HAL
open science

Mécanismes de l'inhibition de la croissance par l'acétate chez Escherichia coli

Stéphane Pinhal

To cite this version:

Stéphane Pinhal. Mécanismes de l'inhibition de la croissance par l'acétate chez Escherichia coli. Physique [physics]. Université Grenoble Alpes, 2015. Français. NNT : 2015GREAV003 . tel-01178817

HAL Id: tel-01178817

https://theses.hal.science/tel-01178817v1

Submitted on 21 Jul 2015

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.

UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Virologie Microbiologie Immunologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Stéphane PINHAL

Thèse dirigée par **Johannes Geiselmann**
et codirigée par **Hidde de Jong et Delphine Ropers**

préparée au sein de **Laboratoire Interdisciplinaire de Physique**
et de **Ecole doctorale Chimie et Science du Vivant**

Mécanismes de l'inhibition de la croissance par l'acétate chez *Escherichia coli*

Thèse soutenue publiquement le **17 mars 2015**,
devant le jury composé de :

Mme, Aline Métris
Chercheur, IFR, Norwich, Royaume-Uni, Rapporteur
M, Gilles Truan
Chargé de recherche CNRS, LISBP, INSA de Toulouse, Rapporteur
Mme, Christelle Breton
Professeur Université Joseph Fourier, CERMAV, Grenoble, Examinatrice
M, Jean-Pierre Mazat
Professeur émérite Université de Bordeaux 2, IBGC, CNRS, Bordeaux, Examinateur
M, Johannes Geiselmann
Professeur Université Joseph Fourier, LIPhy, Grenoble, Directeur de thèse
Mme, Delphine Ropers
Chargée de recherche INRIA, Grenoble - Rhône-Alpes, Directeur de thèse
M, Hidde de Jong
Directeur de recherche INRIA, Grenoble - Rhône-Alpes, Invité

Remerciements

Je remercie mes directeurs de thèse Hans Geiselmann, Hidde de Jong et Delphine Ropers de m'avoir donné la possibilité de réaliser cette thèse. Les choses n'ont pas toujours été simples mais sans vous cette thèse n'aurait jamais pu être ce qu'elle est. Je remercie également Ina Attree, Hugues Berry et Brice Enjalbert d'avoir suivi l'avancement de mon projet et de m'avoir apporté conseils et soutien au cours des différents comités de suivi de thèse qui ont ponctué ces trois dernières années. Ceci m'amène tout naturellement à remercier les membres du jury, Aline Métris et Gilles Truan, d'avoir accepté d'être rapporteurs ; ainsi que Jean-Pierre Mazat et Christelle Breton, pour en être les examinateurs. Finalement, je tiens à remercier l'intérêt que l'école doctorale Chimie et Science du Vivant a porté au déroulement de mon projet.

Je remercie Julien et Caroline pour leur aide, leur soutien, nos discussions scientifiques (ou pas) et surtout pour tous ces fous rires. Un grand merci à Stephan qui a su m'encadrer dans mon rôle de moniteur (je me suis permis de reprendre quelques unes de tes vannes avec mes étudiants). Je remercie Amandine, Jessika, Jean Michel, Guillaume, Jérôme, Omaya, Joël, Antonia...

Ma thèse est partagée entre l'acétate et la compétition iGEM. Je tenais à remercier la confiance que Robert Baptist, Franz Bruckert et Marianne Weidenhaupt ont placé en moi pour encadrer la trentaine d'étudiants qui ont défilé pendant l'aventure iGEM. J'ai énormément appris à vos côtés. Comme je n'ai cessé de le répéter iGEM est une aventure scientifique ; mais c'est surtout une aventure humaine. J'y ai rencontré des gens qui sont devenus des amis. Merci à Geofrrey d'avoir su animer nos nuits blanches de quelques chansons et vidéos dont toi seul à le secret. Quant à toi, Pierre, je ne regrette pas d'avoir choisi ton CV de conducteur de transpalette.

Je remercie Jérôme, Petite Marie, Lorraine, Jules, Romain, Camille, Julie, BenJ, Laurette et Manue de m'avoir accompagné jour après jour. On a ri, on a pleuré, on s'est embrouillé, on a bu, on a fêté, on a... bref ! Vous avez dû supporter la raison qui m'entraîne à chaque pas sur le devant de la scène... et cela jusqu'au bout de la nuit. Plus sérieusement, vous m'avez soutenu dans mes moments de doute. Vous étiez là quand j'en avais besoin et ça je ne l'oublierai jamais. Aujourd'hui une page se tourne mais comme le dit si bien Petite Marie nous avons créé des liens qui perdureront.

