une nouvelle fois, ces résultats sont cohérents avec ceux de l'étude de Noack et al. (2017).

Il y a peu de données dans la littérature concernant le métabolisme de consommation du succinate par *C. glutamicum*. Teramoto et al. (2008) ont indiqué qu'une croissance marginale de *C. glutamicum* R avait été observée sur un milieu gélosé avec le succinate comme seule source carbonée. Les résultats de simulation avec le modèle ajusté 3 vont dans ce sens puisqu'ils suggèrent que le succinate pourrait, comme le lactate et l'acétate, permettre la croissance de *C. glutamicum* (Figure V.14).

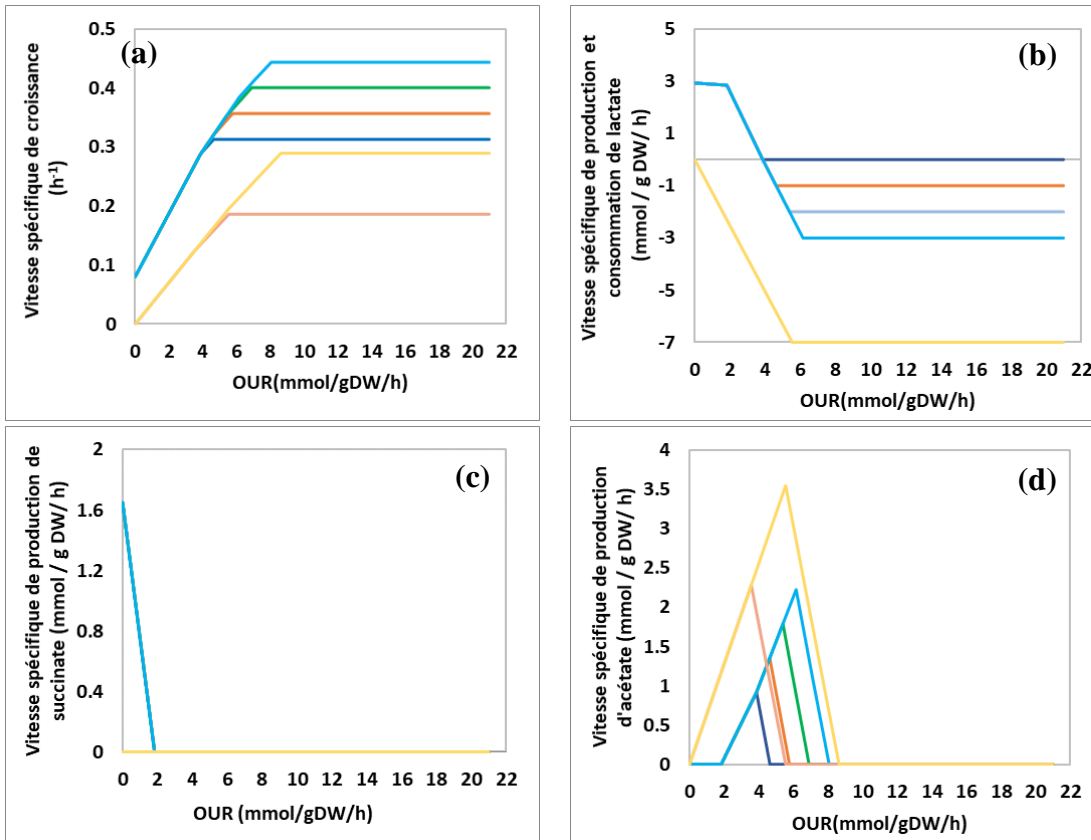
### Comportement de *C. glutamicum* vis-à-vis de changements du flux d'apport en acides organiques et en oxygène

Pour étudier le comportement de *C. glutamicum* vis-à-vis du changement des conditions opératoires, des simulations ont été réalisées en faisant varier les flux de consommation de substrat carboné et les flux d'apport en oxygène, avec ou sans utilisation de glucose.

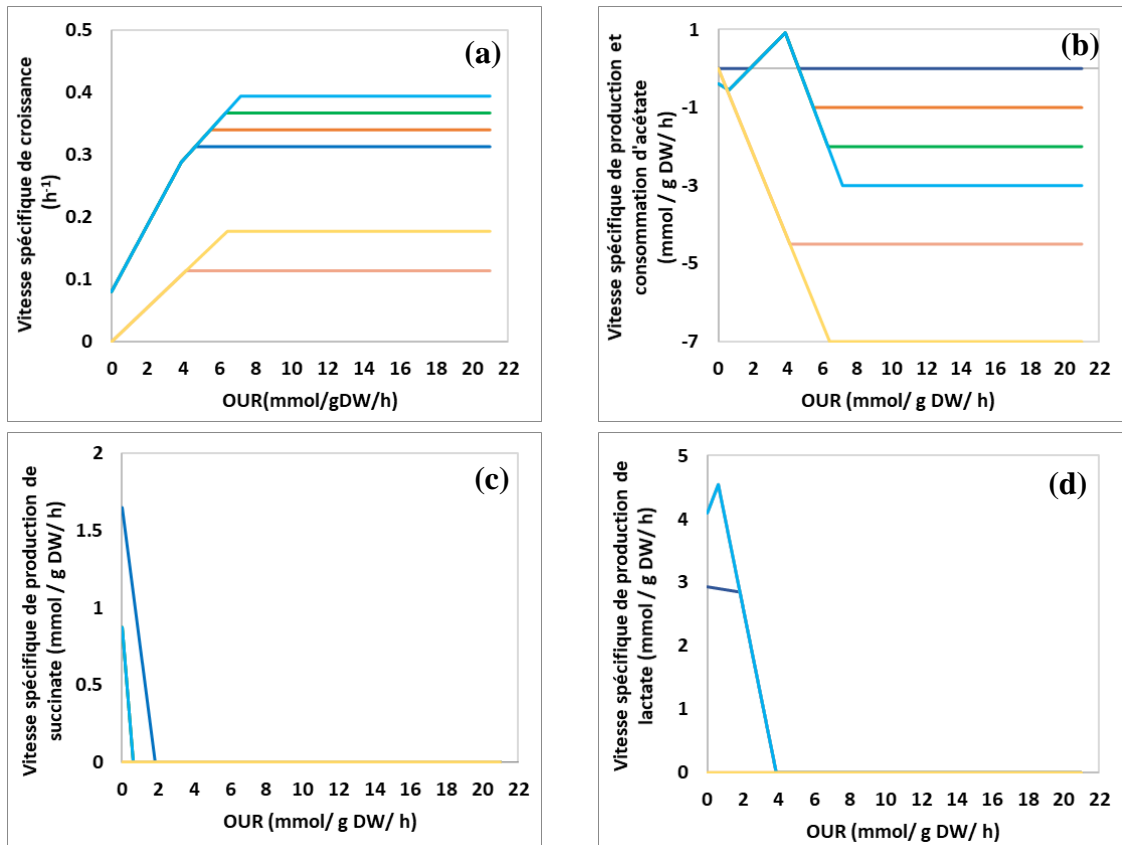


**Figure V.15 :** Évolution des vitesses spécifiques de croissance (a), de consommation de succinate (b), de production de lactate (c) et de production d'acétate (d) en fonction de la vitesse de consommation d'oxygène (OUR). Vitesses spécifiques de consommation de succinate en présence de glucose (3 mmol/ g DW/ h) : (—) : 0 mmol/ g DW/ h, (—) : 1 mmol/ g DW/ h, (—) : 2 mmol/ g DW/ h (—) : 3 mmol/ g DW/ h et en absence de glucose (—) : 4,5 mmol/ g DW/ h et (—) : 7 mmol/ g DW/ h.





**Figure V.16 :** Évolution des vitesses spécifiques de croissance (a), de consommation de lactate (b), de production de succinate (c) et de production d'acétate (d) en fonction de la vitesse de consommation d'oxygène (OUR). Vitesses spécifiques de consommation de lactate en présence de glucose (3 mmol/ g DW/ h) : (—) : 0 mmol/ g DW/ h, (—) : 1 mmol/ g DW/ h, (—) : 2 mmol/ g DW/ h, (—) : 3 mmol/ g DW/ h et en absence de glucose (—) : 4,5 mmol/ g DW/ h et (—) : 7 mmol/ g DW/ h.



**Figure V.17 :** Évolution des vitesses spécifiques de croissance (a), de consommation d'acétate (b), de production de succinate (c) et de production de lactate (d) en fonction de la vitesse de consommation d'oxygène (OUR). Vitesses spécifiques de consommation d'acétate en présence de glucose (3 mmol/ g DW/ h) : (—) : 0 mmol/ g DW/ h, (—) : 1 mmol/ g DW/ h, (—) : 2 mmol/ g DW/ h, (—) : 3 mmol/ g DW/ h et en absence de glucose (—) : 4,5 mmol/ g DW/ h et (—) : 7 mmol/ g DW/ h.

En présence de glucose et de l'un des acides organiques comme substrat, différentes phases de production et de consommation ont été identifiées ; ces phases sont similaires à celles observées dans le cas d'une croissance sur glucose seul (Figures V.15, 16 et 17). Le flux de consommation de glucose est constant et maximal (égal au flux imposé) quel que soit l'apport en oxygène. Par contre, le flux de chaque acide organique catabolisé est différent de celui imposé. En effet, lorsque OUR diminue, le flux de consommation des acides organiques diminue voire une production est simulée (Figures V.15.b, 16.b et 17.b). Ceci pourrait être expliqué par la nécessité de l'adaptation du métabolisme afin de maintenir l'équilibre redox intracellulaire dans des niveaux d'oxygénation faible. Concernant le succinate, à partir d'une valeur seuil du flux de consommation d'oxygène (OUR = 1,83 mmol/ g DW/ h), sa consommation s'arrête et sa production est enclenchée. Ceci semble cohérent avec les précédents résultats où des valeurs de concentration en glucose résiduel et du ratio OUR /GUR avaient été identifiés lors de l'arrêt de

la production de cet acide organique (chapitre 3). De même, la production de lactate et d'acétate débutent à partir d'un seuil de 1,29 et 4,64 mmol/ gDW/ h, respectivement (Figures V.15.b, 16.b et 17.b).

D'autre part, en absence de glucose, le lactate et acétate sont utilisés comme source carbonée. Une croissance a été observée sur chacun de ces acides organiques quel que soit le niveau d'oxygénation (OUR) sauf en anaérobiose (Figures V.15.a, 16.a et 17.a). Ceci semble cohérent avec les données de littérature montrant la capacité de cette bactérie à croître sur lactate et acétate comme seul substrat carboné (Cocaign et al., 1993; Noack et al., 2017). Dans le cas du lactate, en plus de la croissance, une production d'acétate a été observée, ce qui pourrait être permettre la synthèse d'ATP nécessaire à la croissance. Par contre, dans le cas de succinate, bien qu'il ait montré qu'il joue le rôle de co-substrat énergétique chez *C. glutamicum* 2262 (chapitre 3), une croissance sur cet acide organique a été simulée par le modèle ajusté 3. En fait, ces résultats de simulation sont attendus, puisque la méthode de résolution FBA de ce modèle métabolique simplifié est basée uniquement sur un bilan carbone qui ne tient pas compte d'éventuels phénomènes de régulation.

Le modèle métabolique ajusté 3 est capable de simuler non seulement le métabolisme du glucose mais aussi du lactate et de l'acétate en aérobiose. Ainsi, des OUR seuils ont été identifiés pour la transition entre la production et la consommation de lactate, succinate et acétate. Néanmoins, à ce stade, les liens entre ces différents seuils (vitesses, concentrations, ratios) ne sont pas encore identifiés. Afin de prendre en considération ces seuils, un couplage du modèle métabolique au modèle cinétique semblerait être intéressant pour prédire la production, la consommation et la phase de transition métabolique.

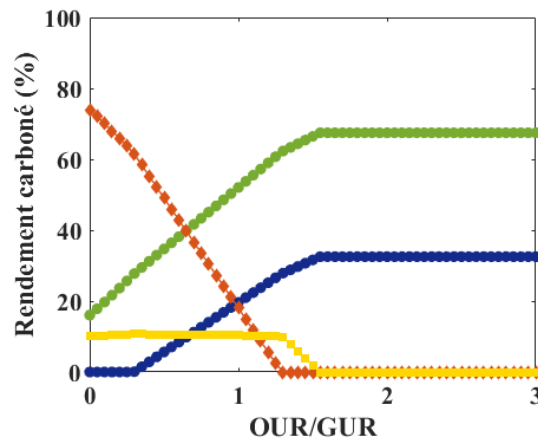
### 3.2.2. Simulation du comportement de *C. glutamicum* 2262 $\Delta$ ldhA en conditions stationnaires et dynamiques

Après avoir focalisé notre étude sur la souche sauvage, *C. glutamicum* 2262, pour vérifier les performances du modèle métabolique proposé, le comportement de la souche mutante, *C. glutamicum* 2262 $\Delta$ ldhA, a également fait l'objet de simulations, en conditions stationnaires et dynamiques. Les trois modèles ajustés utilisés précédemment ont été appliqués sur cette souche, en désactivant les deux voies de production et de consommation de lactate (R\_ldh et R\_ild : PYR  $\leftrightarrow$  LAC). Comme les résultats étaient similaires à ceux que obtenus avec la

souche sauvage, seules les simulations résultant de l'utilisation du modèle ajusté 3 seront présentées par la suite.

### Simulation en conditions stationnaires

Afin d'étudier le comportement de *C. glutamicum 2262ΔldhA* en fonction du ratio OUR/GUR, des simulations par le modèle ajusté 3 ont été réalisées en modifiant l'apport en oxygène. Le flux de consommation de glucose a été fixé à 7 mmol/ g DW/ h. Les résultats de ces simulations sont présentés au travers de rendements carbonés ramenés au flux de consommation de glucose. Les évolutions des rendements carbonés de production de biomasse, de CO<sub>2</sub>, et d'acides organiques (succinate et acétate) sont reportés figure V.18.



**Figure V.18 :** Simulation par le modèle ajusté 3 de l'impact du rapport OUR/GUR sur les rendements carbonés de conversion du glucose en lactate (\*), succinate (◆), acétate (■), biomasse (●) et CO<sub>2</sub> (●) par *C. glutamicum 2262ΔldhA*.

Tout le glucose catabolisé est transformé en biomasse et en CO<sub>2</sub> dans des conditions d'excès en oxygène (OUR/GUR > 1,55), ce qui semble cohérent avec d'autres études de cette souche (Kaboré et al., 2015). En effet, dans ces conditions d'oxygénation, il a été montré que le comportement de cette souche était similaire à celui de la souche sauvage. De fait, les rendements de conversion du glucose en biomasse et en CO<sub>2</sub> sont similaires à ceux obtenus avec la souche sauvage (tableau V.6) avec des valeurs d'environ 67 et 33 %, respectivement. Pour des ratios OUR/GUR inférieurs à 1,55, deux phases correspondant au déclenchement de la production des acides organiques ont été identifiées. Pour des ratios compris entre 1,3 et 1,55 une phase de production d'acétate est observée. En diminuant le ratio OUR/GUR à des valeurs inférieures à 1,3, les rendements de conversion du glucose en acétate semblent constants alors que ceux du succinate augmentent. Au cours de ces dernières phases, une diminution des

rendements de conversion en biomasse et en CO<sub>2</sub> a été observée. Il est à noter que pour des ratios faibles (entre 0 et 0,3), l'intégralité du CO<sub>2</sub> produit suite à la croissance, est consommée pour la production de succinate jusqu'à un rendement maximal d'environ 74 % en absence d'oxygène (OUR/GUR = 0). Ces résultats de simulation dans des conditions de limitation en oxygène sont en accord avec les données de la littérature (Kaboré et al., 2015).

Afin de compléter cette étude de robustesse du modèle, nous avons comparé les cinétiques de concentrations en glucose et en acides organiques mesurées lors de cultures en mode discontinu avec cette souche mutante (Kaboré et al., 2015) aux résultats de simulation en conditions dynamiques du modèle

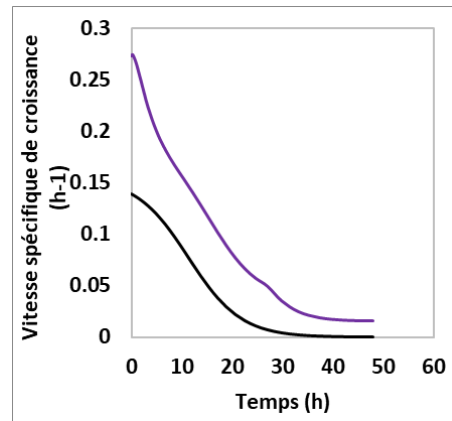
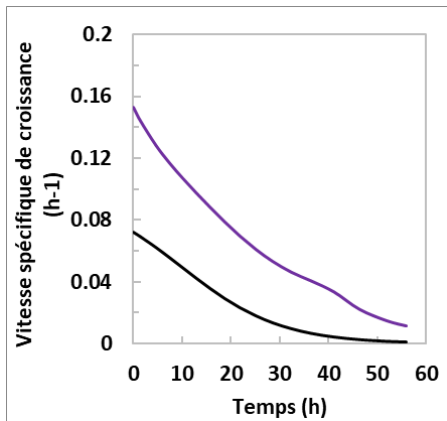
#### Simulation en conditions dynamiques

Comme dans le cas de la souche sauvage, nous avons déterminé les vitesses de consommation de glucose et d'oxygène à l'aide du modèle cinétique développé dans le présent travail (chapitre 4). Les simulations ont été effectuées dans différentes conditions de  $k_{La}$ , en imposant les vitesses de consommation de glucose et d'oxygène simulées par le modèle cinétique. Les résultats de simulation pour chaque condition de  $k_{La}$  ont été comparés aux vitesses de croissance, de production de succinate et d'acétate simulées par le modèle cinétique (Figure V.19). Les évolutions temporelles des concentrations ont été déterminées à partir des flux simulés par le modèle ajusté 3. Comme la production de biomasse est surestimée, nous avons utilisé les concentrations en biomasse simulées par le modèle cinétique pour la détermination des concentrations en succinate et en acétate (Figure V.19).

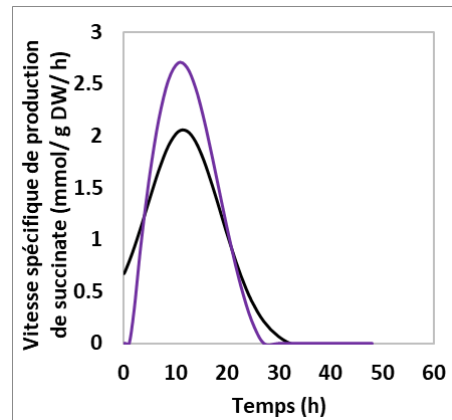
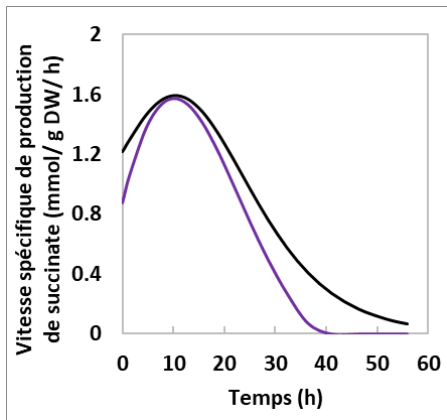
$$k_{LA} = 5 \text{ h}^{-1}$$

$$k_{LA} = 11 \text{ h}^{-1}$$

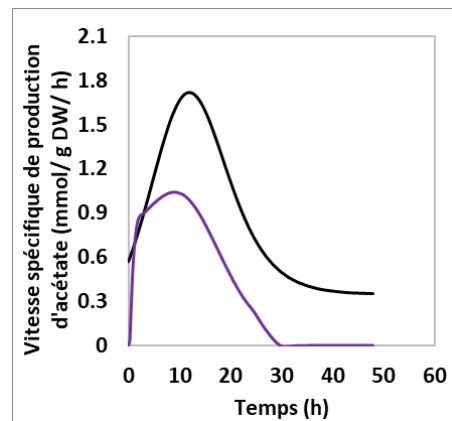
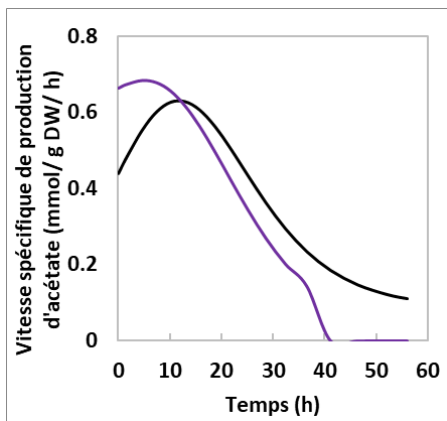
(a)



(b)



(c)

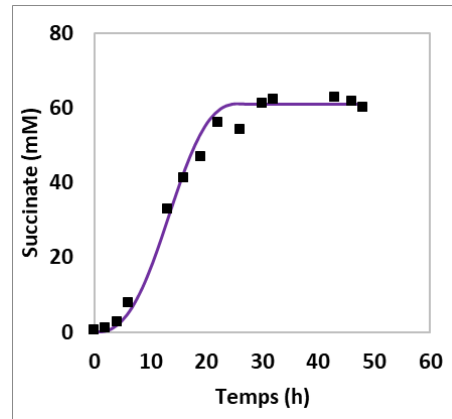
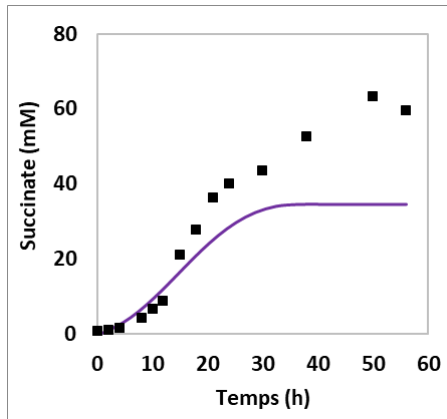


**Figure V.19 :** Évolution des vitesses spécifiques de croissance (a), de production d'acétate (b) et de succinate (c) lors d'une culture en fiole de *C. glutamicum* 2262 $\Delta$ dhA, avec un  $k_{LA}$  de 5 et 11 h<sup>-1</sup>. Vitesses simulées par le modèle ajusté 3 (—) et le modèle cinétique (—).

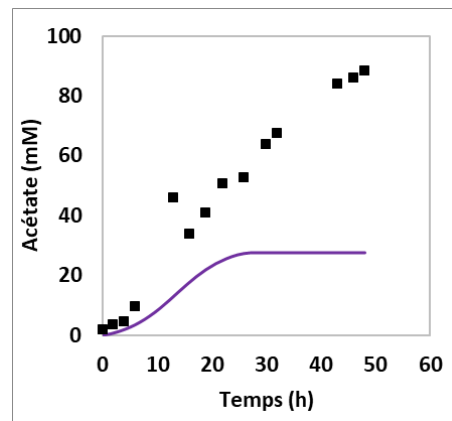
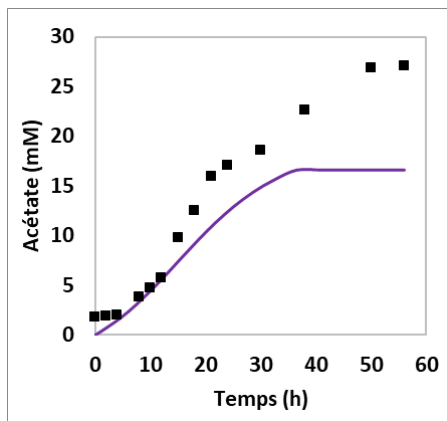
$$k_{LA} = 5 \text{ h}^{-1}$$

$$k_{LA} = 11 \text{ h}^{-1}$$

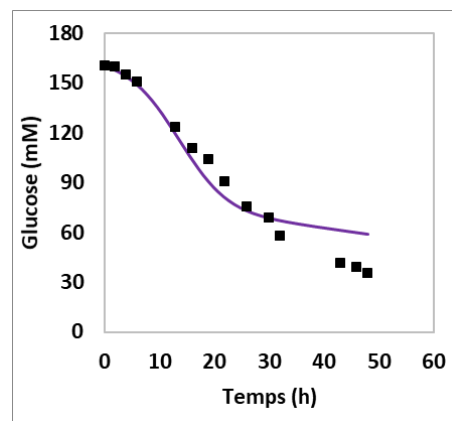
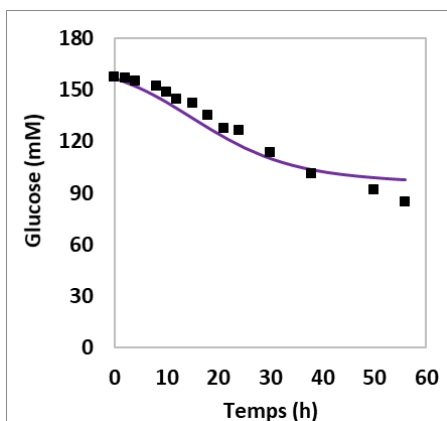
(a)



(b)



(c)



**Figure V.20 :** Évolution des concentrations en succinate (a), acétate (b) et glucose (c) lors d'une culture en fiole de *C. glutamicum* 2262 $\Delta$ ldhA, avec un  $k_{LA}$  de 5 et 11  $\text{h}^{-1}$ . Concentrations simulées par le modèle ajusté 3 (—) et données expérimentales (■).