Résumé

L'acétate nuit à la croissance de la bactérie *E. coli*. Malgré les recherches qui tentent d'en décrire les raisons, il nous est impossible actuellement de fournir le schéma explicatif complet de ce phénomène. Cette thèse propose de déterminer l'importance des différents mécanismes possibles de l'inhibition de la croissance par l'acétate. Pour cela, nous avons construit une collection de mutants des voies métaboliques de l'acétate que nous avons systématiquement caractérisés avec/sans l'ajout de 128 mM d'acétate au cours de la phase exponentielle de croissance. La voie Pta AckA semble contribuer à 20% à l'inhibition par l'acétate, probablement par l'action de l'acétyle-phosphate sur l'expression des gènes ou la régulation de l'activité enzymatique. Nous montrons que le mécanisme généralement invoqué, l'effet découplant de l'acétate, ne joue pas de rôle dans l'inhibition. L'effet majeur est dû à un déséquilibre des anions de la cellule. Nous présentons également deux projets de biologie synthétique : l'un visant à quantifier le mercure dans un échantillon d'eau ; et l'autre contrôlant le nombre de cellules vivantes par la lumière au sein d'une population bactérienne.

Mots-clés: inhibition, croissance, acétate, métabolisme, *Escherichia coli*, biologie synthétique, iGEM

Abstract

Acetate inhibits the growth of *Escherichia coli* on glucose. Despite many studies that have attempted to elucidate the underlying mechanisms, we are currently unable to provide a comprehensive explanation of this phenomenon. Here, we construct a series of isogenic mutants that inactivate specific parts of the metabolic pathways of acetate. By systematically measuring growth rate, as well as the fluxes of carbon metabolites entering and leaving the cell, we are able to propose an explanation for the growth inhibition by acetate. The Pta-AckA pathway contributes about 20% of the growth inhibition by acetate, probably through the action of acetyl-phosphate on gene expression or the regulation of enzyme activities. We also show that acetate does not function as a classical uncoupling agent. This mechanism was commonly assumed to account for the largest part of acetate inhibition. Our data support a model where the imbalance of cellular anions, caused by the massive influx of acetate into the cell, is the major determinant of growth inhibition by acetate. We also present two synthetic biology projects from the iGEM competition: one to quantify mercury in a water sample and the other controlling the number of living cells by light in a bacterial population.

Keywords: inhibition, growth, acetate, metabolism, *Escherichia coli*, synthetic biology, iGEM

Avant-propos

Quelle est la question ? Il n'y a pas une question, mais plusieurs. Il n'y a pas un projet, mais plusieurs. Ce manuscrit a été conçu à l'image de mes trois ans de thèse pendant lesquels j'ai été partagé entre mon sujet de thèse à proprement parler et l'encadrement de l'équipe grenobloise iGEM. Toutefois j'ai essayé de concilier tous ces aspects dans un discours cohérent autour de la biologie synthétique.

La biologie synthétique identifie un problème d'ordre sociétal, industriel ou tout simplement du quotidien d'un tout à chacun. Elle tente d'y apporter une solution en modifiant génétiquement un micro-organisme. D'aucuns considèrent que si on arrive à forcer le comportement d'un micro-organisme dans un but précis, c'est qu'on a compris les mécanismes sous-jacents qui régissent ce comportement. Mais encore faut-il avoir identifié ces mécanismes.

L'acétate nuit à la croissance de la bactérie *Escherichia coli*. C'est indéniable ! Toutefois les mécanismes de cette inhibition restent flous. L'acétate peut être consommé par la cellule et venir perturber l'équilibre métabolique de la cellule, l'expression des gènes ou encore l'activité enzymatique. Mon sujet de thèse propose d'évaluer la contribution des différents mécanismes possibles par lesquels l'acétate inhibe la croissance d'*Escherichia coli*. Élucider ces mécanismes permettrait de construire des souches avec un potentiel industriel dont les rendements de production ne seraient plus assujettis à une diminution à cause de l'acétate.