La figure V.19 présente l'évolution des vitesses spécifiques de croissance et de production de succinate et d'acétate au cours de cultures en mode discontinu de *C. glutamicum* 2262 $\Delta$ ldhA pour des  $k_{LA}$  de 5 et 11 h<sup>-1</sup>. Comme pour la souche sauvage, les flux de biomasse simulés par le modèle ajusté 3 sont plus élevés que les vitesses simulées par le modèle cinétique alors que ceux de production de succinate sont similaires (Figures V.19.a et b). Une bonne corrélation entre la prédiction des flux de production de cet acide organique par le modèle métabolique ajusté 3 et le modèle cinétique a été observée avec un R<sup>2</sup> de 0,93 et 0,86 dans le cas des  $k_{LA}$  de 5 et 11 h<sup>-1</sup> respectivement. Cette corrélation a été confirmée par l'évolution des cinétiques de production de cet acide organique (Figure V.20.a). Un écart plus important a été observé pour la production d'acétate (avec un R<sup>2</sup> de 0,78 et 0,69 pour des  $k_{LA}$  de 5 et 11 h<sup>-1</sup>, respectivement) (Figure V.19.c, Figure V.20.b). En revanche, le modèle simule mieux les flux de production d'acétate dans le cas de la souche mutante que dans celui de la souche sauvage, ce qui est dû à l'absence de synthèse de lactate chez *C. glutamicum* 2262 $\Delta$ ldhA. Comme discuté précédemment, la prédiction de production de succinate par le modèle ajusté 3 est limitée aux valeurs des ratios OUR/GUR les plus faibles (< 1,3 pour le succinate) alors que, expérimentalement, cette production a été observée pour des ratios plus élevés. Ceci engendre une sous-estimation des flux de production de succinate et d'acétate simulés par le modèle métabolique comparés à ceux expérimentaux.

Cette étape d'analyse a permis de vérifier la robustesse du modèle pour la prédiction en conditions dynamiques de succinate dans de faibles niveaux d'oxygénation ( $k_{LA}$  de 5 et 11<sup>-1</sup>). Une amélioration de la prédiction d'acétate a été observée avec la souche mutante, comparativement à la souche sauvage. Cependant, la surestimation du flux de biomasse et la sous-estimation de celui d'acétate dans le cas des deux souches suggèrent que le modèle nécessite des ajustements par rapport à la génération d'ATP qui présente un lien fort avec la production de biomasse et celle de l'acétate.



#### 4. Conclusion

L'objectif principal de cette partie du travail était de construire un modèle métabolique simplifié robuste permettant de simuler, au niveau extra- et intracellulaire, le comportement de *C. glutamicum* dans des conditions de limitation en oxygène.

Le modèle construit est constitué du métabolisme central de *C. glutamicum*, des principales réactions impliquées dans le métabolisme énergétique, des réactions de transport et d'une équation de biomasse. Lors de la phase de construction de ce modèle, des boucles de vérification et des ajustements ont été réalisés. Des adaptations, en particulier au niveau du métabolisme énergétique (par rapport à la production du cofacteur NADPH), ont permis d'améliorer la prédiction de la production des acides organiques, notamment du succinate. Comme dans le cas des simulations réalisées par Shinfuku et al. (2009), une production maximale séquentielle de biomasse ou d'acides organiques a été simulée en fonction des ratios OUR/GUR appliqués. La production maximale de succinate a été obtenue pour des ratios les plus faibles ( $< 0,35$ ).

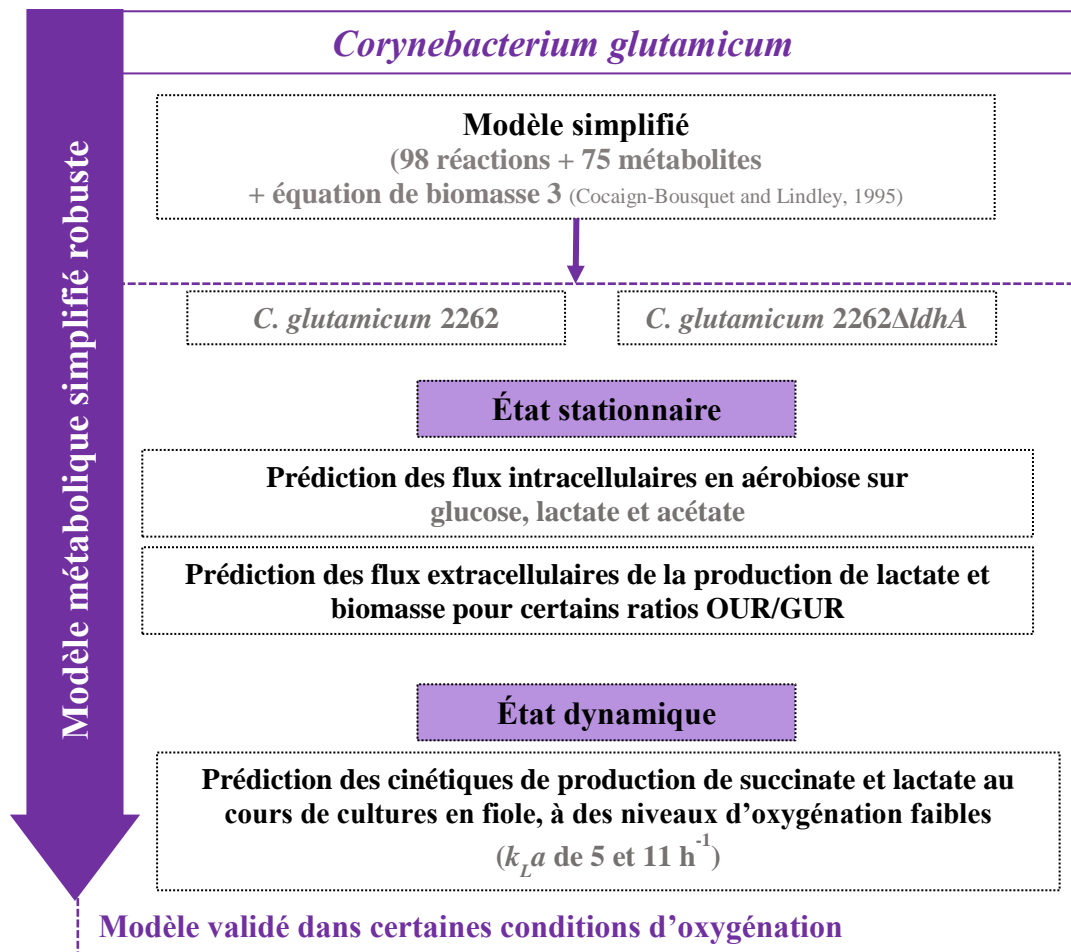
Par ailleurs, une étude de sensibilité des coefficients stœchiométriques de l'équation de biomasse a montré que certains d'entre eux influençaient remarquablement la précision du modèle. Ainsi, il a été constaté que l'ajustement du coefficient stœchiométrique de l'ATP était le levier principal de l'amélioration de la simulation de la synthèse de biomasse, de succinate et de lactate. Étant donnée l'influence de l'équation de biomasse, trois équations précédemment utilisées dans des travaux de simulation métabolique de *C. glutamicum* ont donc été testées, aboutissant à trois modèles ajustés (1, 2 et 3). Comparées à des données expérimentales et de simulation issues de la littérature, les meilleures simulations ont été obtenues avec le modèle ajusté 3. Ce modèle a permis d'améliorer, en particulier, la simulation de la production de succinate dont le déclenchement a été simulé à un OUR/GUR seuil de 0,65, plus élevée que le cas du modèle ajusté 1 mais moins élevée que celui identifié expérimentalement (environ 1). La production maximale de lactate a été obtenue pour des ratios entre 0,65 et 1,3. L'augmentation de ratio favorise la production d'acétate qui était maximale avec des ratios entre 1,3 et 1,55, alors qu'une croissance maximale a été simulée avec les ratios les plus élevés ( $> 1,55$ ).

Le modèle ajusté 3 a également permis de simuler de façon satisfaisante des flux extra- et intracellulaire de production de biomasse et des acides organiques selon le niveau d'oxygénation. En effet, ce modèle simule correctement les flux extracellulaires de production de biomasse et de lactate obtenues lors d'une culture continue de *C. glutamicum* 2262 (ratios

entre 0,25 et 1,42). Il est aussi capable de prédire les flux de production de succinate mais uniquement pour des ratios faibles (0,46 et 0,42 obtenu lors de la culture continue). De plus, les flux intracellulaires, simulés en aérobiose, sont cohérents avec les données de la littérature. Le modèle a ensuite été appliqué en conditions dynamiques. Les résultats de simulation confirment la capacité du modèle ajusté 3 à prédire les cinétiques de production de succinate et de lactate au cours des cultures discontinues de *C. glutamicum* 2262 réalisées dans des conditions de  $k_{LA}$  faibles (5 et 11 h<sup>-1</sup>). Mais, des limites de prédiction des flux de production de biomasse et d'acétate ont été constatées pour les conditions testées.

La robustesse de ce modèle métabolique a également été vérifiée, en modifiant la nature de la source carbonée, d'une part, et en transposant ce modèle à la souche mutante *C. glutamicum* 2262 $\Delta$ *ldhA*, d'autre part. Premièrement, il a été montré que le modèle ajusté 3 est capable de prédire le métabolisme de *C. glutamicum* non seulement sur glucose, mais aussi sur lactate et acétate comme seul substrat carboné ainsi que sur un mélange glucose/acide organique. Il est à noter que ce modèle est capable de différencier les phases de production et de consommation des acides organiques selon le niveau d'oxygénation. Un OUR seuil a été identifié pour chaque acide organique. Dans un second temps, lorsqu'il est transposé à la souche *C. glutamicum* 2262 $\Delta$ *ldhA*, le modèle ajusté 3 permet de simuler la production de succinate. Comme dans le cas de la souche sauvage, le modèle est capable de prédire les cinétiques de production de succinate au cours d'une culture en mode discontinu à des niveaux d'oxygénation faibles ( $k_{LA}$  de 5 et 11 h<sup>-1</sup>).

Le modèle métabolique simplifié proposé dans ce travail est donc capable de prédire la production de biomasse, de lactate, de succinate par *C. glutamicum* pour certaines conditions d'oxygénation. Il est à noter que ce modèle métabolique peut être utilisé non seulement à l'état stationnaire, mais aussi, pour prédire des cinétiques au cours de cultures en mode discontinu. Néanmoins, ses prédictions restent, pour l'instant, limitées à certaines gammes de ratios OUR/GUR pour chaque produit. Ainsi, des limitations de la prédiction du flux de biomasse et d'acétate ont été soulignées. Une réévaluation et un ajustement des voies considérées dans le modèle pour la synthèse de ces produits devront être effectués afin d'améliorer la pertinence des simulations.



**Figure V.21** : Synthèse de principaux résultats obtenus au cours de l'étude de modélisation métabolique.

## **Conclusions et perspectives**

---

## Conclusions et perspectives

### Conclusions

L'objectif de ce travail de thèse était d'étudier et de comprendre le comportement de *C. glutamicum*, vis-à-vis du changement des conditions environnementales au cours d'une culture, en particulier lors de la production de succinate. Deux approches ont été utilisées pour cette étude : (1) une approche expérimentale pour identifier les paramètres influençant la réponse physiologique de cette bactérie et une approche numérique à deux échelles : (2) une modélisation cinétique dédiée à la simulation et à la compréhension au niveau macroscopique et (3) une modélisation métabolique consistant à construire un modèle métabolique simplifié permettant de simuler le comportement de *C. glutamicum* à l'échelle métabolique. Les résultats de simulation par les deux modèles ont été comparés et validés par des données expérimentales obtenues au cours des cultures en fiole et en cultures continues réalisées à différents niveaux d'oxygénation. Ces deux modèles ont été appliqués non seulement pour étudier le comportement de la souche sauvage, *C. glutamicum* 2262, mais aussi d'une souche mutante privée de lactate déshydrogénase, *C. glutamicum* 2262 $\Delta$ ldhA.

Dans la première partie de cette thèse, nous avons tenté à répondre à la question scientifique suivante :

- ❖ **Quel est l'impact d'un changement des conditions environnementales, oxygène et substrat carboné, sur la réponse physiologique de *C. glutamicum* ? Quel est le paramètre le plus approprié pour présenter et quantifier cet impact ?**

Une étude expérimentale, s'appuyant sur des cultures en fiole, a été réalisée afin d'étudier le comportement de *C. glutamicum* dans des conditions de limitation en oxygène et d'identifier les paramètres influençant ce comportement. Le niveau d'oxygénation a été représenté par le coefficient de transfert d'oxygène ( $k_{LA}$ ). Cette étude a montré que la réponse physiologique de *C. glutamicum* dépend à la fois du niveau d'oxygénation et de la disponibilité en glucose. Il a été observé que l'accumulation des acides organiques produits par *C. glutamicum*, le lactate, le succinate et l'acétate, est transitoire dans certaines conditions de  $k_{LA}$ . En fonction de ces dernières, différents intervalles de  $k_{LA}$  ont pu être caractérisés pour leur impact sur le métabolisme de *C. glutamicum* 2262. En effet, la condition de  $k_{LA}$  la plus faible s'est avérée être la condition optimale de production de succinate. Pour des  $k_{LA}$  entre 5 et 11 h<sup>-1</sup>, la

production de lactate était maximale et une consommation de succinate était déclenchée. En augmentant les valeurs de  $k_{La}$  (entre 31 et 77 h<sup>-1</sup>), une consommation de lactate a été observée ainsi qu'une production maximale d'acétate. Les  $k_{La}$  les plus élevés (entre 90 et 118 h<sup>-1</sup>) favorisaient la croissance bactérienne.

Par ailleurs, il a été montré que la reconsommation des acides organiques observée en fin de culture dépendait non seulement du niveau d'oxygénation mais aussi de la disponibilité en glucose. Ainsi, le lactate et l'acétate ont été reconsommés uniquement dans le cas d'une limitation en glucose. Par contre, dans le cas du succinate, sa reconsommation a été observée lorsque la concentration résiduelle en glucose atteignait une valeur seuil d'environ 50 mM (9 g/L). De plus, à partir des résultats de cultures discontinues réalisées avec un mélange de substrats (glucose/succinate) et de travaux précédents (Youn et al., 2008; 2009), il a été suggéré que le succinate intervenait comme un co-substrat énergétique chez *C. glutamicum*.

Les résultats de cette première partie de l'étude expérimentale ont donc permis d'identifier deux paramètres clés, le niveau d'oxygénation et la disponibilité en glucose, influençant le comportement de *C. glutamicum* 2262. En se basant sur ces deux paramètres ainsi que sur les données de la littérature concernant, notamment, la disponibilité de CO<sub>2</sub> (Radoš et al., 2014), un procédé semi-continu en une seule étape, couplant la croissance en aérobiose puis la production des acides organiques en anaérobiose, a été mis en œuvre. Pendant la phase d'anaérobiose, une alimentation en bicarbonate et en glucose a été réalisée, ce qui permet de maintenir la concentration en glucose résiduel au-delà de 50 mM. Ce procédé a permis la production par *C. glutamicum* 2262 de succinate en quantité équimolaire au lactate, acide organique habituellement prédominant, pendant la phase d'anaérobiose. La concentration de succinate obtenue est d'environ 793 mM ce qui est proche de celles mesurées chez des producteurs naturels de cet acide organique. Il est à noter que la maîtrise des conditions opératoires, notamment la transition de la phase d'aérobiose à l'anaérobiose et la disponibilité en glucose (> 50 mM), ont permis d'optimiser la production de succinate chez une souche non modifiée génétiquement de *C. glutamicum*.

Outre une concentration seuil en glucose, la transition entre la production du succinate et la reconsommation de ce dernier semble être également liée à la variation d'un indicateur précédemment utilisé, le rapport OUR/GUR (Shinfuku et al., 2009). Il a ainsi pu être montré que lors des cultures en fioles, en mode discontinu, la bascule métabolique entre la production et la consommation du succinate intervenait pour une valeur seuil de OUR/GUR et ce, chez les

2 souches de *C. glutamicum* étudiées (0,81 avec *C. glutamicum* 2262 et 1,77 avec *C. glutamicum* 2262  $\Delta$ ldhA). Cet indicateur a ainsi été utilisé pour étudier les phases de production de biomasse et des acides organiques chez *C. glutamicum* 2262, lors des cultures discontinues et continues. Cette étude a été basée sur l'évolution des rendements carbonés de conversion de glucose en biomasse et acides organiques, en fonction du ratio OUR/GUR. Un ratio seuil (environ 1) a été identifié pour différencier la phase d'aérobiose (phase I) de la phase de microaérobiose (phase II). Pour des ratios supérieurs à 1 (phase I), la croissance est maximale, et aucune production des acides organiques n'a été observée. Comme attendu, cette phase de croissance n'a pas été identifiée avec les données des cultures en fiole qui ont été réalisés dans des conditions de limitation en oxygène. La diminution des ratios ( $< 1$ ) favorise la production des acides organiques. Cette gamme de ratios correspond à la phase de microaérobiose (phase II) où une production simultanée des acides organiques a été observée. Le rendement carboné maximal de conversion du glucose en succinate, d'environ 23 %, a été obtenu lors d'une culture discontinue, correspondant à un ratio de 0,17. Par contre, pour la production de biomasse pendant la phase II, les rendements carbonés obtenus lors de la culture continue sont plus élevés que ceux obtenus avec les cultures discontinues. D'autre part, dans les deux modes de culture, très peu d'acétate a été produit.

Ces travaux ont permis de confirmer la pertinence du ratio OUR/GUR pour décrire l'impact du niveau d'oxygénation et de la disponibilité de glucose, sur le comportement de *C. glutamicum* 2262. En nous appuyant sur ces observations expérimentales, nous nous sommes intéressés, pour la suite de ces travaux, à appliquer différentes approches numériques pour répondre à la question scientifique suivante :

- ❖ **Quelles peuvent-être les représentations mathématiques les plus appropriées du comportement physiologique de *C. glutamicum* permettant de décrire à l'échelle macroscopique et métabolique l'effet de l'oxygénation et de la disponibilité en substrat carboné ?**

Cette étude est subdivisée en deux parties : la première partie est consacré à l'approche de modélisation cinétique et la seconde à la modélisation métabolique.

## **✚ Modélisation cinétique de la réponse physiologique de *C. glutamicum* en limitation en oxygène**

Un modèle cinétique a été développé afin de prédire et quantifier le comportement de *C. glutamicum* dans des conditions de limitation en oxygène, à l'échelle macroscopique. Ce modèle est constitué de cinq équations : une équation décrivant la vitesse de croissance sur glucose et acide organique, 3 équations décrivant la vitesse de production/consommation de lactate, succinate et acétate, et une équation bilan pour la vitesse de consommation de glucose. Dans ces équations, des fonctions logistiques ont été intégrées afin de prendre en compte les concentrations seuil en glucose et l'effet de la limitation en oxygène. Comme le modèle proposé est générique, sur une large gamme de  $k_{La}$ , décrivant plusieurs phénomènes expérimentaux, une méthodologie a été mise en place pour l'identification des paramètres cinétiques et numériques du modèle, en utilisant un algorithme génétique diploïde. Puis, différentes étapes de validation ont été réalisées. (1) La structure du modèle a été analysée en se basant sur les profils des vitesses spécifiques de croissance, de production/consommation des acides organiques et de consommation de glucose. En complément, la contribution de chaque terme de croissance et de production dans les vitesses globales de croissance et de production/consommation de chaque acide organique a été analysé. Il a été constaté que chaque paramètre du modèle présentait une contribution importante pour au moins une condition de  $k_{La}$ . (2) Le modèle s'est avéré capable de prédire parfaitement les cinétiques de croissance, de production/consommation des trois acides organiques et de consommation de glucose. Cela corrobore les hypothèses faites précédemment sur l'impact du niveau d'oxygénation ainsi que de la concentration résiduelle en glucose sur la réponse physiologique de *C. glutamicum*. Dans un second temps, des corrélations entre les principaux paramètres cinétiques du modèle et le  $k_{La}$  ont été établies sur la base de polynômes cubiques avec des coefficients de corrélation, pour la plupart, supérieurs à 0,89. (3) Ces corrélations ont été intégrées dans le modèle proposé initialement pour former un modèle généralisé. Comme dans le cas du modèle primaire, les profils des concentrations en biomasse, acides organiques et glucose prédites par ce modèle généralisé présentent une bonne concordance avec les données expérimentales. Le coefficient de corrélation entre ces deux types de données est supérieur à 0,98 pour presque toutes les conditions de  $k_{La}$ .



Les deux modèles cinétiques proposés (primaire et généralisé) constituent, à ce jour, les premiers modèles proposés pour décrire les cinétiques de production des acides organiques par *C. glutamicum* dans des conditions de limitation en oxygène. La dernière étape de ces travaux a été consacrée à la modélisation métabolique. L'objectif de cette partie d'étude était de construire un modèle métabolique simplifié afin d'apporter des éléments de compréhension du comportement de cette bactérie, à l'échelle métabolique, pendant la phase de production des acides organiques.

### Développement d'un modèle métabolique simplifié de *C. glutamicum*

Le modèle métabolique simplifié proposé comprend principalement le métabolisme central de *C. glutamicum*, les voies de synthèse des acides lactique, acétique, quelques réactions des voies énergétiques (la chaîne respiratoire) et une réaction artificielle de biomasse. Des ajustements du modèle initial ont été réalisés afin d'améliorer la prédiction du modèle. La suppression de réactions impliquées dans le métabolisme énergétique (la glyceraldehyde-3P déshydrogénase B et la NADP transhydrogénase) a permis d'améliorer la pertinence du modèle en aérobiose (flux intracellulaires) ainsi que dans des conditions de limitation en oxygène (flux intracellulaires et flux extracellulaire de production de succinate). D'autre part, l'influence de l'équation de biomasse sur la prédiction a été étudiée en réalisant une étude de sensibilité. Il a été constaté que l'ATP est le levier principal de la prédiction de production de biomasse, de lactate et de succinate. Afin de prendre en considération l'impact de l'équation de biomasse sur les prédictions du modèle, trois équations de biomasse issues de modèles métaboliques de *C. glutamicum* de la littérature ont été testées. Parmi les trois modèles ainsi comparés, les résultats de simulation, qui ont été réalisées dans des conditions stationnaires et dynamiques, à l'échelle extra- et intracellulaire, ont révélé que le modèle utilisant l'équation de biomasse de Coccagn-Bousquet et Lindley (1995) (modèle ajusté 3) permet d'obtenir les meilleures simulations des flux de production de biomasse et des acides organiques dans les différentes conditions d'oxygénation testées. Ce modèle prédit une production séquentielle de biomasse et des acides organiques en fonction du ratio OUR/GUR, ce qui semble cohérent avec les données de simulation de la littérature (Shinfuku et al., 2009), mais n'est pas complètement confirmé par les données expérimentales obtenues au cours de notre travail. En effet, alors que les travaux de Shinfuku et al. (2005) décrivent 5 phases en fonction du rapport OUR/GUR, le modèle ajusté 3 n'en simule que 4 : (1) une phase de croissance correspondant à la phase d'aérobiose

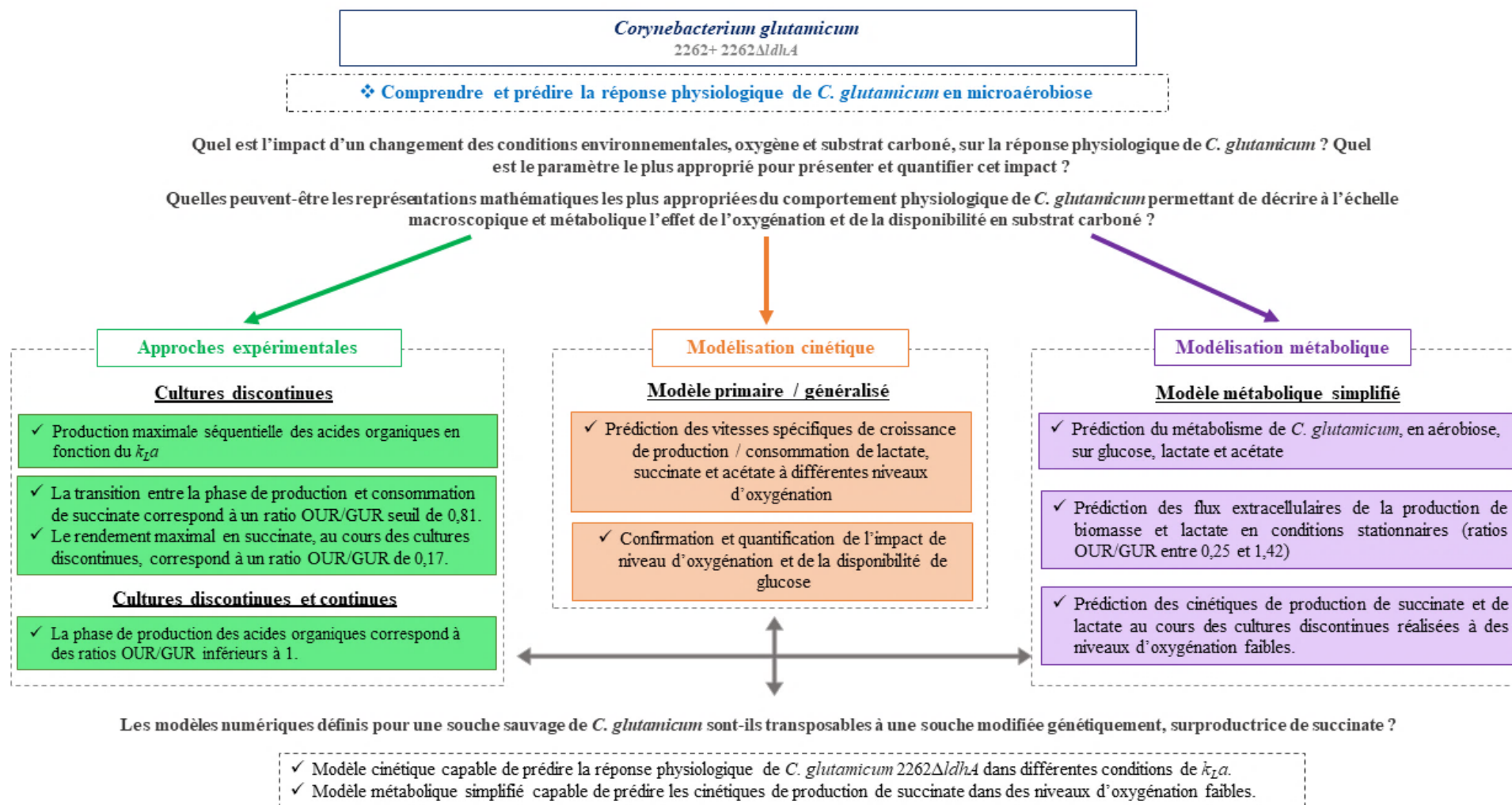
(OUR/GUR > 1,55), (2) une production maximale d'acétate ( $1,3 < \text{OUR/GUR} < 1,55$ ), (3) une production maximale de lactate ( $0,65 < \text{OUR/GUR} < 1,3$ ) et (4) une production maximale de succinate avec les ratios les plus faibles ( $\text{OUR/GUR} < 0,65$ ). Ce ratio seuil pour la production de succinate est plus élevé que celui identifié lors de l'étude de Shinfuku et al. (2009) mais moins élevé que le cas de notre étude expérimentale. Par rapport aux résultats de cette dernière, une bonne concordance a été observée entre les valeurs des flux de production de biomasse et de lactate simulés par le modèle ajusté 3 et ceux déterminés expérimentalement, lors d'une culture continue, pour un OUR/GUR compris entre 0,25 et 1,42. Le flux de production de succinate est, pour sa part, correctement simulé dans 2 conditions de cultures correspondant à des ratios faibles de 0,46 et 0,42. Dans les autres conditions testées, la simulation du flux de production de succinate est moins satisfaisante. Au niveau métabolique, en aérobiose, les flux intracellulaires simulés sont tout à fait cohérents avec ceux relevés dans la littérature. Testé dans des conditions dynamiques, le modèle métabolique proposé est capable de prédire les cinétiques de production de succinate et de lactate, mesurées lors de cultures discontinues réalisées à des conditions d'oxygénation faible ( $k_{LA}$  de 5 et 11 h<sup>-1</sup>). Par contre, des limitations de prédiction ont été soulignées dans le cas des flux de production de ces deux acides organiques à des niveaux d'oxygénation plus élevés. Une surestimation de la synthèse de biomasse a également été notée dans toutes les conditions testées. Enfin, pour l'acétate, des limitations de prédiction ont été soulignées, que ce soit à l'état stationnaire ou dynamique.

Dans un second temps, afin de vérifier sa robustesse, le modèle ajusté 3 a été utilisé pour simuler le métabolisme de croissance de *C. glutamicum* sur différents substrats carbonés avec différents niveaux d'oxygénation. Il a pu être montré que ce modèle est capable, non seulement, de prédire le métabolisme de cette bactérie sur lactate et acétate, en aérobiose, mais aussi de différencier la phase de production et de celle de re-consommation des acides organiques, selon le niveau d'oxygénation, dans le cas d'une croissance sur un mélange de deux substrats carbonés, glucose et acide organique (lactate, acétate ou succinate). Un OUR seuil a été identifié pour cette transition, mais il n'a pas pu être validé par des données expérimentales compte tenu du manque de données dans ces conditions particulières.

Des résultats intéressants ont été obtenus avec les outils numériques étudiés lors de cette thèse (modèle cinétique et modèle métabolique) dans le cas de la souche sauvage, *C. glutamicum* 2262. En parallèle, nous avons choisi d'appliquer ces deux outils à *C. glutamicum* 2262 $\Delta$ ldhA afin d'apporter une réponse à la question suivante :

❖ **Les modèles numériques définis pour une souche sauvage de *C. glutamicum* sont-ils transposables à une souche modifiée génétiquement, surproductrice de succinate ?**

Premièrement, la même démarche d'identification et de validation du modèle cinétique a été suivie pour *C. glutamicum* 2262 $\Delta$ ldhA. Il a été montré que les 2 modèles développés permettaient de prédire parfaitement les cinétiques de croissance, de production / consommation des acides organiques et de consommation de glucose dans des conditions de limitation de l'apport en oxygène. Comme le cas de la souche sauvage, le modèle cinétique a permis non seulement de confirmer l'impact des niveaux d'oxygénation et de la disponibilité de glucose, définis expérimentalement, mais aussi de quantifier cet effet sur une large gamme de  $k_{LA}$  entre 0,6 et 164 h<sup>-1</sup>, en s'appuyant sur des corrélations entre les paramètres cinétiques et les valeurs de  $k_{LA}$  (modèle généralisé). Dans un second temps, le modèle métabolique a été adapté à *C. glutamicum* 2262 $\Delta$ ldhA afin de simuler son métabolisme, notamment la voie de synthèse du succinate, et de prédire ses capacités de production de succinate et des acides organiques, plus généralement. Le modèle s'est avéré capable de prédire les cinétiques de production de succinate dans des conditions de  $k_{LA}$  faible ( $k_{LA} = 11$  h<sup>-1</sup>), au cours d'une culture en fiole. Par contre, le modèle n'était pas en mesure de simuler la production des acides organiques et de biomasse dans une gamme de conditions d'oxygénation plus large. Néanmoins, le modèle cinétique et le modèle métabolique développés initialement pour *C. glutamicum* 2262 s'avèrent être pertinents pour simuler le comportement physiologique de la souche modifiée génétiquement, *C. glutamicum* 2262 $\Delta$ ldhA.



**Figure 2 :** Synthèse des résultats obtenus au cours de la thèse.

## Perspectives

Au cours de nos travaux, deux approches, expérimentales et numériques, ont été réalisées :

- ❖ Lors de l'étude expérimentale, nous avons pu identifier deux paramètres clés influençant le comportement de *C. glutamicum* en microaérobiose, en particulier la production de succinate. Il serait intéressant de compléter cette étude en évaluant l'influence d'autres conditions opératoires comme la température et le pH pendant la phase de production de succinate (phase de microaérobiose). En fait, il a été évoqué, précédemment, lors de l'étude de Khuat (2013) que l'élévation de la température au cours d'un procédé mono-étape de production de lactate par *C. glutamicum* permet d'améliorer la production de succinate. De même, récemment Michel et al. (2015) ont montré que le pH présente un effet négatif sur la croissance de *C. glutamicum* en anaérobiose. Il a été mesuré lors de la partie expérimentale de notre étude, une variation importante de pH au cours des cultures discontinues, d'où la question : est-ce que le pH a une influence significative sur la production de succinate en condition de limitation en oxygène ou encore, sur la transition entre la production et la consommation de cet acide organique ?
  
- ❖ Le modèle cinétique développé, que ce soit le modèle primaire ou le modèle généralisé, présente une excellente capacité de prédiction de la réponse physiologique pour les deux souches de *C. glutamicum* étudiées au cours de ce travail. Il est valable sur une large gamme de  $k_{LA}$ , entre 0,6 et 118 h<sup>-1</sup> dans le cas de *C. glutamicum* 2262 et jusqu'à 164 h<sup>-1</sup> pour *C. glutamicum* 2262 $\Delta$ ldhA. Cependant, ce modèle a été établi pour une seule et unique concentration initiale en glucose quelles que soient les conditions d'oxygénation imposées. Il serait intéressant d'élargir cette gamme de concentration initiale en glucose afin de vérifier si la robustesse du modèle est toujours maintenue. La consommation de glucose peut en effet être associée à l'utilisation d'autres composés du milieu. Le fait de partir d'une seule et unique concentration en glucose pourrait ainsi masquer l'effet limitant d'un autre composant du milieu si la consommation de glucose pouvait être plus importante. D'autre part, il serait intéressant de mettre en place d'une démarche d'optimisation, en utilisant à la fois le  $k_{LA}$  et la concentration en glucose, voire d'autres paramètres si cela est possible (température et/ou pH) comme variables de commande. Compte tenu du besoin simultanée et /ou séquentiel de croissance de biomasse et de production de succinate, une optimisation dynamique pourrait être envisagée à partir de ce modèle. Compte tenu de l'antagonisme

entre la croissance bactérienne et la production d'acides organiques, une optimisation dynamique et multicritère pourrait être réalisée pour améliorer les performances du procédé de production de succinate.

❖ Malgré la pertinence des résultats obtenus avec le modèle métabolique ajusté 3, différentes limitations de prédiction du flux de production de biomasse et des acides organiques ont été soulignées. Pour y remédier, des perspectives sont proposés à plusieurs niveaux :

- Équation de biomasse : Comme l'équation de biomasse, qui peut changer selon les conditions opératoires, présente un effet important sur la prédiction du comportement de *C. glutamicum*, il serait important de déterminer, expérimentalement, les précurseurs nécessaires à la production de biomasse, en particulier dans les conditions opératoires étudiées au cours de ces travaux, en limitation d'oxygénation. Il n'existe pas à ce jour d'équation de biomasse déterminée dans de telles conditions. Les 3 équations de biomasse que nous avons utilisées au cours de ce travail, ont toutes été définies et employées, jusqu'à présent, dans des contextes aérobies et de production des acides aminés.

- Prédiction des flux de la biomasse : une surestimation des flux de production de biomasse en mode discontinu a été observé. Ceci pourrait être dû au choix de la fonction objectif qui est, pour toutes les conditions, la « réaction de biomasse ». Contrairement au cas de la culture continue où *C. glutamicum* oriente son métabolisme pour optimiser la croissance, une production préférentielle des acides organiques a été observée lors des cultures discontinues. Il semble donc intéressant de bien choisir la fonction objectif dans ces conditions de limitation en oxygène. Il serait possible d'utiliser une autre fonction objectif qui pourrait être une réaction de métabolisme énergétique notamment la réaction de génération d'ATP, comme c'était le cas pour certains travaux dans la littérature (Bonarius et al., 1998 ; Ivarsson et al., 2015).

- Prédiction des flux de production d'acétate : un ajustement du modèle, en particulier du métabolisme énergétique, pourrait être nécessaire pour améliorer les flux de cette voie de synthèse. En effet, l'acétate est produit au début de la phase de microaérobiose où le besoin en ATP est encore important par rapport à des conditions de limitation en oxygène plus strictes. Nous faisons l'hypothèse que cette limitation est liée à la génération d'ATP par le modèle, ce qui pose, une nouvelle fois, la question de la pertinence du métabolisme énergétique simplifié dans notre modèle métabolique. Ainsi, il semble judicieux de bien maîtriser les besoins en ATP pour la maintenance cellulaire. L'amélioration des flux de production d'acétate pourrait être une clé pour l'amélioration de la prédiction des autres acides organiques dans des conditions

d'oxygénation plus élevées, correspondant aux conditions favorables de la production d'acétate ( $k_{La} > 11 \text{ h}^{-1}$ ).

- Réconciliation des échelles : une fois le modèle métabolique validé, en conditions stationnaires, il serait intéressant de l'intégrer dans une méthode de résolution comme la dFBA pour le simuler en conditions dynamiques. Pour bien prendre en considération les différents phénomènes observés expérimentalement, notamment la transition entre la production et la consommation des acides organiques lors des cultures discontinues, il serait encore plus intéressant de mettre en place un couplage du modèle cinétique proposé dans ces travaux, qui décrit parfaitement ces phénomènes, avec le modèle métabolique ajusté 3, voire avec un modèle métabolique simplifié comprenant une équation de biomasse plus appropriée aux conditions particulières de la microaérobiose. Cette approche permettrait de proposer des stratégies d'optimisation de cette production en tenant compte des deux échelles métabolique et macro-cinétique du système. Les approches d'optimisation pourraient être basées à la fois sur des modifications génétiques et sur la détermination de conditions opératoires optimales.
- En dernier niveau, il semble intéressant de transposer ce modèle ainsi que le modèle cinétique, sur d'autres souches surproductrices de succinate, comme celles dépourvues des voies de synthèse d'acétate et/ou avec surexpression de la synthèse pyruvate (Chung et al., 2017 ; Litsanov et al., 2012a ; Okino et al., 2008a).

## Références

- Ahn, J.H., Jang, Y.S., Lee, S.Y., 2016. Production of succinic acid by metabolically engineered microorganisms. *Curr. Opin. Biotechnol., Chemical biotechnology • Pharmaceutical biotechnology* 42, 54–66. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.02.034>
- Aiba, S., Shoda, M., Nagatani, M., 1968. Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 10, 845–864. <https://doi.org/10.1002/bit.260100610>
- Alfonsi, A., Cancès, E., Turinici, G., Ventura, B.D., Huisinga, W., 2005. Adaptive simulation of hybrid stochastic and deterministic models for biochemical systems. *ESAIM Proc.* 14, 1–13. <https://doi.org/10.1051/proc:2005001>
- Amrane, A., Prigent, Y., 1994. Mathematical model for lactic acid production from lactose in batch culture: Model development and simulation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 60, 241–246. <https://doi.org/10.1002/jctb.280600303>
- Andrews, J.F., 1968. A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates. *Biotechnol. Bioeng.* 10, 707–723.
- Arndt, A., Auchter, M., Ishige, T., Wendisch, V.F., Eikmanns, B.J., 2008. Ethanol Catabolism in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 15, 222–233. <https://doi.org/10.1159/000107370>
- Ashyraliyev, M., Fomekong-Nanfack, Y., Kaandorp, J.A., Blom, J.G., 2009. Systems biology: parameter estimation for biochemical models. *FEBS J.* 276, 886–902. [https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06844.x@10.1002/\(ISSN\)1742-4658\(CAT\)FreeReviewContent\(VI\)Reviews0809](https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06844.x@10.1002/(ISSN)1742-4658(CAT)FreeReviewContent(VI)Reviews0809)
- Baritugo, K.-A.G., Kim, H.T., David, Y.C., Choi, J.H., Choi, J., Kim, T.W., Park, C., Hong, S.H., Na, J.-G., Jeong, K.J., Joo, J.C., Park, S.J., 2018. Recent advances in metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* as a potential platform microorganism for biorefinery: *Corynebacterium glutamicum* strains as industrial microorganisms for biorefinery. *Biofuels Bioprod. Biorefining* 12, 899–925. <https://doi.org/10.1002/bbb.1895>
- Bartek, T., Blombach, B., Lang, S., Eikmanns, B.J., Wiechert, W., Oldiges, M., Nöh, K., Noack, S., 2011. Comparative <sup>13</sup>C Metabolic Flux Analysis of pyruvate dehydrogenase complex-deficient, L-valine-producing *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 6644–6652. <https://doi.org/10.1128/AEM.00575-11>
- Beal, C., Louvet, P., Corrieu, G., 1989. Influence of controlled pH and temperature on the growth and acidification of pure cultures of *Streptococcus thermophilus* 404 and *Lactobacillus bulgaricus* 398. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32, 148–154. <https://doi.org/10.1007/BF00165879>
- Becker, J., Wittmann, C., 2012. Bio-based production of chemicals, materials and fuels – *Corynebacterium glutamicum* as versatile cell factory. *Curr. Opin. Biotechnol., Nanobiotechnology • Systems biology* 23, 631–640. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.11.012>
- Beefink, H.H., van der Heijden, R.T.J.M., Heijnen, J.J., 1990. Maintenance requirements: energy supply from simultaneous endogenous respiration and substrate consumption. *FEMS Microbiol. Ecol.* 6, 203–209. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1990.tb03942.x>
- Bercovitz, A., Peleg, Y., Battat, E., Rokem, J.S., Goldberg, I., 1990. Localization of pyruvate carboxylase in organic acid-producing *Aspergillus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1594–1597.
- Blombach, B., Schreiner, M.E., Moch, M., Oldiges, M., Eikmanns, B.J., 2007. Effect of pyruvate dehydrogenase complex deficiency on L-lysine production with *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76, 615–623. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0904-1>
- Blombach, B., Seibold, G.M., 2010. Carbohydrate metabolism in *Corynebacterium glutamicum* and applications for the metabolic engineering of L-lysine production strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86, 1313–1322. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2537-z>
- Bona, R., Moser, A., 1997a. Modelling of growth of *Corynebacterium glutamicum* under biotin limitation. *Bioprocess Eng.* 17, 121–125. <https://doi.org/10.1007/PL00008956>
- Bona, R., Moser, A., 1997b. Modelling L-glutamic acid production with *Corynebacterium glutamicum* under biotin limitation. *Acta Biotechnol.* 17, 327–337. <https://doi.org/10.1002/abio.370170408>



- Bonarius HPJ, Timmerarends B, Gooijer CD de, Tramper J. 1998. Metabolite-balancing techniques vs.  $^{13}\text{C}$  tracer experiments to determine metabolic fluxes in hybridoma cells. *Biotechnol. Bioeng.* 58:258–262.
- Bott, M., Niebisch, A., 2003. The respiratory chain of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* 104, 129–153. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(03\)00144-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(03)00144-5)
- Briki, A., Kaboré, K., Olmos, E., Bosselaar, S., Blanchard, F., Fick, M., Guedon, E., Fournier, F., Delaunay, S., 2020. *Corynebacterium glutamicum*, a natural overproducer of succinic acid? *Eng. Life Sci.* 1–11. <https://doi.org/10.1002/elsc.201900141>
- Bruggeman, F.J., Westerhoff, H.V., 2007. The nature of systems biology. *Trends Microbiol.* 15, 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.11.003>
- Çakır, T., Khatibipour, M.J., 2014. Metabolic network discovery by top-down and bottom-up approaches and paths for reconciliation. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2014.00062>
- Cao, Y., Zhang, R., Sun, C., Cheng, T., Liu, Y., Xian, M., 2013. Fermentative succinate production: An emerging technology to replace the traditional petrochemical processes. *BioMed Res. Int.* <https://doi.org/10.1155/2013/723412>
- Carvalho, M., Roca, C., Reis, M.A.M., 2016. Improving succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* from raw industrial carob pods. *Bioresour. Technol.* 218, 491–497. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.140>
- Chai, X., Shang, X., Zhang, Yu, Liu, S., Liang, Y., Zhang, Yun, Wen, T., 2016. A novel pyruvate kinase and its application in lactic acid production under oxygen deprivation in *Corynebacterium glutamicum*. *BMC Biotechnol.* 16. <https://doi.org/10.1186/s12896-016-0313-6>
- Chen, T., Zhu, N., Xia, H., 2014. Aerobic production of succinate from arabinose by metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum*. *Bioresour. Technol.* 151, 411–414. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.017>
- Cheng, K.-K., Zhao, X.-B., Zeng, J., Zhang, J.-A., 2012. Biotechnological production of succinic acid: current state and perspectives. *Biofuels Bioprod. Biorefining* 6, 302–318. <https://doi.org/10.1002/bbb.1327>
- Choi, S., Song, C.W., Shin, J.H., Lee, S.Y., 2015. Biorefineries for the production of top building block chemicals and their derivatives. *Metab. Eng.* 28, 223–239. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2014.12.007>
- Choi, W.-W., Park, S.-D., Lee, S.-M., Kim, H.-B., Kim, Y., Lee, H.-S., 2009. The *whcA* gene plays a negative role in oxidative stress response of *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 290, 32–38. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01398.x>
- Chung, S.-C., Park, J.-S., Yun, J., Park, J.H., 2017. Improvement of succinate production by release of end-product inhibition in *Corynebacterium glutamicum*. *Metab. Eng.* 40, 157–164. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2017.02.004>
- Cocaign, M., Monnet, C., Lindley, NicholasD., 1993. Batch kinetics of *Corynebacterium glutamicum* during growth on various carbon substrates: use of substrate mixtures to localise metabolic bottlenecks. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40, 526–530. <https://doi.org/10.1007/BF00175743>
- Cocaign-Bousquet, M., Guyonvarch, A., Lindley, N.D., 1996. Growth rate-dependent modulation of carbon flux through central metabolism and the kinetic consequences for glucose-limited chemostat cultures of *Corynebacterium glutamicum*. *APPL Env. MICROBIOL* 62, 8.
- Cocaign-Bousquet, M., Lindley, N.D., 1995. Pyruvate overflow and carbon flux within the central metabolic pathways of *Corynebacterium glutamicum* during growth on lactate. *Enzyme Microb Technol* 17, 8.
- Conrady, M., Lemoine, A., Limberg, M.H., Oldiges, M., Neubauer, P., Junne, S., 2019. Carboxylic acid consumption and production by *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol. Prog.* 35, e2804. <https://doi.org/10.1002/btpr.2804>
- Covert, M.W., Palsson, B.O., 2003. Constraints-based models: Regulation of gene expression reduces the steady-state solution space. *J. Theor. Biol.* 221, 309–325. <https://doi.org/10.1006/jtbi.2003.3071>
- Covert, M.W., Schilling, C.H., Famili, I., Edwards, J.S., Goryanin, I.I., Selkov, E., Palsson, B.O., 2001. Metabolic modeling of microbial strains in silico. *Trends Biochem. Sci.* 26, 179–186. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)01754-0](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)01754-0)

- Dai, Z., Guo, F., Zhang, S., Zhang, W., Yang, Q., Dong, W., Jiang, M., Ma, J., Xin, F., 2019. Bio-based succinic acid: an overview of strain development, substrate utilization, and downstream purification. *Biofuels Bioprod. Bioref.* (2019). <https://doi.org/10.1002/bbb.2063>
- Dantzig, G., 2016. *Linear Programming and Extensions*. Princeton University Press.
- Das, J., Jayaprakash, C., 2018. *Systems immunology: An introduction to modeling methods for scientists*. CRC Press.
- Dawes, E.A., Ribbons, D.W., 1965. Studies on the endogenous metabolism of *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 95, 332–343.
- Dawes, E.A., Ribbons, D.W., 1964. Some aspects of the endogenous metabolism of bacteria. *Bacteriol. Rev.* 28, 126–149.
- Dawes, E.A., Ribbons, D.W., 1962. The Endogenous metabolism of microorganisms. *Annu. Rev. Microbiol.* 16, 241–264. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.16.100162.001325>
- Delaunay S. 1999. Étude et modification du métabolisme central de *Corynebacterium glutamicum*, productrice de glutamate (Thèse de doctorat). Université de Lorraine.
- Dietrich, C., Nato, A., Bost, B., Le Maréchal, P., Guyonvarch, A., 2009. Regulation of *ldh* expression during biotin-limited growth of *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology*, 155, 1360–1375. <https://doi.org/10.1099/mic.0.022004-0>
- Dominguez, H., Coccagn-Bousquet, M., Lindley, N.D., 1997. Simultaneous consumption of glucose and fructose from sugar mixtures during batch growth of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47, 600–603. <https://doi.org/10.1007/s002530050980>
- Dominguez, H., Nezondet, C., Lindley, N.D., Coccagn, M., 1993. Modified carbon flux during oxygen limited growth of *Corynebacterium glutamicum* and the consequences for amino acid overproduction. *Biotechnol. Lett.* 15, 449–454.
- Dominguez, H., Rollin, C., Guyonvarch, A., Guerquin-Kern, J.-L., Coccagn-Bousquet, M., Lindley, N.D., 1998. Carbon-flux distribution in the central metabolic pathways of *Corynebacterium glutamicum* during growth on fructose. *Eur. J. Biochem.* 254, 96–102. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2540096.x>
- Dougall, D.K., Weyrauch, K.W., 1980. Abilities of organic acids to support growth and anthocyanin accumulation by suspension cultures of wild carrot cells using ammonium as the sole nitrogen source. *In Vitro* 16, 969–975. <https://doi.org/10.1007/BF02619335>
- Edwards, J.S., Covert, M., Palsson, B., 2002. Metabolic modelling of microbes: the flux-balance approach. *Environ. Microbiol.* 4, 133–140. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00282.x>
- Edwards, V.H., 1970. The influence of high substrate concentrations on microbial kinetics. *Biotechnol. Bioeng.* 12, 679–712. <https://doi.org/10.1002/bit.260120504>
- Eikmanns, B.J., 1992. Identification, sequence analysis, and expression of a *Corynebacterium glutamicum* gene cluster encoding the three glycolytic enzymes glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 3-phosphoglycerate kinase, and triosephosphate isomerase. *J. Bacteriol.* 174, 6076–6086. <https://doi.org/10.1128/jb.174.19.6076-6086.1992>
- Eikmanns, B.J., Follettie, M.T., Griot, M.U., Sinskey, A.J., 1989. The phosphoenolpyruvate carboxylase gene of *Corynebacterium glutamicum*: Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression. *Mol. Gen. Genet. MGG* 218, 330–339. <https://doi.org/10.1007/BF00331286>
- Eikmanns, B.J., Rittmann, D., Sahm, H., 1995. Cloning, sequence analysis, expression, and inactivation of the *Corynebacterium glutamicum icd* gene encoding isocitrate dehydrogenase and biochemical characterization of the enzyme. *J. Bacteriol.* 177, 774–782. <https://doi.org/10.1128/jb.177.3.774-782.1995>
- Eikmanns, B.J., Thum-Schmitz, N., Eggeling, L., Lüdtke, K.-U., Sahm, H., 1994. Nucleotide sequence, expression and transcriptional analysis of the *Corynebacterium glutamicum gltA* gene encoding citrate synthase. *Microbiology*, 140, 1817–1828. <https://doi.org/10.1099/13500872-140-8-1817>
- Fonteix, C., BICKING, F., PERRIN, E., MARC, I., 1995. Haploid and diploid algorithms, a new approach for global optimization: compared performances. *Int. J. Syst. Sci.* 26, 1919–1933. <https://doi.org/10.1080/00207729508929145>
- Fukui, K., Koseki, C., Yamamoto, Y., Nakamura, J., Sasahara, A., Yuji, R., Hashiguchi, K., Usuda, Y., Matsui, K., Kojima, H., Abe, K., 2011. Identification of succinate exporter in *Corynebacterium glutamicum* and its physiological roles under anaerobic conditions. *J. Biotechnol.* 154, 25–34. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.03.010>