Finalement, le manuscrit se termine par la présentation de deux projets iGEM auxquels j'ai activement participé tant dans la réalisation des expériences que dans l'encadrement. iGEM est un concours étudiant de promotion de la biologie synthétique. En 2011, Mercuro-Coli visait à détecter et à quantifier le mercure dans un échantillon d'eau. En 2013, TalkE'coli unissait le vivant et la machine pour contrôler à façon le nombre de cellules vivantes au sein d'une population bactérienne.

Table des matières

I. Introduction et revue de la littérature 12

1. Industrialiser la biologie 14
1.1. Retour sur une « success story » : l'artémisinine . . . 14
1.2. Conception et construction d'une usine vivante . . . 17
1.3. L'acétate : un problème en biotechnologie . . . 26

2. Le métabolisme de l'acétate chez Escherichia coli 28
2.1. Les voies de la production de l'acétate . . . 28
2.1.1. La voie Pta AckA . . . 28
2.1.2. La voie PoxB . . . 30
2.1.3. Les autres voies de production de l'acétate . . . 31
2.2. Le transport de l'acétate . . . 31
2.3. Les voies de la consommation de l'acétate . . . 33
2.4. L'acétyl-phosphate : entre métabolisme et signalisation . . . 35

3. Les mécanismes de l'inhibition de la croissance par l'acétate 38

4. Objectifs de la thèse 42

II. Quantitative analysis of the inhibition of bacterial growth by acetate 43

5. Résumé en français 44

6. Abstract 46

7. Introduction 47

8. Materials and Methods 51
8.1. Bacterial strains and growth media . . . 51
8.2. Construction of *E. coli* mutants . . . 51
8.3. Growth in shake flasks . . . 52
8.4. pO_2, pH and DO measurements . . . 54

8.5. Quantification of metabolite concentrations in the medium 54
8.6. Estimation of growth rates and growth yields 55
8.7. Flux balance analysis 56

9. Results **58**
9.1. Growth inhibition by acetate 58
9.2. The perturbation of acetate metabolism plays a minor role in growth inhibition 61
9.3. Metabolic characterization of central carbon metabolism during growth inhibition by acetate 65
9.4. Uncoupling has no effect on growth inhibition by acetate 69
9.5. Methionine supplementation does not relieve growth inhibition 72

10. Discussion **75**

III. iGEM **78**

11. Mercuro-Coli, détecter et quantifier le mercure (2011) **81**
11.1. Conception du réseau génétique 83
11.2. Caractérisation du *toggle switch* 86
11.2.1. Modéliser le *toggle switch* 86
11.2.2. Construction et caractérisation du *toggle switch in vivo* 89
11.3. La signalisation cellulaire contrôle la coloration rouge 92
11.4. Un nouvel outil pour le contrôle de la traduction 94
11.5. Conclusions et Perspectives 97

12. TalkE'coli, contrôler la croissance bactérienne par la lumière (2013) **99**
12.1. Caractérisation de KillerRed 100
12.1.1. Construction de la souche et conditions expérimentales 100
12.1.2. Caractérisation de BBa_K1141001 101
12.2. Vers le contrôle du nombre de cellule vivante par la lumière 107
12.2.1. Construction du modèle mathématique 107
12.2.2. Validation du modèle 111
12.3. Conclusions et Perspectives 115

IV. Discussion **119**

13. L'acétate, un problème qu'il reste à comprendre **120**
13.1. La construction difficile du mutant Δacs 121
13.2. L'importance des conditions expérimentales. 121
13.3. La voie AckA cause environ 20% de l'inhibition de la croissance par l'acétate. 124
13.4. La quantification de l'acétyle-phosphate. 124

13.5. L'acétate perturbe faiblement le métabolisme central. 124

14. Développement d'une souche pour faire face au problème de l'acétate dans l'industrie 126

14.1. Le concept 126
14.2. Conception du réseau : détection de l'acétate externe 127
14.3. Conception du réseau : forcer la cellule à consommer l'acétate 127
14.4. Construction du réseau : un problème technique inexpliqué 130
14.5. Une nouvelle hypothèse : la sur-expression du gène *acs* 132