- Gallmetzer, M., Meraner, J., Burgstaller, W., 2002. Succinate synthesis and excretion by *Penicillium simplicissimum* under aerobic and anaerobic conditions. *FEMS Microbiol. Lett.* 210, 221–225. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11184.x>
- Geeraerd, A.H., Valdramidis, V.P., Devlieghere, F., Bernaert, H., Debevere, J., Van Impe, J.F., 2004. Development of a novel approach for secondary modelling in predictive microbiology: incorporation of microbiological knowledge in black box polynomial modelling. *Int. J. Food Microbiol.* 91, 229–244. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00388-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00388-X)
- Georgi, T., Engels, V., Wendisch, V.F., 2008. Regulation of L-Lactate utilization by the FadR-Type Regulator LldR of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 190, 963–971. <https://doi.org/10.1128/JB.01147-07>
- Gerstmeir, R., Wendisch, V.F., Schnicke, S., Ruan, H., Farwick, M., Reinscheid, D., Eikmanns, B.J., 2003. Acetate metabolism and its regulation in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol., A New Era in Corynebacterium glutamicum Biotechnology* 104, 99–122. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(03\)00167-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(03)00167-6)
- Gourdon, P., Baucher, M.-F., Lindley, N.D., Guyonvarch, A., 2000. Cloning of the malic enzyme gene from *Corynebacterium glutamicum* and role of the enzyme in lactate metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2981–2987. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.7.2981-2987.2000>
- Gourdon, P., Raheirandimby, M., Dominguez, H., Coccain-Bousquet, M., Lindley, N.D., 2003. Osmotic stress, glucose transport capacity and consequences for glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* 104, 77–85. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(03\)00165-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(03)00165-2)
- Gubler, M., Jetten, M., Lee, S.H., Sinskey, A.J., 1994. Cloning of the pyruvate kinase gene (*pyk*) of *Corynebacterium glutamicum* and site-specific inactivation of *pyk* in a lysine-producing *Corynebacterium lactofermentum* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2494–2500.
- Guettler, M.V., Jain, M.K., Rumler, D., 1996. Method for making succinic acid, bacterial variants for use in the process, and methods for obtaining variants. US5573931A.
- Guettler, M.V., Rumler, D., Jain, M.K., 1999. *Actinobacillus succinogenes* sp. nov., a novel succinic-acid-producing strain from the bovine rumen. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 49, 207–216. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-1-207>
- Guillouet, S., 1996. Étude cinétique et physiologique de *Corynebacterium glutamicum* sous stress osmotique (Thèse de doctorat). Vandoeuvre-les-Nancy, INPL.
- Han, K., Levenspiel, O., 1988. Extended monod kinetics for substrate, product, and cell inhibition. *Biotechnol. Bioeng.* 32, 430–447. <https://doi.org/10.1002/bit.260320404>
- Han, S.O., Inui, M., Yukawa, H., 2008. Effect of carbon source availability and growth phase on expression of *Corynebacterium glutamicum* genes involved in the tricarboxylic acid cycle and glyoxylate bypass. *Microbiology* 154, 3073–3083.
- Han, S.O., Inui, M., Yukawa, H., 2007. Expression of *Corynebacterium glutamicum* glycolytic genes varies with carbon source and growth phase. *Microbiology*, 153, 2190–2202. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/004366-0>
- Hanly, T.J., Henson, M.A., 2013. Dynamic metabolic modeling of a microaerobic yeast co-culture: predicting and optimizing ethanol production from glucose/xylose mixtures. *Biotechnol. Biofuels* 6, 44. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-44>
- Hanson, T.P., Tsao, G.T., 1972. Kinetic studies of the lactic acid fermentation in batch and continuous cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 14, 233–252. <https://doi.org/10.1002/bit.260140207>
- Hayashi, M., Mizoguchi, H., Shiraishi, N., Obayashi, M., Nakagawa, S., Imai, J., Watanabe, S., Ota, T., Ikeda, M., 2002. Transcriptome analysis of acetate metabolism in *Corynebacterium glutamicum* using a newly developed metabolic array. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66, 1337–1344.
- Höffner, K., Harwood, S.M., Barton, P.I., 2013. A reliable simulator for dynamic flux balance analysis. *Biotechnol. Bioeng.* 110, 792–802. <https://doi.org/10.1002/bit.24748>
- Hofmeyr, J.H.S., 1986. Steady-state modelling of metabolic pathways: A guide for the prospective simulator. *Bioinformatics* 2, 5–11. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/2.1.5>
- Holzberg, I., Finn, R.K., Steinkraus, K.H., 1967. A kinetic study of the alcoholic fermentation of grape juice. *Biotechnol. Bioeng.* 9, 413–427. <https://doi.org/10.1002/bit.260090312>
- Hong, S.H., 2007. Systems approaches to succinic acid-producing microorganisms. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 12, 73–79. <https://doi.org/10.1007/BF03028629>

- Huhn, S., Jolkver, E., Krämer, R., Marin, K., 2011. Identification of the membrane protein SucE and its role in succinate transport in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89, 327–335. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2855-1>
- Ikeda, M., Kamada, N., Takano, Y., Nakano, T., 1999. Molecular analysis of the *Corynebacterium glutamicum* transketolase gene. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63, 1806–1810. <https://doi.org/10.1271/bbb.63.1806>
- Ikeda, M., Noguchi, N., Ohshita, M., Senoo, A., Mitsuhashi, S., Takeno, S., 2015. A third glucose uptake bypass in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 31833. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 2741–2750. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6323-1>
- Intratec, 2017. Succinic acid from maleic anhydride - cost analysis - succinic acid E41A. Intratec.
- Inui, M., Murakami, S., Okino, S., Kawaguchi, H., Vertès, A.A., Yukawa, H., 2004. Metabolic analysis of *corynebacterium glutamicum* during lactate and succinate productions under oxygen deprivation conditions. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 7, 182–196. <https://doi.org/10.1159/000079827>
- Inui, M., Suda, M., Okino, S., Nonaka, H., Puskas, L.G., Vertes, A.A., Yukawa, H., 2007. Transcriptional profiling of *Corynebacterium glutamicum* metabolism during organic acid production under oxygen deprivation conditions. *Microbiology* 153, 2491–2504. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/005587-0>
- Ivarsson M, Noh H, Morbidelli M, Soos M. 2015. Insights into pH-induced metabolic switch by flux balance analysis. *Biotechnol. Prog.* 31:347–357.
- Jansen, M.L., van Gulik, W.M., 2014. Towards large scale fermentative production of succinic acid. *Curr. Opin. Biotechnol., Chemical biotechnology • Pharmaceutical biotechnology* 30, 190–197. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.07.003>
- Jantama, K., Zhang, X., Moore, J.C., Shanmugam, K.T., Svoronos, S.A., Ingram, L.O., 2008. Eliminating side products and increasing succinate yields in engineered strains of *Escherichia coli* C. *Biotechnol. Bioeng.* 101, 881–893. <https://doi.org/10.1002/bit.22005>
- Jebari, K., Madiafi, M., 2013. Selection methods for genetic algorithms. *Int. J. Emerg. Sci.* 3, 333–344.
- Jeon, J.-M., Rajesh, T., Song, E., Lee, Hyuk-Won, Lee, Hong-Weon, Yang, Y.-H., 2013. Media optimization of *Corynebacterium glutamicum* for succinate production under oxygen-deprived condition. *J Microbiol Biotechnol* 23, 211–7.
- Jetten, M.S.M., Pitoc, G.A., Follettie, M.T., Sinskey, A.J., 1994. Regulation of phospho(enol)-pyruvate- and oxaloacetate-converting enzymes in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41, 47–52. <https://doi.org/10.1007/BF00166080>
- Jetten, M.S.M., Sinskey, A.J., 1995. Purification and properties of oxaloacetate decarboxylase from *Corynebacterium glutamicum*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 67, 221–227. <https://doi.org/10.1007/BF00871217>
- Jiang, M., Liu, S., Ma, J., Chen, K., Yu, L., Yue, F., Xu, B., Wei, P., 2010. Effect of growth phase feeding strategies on succinate production by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 1298–1300. <https://doi.org/10.1128/AEM.02190-09>
- Jiang, M., Ma, J., Wu, M., Liu, R., Liang, L., Xin, F., Zhang, W., Jia, H., Dong, W., 2017. Progress of succinic acid production from renewable resources: Metabolic and fermentative strategies. *Bioresour. Technol.* 245, 1710–1717. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.209>
- Jojima, T., Noburyu, R., Suda, M., Okino, S., Yukawa, H., Inui, M., 2016. Improving process yield in succinic acid production by cell recycling of recombinant *Corynebacterium glutamicum*. *Fermentation* 2, 5. <https://doi.org/10.3390/fermentation2010005>
- Jolkver, E., Emer, D., Ballan, S., Krämer, R., Eikmanns, B.J., Marin, K., 2009. Identification and characterization of a bacterial transport system for the uptake of pyruvate, propionate, and acetate in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 191, 940–948. <https://doi.org/10.1128/JB.01155-08>
- Kaboré, A.K., 2015. Étude de l'influence de l'aération sur la mise en œuvre d'un procédé de production d'acide succinique par *Corynebacterium glutamicum* 2262 (Thèse de doctorat). Université de Lorraine.
- Kaboré, A.K., Olmos, E., Blanchard, F., Fick, M., Delaunay, S., Guedon, E., 2015. Impact of gas–liquid mass transfer on organic acids production by *Corynebacterium glutamicum* in unbaffled shake flasks. *Biochem. Eng. J.* 101, 237–247. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.06.003>

- Kaboré, A.-K., Olmos, E., Fick, M., Blanchard, F., Guedon, E., Delaunay, S., 2017. Aerobiosis–anaerobiosis transition has a significant impact on organic acid production by *Corynebacterium glutamicum*. *Process Biochem.* 52, 10–21. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.10.007>
- Kalinowski, J., Bathe, B., Bartels, D., Bischoff, N., Bott, M., Burkovski, A., Dusch, N., Eggeling, L., Eikmanns, B.J., Gaigalat, L., Goesmann, A., Hartmann, M., Huthmacher, K., Krämer, R., Linke, B., McHardy, A.C., Meyer, F., Möckel, B., Pfefferle, W., Pühler, A., Rey, D.A., Rückert, C., Rupp, O., Sahm, H., Wendisch, V.F., Wiegräbe, I., Tauch, A., 2003a. The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of l-aspartate-derived amino acids and vitamins. *J. Biotechnol., A New Era in Corynebacterium glutamicum Biotechnology* 104, 5–25. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(03\)00154-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(03)00154-8)
- Kalinowski, J., Bathe, B., Bartels, D., Bischoff, N., Bott, M., Burkovski, A., Dusch, N., Eggeling, L., Eikmanns, B.J., Gaigalat, L., Goesmann, A., Hartmann, M., Huthmacher, K., Krämer, R., Linke, B., McHardy, A.C., Meyer, F., Möckel, B., Pfefferle, W., Pühler, A., Rey, D.A., Rückert, C., Rupp, O., Sahm, H., Wendisch, V.F., Wiegräbe, I., Tauch, A., 2003b. The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. *J. Biotechnol.* 104, 5–25. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(03\)00154-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(03)00154-8)
- Kamada, N., Yasuhara, A., Takano, Y., Nakano, T., Ikeda, M., 2001. Effect of transketolase modifications on carbon flow to the purine-nucleotide pathway in *Corynebacterium ammoniagenes*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 710–717. <https://doi.org/10.1007/s002530100738>
- Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M., Tanabe, M., 2014. Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. *Nucleic Acids Res.* 42, D199–D205. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1076>
- Kappellmann, J., Wiechert, W., Noack, S., 2016. Cutting the Gordian Knot: Identifiability of anaplerotic reactions in *Corynebacterium glutamicum* by means of <sup>13</sup>C-metabolic flux analysis. *Biotechnol. Bioeng.* 113, 661–674. <https://doi.org/10.1002/bit.25833>
- Käß, F., Prasad, A., Tillack, J., Moch, M., Giese, H., Büchs, J., Wiechert, W., Oldiges, M., 2014. Rapid assessment of oxygen transfer impact for *Corynebacterium glutamicum*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 37, 2567–2577. <https://doi.org/10.1007/s00449-014-1234-1>
- Kato, O., Youn, J.-W., Stansen, K.C., Matsui, D., Oikawa, T., Wendisch, V.F., 2010. Quinone-dependent D-lactate dehydrogenase Dld (Cg1027) is essential for growth of *Corynebacterium glutamicum* on D-lactate. *BMC Microbiol.* 10, 321. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-321>
- Kauffman, K.J., Prakash, P., Edwards, J.S., 2003. Advances in flux balance analysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14, 491–496. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2003.08.001>
- Kempes, C.P., van Bodegom, P.M., Wolpert, D., Libby, E., Amend, J., Hoehler, T., 2017. Drivers of bacterial maintenance and minimal energy requirements. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00031>
- Keseler, I.M., Mackie, A., Peralta-Gil, M., Santos-Zavaleta, A., Gama-Castro, S., Bonavides-Martínez, C., Fulcher, C., Huerta, A.M., Kothari, A., Krummenacker, M., Latendresse, M., Muñoz-Rascado, L., Ong, Q., Paley, S., Schröder, I., Shearer, A.G., Subhraveti, P., Travers, M., Weerasinghe, D., Weiss, V., Collado-Vides, J., Gunsalus, R.P., Paulsen, I., Karp, P.D., 2013. EcoCyc: fusing model organism databases with systems biology. *Nucleic Acids Res.* 41, D605–D612. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1027>
- Khan, N.S., Mishra, I.M., Singh, R.P., Prasad, B., 2005. Modeling the growth of *Corynebacterium glutamicum* under product inhibition in L-glutamic acid fermentation. *Biochem. Eng. J.* 25, 173–178. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.01.025>
- Kiefer, P., Heinzle, E., Wittmann, C., 2002. Influence of glucose, fructose and sucrose as carbon sources on kinetics and stoichiometry of lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 28, 338–343.
- Kim, B., Kim, W.J., Kim, D.I., Lee, S.Y., 2015. Applications of genome-scale metabolic network model in metabolic engineering. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*
- Kim, T.Y., Sohn, S.B., Kim, Y.B., Kim, W.J., Lee, S.Y., 2012. Recent advances in reconstruction and applications of genome-scale metabolic models. *Curr. Opin. Biotechnol., Nanobiotechnology • Systems biology* 23, 617–623. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.10.007>

- Kjeldsen, K.R., Nielsen, J., 2009a. In silico genome-scale reconstruction and validation of the *Corynebacterium glutamicum* metabolic network. *Biotechnol. Bioeng.* 102, 583–597. <https://doi.org/10.1002/bit.22067>
- Kjeldsen, K.R., Nielsen, J., 2009b. In silico genome-scale reconstruction and validation of the *Corynebacterium glutamicum* metabolic network. *Biotechnol. Bioeng.* 102, 583–597. <https://doi.org/10.1002/bit.22067>
- Koch-Koerfges, A., Kabus, A., Ochrombel, I., Marin, K., Bott, M., 2012. Physiology and global gene expression of a *Corynebacterium glutamicum*  $\Delta F_1F_0$ -ATP synthase mutant devoid of oxidative phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1817, 370–380. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.10.006>
- Koch-Koerfges, A., Pfelzer, N., Platzen, L., Oldiges, M., Bott, M., 2013. Conversion of *Corynebacterium glutamicum* from an aerobic respiring to an aerobic fermenting bacterium by inactivation of the respiratory chain. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1827, 699–708. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.02.004>
- Koffas, M.A.G., Jung, G.Y., Aon, J.C., Stephanopoulos, G., 2002. Effect of pyruvate carboxylase overexpression on the physiology of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5422–5428. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.11.5422-5428.2002>
- Kora, P., Yadlapalli, P., 2017. Crossover operators in genetic algorithms: A review. *Int. J. Comput. Appl.* 162.
- Kramer, O., 2017. Genetic algorithm essentials, studies in computational intelligence. Springer International Publishing, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-52156-5>
- Kramer, R., Lambert, C., Hoischen, C., Ebbighausen, H., 1990. Uptake of glutamate in *Corynebacterium glutamicum*. 1. Kinetic properties and regulation by internal pH and potassium. *Eur. J. Biochem.* 194, 929–935. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb19488.x>
- Kremling, A., Bettenbrock, K., Laube, B., Jahreis, K., Lengeler, J.W., Gilles, E.D., 2001. The Organization of metabolic reaction networks: III. Application for diauxic growth on glucose and lactose. *Metab. Eng.* 3, 362–379. <https://doi.org/10.1006/mben.2001.0199>
- Kumar, M., Husain, M., Upreti, N., Gupta, D., 2010. Genetic algorithm: Review and application. Available SSRN 3529843.
- Kusumoto, K., Sakiyama, M., Sakamoto, J., Noguchi, S., Sone, N., 2000. Menaquinol oxidase activity and primary structure of cytochrome bd from the amino-acid fermenting bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *Arch. Microbiol.* 173, 390–397. <https://doi.org/10.1007/s002030000161>
- Kusumoto, T., Aoyagi, M., Iwai, H., Kabashima, Y., Sakamoto, J., 2011. Monitoring enzyme expression of a branched respiratory chain of *Corynebacterium glutamicum* using an EGFP reporter gene. *J. Bioenerg. Biomembr.* 43, 257–266. <https://doi.org/10.1007/s10863-011-9355-6>
- Lancaster, C.R.D., Kröger, A., 2000. Succinate: quinone oxidoreductases: new insights from X-ray crystal structures. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1459, 422–431. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(00\)00180-8](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(00)00180-8)
- Lange, J., Münch, E., Müller, J., Busche, T., Kalinowski, J., Takors, R., Blombach, B., 2018. Deciphering the adaptation of *Corynebacterium glutamicum* in transition from aerobiosis via microaerobiosis to anaerobiosis. *Genes* 9, 297. <https://doi.org/10.3390/genes9060297>
- Lange, J., Takors, R., Blombach, B., 2017. Zero-growth bioprocesses: A challenge for microbial production strains and bioprocess engineering. *Eng. Life Sci.* 17, 27–35. <https://doi.org/10.1002/elsc.201600108>
- Lee, P., Lee, S., Hong, S., Chang, H., 2002. Isolation and characterization of a new succinic acid-producing bacterium, *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E, from bovine rumen. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 663–668. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-0935-6>
- Lee, P.C., Lee, S.Y., Hong, S.H., Chang, H.N., 2003. Batch and continuous cultures of *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E for the production of succinic acid from whey and corn steep liquor. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 26, 63–67. <https://doi.org/10.1007/s00449-003-0341-1>
- Lee, P.C., Lee, W.G., Kwon, S., Lee, S.Y., Chang, H.N., 1999. Succinic acid production by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*: effects of the H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> supply and glucose concentration. *Enzyme Microb. Technol.* 24, 549–554. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(98\)00156-2](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(98)00156-2)

- Levenspiel, O., 1980. The monod equation: A revisit and a generalization to product inhibition situations. *Biotechnol. Bioeng.* 22, 1671–1687. <https://doi.org/10.1002/bit.260220810>
- Lin, H., Bennett, G.N., San, K.-Y., 2005a. Fed-batch culture of a metabolically engineered *Escherichia coli* strain designed for high-level succinate production and yield under aerobic conditions. *Biotechnol. Bioeng.* 90, 775–779. <https://doi.org/10.1002/bit.20458>
- Lin, H., Bennett, G.N., San, K.-Y., 2005b. Metabolic engineering of aerobic succinate production systems in *Escherichia coli* to improve process productivity and achieve the maximum theoretical succinate yield. *Metab. Eng.* 7, 116–127. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2004.10.003>
- Ling, E.T., Dibble, J.T., Houston, M.R., Lockwood, L.B., Elliott, L.P., 1978. Accumulation of 1-trans-2,3-epoxysuccinic acid and succinic acid by *Paecilomyces varioti*. *Appl. Environ. Microbiol.* 35, 1213–1215.
- Lipson, D.A., 2015. The complex relationship between microbial growth rate and yield and its implications for ecosystem processes. *Front. Microbiol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00615>
- Litsanov, B., Brocker, M., Bott, M., 2013. Glycerol as a substrate for aerobic succinate production in minimal medium with *Corynebacterium glutamicum*. *Microb. Biotechnol.* 6, 189–195. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2012.00347.x>
- Litsanov, B., Brocker, M., Bott, M., 2012a. Toward homosuccinate fermentation: Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for anaerobic production of succinate from glucose and formate. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 3325–3337. <https://doi.org/10.1128/AEM.07790-11>
- Litsanov, B., Kabus, A., Brocker, M., Bott, M., 2012b. Efficient aerobic succinate production from glucose in minimal medium with *Corynebacterium glutamicum*. *Microb. Biotechnol.* 5, 116–128. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2011.00310.x>
- Liu, L., Agren, R., Bordel, S., Nielsen, J., 2010. Use of genome-scale metabolic models for understanding microbial physiology. *FEBS Lett.*, Gothenburg Special Issue: Molecules of Life 584, 2556–2564. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.04.052>
- Llaneras, F., Picó, J., 2008. Stoichiometric modelling of cell metabolism. *J. Biosci. Bioeng.* 105, 1–11. <https://doi.org/10.1263/jbb.105.1>
- Luedeking, R., Piret, E.L., 2000. A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. *Biotechnol. Bioeng.* 67, 636–644. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(20000320\)67:6<636::AID-BIT3>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(20000320)67:6<636::AID-BIT3>3.0.CO;2-U)
- Lularevic, M., Racher, A.J., Jaques, C., Kiparissides, A., 2019. Improving the accuracy of flux balance analysis through the implementation of carbon availability constraints for intracellular reactions. *Biotechnol. Bioeng.* 116, 2339–2352. <https://doi.org/10.1002/bit.27025>
- Luong, J.H.T., 1987. Generalization of monod kinetics for analysis of growth data with substrate inhibition. *Biotechnol. Bioeng.* 29, 242–248. <https://doi.org/10.1002/bit.260290215>
- Luong, J.H.T., 1985. Kinetics of ethanol inhibition in alcohol fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 27, 280–285. <https://doi.org/10.1002/bit.260270311>
- Machado, D., Costa, R.S., Rocha, M., Ferreira, E.C., Tidor, B., Rocha, I., 2011. Modeling formalisms in Systems Biology. *AMB Express* 1, 45. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-1-45>
- Mahadevan, R., Edwards, J.S., Doyle, F.J., 2002. Dynamic flux balance analysis of diauxic growth in *Escherichia coli*. *Biophys. J.* 83, 1331–1340. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)73903-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)73903-9)
- Mankad, T., Bungay, H.R., 1988. Model for microbial growth with more than one limiting nutrient. *J. Biotechnol.* 7, 161–166. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(88\)90062-4](https://doi.org/10.1016/0168-1656(88)90062-4)
- Mao, Y., Li, G., Chang, Z., Tao, R., Cui, Z., Wang, Z., Tang, Y., Chen, T., Zhao, X., 2018. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for efficient production of succinate from lignocellulosic hydrolysate. *Biotechnol. Biofuels* 11, 95. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1094-z>
- Martínez, I., Bennett, G.N., San, K.-Y., 2010. Metabolic impact of the level of aeration during cell growth on anaerobic succinate production by an engineered *Escherichia coli* strain. *Metab. Eng.* 12, 499–509. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2010.09.002>
- Marx, A., de Graaf, A.A., Wiechert, W., Eggeling, L., Sahm, H., 1996a. Determination of the fluxes in the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* by nuclear magnetic resonance spectroscopy combined with metabolite balancing. *Biotechnol. Bioeng.* 49, 111–129.

- Marx, A., Eikmanns, B.J., Sahm, H., de Graaf, A.A., Eggeling, L., 1999. Response of the Central Metabolism in *Corynebacterium glutamicum* to the use of an NADH-Dependent Glutamate Dehydrogenase. *Metab. Eng.* 1, 35–48. <https://doi.org/10.1006/mben.1998.0106>
- Marx, A., Graaf, A.A. de, Wiechert, W., Eggeling, L., Sahm, H., 1996b. Determination of the fluxes in the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* by nuclear magnetic resonance spectroscopy combined with metabolite balancing. *Biotechnol. Bioeng.* 49, 111–129. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19960120\)49:2<111::AID-BIT1>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19960120)49:2<111::AID-BIT1>3.0.CO;2-T)
- Marx, A., Striegel, K., de Graaf, A.A., Sahm, H., Eggeling, L., 1997. Response of the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* to different flux burdens. *Biotechnol. Bioeng.* 56, 13.
- Matsushita, K., Yamamoto, T., Toyama, H., Adachi, O., 1998. NADPH oxidase system as a superoxide-generating cyanide-resistant pathway in the respiratory chain of *Corynebacterium glutamicum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, 1968–1977. <https://doi.org/10.1271/bbb.62.1968>
- McCall, J., 2005. Genetic algorithms for modelling and optimisation. *J. Comput. Appl. Math.* 184, 205–222. <https://doi.org/10.1016/j.cam.2004.07.034>
- McKinlay, J.B., Vieille, C., Zeikus, J.G., 2007. Prospects for a bio-based succinate industry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76, 727–740. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1057-y>
- Megee III, R.D., Drake, J.F., Fredrickson, A.G., Tsuchiya, H.M., 1972. Studies in intermicrobial symbiosis. *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus casei*. *Can. J. Microbiol.* 18, 1733–1742. <https://doi.org/10.1139/m72-269>
- Mei, J., Xu, N., Ye, C., Liu, L., Wu, J., 2016. Reconstruction and analysis of a genome-scale metabolic network of *Corynebacterium glutamicum* S9114. *Gene* 575, 615–622. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.09.038>
- Meynial-Salles, I., Dorotyn, S., Soucaille, P., 2008. A new process for the continuous production of succinic acid from glucose at high yield, titer, and productivity. *Biotechnol. Bioeng.* 99, 129–135. <https://doi.org/10.1002/bit.21521>
- Michel, A., Koch-Koerfges, A., Krumbach, K., Brocker, M., Bott, M., 2015. Anaerobic growth of *Corynebacterium glutamicum* via mixed-acid fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 7496–7508. <https://doi.org/10.1128/AEM.02413-15>
- Millard, C.S., Chao, Y.P., Liao, J.C., Donnelly, M.I., 1996. Enhanced production of succinic acid by overexpression of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1808–1810.
- Molenaar, D., Rest, M.E. van der, Drysch, A., Yücel, R., 2000. Functions of the membrane-associated and cytoplasmic malate dehydrogenases in the citric acid cycle of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 182, 6884–6891. <https://doi.org/10.1128/JB.182.24.6884-6891.2000>
- Molenaar, D., Rest, M.E. van der, Petrović, S., 1998. Biochemical and genetic characterization of the membrane-associated malate dehydrogenase (acceptor) from *Corynebacterium glutamicum*. *Eur. J. Biochem.* 254, 395–403. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2540395.x>
- Mori, M., Shiio, I., 1987. Phosphoenolpyruvate: Sugar Phosphotransferase Systems and Sugar Metabolism in *Brevibacterium flavum*. *Agric. Biol. Chem.* 51, 2671–2678. <https://doi.org/10.1080/00021369.1987.10868474>
- Moritz, B., Striegel, K., Graaf, A.A. de, Sahm, H., 2000. Kinetic properties of the glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases from *Corynebacterium glutamicum* and their application for predicting pentose phosphate pathway flux in vivo. *Eur. J. Biochem.* 267, 3442–3452. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01354.x>
- Moser, H., 1958. The dynamics of bacterial populations maintained in the chemostat. *Dyn. Bact. Popul. Maint. Chemostat.*
- Muffler, A., Bettermann, S., Haushalter, M., Hörlein, A., Neveling, U., Schramm, M., Sorgenfrei, O., 2002. Genome-wide transcription profiling of *Corynebacterium glutamicum* after heat shock and during growth on acetate and glucose. *J. Biotechnol., Highlights from ECB10 - Applied Genome Research* 98, 255–268. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(02\)00136-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00136-0)
- Nantapong, N., Kugimiya, Y., Toyama, H., Adachi, O., Matsushita, K., 2004. Effect of NADH dehydrogenase-disruption and over-expression on respiration-related metabolism in *Corynebacterium glutamicum* KY9714. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66, 187–193. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1659-6>



- Ng, T.M., Schaffner, D.W., 1997. Mathematical Models for the Effects of pH, Temperature, and Sodium Chloride on the Growth of *Bacillus stearothermophilus* in Salty Carrots. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1237–1243.
- Nghiem, N.P., Davison, B.H., Suttle, B.E., Richardson, G.R., 1997. Production of succinic acid by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 63, 565. <https://doi.org/10.1007/BF02920454>
- Niebisch, A., Bott, M., 2003. Purification of a Cytochromebc 1-aa 3 Supercomplex with Quinol Oxidase Activity from *Corynebacterium glutamicum* Identification of a fourth subunit of cytochromeaa 3 oxidase and mutational analysis of diheme cytochrome c 1. *J. Biol. Chem.* 278, 4339–4346. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210499200>
- Nishimura, T., Vertès, A.A., Shinoda, Y., Inui, M., Yukawa, H., 2007. Anaerobic growth of *Corynebacterium glutamicum* using nitrate as a terminal electron acceptor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75, 889–897. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0879-y>
- Noack, S., Voges, R., Gätgens, J., Wiechert, W., 2017. The linkage between nutrient supply, intracellular enzyme abundances and bacterial growth: New evidences from the central carbon metabolism of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.*, 40 Years of Biotechnology Research at Forschungszentrum Jülich 258, 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.06.407>
- O'Brien, E.J., Monk, J.M., Palsson, B.O., 2015. Using Genome-scale Models to Predict Biological Capabilities. *Cell* 161, 971–987. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.019>
- Ohara, H., Hiyama, K., Yoshida, T., 1992. Non-competitive product inhibition in lactic acid fermentation from glucose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36, 773–776. <https://doi.org/10.1007/BF00172192>
- Okino, S., Inui, M., Yukawa, H., 2005. Production of organic acids by *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68, 475–480. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1900-y>
- Okino, S., Noburyu, R., Suda, M., Jojima, T., Inui, M., Yukawa, H., 2008a. An efficient succinic acid production process in a metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81, 459–464. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1668-y>
- Okino, S., Suda, M., Fujikura, K., Inui, M., Yukawa, H., 2008b. Production of d-lactic acid by *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78, 449–454. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1336-7>
- Omumasaba, C.A., Okai, N., Inui, M., Yukawa, H., 2004. *Corynebacterium glutamicum* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoforms with opposite, atp-dependent regulation. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 8, 91–103. <https://doi.org/10.1159/000084564>
- Orth, J.D., Thiele, I., Palsson, B.Ø., 2010. What is flux balance analysis? *Nat. Biotechnol.* 28, 245–248. <https://doi.org/10.1038/nbt.1614>
- Osten, C.H. von der, Barbas, C.F., Wong, C.-H., Sinskey, A.J., 1989. Molecular cloning, nucleotide sequence and fine-structural analysis of the *Corynebacterium glutamicum fda* gene: structural comparison of *C. glutamicum* fructose-1,6-biphosphate aldolase to class I and class II aldolases. *Mol. Microbiol.* 3, 1625–1637. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1989.tb00148.x>
- Palsson, B.Ø., 2006. *Systems Biology: Properties of reconstructed networks*. Cambridge University Press.
- Parche, S., Burkovski, A., Sprenger, G.A., Weil, B., Krämer, R., Titgemeyer, F., 2001. *Corynebacterium glutamicum*: a dissection of the PTS. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3, 423–428.
- Park, S.M., Shaw-Reid, C., Sinskey, A.J., Stephanopoulos, G., 1997a. Elucidation of anaplerotic pathways in *Corynebacterium glutamicum* via <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy and GC-MS. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47, 430–440. <https://doi.org/10.1007/s002530050952>
- Park, S.M., Sinskey, A.J., Stephanopoulos, G., 1997b. Metabolic and physiological studies of *Corynebacterium glutamicum* mutants. *Biotechnol. Bioeng.* 55, 864–879. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19970920\)55:6<864::AID-BIT5>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19970920)55:6<864::AID-BIT5>3.0.CO;2-E)
- Park, S.-Y., Kim, H.-K., Yoo, S.-K., Oh, T.-K., Lee, J.-K., 2000. Characterization of glk, a gene coding for glucose kinase of *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 188, 209–215. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09195.x>
- Patil, K.R., Åkesson, M., Nielsen, J., 2004. Use of genome-scale microbial models for metabolic engineering. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15, 64–69. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2003.11.003>

- Pelmont, J., 2005. La collecte de l'énergie, in: Biodégradations et Métabolismes : Les bactéries pour les technologies de l'environnement.
- Perrin, E., Mandrille, A., Oumoun, M., Fonteix, C., Marc, I., 1997. Optimisation globale par stratégie d'évolution. *RAIRO - Oper. Res.* 31, 161–201. <https://doi.org/10.1051/ro/1997310201611>
- Petersen, S., Graaf, A.A. de, Eggeling, L., Möllney, M., Wiechert, W., Sahm, H., 2000. In vivo quantification of parallel and bidirectional fluxes in the anaerobiosis of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biol. Chem.* 275, 35932–35941. <https://doi.org/10.1074/jbc.M908728199>
- Peters-Wendisch, P.G., Kreuzer, C., Kalinowski, J., Pátek, M., Sahm, H., Eikmanns, B.J., 1998. Pyruvate carboxylase from *Corynebacterium glutamicum*: characterization, expression and inactivation of the *pyc* gene. *Microbiology*, 144, 915–927. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-4-915>
- Peters-Wendisch, P.G., Wendisch, V.F., Paul, S., Eikmanns, B.J., Sahm, H., 1997. Pyruvate carboxylase as an anaerobic enzyme in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology* 143, 1095–1103. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-4-1095>
- Pirt, S.J., 1982. Maintenance energy: a general model for energy-limited and energy-sufficient growth. *Arch. Microbiol.* 133, 300–302. <https://doi.org/10.1007/BF00521294>
- Pirt, S.J., Hinshelwood, C.N., 1965. The maintenance energy of bacteria in growing cultures. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 163, 224–231. <https://doi.org/10.1098/rspb.1965.0069>
- Price, N.D., Papin, J.A., Schilling, C.H., Palsson, B.O., 2003. Genome-scale microbial in silico models: the constraints-based approach. *Trends Biotechnol.* 21, 162–169. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(03\)00030-1](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(03)00030-1)
- Radoš, D., Turner, D.L., Fonseca, L.L., Carvalho, A.L., Blombach, B., Eikmanns, B.J., Neves, A.R., Santos, H., 2014. Carbon flux analysis by <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance to determine the effect of CO<sub>2</sub> on anaerobic succinate production by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 3015–3024. <https://doi.org/10.1128/AEM.04189-13>
- Ramkrishna, D., Fredrickson, A.G., Tsuchiya, H.M., 1967. Dynamics of microbial propagation: Models considering inhibitors and variable cell composition. *Biotechnol. Bioeng.* 9, 129–170. <https://doi.org/10.1002/bit.260090203>
- Reinscheid, D.J., Eikmanns, B.J., Sahm, H., 1994. Malate synthase from *Corynebacterium glutamicum*: sequence analysis of the gene and biochemical characterization of the enzyme. *Microbiology*, 140, 3099–3108. <https://doi.org/10.1099/13500872-140-11-3099>
- Riedel, C., Rittmann, D., Dangel, P., Möckel, B., Petersen, S., Sahm, H., Eikmanns, B.J., 2001. Characterization of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene from *Corynebacterium glutamicum* and significance of the enzyme for growth and amino acid production. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3, 573–583.
- Rocha, I., Maia, P., Evangelista, P., Vilaça, P., Soares, S., Pinto, J.P., Nielsen, J., Patil, K.R., Ferreira, E.C., Rocha, M., 2010. OptFlux: an open-source software platform for in silico metabolic engineering. *BMC Syst. Biol.* 4, 45. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-4-45>
- Rollin, C., Morgant, V., Guyonvarch, A., Guerquin-Kern, J.-L., 1995. <sup>13</sup>C-NMR Studies of *Corynebacterium melassecola* Metabolic Pathways. *Eur. J. Biochem.* 227, 488–493. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.tb20414.x>
- Saini, N., 2017. Review of selection methods in genetic algorithms. *Int. J. Eng. Comput. Sci.* 6, 22261–22263.
- Samuelov, N.S., Datta, R., Jain, M.K., Zeikus, J.G., 1999. Whey fermentation by *Anaerobiospirillum succiniciproducens* for production of a succinate-based animal feed additive. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2260–2263.
- Scheid, J.-F., 2015. Programmation linéaire - Méthodes et applications 24. Techniques de l'ingénieur.
- Schellenberger, J., Que, R., Fleming, R.M.T., Thiele, I., Orth, J.D., Feist, A.M., Zielinski, D.C., Bordbar, A., Lewis, N.E., Rahmanian, S., Kang, J., Hyduke, D.R., Palsson, B.Ø., 2011. Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox v2.0. *Nat. Protoc.* 6, 1290–1307. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.308>
- Schmid, J.W., Mauch, K., Reuss, M., Gilles, E.D., Kremling, A., 2004. Metabolic design based on a coupled gene expression—metabolic network model of tryptophan production in *Escherichia coli*. *Metab. Eng.* 6, 364–377. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2004.06.003>

- Scholten, E., Dägele, D., 2008. Succinic acid production by a newly isolated bacterium. *Biotechnol. Lett.* 30, 2143–2146. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9806-2>
- Schreiner, M.E., Eikmanns, B.J., 2005. Pyruvate: quinone oxidoreductase from *Corynebacterium glutamicum*: Purification and biochemical characterization. *J. Bacteriol.* 187, 862–871. <https://doi.org/10.1128/JB.187.3.862-871.2005>
- Schreiner, M.E., Fiur, D., Holátko, J., Pátek, M., Eikmanns, B.J., 2005. E1 Enzyme of the pyruvate dehydrogenase complex in *Corynebacterium glutamicum*: Molecular analysis of the gene and phylogenetic aspects. *J. Bacteriol.* 187, 6005–6018. <https://doi.org/10.1128/JB.187.17.6005-6018.2005>
- Schwentner, A., Feith, A., Münch, E., Stiefelmaier, J., Lauer, I., Favilli, L., Massner, C., Öhrlein, J., Grund, B., Hüser, A., Takors, R., Blombach, B., 2019. Modular systems metabolic engineering enables balancing of relevant pathways for L-histidine production with *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol. Biofuels* 12, 65. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1410-2>
- Seletzky, J.M., Noak, U., Fricke, J., Welk, E., Eberhard, W., Knocke, C., Büchs, J., 2007. Scale-up from shake flasks to fermenters in batch and continuous mode with *Corynebacterium glutamicum* on lactic acid based on oxygen transfer and pH. *Biotechnol. Bioeng.* 98, 800–811. <https://doi.org/10.1002/bit.21359>
- Sener, A., Kadiata, M.M., Ladrière, L., Malaisse, W.J., 1997. Synergistic insulinotropic action of succinate, acetate, and glucose esters in islets from normal and diabetic rats. *Endocrine* 7, 151–155. <https://doi.org/10.1007/BF02778136>
- Shen, L., An, Z., Li, Q., Yao, C., Peng, Y., Wang, Y., Lai, R., Deng, X., He, N., 2015. Three-stage fermentation and kinetic modeling of bioflocculant by *Corynebacterium glutamicum*. *Chin. J. Chem. Eng.* 23, 219–226. <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2014.11.012>
- Shin, W.-S., Lee, D., Lee, S.J., Chun, G.-T., Choi, S.-S., Kim, E.-S., Kim, S., 2018. Characterization of a non-phosphotransferase system for cis,cis-muconic acid production in *Corynebacterium glutamicum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 499, 279–284. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.03.146>
- Shinfuku, Y., Sorpitiporn, N., Sono, M., Furusawa, C., Hirasawa, T., Shimizu, H., 2009. Development and experimental verification of a genome-scale metabolic model for *Corynebacterium glutamicum*. *Microb. Cell Factories* 8, 43. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-43>
- Shirai, T., Fujimura, K., Furusawa, C., Nagahisa, K., Shioya, S., Shimizu, H., 2007. Study on roles of anaplerotic pathways in glutamate overproduction of *Corynebacterium glutamicum* by metabolic flux analysis. *Microb. Cell Factories* 6, 19. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-6-19>
- Shukla, A., Pandey, H.M., Mehrotra, D., 2015. Comparative review of selection techniques in genetic algorithm, in: 2015 International Conference on Futuristic Trends on Computational Analysis and Knowledge Management (ABLAZE). Presented at the 2015 International Conference on Futuristic Trends on Computational Analysis and Knowledge Management (ABLAZE), pp. 515–519. <https://doi.org/10.1109/ABLAZE.2015.7154916>
- Sinner, P., Kager, J., Daume, S., Herwig, C., 2019. Model-based analysis and optimisation of a continuous *Corynebacterium glutamicum* bioprocess utilizing lignocellulosic waste. *IFAC-Pap., 8th Conference on Foundations of Systems Biology in Engineering FOSBE 2019* 52, 181–186. <https://doi.org/10.1016/j.ifacol.2019.12.255>
- Song, H., Lee, S.Y., 2006. Production of succinic acid by bacterial fermentation. *Enzyme Microb. Technol.*, The Asia-Pacific Biochemical Engineering Conference (APBioChEC 2005) 39, 352–361. <https://doi.org/10.1016/j.enzmctec.2005.11.043>
- Stansen, C., Uy, D., Delaunay, S., Eggeling, L., Goergen, J.-L., Wendisch, V.F., 2005. Characterization of a *Corynebacterium glutamicum* lactate utilization operon induced during temperature-triggered glutamate production. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 5920–5928. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.10.5920-5928.2005>
- Stelling, J., 2004. Mathematical models in microbial systems biology. *Curr. Opin. Microbiol.* 7, 513–518. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.08.004>
- Stols, L., Donnelly, M.I., 1997. Production of succinic acid through overexpression of NAD(+)-dependent malic enzyme in an *Escherichia coli* mutant. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2695–2701.

- Sugimoto, S., Shiio, I., 1989. Regulation of enzymes for erythrose 4-phosphate synthesis in *Brevibacterium flavum*. *Agric. Biol. Chem.* 53, 2081–2087. <https://doi.org/10.1080/00021369.1989.10869641>
- Sugimoto, S., Shiio, I., 1987. Regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase in *Brevibacterium flavum*. *Agric. Biol. Chem.* 51, 101–108. <https://doi.org/10.1271/bbb1961.51.101>
- Takeno, S., Ohnishi, J., Komatsu, T., Masaki, T., Sen, K., Ikeda, M., 2007. Anaerobic growth and potential for amino acid production by nitrate respiration in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75, 1173–1182. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0926-8>
- Tatsumi, N., Inui, M., 2012. *Corynebacterium glutamicum*: biology and biotechnology. Springer Science & Business Media.
- Teramoto, H., Shirai, T., Inui, M., Yukawa, H., 2008. Identification of a gene encoding a transporter essential for utilization of C4 dicarboxylates in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 5290–5296. <https://doi.org/10.1128/AEM.00832-08>
- Thiele, I., Palsson, B.Ø., 2010. A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction. *Nat. Protoc.* 5, 93–121. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.203>
- Toyoda, K., Teramoto, H., Inui, M., Yukawa, H., 2009. The *ldhA* Gene, encoding fermentative L-lactate dehydrogenase of *Corynebacterium glutamicum*, is under the control of positive feedback regulation mediated by LldR. *J. Bacteriol.* 191, 4251–4258. <https://doi.org/10.1128/JB.00303-09>
- Urbance, S.E., Pometto, A.L., DiSpirito, A.A., Denli, Y., 2004. Evaluation of succinic acid continuous and repeat-batch biofilm fermentation by *Actinobacillus succinogenes* using plastic composite support bioreactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65, 664–670. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1634-2>
- Usuda, Y., Tujimoto, N., Abe, C., Asakura, Y., Kimura, E., Kawahara, Y., Kurahashi, O., Matsui, H., 1996. Molecular cloning of the *Corynebacterium glutamicum* (*Brevibacterium lactofermentum* AJ12036) *odhA* gene encoding a novel type of 2-oxoglutarate dehydrogenase. *Microbiology*, 142, 3347–3354. <https://doi.org/10.1099/13500872-142-12-3347>
- Vallino, J.J., Stephanopoulos, G., 2000. Metabolic flux distributions in *Corynebacterium glutamicum* during growth and lysine overproduction. *Biotechnol. Bioeng.* 67, 872–885. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(20000320\)67:6<872::AID-BIT21>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(20000320)67:6<872::AID-BIT21>3.0.CO;2-X)
- Vallino, J.J., Stephanopoulos, G., 1994. Carbon flux distributions at the pyruvate branch point in *Corynebacterium glutamicum* during lysine overproduction. *Biotechnol. Prog.* 10, 320–326. <https://doi.org/10.1021/bp00027a013>
- van Bodegom, P., 2007. Microbial maintenance: A critical review on its quantification. *Microb. Ecol.* 53, 513–523. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9049-5>
- Varma, A., Palsson, B.O., 1994. Stoichiometric flux balance models quantitatively predict growth and metabolic by-product secretion in wild-type *Escherichia coli* W3110. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3724–3731. <https://doi.org/10.1128/AEM.60.10.3724-3731.1994>
- Vaswani, S., 2010. Bio-based succinic acid. *SRI Consult. Rev.*
- Vemuri, G.N., Eiteman, M.A., Altman, E., 2002. Succinate production in dual-phase *Escherichia coli* fermentations depends on the time of transition from aerobic to anaerobic conditions. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 28, 325–332.
- Wang, C., Zhang, H., Cai, H., Zhou, Z., Chen, Yilu, Chen, Yali, Ouyang, P., 2014. Succinic acid production from corn cob hydrolysates by genetically engineered *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 172, 340–350. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0539-x>
- Wang, D., Li, Q., Song, Z., Zhou, W., Su, Z., Xing, J., 2011. High cell density fermentation via a metabolically engineered *Escherichia coli* for the enhanced production of succinic acid. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 86, 512–518. <https://doi.org/10.1002/jctb.2543>
- Wang, G., Post, W.M., 2012. A theoretical reassessment of microbial maintenance and implications for microbial ecology modeling. *FEMS Microbiol. Ecol.* 81, 610–617. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01389.x>
- Wang, L., Ridgway, D., Gu, T., Moo-Young, M., 2008. Kinetic modeling of cell growth and product formation in submerged culture of recombinant *Aspergillus Niger*. *Chem. Eng. Commun.* 196, 481–490. <https://doi.org/10.1080/00986440802483947>

- Wayman, M., Tseng, M.C., 1976. Inhibition-threshold substrate concentrations. *Biotechnol. Bioeng.* 18, 383–387. <https://doi.org/10.1002/bit.260180308>
- Wei, L.-N., Zhu, L.-W., Tang, Y.-J., 2016. Succinate production positively correlates with the affinity of the global transcription factor Cra for its effector FBP in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Biofuels* 9, 264. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0679-7>
- Wendisch, V.F., de Graaf, A.A., Sahm, H., Eikmanns, B.J., 2000. Quantitative determination of metabolic fluxes during coutilization of two carbon sources: Comparative analyses with *Corynebacterium glutamicum* during growth on acetate and/or glucose. *J. Bacteriol.* 182, 3088–3096. <https://doi.org/10.1128/JB.182.11.3088-3096.2000>
- Wendisch, V.F., Spies, M., Reinscheid, D.J., Schnicke, S., Sahm, H., Eikmanns, B.J., 1997. Regulation of acetate metabolism in *Corynebacterium glutamicum*: transcriptional control of the isocitrate lyase and malate synthase genes. *Arch. Microbiol.* 168, 262–269. <https://doi.org/10.1007/s002030050497>
- Werpy, T., Petersen, G., 2004. Top value added chemicals from biomass: Volume I -- Results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas (No. DOE/GO-102004-1992, 15008859). <https://doi.org/10.2172/15008859>
- Wieschalka, S., Blombach, B., Bott, M., Eikmanns, B.J., 2013. Bio-based production of organic acids with *Corynebacterium glutamicum*: Organic acid production with *Corynebacterium glutamicum*. *Microb. Biotechnol.* 6, 87–102. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12013>
- Wilkinson, D.J., 2009. Stochastic modelling for quantitative description of heterogeneous biological systems. *Nat. Rev. Genet.* 10, 122–133. <https://doi.org/10.1038/nrg2509>
- Willke, Th., Vorlop, K.-D., 2004. Industrial bioconversion of renewable resources as an alternative to conventional chemistry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66, 131–142. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1733-0>
- Wittmann, C., Heinzle, E., 2001. Application of MALDI-TOF MS to lysine-producing *Corynebacterium glutamicum*. *Eur. J. Biochem.* 268, 2441–2455. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.02129.x>
- Wu, H., Li, Z., Zhou, L., Ye, Q., 2007. Improved succinic acid production in the anaerobic culture of an *Escherichia coli pflB ldhA* Double Mutant as a Result of Enhanced Anaplerotic Activities in the Preceding Aerobic Culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 7837–7843. <https://doi.org/10.1128/AEM.01546-07>
- Xu, H., Zhou, Z., Wang, C., Chen, Z., Cai, H., 2016. Enhanced succinic acid production in *Corynebacterium glutamicum* with increasing the available NADH supply and glucose consumption rate by decreasing H<sup>+</sup>-ATPase activity. *Biotechnol. Lett.* 38, 1181–1186. <https://doi.org/10.1007/s10529-016-2093-4>
- Yamauchi, Y., Hirasawa, T., Nishii, M., Furusawa, C., Shimizu, H., 2014. Enhanced acetic acid and succinic acid production under microaerobic conditions by *Corynebacterium glutamicum* harboring *Escherichia coli* transhydrogenase gene *pntAB*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 60, 112–118. <https://doi.org/10.2323/jgam.60.112>
- Yasuda, K., Jojima, T., Suda, M., Okino, S., Inui, M., Yukawa, H., 2007. Analyses of the acetate-producing pathways in *Corynebacterium glutamicum* under oxygen-deprived conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77, 853–860. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1199-y>
- Yedur, S., Berglund, K.A., Dunuwila, D.D., 2001. Succinic acid production and purification. US6265190B1.
- Yeh, P.L.-H., Bajpai, R.K., Iannotti, E.L., 1991. An improved kinetic model for lactic acid fermentation. *J. Ferment. Bioeng.* 71, 75–77. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(91\)90309-5](https://doi.org/10.1016/0922-338X(91)90309-5)
- Yilmaz, L.S., Walhout, A.J., 2017. Metabolic network modeling with model organisms. *Curr. Opin. Chem. Biol., Omics* 36, 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.12.025>
- Yoon, H., Klinzing, G., Blanch, H.W., 1977. Competition for mixed substrates by microbial populations. *Biotechnol. Bioeng.* 19, 1193–1210. <https://doi.org/10.1002/bit.260190809>
- Youn, J.-W., Jolkver, E., Kramer, R., Marin, K., Wendisch, V.F., 2009. Characterization of the dicarboxylate transporter DctA in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 191, 5480–5488. <https://doi.org/10.1128/JB.00640-09>

- Youn, J.-W., Jolkver, E., Kramer, R., Marin, K., Wendisch, V.F., 2008. Identification and characterization of the dicarboxylate uptake system DccT in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 190, 6458–6466. <https://doi.org/10.1128/JB.00780-08>
- Yu, C., Cao, Y., Zou, H., Xian, M., 2011. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for biotechnological production of high-value organic acids and alcohols. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89, 573–583. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2970-z>
- Zahoor, A., Lindner, S.N., Wendisch, V.F., 2012. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* aimed at alternative carbon sources and new products. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 3, e201210004. <https://doi.org/10.5936/CSBJ.201210004>
- Zeikus, J.G., Jain, M.K., Elankovan, P., 1999. Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51, 545–552. <https://doi.org/10.1007/s002530051431>
- Zeng, A.-P., Ross, A., Biebl, H., Tag, C., Günzel, B., Deckwer, W.-D., 1994. Multiple product inhibition and growth modeling of *Clostridium butyricum* and *Klebsiella pneumoniae* in glycerol fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 44, 902–911. <https://doi.org/10.1002/bit.260440806>
- Zhang, Yu, Cai, J., Shang, X., Wang, B., Liu, S., Chai, X., Tan, T., Zhang, Yun, Wen, T., 2017. A new genome-scale metabolic model of *Corynebacterium glutamicum* and its application. *Biotechnol. Biofuels* 10, 169. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0856-3>
- Zhang, Yu, Zhang, Yun, Shang, X., Wang, B., Hu, Q., Liu, S., Wen, T., 2019. Reconstruction of tricarboxylic acid cycle in *Corynebacterium glutamicum* with a genome-scale metabolic network model for trans-4-hydroxyproline production. *Biotechnol. Bioeng.* 116, 99–109. <https://doi.org/10.1002/bit.26818>
- Zhou, Z., Wang, C., Xu, H., Chen, Z., Cai, H., 2015. Increasing succinic acid production using the PTS-independent glucose transport system in a *Corynebacterium glutamicum* PTS-defective mutant. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 42, 1073–1082. <https://doi.org/10.1007/s10295-015-1630-9>
- Zhu, N., Xia, H., Wang, Z., Zhao, X., Chen, T., 2013. Engineering of acetate recycling and citrate synthase to improve aerobic succinate production in *Corynebacterium glutamicum*. *PLoS ONE* 8, e60659. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060659>
- Zhu, N., Xia, H., Yang, J., Zhao, X., Chen, T., 2014. Improved succinate production in *Corynebacterium glutamicum* by engineering glyoxylate pathway and succinate export system. *Biotechnol. Lett.* 36, 553–560. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1376-2>

# **Annexes**

---

## Annexe 1

Métabolites intermédiaires et précurseurs énergétiques nécessaires pour la production de 1 g de biomasse de *C. glutamicum*.

	Équation 1 (Marx et al., 1996a)	Équation 2 (Cocaign-Bousquet et al., 1996)	Équation 3 (Cocaign-Bousquet and Lindley, 1995)
<b>G6P</b>	0,205	0,32	0,205
<b>F6P</b>	0,308	0,13	0,071
<b>R5P</b>	0,879	0,68	0,898
<b>E4P</b>	0,268	0,2	0,361
<b>G3P</b>	0,129	0,06	0,129
<b>3PG</b>	1,295	0,87	1,496
<b>PEP</b>	0,652	0,46	0,519
<b>PYR</b>	2,604	2,81	2,431
<b>ACCOA</b>	3,177	3,12	3,748
<b>AKG</b>	1,224	1,39	1,079
<b>OAA</b>	1,68	1,17	1,787
<b>ATP</b>	47,7	29,2	41,257
<b>NADPH</b>	16,429	11,51	18,225
<b>NADH</b>	0	0,39	-3,547



## Annexe 2

### Programmation linéaire

La programmation linéaire (LP) (ou optimisation linéaire), consiste à résoudre un problème mathématique constitué d'une fonction objectif ( $cx$ ) à plusieurs variables soumises à un ensemble de contraintes linéaires. La formulation d'un programme linéaire peut se faire principalement en trois étapes : (1) choix des variables (ou des inconnues), (2) choix de la fonction objectif à optimiser et (3) détermination des contraintes. Ces dernières représentent les relations entre des variables, exprimées sous la forme d'égalités ou d'inégalités (Dantzig, 2016; Scheid, 2015).

Il existe deux types de résolution : la résolution du problème du maximum et la résolution du problème du minimum. Tous les problèmes de programmation linéaire peuvent se mettre sous l'une de ces deux formes standard : minimiser  $cx$  équivaut à maximiser  $(-cx)$ .

Il existe trois formes d'un problème d'optimisation : générale, canonique et standard. Les méthodes de résolution d'un programme linéaire utilisent souvent la forme standard :

$$\max_{x \in \mathbb{R}^n} [F(x) = c^T x = c_1 x_1 + \dots + c_n x_n]$$

Sous les contraintes :

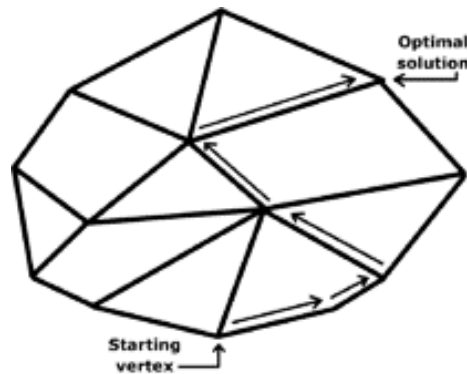
$$\begin{cases} Ax = b \\ x \geq 0 \end{cases}$$

$A$  est la matrice de taille  $m \times n$ . Les inconnues ( $x$ ) doivent être toujours positives.

Un même problème d'optimisation linéaire peut se récrire de diverses manières équivalentes les unes aux autres. Le problème d'optimisation est présenté sous la forme générale qui peut être transformé d'abord en un problème équivalent sous forme canonique, puis sous forme standard. Pour changer une forme, les contraintes d'inégalités doivent être transformées en égalités en intégrant des variables supplémentaires. Ces dernières sont appelées des variables d'écarts. Dans sa forme standard, un programme linéaire ne contient que des contraintes sous la forme d'égalité (Dantzig, 2016; Scheid, 2015).

Pour résoudre ce programme linéaire, il existe deux classes de méthodes de résolution d'un programme linéaire ; la méthode graphique et la méthode du simplexe. Cette dernière,

développée par Dantzig en 1947, est le premier algorithme utilisé pour l'optimisation linéaire. Elle comporte deux phases. La première phase correspond à une phase d'initiation permettant de trouver une solution de base réalisable. L'ensemble des solutions ( $S = \{x \in \mathbb{R}_+^n \mid Ax \geq b\}$ ) admissibles (ou réalisables) est un polyèdre convexe. Une solution réalisable correspond à tout vecteur  $x$  qui satisfait les contraintes du problème d'optimisation (c'est-à-dire  $Ax = 0$  et  $x \geq 0$ ). Ainsi, toute solution optimale de LP se trouve nécessairement à un sommet (ou point extrême), ou éventuellement sur une face, du polyèdre  $S$ . Cette solution optimale est déterminée suite à la deuxième phase de cette méthode ; c'est la phase de progression. Lors de cette phase (Figure 5), des itérations successives sont réalisées afin de trouver les meilleures solutions. Partant d'une solution réalisable, chaque itération consiste à passer d'un sommet du polyèdre convexe, suivant une arête de ce polyèdre, à un autre sommet adjacent afin de minimiser (ou maximiser) la fonction objectif (Dantzig, 2016; Scheid, 2015).



Représentation géométrique des solutions réalisables obtenues par la méthode du simplexe.

La méthode du simplexe est appliquée, pour l'optimisation linéaire, par différents solveurs tels que GLPK (GNU Linear Programming Kit), lp-solve (Licence GNU GPL), CPLEX (IBM ILOG), etc (Scheid, 2015).

### Annexe 3

Listes des réactions du métabolisme central décrit dans le modèle

VOIES MÉTABOLIQUES	NOM _ RÉACTIONS	NOM _ ENZYMES	ÉQUATION _ RÉACTION MÉTABOLIQUE	BORNE MINIMALE	BORNE MAXIMALE
GLYCOLYSE / GLUCONÉOGENÈSE	R_glk	glucokinase	$GLC[c] + ATP[c] \rightarrow G6P[c] + ADP[c] + H[c]$	0	1000
	R_pgi	g6p isomerase	$G6P[c] = F6P[c]$	-1000	1000
	R_pfkA	phosphofruktokinase	$F6P[c] + ATP[c] \rightarrow FDP[c] + ADP[c] + H[c]$	0	1000
	R_glpX	fructose 16biphosphatase	$FDP[c] + H_2O[c] \rightarrow F6P[c] + Pi[c]$	0	1000
	R_fda	fructose biphosphate aldolase	$FDP[c] = DHAP[c] + G3P[c]$	-1000	1000
	R_tpiA	triosephosphate isomerase	$DHAP[c] = G3P[c]$	-1000	1000
	R_gapA	g3p dehydrogenase A	$G3P[c] + NAD[c] + Pi[c] = 13DPG[c] + NADH[c] + H[c]$	-1000	1000
	R_gapB	g3p dehydrogenase B	$G3P[c] + NADP[c] + Pi[c] = 13DPG[c] + NADPH[c] + H[c]$	-1000	1000
	R_pgk	phosphoglycerate kinase	$13DPG[c] + ADP[c] = 3PG[c] + ATP[c]$	-1000	1000
	R_gpmA	phosphoglycerate mutase	$3PG[c] = 2PG[c]$	-1000	1000
	R_eno	phosphopyruvate hydratase	$2PG[c] = PEP[c] + H_2O[c]$	-1000	1000
	R_pyk	pyruvate kinase	$PEP[c] + ADP[c] + H[c] \rightarrow PYR[c] + ATP[c]$	0	1000
	R_ppsA	PEP synthase	$PYR[c] + ATP[c] + H_2O[c] \rightarrow PEP[c] + ADP[c] + 2 H[c]$	0	1000
R_poxB_2	pyruvate dehydrogenase 2	$PYR[c] + COA[c] + NAD[c] \rightarrow ACCOA[c] + CO_2[c] + NADH[c]$	0	1000	
VOIE DES PENTOSE PHOSPHATE	R_zwf	g6p dehydrogenase	$G6P[c] + NADP[c] = 6PGL[c] + NADPH[c] + H[c]$	-1000	1000
	R_devB	6phosphogluconolactonase	$6PGL[c] + H_2O[c] \rightarrow 6PGC[c] + H[c]$	0	1000
	R_gnd	6phosphogluconate dehydrogenase	$6PGC[c] + NADP[c] \rightarrow RU5P[c] + CO_2[c] + NADPH[c]$	0	1000
	R_rpe	ribulose phosphate 3epimerase	$RU5P[c] = XU5P[c]$	-1000	1000
	R_rpi	r5p isomerase B	$RU5P[c] = R5P[c]$	-1000	1000
	R_tkt	transketolase	$R5P[c] + XU5P[c] = S7P[c] + G3P[c]$	-1000	1000
	R_tal	transaldolase	$G3P[c] + S7P[c] = F6P[c] + E4P[c]$	-1000	1000
	R_tkt_2	transketolase 2	$E4P[c] + XU5P[c] = F6P[c] + G3P[c]$	-1000	1000

<b>CYCLE DE KREBS</b>	R_gltA	citrate synthase	$OAA[c] + ACCOA[c] + H_2O[c] \rightarrow CIT[c] + COA[c] + H[c]$	0	1000
	R_acn	aconitate hydratase	$CIT[c] = ACN[c] + H_2O[c]$	-1000	1000
	R_acn_2	aconitate hydratase 2	$ACN[c] + H_2O[c] = ICIT[c]$	-1000	1000
	R_icd	isocitrate dehydrogenase	$ICIT[c] + NADP[c] = AKG[c] + CO_2[c] + NADPH[c]$	-1000	1000
	R_odhA	oxoglutarate to succinate	$AKG[c] + COA[c] + NAD[c] \rightarrow SUCCOA[c] + CO_2[c] + NADH[c]$	0	1000
	R_mdh	malate dehydrogenase	$MAL[c] + NAD[c] = OAA[c] + NADH[c] + H[c]$	-1000	1000
	R_sucD	succinyl coa synthetase	$SUCCOA[c] + ADP[c] + Pi[c] \rightarrow SUCC[c] + ATP[c] + COA[c]$	0	1000
	R_sucfum_redox	succinate fumarate oxydoreductase	$SUCC[c] + FAD[c] = FUM[c] + FADH_2[c]$	-1000	1000
	R_fumC	fumarate hydratase	$FUM[c] + H_2O[c] = MAL[c]$	-1000	1000
	R_gabD2	succinic semialdehyde dehydrogenase	$SUCSAL[c] + NADP[c] + H_2O[c] \rightarrow SUCC[c] + NADPH[c] + 2 H[c]$	0	1000
<b>SHUNT GLYOXYLIQUE</b>	R_aceA	isocitrate lyase	$ICIT[c] \rightarrow GLX[c] + SUCC[c]$	0	1000
	R_aceB	malate synthase	$ACCOA[c] + GLX[c] + H_2O[c] \rightarrow MAL[c] + COA[c] + H[c]$	0	1000
<b>VOIES ANAPLÉROTQUES</b>	R_ppck	pep carboxykinase	$OAA[c] + ATP[c] \rightarrow PEP[c] + CO_2[c] + ADP[c]$	0	1000
	R_pyc	pyruvate carboxylase	$PYR[c] + HCO_3[c] + ATP[c] \rightarrow OAA[c] + ADP[c] + Pi[c] + H[c]$	0	1000
	R_ppc	pep carboxylase	$PEP[c] + HCO_3[c] \rightarrow OAA[c] + Pi[c]$	0	1000
	R_hco3_e	hco3 equilibration reaction	$CO_2[c] + H_2O[c] = HCO_3[c] + H[c]$	-1000	1000
	R_mez	malic enzyme	$MAL[c] + NADP[c] \rightarrow CO_2[c] + PYR[c] + NADPH[c]$	0	1000
	R_mdh2	malate dehydrogenase 2	$MAL[c] + NAD[c] \rightarrow CO_2[c] + PYR[c] + NADH[c]$	0	1000
<b>FERMENTATION ACÉTIQUE</b>	R_ackA	acetate kinase	$ACTP[c] + ADP[c] = AC[c] + ATP[c]$	-1000	1000
	R_eutD	phosphotransacetylase	$ACCOA[c] + Pi[c] = ACTP[c] + COA[c]$	-1000	1000
<b>FERMENTATION LACTIQUE</b>	R_ldh	lactate dehydrogenase	$PYR[c] + NADH[c] + H[c] = LAC\_L[c] + NAD[c]$	-1000	1000

## Annexe 4

Listes des réactions du métabolisme énergétique décrit dans le modèle

VOIES MÉTABOLIQUES	NOM _ RÉACTIONS	NOM _ ENZYMES	ÉQUATION _ RÉACTION MÉTABOLIQUE	BORNE MINIMALE	BORNE MAXIMALE
MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE	R_tdh2	NADP transhydrogenase	$\text{NADH}[c] + \text{NADP}[c] + 2 \text{H}[e] \rightarrow \text{NAD}[c] + \text{NADPH}[c] + 2 \text{H}[c]$	0	1000
	R_sdhA_2	succinate dehydrogenase 2	$\text{FADH2}[c] + \text{UQ}[c] \rightarrow \text{FAD}[c] + \text{UQH2}[c]$	0	1000
	R_pqo	pyruvate quinone oxydoreductase	$\text{PYR}[c] + \text{UQ}[c] + \text{H2O}[c] \rightarrow \text{CO2}[c] + \text{AC}[c] + \text{UQH2}[c]$	0	1000
	R_cydA	cytochrome bd oxydase	$\text{UQH2}[c] + 2 \text{H}[c] + 0.5 \text{O2}[c] \rightarrow \text{UQ}[c] + 2 \text{H}[e] + \text{H2O}[c]$	0	1000
	R_ndh	NADH dehydrogenase	$\text{NADH}[c] + \text{UQ}[c] + 3 \text{H}[c] \rightarrow \text{NAD}[c] + \text{UQH2}[c] + 2 \text{H}[e]$	0	1000
	R_ATPase	ATP synthase	$\text{ADP}[c] + 4 \text{H}[e] + \text{Pi}[c] = \text{ATP}[c] + 3 \text{H}[c] + \text{H2O}[c]$	-1000	1000
	R_nadtrhd	NAD transhydrogenase	$\text{NAD}[c] + \text{NADPH}[c] \rightarrow \text{NADH}[c] + \text{NADP}[c]$	0	1000
	R_ctaD	cytochrome c oxydase	$\text{UQH2}[c] + 0.5 \text{O2}[c] \rightarrow \text{UQ}[c] + \text{H2O}[c]$	0	1000
	R_lld	d lactate dehydrogenase	$\text{LAC}[c] + \text{UQ}[c] + \text{H}[c] \rightarrow \text{PYR}[c] + \text{UQH2}[c]$	0	1000
	R_sdhCAB_1	succinate dehydrogenase 1	$\text{FUM}[c] + \text{UQH2}[c] \rightarrow \text{SUCC}[c] + \text{UQ}[c]$	0	1000
R_mqo	malate quinone oxydoreductase	$\text{MAL}[c] + \text{UQ}[c] \rightarrow \text{OAA}[c] + \text{UQH2}[c]$	0	1000	

## Annexe 5

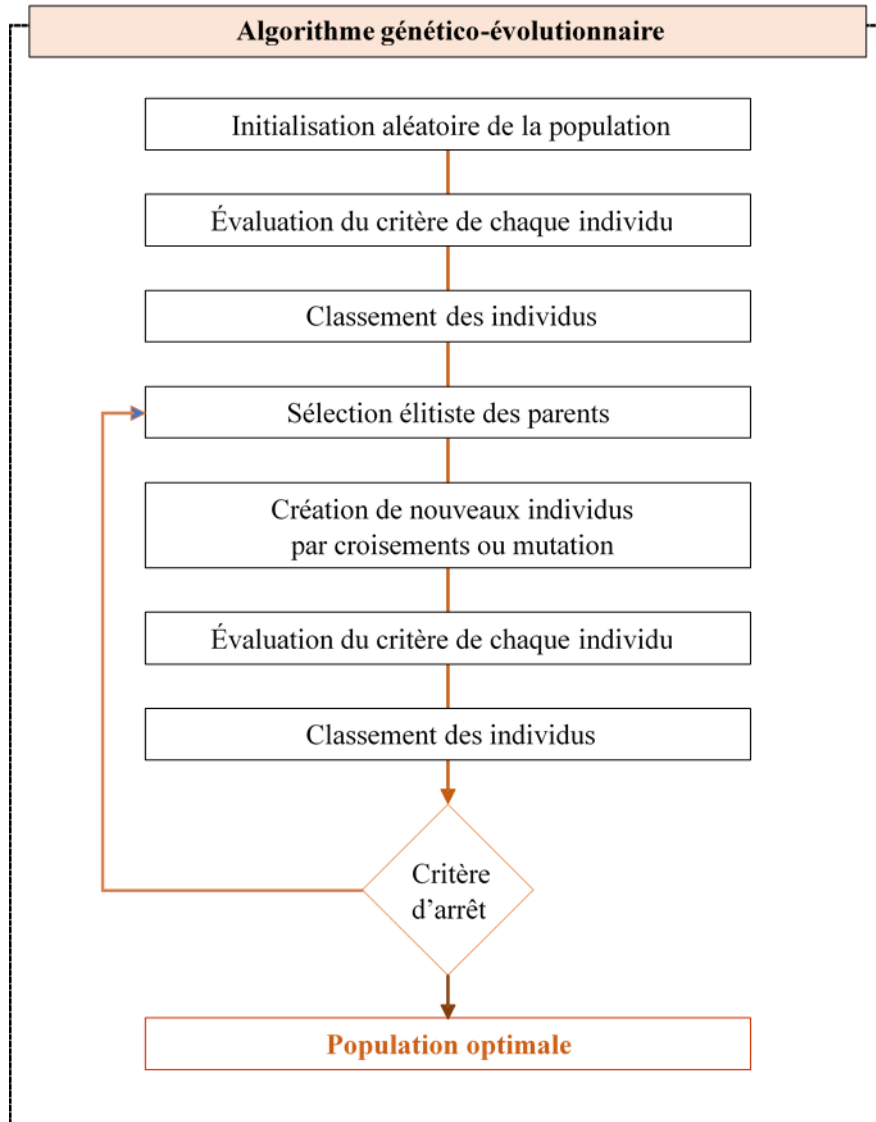
Listes des réactions de transport décrits dans le modèle

NOM _ RÉACTIONS	NOM _ ENZYMES	ÉQUATION _ RÉACTION MÉTABOLIQUE	BORNE MINIMALE	BORNE MAXIMALE
<b>R_ABCTRANSPI</b>	Pi ABC transport system	$ATP[c] + H_2O[c] + Pi[e] \rightarrow ADP[c] + H[c] + 2 Pi[c]$	0	1000
<b>R_PTS_GLC</b>	PTS system glucose specific	$PEP[c] + GLC[e] \rightarrow PYR[c] + G6P[c]$	0	1000
<b>R_PTS_FRU</b>	PTS system fructose specific	$PEP[c] + FRU[e] \rightarrow PYR[c] + F6P[c]$	0	1000
<b>R_PTS_SUCR</b>	PTS system sucrose specific	$PEP[c] + SUCR[e] \rightarrow PYR[c] + SUCR6P[c]$	0	1000
<b>R_RXN05147</b>	D_Glucose_ABC transport	$H_2O[c] + ATP[c] + GLC[e] \rightarrow ADP[c] + Pi[c] + GLC[c] + H[c]$	0	1000
<b>R_RXN05211</b>	citrate transporter	$H[e] + CIT[e] \rightarrow H[c] + CIT[c]$	0	1000
<b>R_RXN05319</b>	H <sub>2</sub> O transport via diffusion	$H_2O[c] = H_2O[e]$	-1000	1000
<b>R_RXN05467</b>	CO <sub>2</sub> transport via diffusion	$CO_2[e] = CO_2[c]$	-1000	1000
<b>R_RXN05468</b>	O <sub>2</sub> transport via diffusion	$O_2[e] = O_2[c]$	-1000	1000
<b>R_RXN05493</b>	2_oxoglutarate transport in via proton symport	$AKG[e] + H[e] = AKG[c] + H[c]$	-1000	1000
<b>R_RXN05561</b>	fumarate transport in out via proton symport	$H[e] + FUM[e] = H[c] + FUM[c]$	-1000	1000
<b>R_RXN05605</b>	L_malate transport in out via proton symport	$H[e] + MAL[e] = H[c] + MAL[c]$	-1000	1000
<b>R_RXN05654</b>	succinate transport in out via proton symport	$SUCC[e] + H[e] = SUCC[c] + H[c]$	-1000	1000
<b>R_TRANS_AC</b>	pyruvate transport reactions	$AC[e] = AC[c]$	-1000	1000
<b>R_TRANS_ADP</b>	transport of ADP	$ADP[c] = ADP[e]$	-1000	1000
<b>R_TRANS_ATP</b>	transport of ATP	$ATP[c] = ATP[e]$	-1000	1000
<b>R_TRANS_COA</b>	transport of COA	$COA[c] = COA[e]$	-1000	1000
<b>R_TRANS_HCO3</b>	transport of HCO <sub>3</sub>	$HCO_3[c] = HCO_3[e]$	-1000	1000
<b>R_TRANS_LAC</b>	pyruvate transport reactions	$LAC_L[e] = LAC_L[c]$	-1000	1000
<b>R_TRANS_PYR</b>	pyruvate transport reactions	$PYR[e] = PYR[c]$	-1000	1000
<b>R_TRANS_UQ</b>	transport of UQ	$UQ[c] = UQ[e]$	-1000	1000
<b>R_TRANS003</b>	phosphate transport in out via proton symporter	$Pi[c] + H[c] = Pi[e] + H[e]$	-1000	1000
<b>R_TRANS009</b>	oxaloacetate transport in out via proton symport	$H[e] + OAA[e] = H[c] + OAA[c]$	-1000	1000

## Annexe 6: Algorithme génétique

### Principe

L'algorithme génétique diploïde est une méthode d'optimisation stochastique basée sur un processus évolutif. Ce processus est présenté dans la figure ci-après.



Cycle évolutif de l'algorithme génétique

### Codification

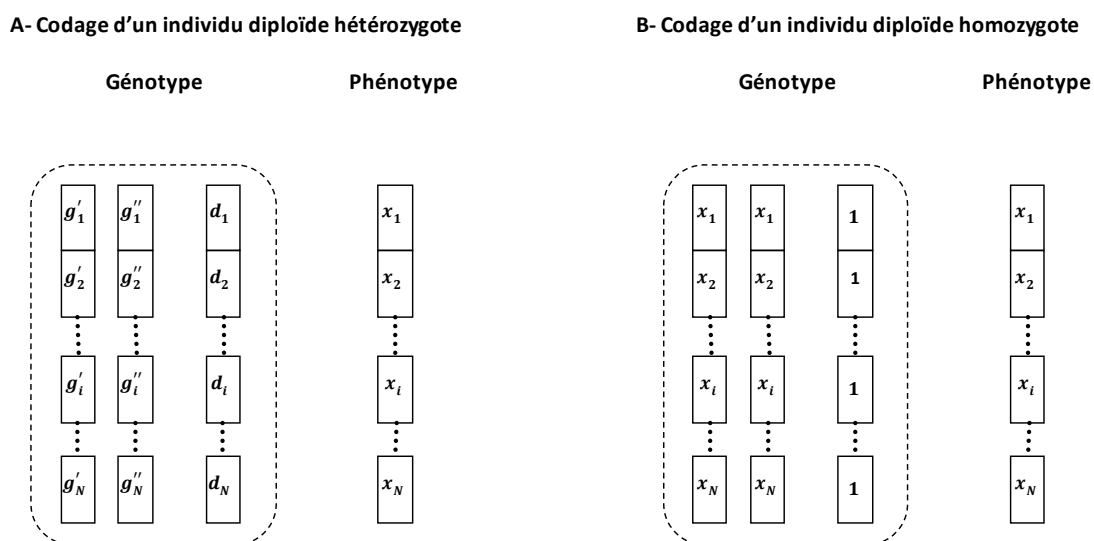
L'algorithme génético-évolutionnaire utilisé dans ces travaux représente le vecteur de paramètres cinétiques de dimension  $N$  sous la forme d'une codification réelle du génotype d'un individu diploïde constitué de deux chromosomes de  $N$  allèles et d'un vecteur de dominance de même dimension. Ce dernier vecteur exprime le caractère dominant (1) ou récessif de l'allèle

du premier chromosome et permet de construire le phénotype de chaque individu. Le caractère diploïde des individus assure une diversité de la population.

L'algorithme AGD implique à la fois des individus hétérozygotes et homozygotes, dans une proportion définie au préalable.

L'individu hétérozygote possède les caractéristiques complètes d'un individu diploïde avec deux chromosomes différents et un vecteur d'expression de la dominance binaire (Figure 12A). Le phénotype d'un individu hétérozygote est déterminé par :  $g_i = d_i g'_i + (1 - d_i) g''_i$  où  $g_i, g'_i, g''_i$  sont les  $i^{\text{ème}}$  allèles du nouvel individu, du premier et du second parent et  $d_i$  l'indicateur de dominance correspondant. Les opérateurs de croisement associés permettent une recherche de la solution optimale dans un espace discrétisé.

L'individu homozygote possède deux chromosomes identiques et un vecteur de dominance unitaire (Figure ci-dessous). Ses caractéristiques l'apparentent ainsi à un individu haploïde et les opérateurs de croisement associés permettent une recherche de la solution optimale dans un espace continu.



Représentation des individus diploïdes hétérozygotes (A) et homozygotes (B). Le phénotype d'un individu est déterminé à partir de son génotype constitué de 2 chromosomes, et son vecteur de dominances (Perrin et al., 1997).

### Processus itératif

La première étape de ce processus évolutif consiste à générer, de manière aléatoire dans un domaine prédéfini, la première population de N individu (génération 0) avec une proportion prédéfinie d'individus hétérozygotes et homozygotes. Dans cette population, le phénotype de



chaque individu représente un vecteur de paramètres du modèle à évaluer. Ce phénotype est utilisé pour intégrer le système d'équations différentielles, calculer les concentrations modélisées et en déduire la valeur du critère d'écart relatif entre les concentrations simulées et expérimentales. Tous les individus de la population sont alors classés selon la valeur de leur critère et les moins performants (avec un critère élevé) sont éliminés. Les meilleurs individus sont conservés dans la génération suivante (sélection élitiste). Pour maintenir la taille de la population à chaque génération, la nouvelle génération est complétée par la création des nouveaux individus, soit par mutation, soit par croisement homozygote ou hétérozygote aléatoire entre deux individus parents conservés dans la génération précédente. Parmi ces nouveaux individus, seuls ceux qui sont au moins aussi bons que le parent le moins performant sont conservés. Une fois la population complétée, les individus sont classés à nouveau et les moins performants sont éliminés. Ce processus est répété jusqu'à ce que le critère d'arrêt (seuil de précision) soit satisfait. À la fin de ce processus, la population a convergé vers une population optimale où tous les individus ont des performances (un critère) équivalentes et ou le phénotype de l'individu classé en premier est conservé comme vecteur optimal des paramètres du modèle.

#### Croisements hétérozygotes et homozygotes

Pour améliorer la convergence de l'algorithme AGD, les croisements génèrent des individus hétérozygotes et homozygotes, dans une proportion définie au préalable

Un croisement qui doit conduire à un individu homozygote, s'appuie sur les phénotypes des parents, générant un nouvel individu dont les caractéristiques sont une combinaison linéaire des phénotypes des parents et s'inscrivent donc dans un intervalle délimité par ces phénotypes (croisement sur un domaine continu).

$$x_i = \alpha_i x'_i + (1 - \alpha_i)x''_i$$

où  $x_i, x'_i, x''_i$  représentent la  $i^{\text{ème}}$  composante du phénotype respectivement du nouvel individu, du premier et du second parent et  $\alpha_i$  un nombre aléatoire dans  $[-\epsilon_0 ; 1 + \epsilon_0]$ .

Un croisement qui doit conduire à un individu hétérozygote, s'appuie sur les allèles du génotype des parents, générant un nouvel individu dont les caractéristiques sont ainsi héritées des valeurs du génome des deux parents (croisement sur un maillage de valeurs). Pour construire les deux chromosomes de l'enfant, chaque parent cède aléatoirement l'allèle d'un de ses deux

chromosomes. La dominante des allèles de l'enfant est déterminée en se basant sur la dominance de chaque allèle des parents. Trois cas sont alors possibles :

- (1) L'allèle fourni par un parent est dominant alors que celui fourni par l'autre parent est récessif. L'allèle issu du parent dominant reste dominant chez l'enfant.
- (2) Les deux allèles sélectionnés sont dominants. Les performances des deux parents sont analysées et l'allèle du meilleur parent sera dominant.
- (3) Les deux allèles sélectionnés sont récessifs. La dominance sera aléatoire.

### Mutations

Dans notre algorithme, les mutations génèrent aléatoirement des individus totalement nouveaux, dans le domaine de recherche à l'instar de ceux générés pour la génération initiale. L'AGD ne prévoit pas de mutations ponctuelles sur les allèles des individus.

### Convergence

Un taux élevé d'hétérozygotes dans la population augmente la vitesse de convergence en parcourant l'espace sur un maillage défini par les génotypes des individus de la population. Cela peut cependant conduire à un optimum local. A l'inverse, un taux élevé d'individus homozygotes ralentit la convergence en scrutant un espace continu mais limite le risque de convergence vers un optimum local.

### Réglage des paramètres

Le réglage des paramètres de cet algorithme est nécessaire afin d'assurer la convergence vers la solution optimale. Ces paramètres sont constants au cours de ce processus itératif.

La liste de ces paramètres est présentée ci-dessous :

- Taille de population : La population doit être représentative du domaine de recherche. Une taille faible peut favoriser la convergence vers un optimum local. Et si la population est grande, le processus prend un énorme temps de calcul. Le nombre d'individus suggéré est voisin de 200 fois la dimension  $N$  du problème à traiter.
- Seuil de sélection : Ce seuil (ou taux de mortalité) représente la proportion d'individus qui sont éliminés lors de la sélection élitiste à chaque génération. Si la valeur est trop

faible, la vitesse de convergence est réduite. Une valeur très élevée peut faire converger rapidement l'algorithme vers un optimum local.

- Taux de mutation : La mutation est indispensable dans le processus mais doit rester limitée. Ce paramètre permet de renouveler la diversité de la population. Une valeur très élevée augmente le risque de ralentir la convergence.
- Taux d'homozygotie : ce paramètre correspond à la proportion des individus homozygotes dans la population.
- Précision sur le critère : La précision sur le critère est le principal critère d'arrêt de processus d'optimisation. Ce processus s'arrête si l'écart entre le meilleur et le plus mauvais des individus de la population est inférieur à cette précision.

## Annexe 7

**Table S1:** kinetic parameters of models for growth, glucose consumption and organic acids production by *C. glutamicum* 2262 during culture in un baffled shake flasks performed at different  $k_{La}$  value of 0.6, 5, 11, 20, 31, 44, 77, 90 and 118  $h^{-1}$ .

$h^{-1}$	$k_{La}$	<b>0.6</b>	<b>5</b>	<b>11</b>	<b>20</b>	<b>44</b>	<b>90</b>	<b>118</b>	
$g L^{-1}$	$X^{(1)}_{max}$	1.76	2.12	3.16	3.94	5.4	10.4	11.9	
$h^{-1}$	$\mu^G_{max}$	0.1 (2.1E-05) <sup>(2)</sup>	0.14 (5.3E-05)	0.18 (8.5E-05)	0.21 (9.7E-05)	0.37 (1E-04)	0.43 (9E-07)	0.49 (3E-05)	
$g (g DW)^{-1}$	$Y^{X_{LX}}$	11.9 (6.7E-04)	12.8 (5.9E-03)	8.3 (2.6E-03)	8.5 (9.4E-04)	6.01 (2E-03)	6.09 (4.3E-05)	6.09 (8.8E-04)	
	$Y^{X_{AX}}$	0.29 (1.5E-05)	0.56 (5.2E-05)	0.62 (5.3E-04)	0.55 (8.6E-04)	0.56 (6.7E-04)	0.92 (6.4E-06)	0.77 (2.1E-06)	
	$Y^{X_{SX}}$	6.09 (2.4E-04)	5.87 (1.9E-03)	3.98 (7.9E-04)	3.03 (8.6E-04)	1.67 (5.4E-04)	1.48 (3.6E-06)	1.18 (1.5E-04)	
$g g^{-1}$	$Y^{X_{XG}}$	0.34 (2.9E-05)	0.34 (8.9E-04)	0.4 (1.5E-04)	0.41 (1.2E-04)	0.41 (1E-04)	0.42 (2.7E-06)	0.41 (5.6E-05)	
	$Y^{X_{LG}}$	0.96 (8.7E-05)	0.99 (1.8E-04)	0.99 (2.4E-04)	0.91 (1.8E-04)	0.92 (3E-04)	0.77 (1.8E-04)	0.77 (4E-05)	
	$Y^{X_{AG}}$	0.39 (4.4E-05)	0.53 (4.3E-04)	0.58 (7.7E-04)	0.54 (2.7E-04)	0.57 (3.4E-04)	0.51 (5.8E-04)	0.49 (3.8E-04)	
	$Y^{X_{SG}}$	0.87 (2.2E-04)	1.09 (5.7E-04)	1.11 (3.8E-04)	0.84 (3.3E-04)	0.82 (2.7E-03)	0.57 (2.5E-05)	0.57 (6.5E-06)	
$g (g DW)^{-1} h^{-1}$	$\alpha^L$	0.06 (1.3E-05)	0.06 (6.7E-05)	0.04 (4.6E-05)	0.04 (1.6E-05)	0.03 (1.7E-05)	0.03 (1.2E-06)	0.03 (1.9E-07)	
	$\alpha^A$	0.01 (7.5E-07)	0.01 (6.5E-06)	0.025					
	$\alpha^S$	0.031 (1.7E-05)			0.0132				
	$m^L$	0	0	0.02 (1.1E-05)	0.03 (1.4E-05)	0.04 (4E-05)	0.04 (2.9E-05)	0.05 (9E-06)	
	$m^G$	0.008						0.061	
	$m^S$	0.026							
	$m^A$	0.005							
$h^{-1}$	$\mu^{LA}_{max}$						0.08 (3.1E-06)	0.11 (1.1E-04)	
$g (g DW)^{-1}$	$1/Y^{X_{XA}}$	-					1.065 (5.1E-04)		
	$1/Y^{X_{XL}}$						4.353 (1.1E-04)		

<sup>(1)</sup> : maximal biomass concentration (experimental data).

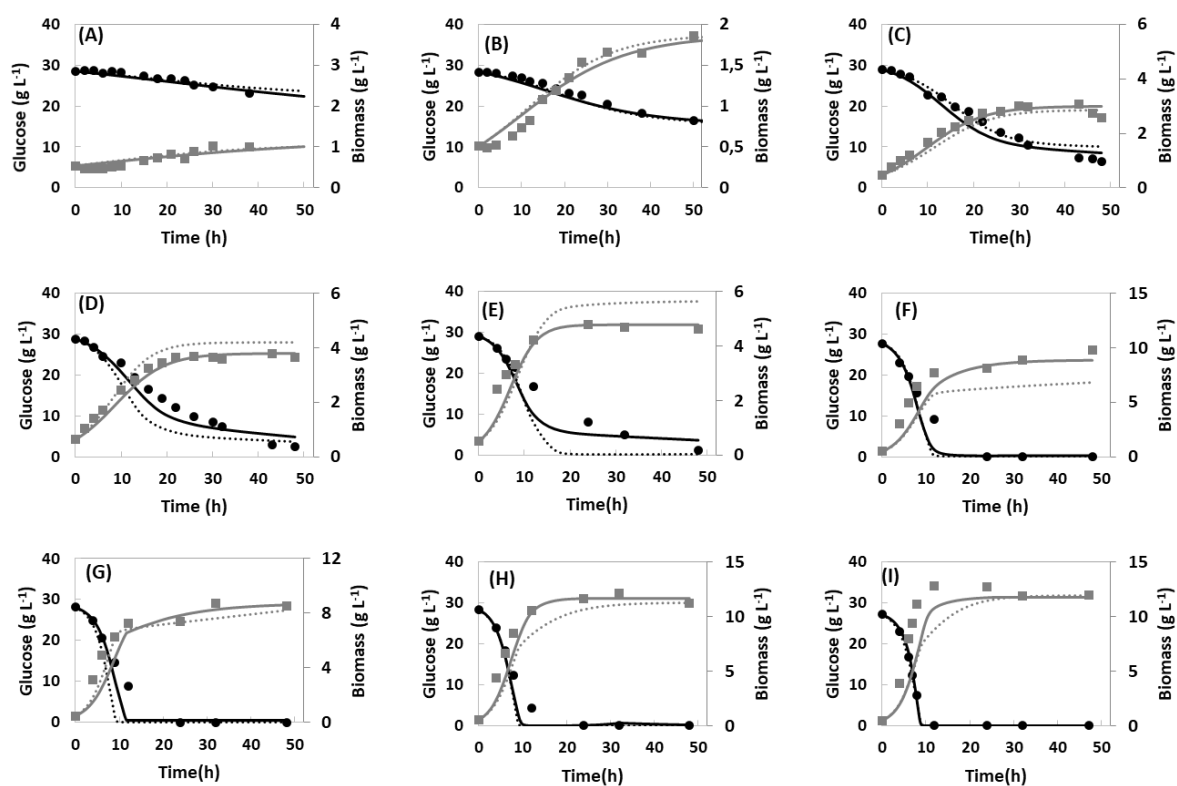
<sup>(2)</sup>: standard deviation determined using all individuals of the optimal population, which containing the optimized parameters.

## Annexe 8

**Table S2:** kinetic parameters of models for growth, glucose consumption and organic acids production by *C. glutamicum* 2262  $\Delta$ ldhA during culture in unbaffled shake flasks performed at different  $k_{LA}$  value of 0.6, 5, 11, 20, 31, 44, 77, 90 and 118 h<sup>-1</sup>.

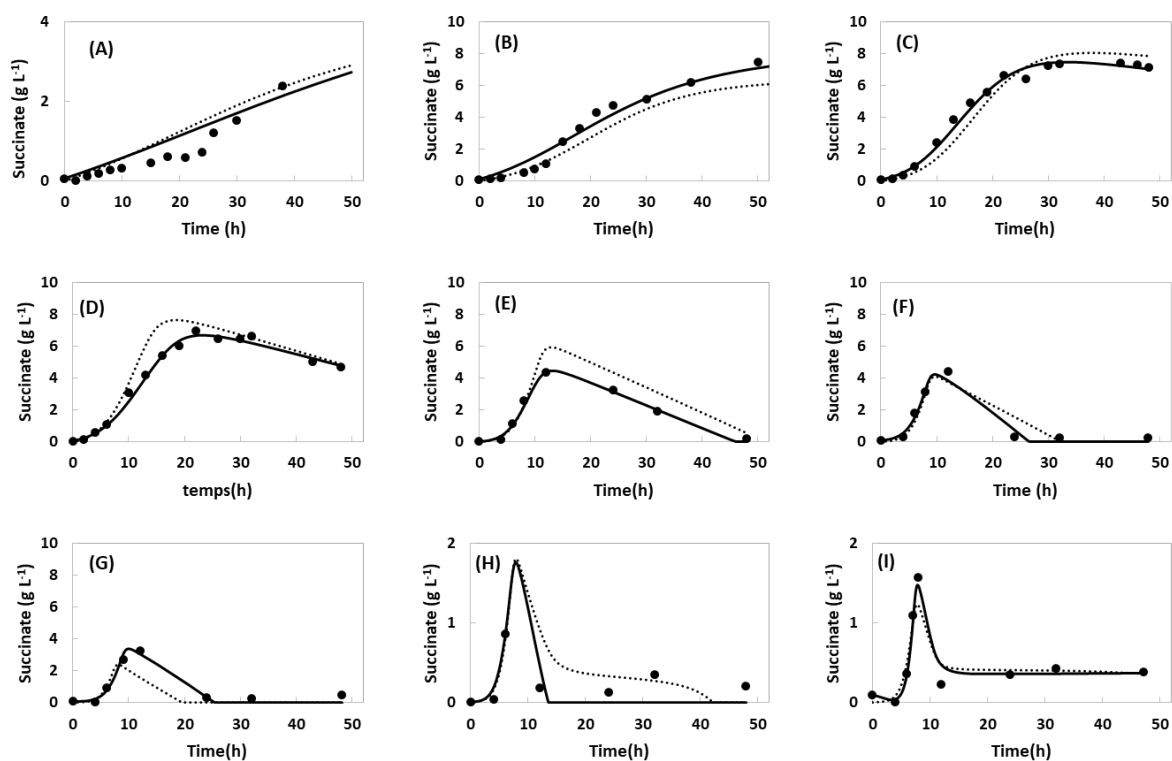
<b>h<sup>-1</sup></b>	<b><math>k_{LA}</math></b>	<b>0,6</b>	<b>5</b>	<b>11</b>	<b>20</b>	<b>44</b>	<b>118</b>	<b>164</b>
<b>g L<sup>-1</sup></b>	<b>X<sub>max</sub></b>	1,2	1.863	2.997	3.794	8.86	11.68	11.85
<b>h<sup>-1</sup></b>	<b>mu<sup>G</sup><sub>max</sub></b>	0.039	0.086	0.155	0.162	0.317	0.349	0.374
<b>g (g DW)<sup>-1</sup></b>	<b>Y<sup>X</sup><sub>A/X</sub></b>	0.747	1.73	2.412	2.686	3.299	3.722	3.103
	<b>Y<sup>X</sup><sub>S/</sub></b>	8.407	9.245	6.589	6.126	5.346	2.46	2.068
	<b>Y<sup>X</sup><sub>X/G</sub></b>	0.392						
	<b>Y<sup>X</sup><sub>A/G</sub></b>	0.617						
	<b>Y<sup>X</sup><sub>S/G</sub></b>	1.071						
<b>g (g DW)<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup></b>	<b>m<sup>G</sup></b>	0.041	0	0	0	0	0.003	0.002
	<b>α<sup>A</sup></b>	0.001	0.011	0.023	0.021	0.011	0.013	0.013
	<b>α<sup>S</sup></b>	0.02	0.016	0.009				
	<b>m<sup>A</sup></b>	0.007	0.006	0.002	0.003	0.01	0.01	0.01
	<b>m<sup>S</sup></b>	0.015	0.013	0.017	0.026	0.035	0.035	0.035
<b>h<sup>-1</sup></b>	<b>mu<sup>A</sup><sub>max</sub></b>	-				0.251	0.123	0.145
<b>g (g DW)<sup>-1</sup></b>	<b>1/Y<sup>X</sup><sub>X/A</sub></b>	-				1.67	3.289	2.082

## Annexe 9



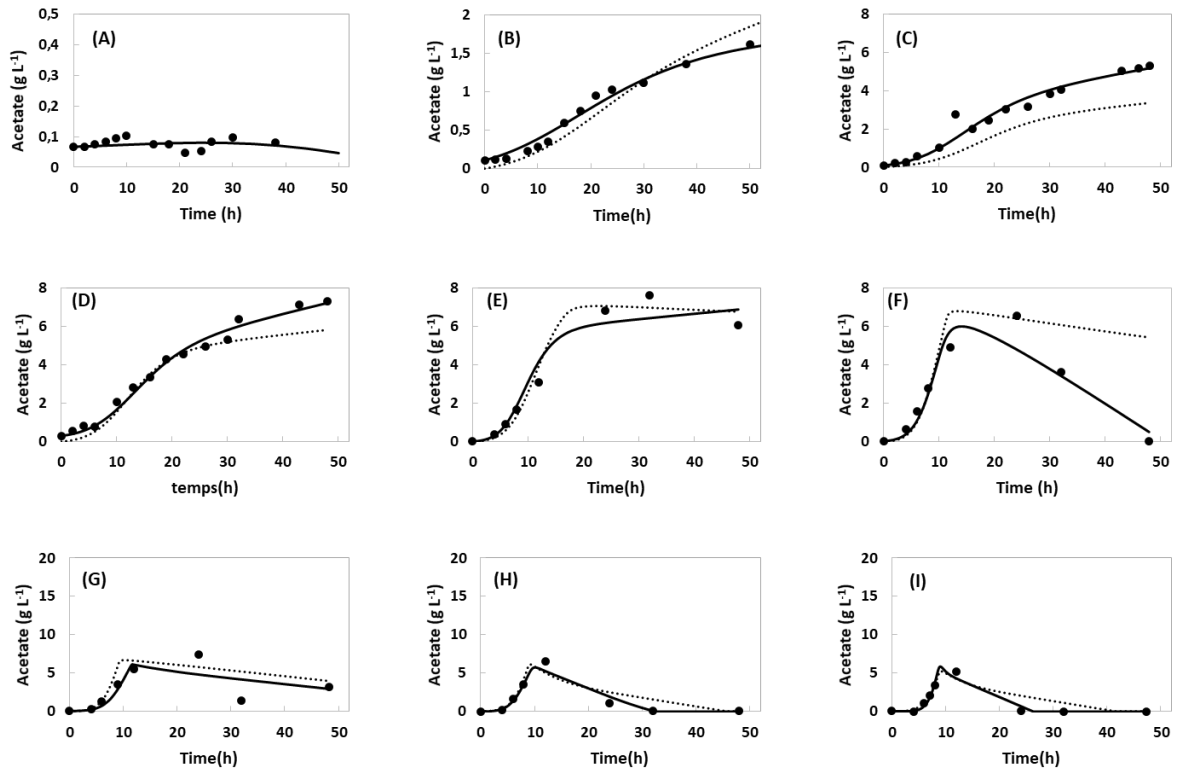
**Figure S1:** Time profiles of biomass (closed square grey) and glucose (closed circle black) concentrations during cultures in un baffled shake flasks of *C. glutamicum* 2262 $\Delta$ ldhA performed at different  $k_{La}$  value : (A)  $0.6 \text{ h}^{-1}$ , (B)  $5 \text{ h}^{-1}$ , (C)  $11 \text{ h}^{-1}$ , (D)  $20 \text{ h}^{-1}$ , (E)  $31 \text{ h}^{-1}$ , (F)  $44 \text{ h}^{-1}$ , (G)  $77 \text{ h}^{-1}$ , (H)  $90 \text{ h}^{-1}$ , and (I)  $118 \text{ h}^{-1}$ . Experimental data (symbols) and simulated data by primary (solid line) and generalized (dashed line) model were plotted on each figure.

## Annexe 10



**Figure S2 :** Time profiles of succinate (closed circle black) concentration during cultures in unbaffled shake flasks of *C. glutamicum* 2262 $\Delta$ ldhA performed at different  $k_{La}$  value : (A)  $0.6 \text{ h}^{-1}$ , (B)  $5 \text{ h}^{-1}$ , (C)  $11 \text{ h}^{-1}$ , (D)  $20 \text{ h}^{-1}$ , (E)  $31 \text{ h}^{-1}$ , (F)  $44 \text{ h}^{-1}$ , (G)  $77 \text{ h}^{-1}$ , (H)  $90 \text{ h}^{-1}$ , and (I)  $118 \text{ h}^{-1}$ . Experimental data (symbols) and simulated data by primary (solid line) and generalized (dashed line) model were plotted on each figure.

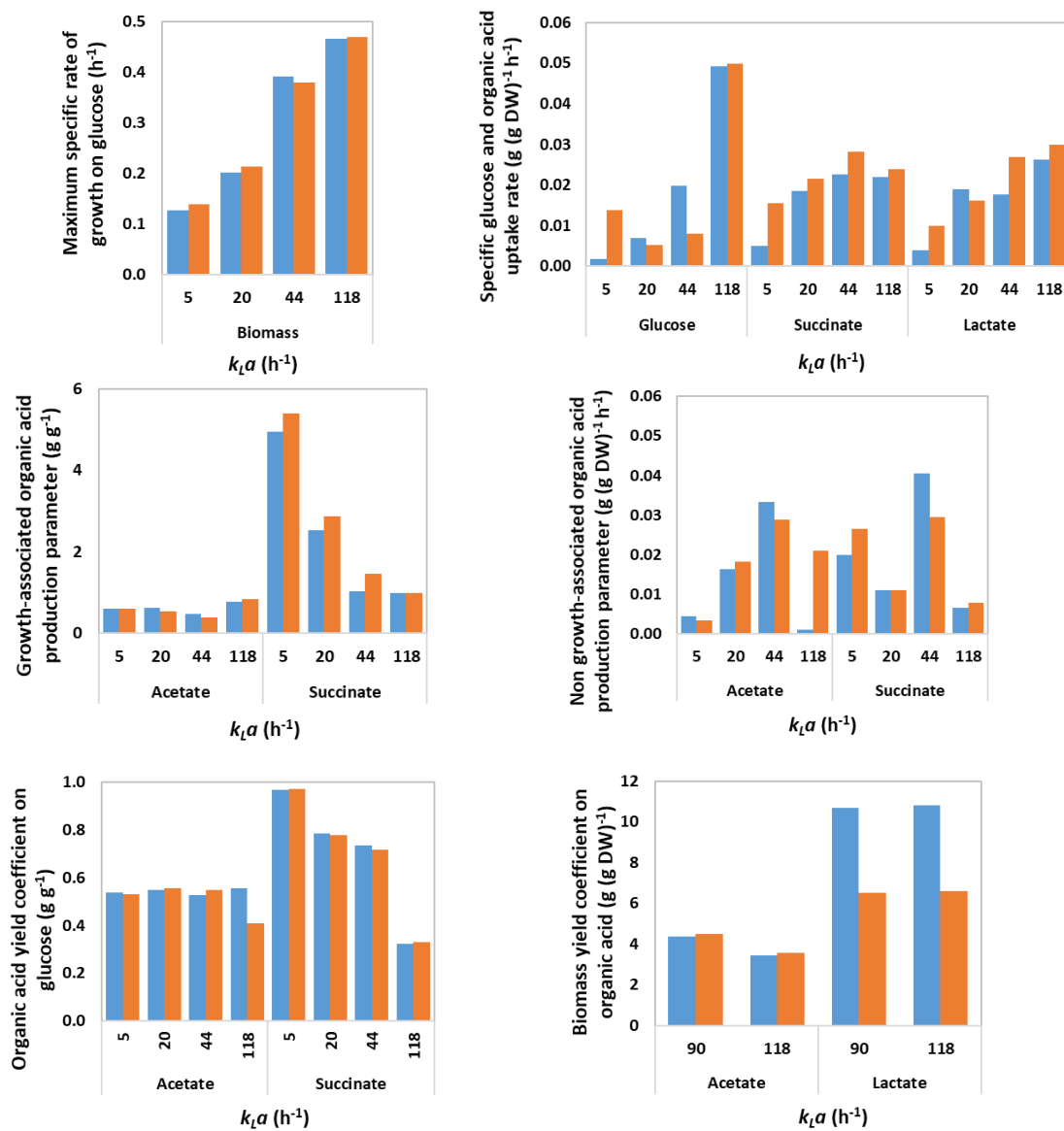
## Annexe 11



**Figure S3 :** Time profiles of acetate (closed circle black) concentration during cultures in unbaffled shake flasks of *C. glutamicum* 2262 $\Delta$ ldhA performed at different  $k_{La}$  value : (A)  $0.6 \text{ h}^{-1}$ , (B)  $5 \text{ h}^{-1}$ , (C)  $11 \text{ h}^{-1}$ , (D)  $20 \text{ h}^{-1}$ , (E)  $31 \text{ h}^{-1}$ , (F)  $44 \text{ h}^{-1}$ , (G)  $77 \text{ h}^{-1}$ , (H)  $90 \text{ h}^{-1}$ , and (I)  $118 \text{ h}^{-1}$ . Experimental data (symbols) and simulated data by primary (solid line) and generalized (dashed line) model were plotted on each figure.



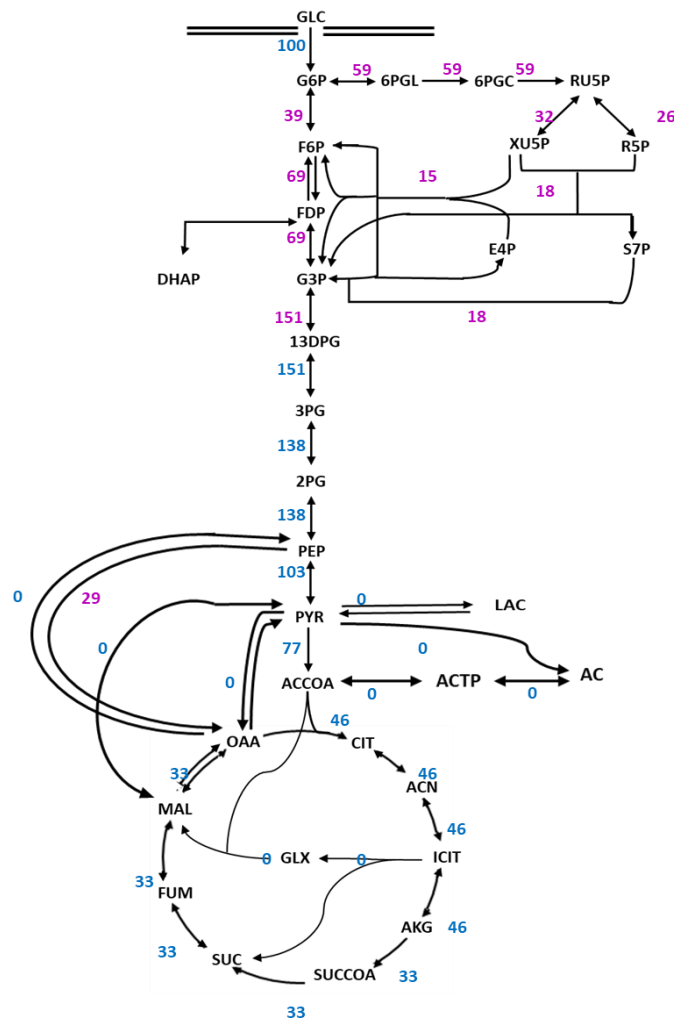
## Annexe 12



Les valeurs des paramètres cinétiques du modèle développé, estimées en utilisant les deux critères d'optimisation  $J_{rel}$  (bleu) et  $J_{max}$  (orange). Ces paramètres cinétiques ont été identifiés dans différentes conditions de  $k_{LA}$ .

## Annexe 13

(a)

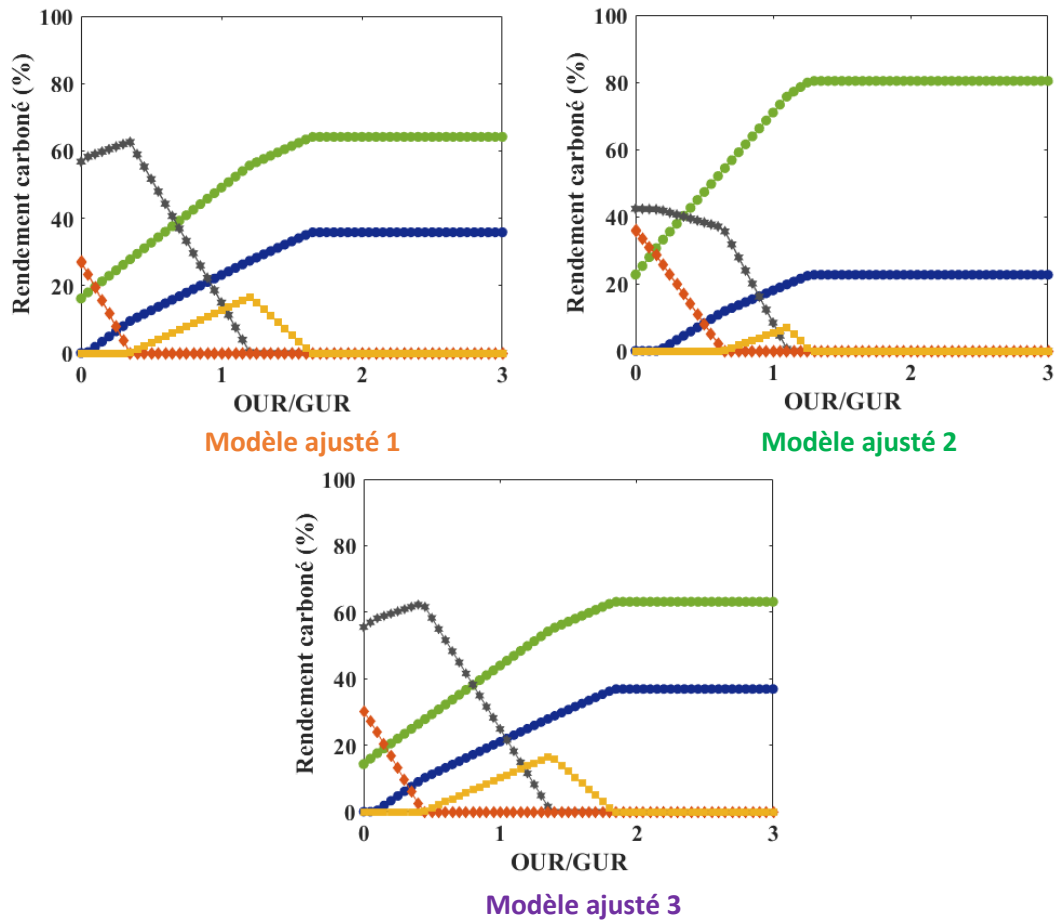


(b)

Modèle métabolique initial _ sans R_gapB		
	Aérobie	Anaérobie
<b>Consommation (mmol/gDW/h)</b>		
Glucose	7	
O <sub>2</sub>	11.49	0
<b>Production (mmol/gDW/h)</b>		
Biomasse (h <sup>-1</sup> )	0.69	0.18
CO <sub>2</sub>	15.54	0.97
Lactate		11.09
Succinate		0.19
Acétate		0

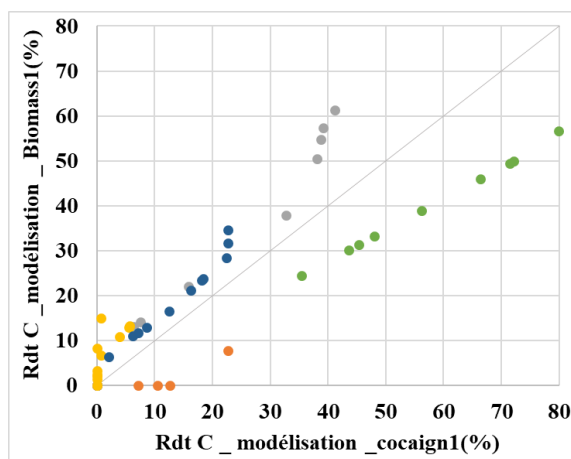
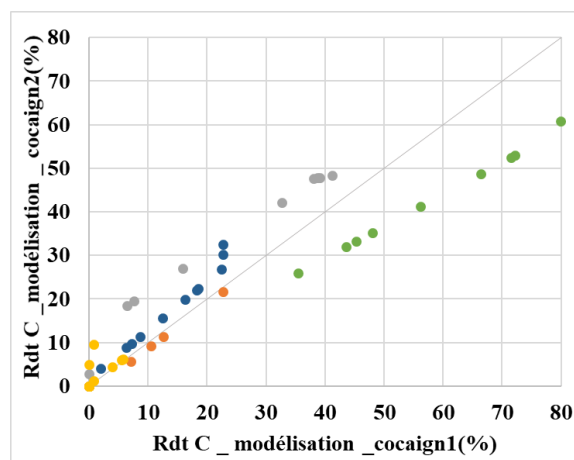
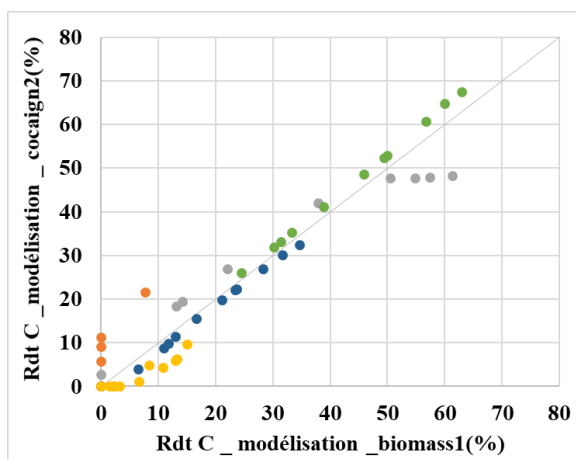
Modélisation, par le modèle métabolique initial sans la réaction R\_gapB, des (a) flux intracellulaires de métabolisme de *C. glutamicum* en aérobiose (en bleu) et (b) des flux extracellulaires de la production de biomasse et des acides organiques en aérobiose et anaérobiose.

## Annexe 14 :



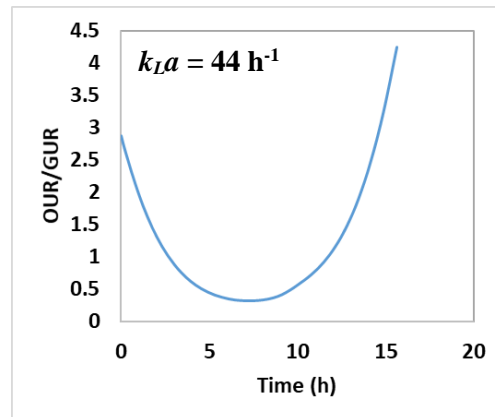
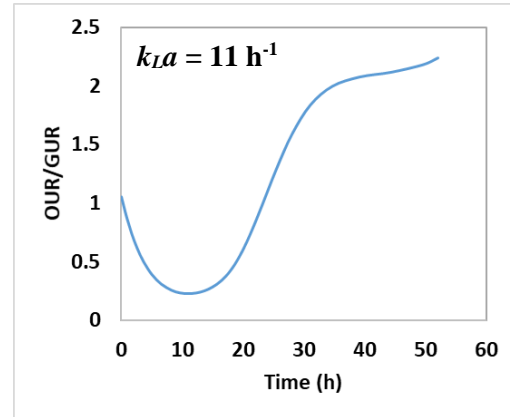
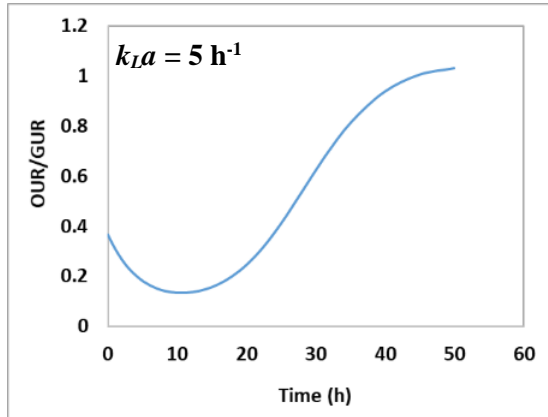
Modélisation de l'impact du rapport OUR/GUR sur les rendements carbonés de conversion du glucose en lactate (\*), succinate (♦), acétate (■), biomasse (●) et CO<sub>2</sub> (●). Les flux simulés par les trois modèles métaboliques.

## Annexe 15



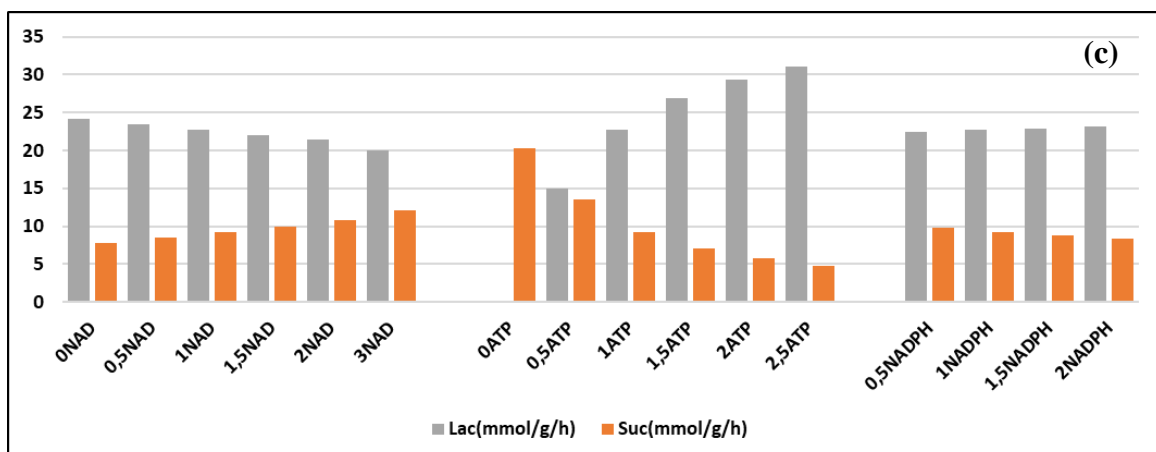
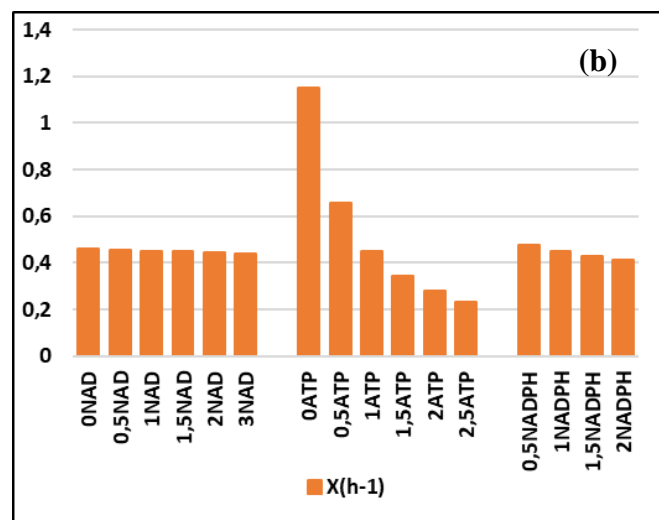
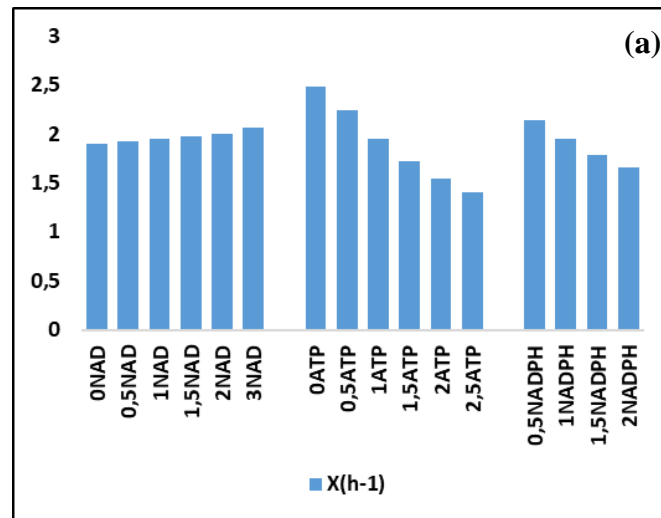
Comparaison entre des rendements carbonés simulés par les trois modèles.

## Annexe 16



Évolution des ratios OUR/GUR au cours du temps. Ces ratios ont été déterminés au cours des cultures en batch de *C. glutamicum* 2262 réalisées à différentes conditions de  $k_{La}$ .

## Annexe 17 :



Évolution des vitesses spécifiques de la production de biomasse en aérobiose (a) et des vitesses spécifiques de la production de biomasse (b) de lactate (en gris) et de succinate (en orange) (c) en anaérobiose, en multipliant le coefficient de certains métabolites de la réaction de biomasse par un facteur 1 ; 1,5 ; 2 ; 3 ; 0,5 et 0.



## **Production de succinate par *Corynebacterium glutamicum* en microaérobiose : approches expérimentales et numériques, de l'échelle métabolique au bioréacteur**

**Mots clés :** Succinate, *Corynebacterium glutamicum*, microaérobiose, glucose résiduel, modélisation cinétique, modélisation métabolique.

Le succinate est classé parmi les 12 principaux précurseurs chimiques à fort potentiel industriel. Cet acide, classiquement produit par l'intermédiaire de procédés chimiques, peut être aussi obtenu par voie microbiologique. *Corynebacterium glutamicum*, utilisée pour la production industrielle d'acides aminés, est ainsi capable de produire des acides organiques, dont le succinate, en microaérobiose ou en anaérobiose. L'objectif de cette thèse a donc été la compréhension de la réponse physiologique de *C. glutamicum* vis-à-vis du changement des conditions d'oxygénation. Des outils expérimentaux et numériques ont été mis en œuvre. Une étude expérimentale a pu montrer que l'oxygénation et la disponibilité en glucose sont des paramètres clés pour la production de succinate. Le ratio OUR/GUR, représentatif de ces deux paramètres, a été choisi comme indicateur de l'état physiologique de cette bactérie en microaérobiose. Pour un OUR/GUR inférieur à 1, la production d'acides organiques est effective alors que pour une valeur supérieure, seule la croissance est observée. La production maximale de succinate a été mesurée dans les conditions d'oxygénation les plus faibles, correspondant au ratio le plus faible (0,17). De plus, une reconsommation du succinate produit a pu être mise en évidence lorsqu'une concentration résiduelle seuil en glucose était atteinte. En s'appuyant sur ces observations, un procédé semi-continu performant de production de succinate avec une souche non modifiée génétiquement de *C. glutamicum* a pu être mis en œuvre. Un modèle cinétique capable de prédire les cinétiques de croissance, de consommation du substrat et de production des acides organiques, dans différentes conditions d'oxygénation, a ensuite été établi. Ce modèle initial a pu être généralisé tout en conservant une très bonne concordance entre les résultats de simulation et les données expérimentales. Le modèle a également pu être transposé, avec succès, à une souche mutante de *C. glutamicum* 2262. Enfin, un modèle métabolique simplifié a été construit pour *C. glutamicum* 2262 afin de prédire les flux intracellulaires permettant de comprendre son adaptation métabolique dans des environnements déficients en oxygène et/ou en source de carbone. Ce modèle a permis de prédire, en conditions stationnaires, les flux de production de lactate dans des niveaux d'oxygénation faibles ainsi que la production de biomasse dans certaines conditions d'aérobiose. Il a également été capable de simuler, en conditions dynamiques, des concentrations en succinate dans des conditions d'oxygénation faibles et ce, chez les deux souches étudiées.

## **Succinic acid production by *Corynebacterium glutamicum* in micro-aerobic conditions: experimental and numerical approaches, from metabolic scale to bioreactor**

**Key words:** succinate, *Corynebacterium glutamicum*, micro-aerobiosis, residual glucose, kinetic modeling, metabolic modeling.

Succinate is a diacid used nowadays as a building block in the synthesis of various molecules of interest. It is mostly produced by chemical synthesis. A part of succinate is industrially produced using a microbiological process. *Corynebacterium glutamicum*, a well-known industrial producer of amino acids, is able to produce organic acids, in particular succinate, under micro-aerobic and anaerobic conditions. The aim of this work was thus to understand the physiological response of *C. glutamicum* 2262 to change in oxygen supply conditions. Both experimental and numerical tools have been implemented. The first step was to identify, experimentally, the parameters influencing the physiological response of *C. glutamicum* 2262 during batch and continuous cultures. This approach allowed to identify oxygenation level and residual glucose concentration as key parameters for organic acids production. The ratio OUR/GUR was also defined as a relevant indicator of the physiological state of *C. glutamicum* 2262. It was observed that organic acids were simultaneously produced during micro-aerobic phase corresponding to ratio below 1, whereas, above this value, a maximal growth was obtained. The maximal succinate production was obtained at the lower oxygenation level. Moreover, a re-consumption of the produced succinate was also observed when a threshold residual concentration of glucose was reached. Considering the influence of these two key parameters, a highly performant fed-batch process for the succinate production using a wild-type strain of *C. glutamicum* was defined. Then, a kinetic model was developed. This primary model was then generalized by integrating a correlation between kinetic parameters of model and oxygenation level. The results of both primary and generalized model simulation, showed an excellent agreement with the experimental data. The generalized model was then successfully transposed to a *C. glutamicum* mutant strain. In addition, a simplified metabolic model for *C. glutamicum* 2262 was constructed to understand the metabolic response of this bacterium in micro-aerobiosis. Both predicted production fluxes of lactate in microaerobiosis and of biomass synthesis during aerobiosis phase, under stationary conditions, agreed with the experimental data. This metabolic model was also able to predict, under dynamic conditions, the concentration profiles of the succinate during highly limited oxygen supply conditions.