15. La compétition iGEM & l'évolution de la biologie synthétique 135

16. Conclusion 138

Bibliography 138

List of Figures

1.1. Les principales étapes de la synthèse de l'hémi-artémisinine 16
1.2. Métabolisme central et biosytnhèse des protéines chez *Escherichia coli* . 19
1.3. Assemblage standardisé des BioBricks : 3A Assembly 22
1.4. Amélioration de la production du lycopène par un contôleur métabolique synthétique 23
1.5. Les différentes étapes du développement d'une usine vivante 25
1.6. L'acétate inhibe la croissance de la bactérie *E. coli* 27

2.1. La production de l'acétate est modulée par l'état redox de la cellule . . . 29
2.2. Concentration d'acétate chez des mutants des voies de production de l'acétate 31
2.3. Transport de l'acétate vu par Axe et Bailey (1995) 32
2.4. L'acétyle-phosphate, un acteur de la phosphorylation et de l'acétylation chez E. coli 36

3.1. Théorie du découplage 39
3.2. Le glutamate régulerait le pH interne de *E. coli* 40

7.1. Schematic representation of the major metabolic pathways of acetate metabolism 50

9.1. Growth characteristics of strain BW25113 grown in minimal glucose medium 59
9.2. Growth inhibition by acetate 60
9.3. Growth inhibition by different concentrations of acetate 60
9.4. Growth rate of mutant strains on minimal glucose medium 63
9.5. Growth rate of mutant strains in the presence of 128 mM acetate 64
9.6. Measurement of metabolites excreted by *E. coli* 68
9.7. Prediction of metabolic flux distributions using a genome-scale model of *E. coli* metabolism 70
9.8. Growth yield and glucose uptake rate 71
9.9. Effect of methionine on growth inhibition by acetate 73

11.1. Visuelle de la plaque Mercuro-Coli et son mode d'emploi 82
11.2. Principe de la quantification de la concentration du mercure par des bactéries synthétiques 85
11.3. Réseau génétique de la preuve de concept 87
11.4. Prédictions sur le comportement du *toggle switch* 88

11.5. Les expériences valident le modèle mathématique et l'utilisation du *toggle switch* 90
11.6. La bi-stabilité du système permet la coloration 91
11.7. La signalisation cellulaire contrôle l'apparition de la coloration rouge . . 93
11.8. Fonctionnement d'un nouveau module pour le contrôle de la traduction chez *E. coli* 95
11.9. Caractérisation du module FHA/RsmA/rsmY 96

12.1. KillerRed tue la bactérie *E. coli* 102
12.2. Les ROS générés par KillerRed sont responsables de la mort des cellules . 104
12.3. Un retour à l'obscurité autorise une reprise de la croissance 105
12.4. La mort des bactéries par KillerRed dépend de l'intensité de la lumière . 106
12.5. Les trois étapes de la construction du modèle mathématique 109
12.6. Démarche pour contrôler le nombre de cellules vivantes 113
12.7. Les prédictions du modèle permettent de maintenir le nombre de cellules vivantes constant grâce à la lumière 114
12.8. Fonctionnement de TalkE'coli 116

13.1. Croissance des différents mutants Δacs 122

14.1. La communication cellule-cellule utilisant l'acétate 128
14.2. La méthode de la Gibson Assembly 131
14.3. Effets de la sur-expression du gène *acs* sur la croissance d'*E. coli* 133

List of Tables

8.2. Oligonucleotides used in this study 53

9.1. Strains used to dissect different mechanisms of growth inhibition by acetate 62

Première partie .

Introduction et revue de la littérature

L'introduction de ce manuscrit de thèse raconte dans un premier temps une histoire, celle du pari réussi de l'hémi-artémisinine (section 1.1). L'ingénierie de la levure *S. cerevisiae* a permis d'industrialiser la production de cet antipaludique permettant de mieux couvrir les besoins mondiaux. Un besoin a été identifié, et la biologie synthétique y a répondu. La biologie construit et se met au service de l'industrie en créant des usines vivantes. La section 1.2 de l'introduction détaille la démarche de la construction de ces usines vivantes dont la conception et la construction sont facilitées par la standardisation de briques biologiques que l'on assemble à façon pour programmer la cellule dans un but précis. Au cours des processus industriels utilisant ces usines vivantes, l'accumulation d'acétate dans le milieu pose un problème, car elle nuit aux rendements de production (section 1.3). Au cours de cette thèse, nous nous focaliserons sur l'étude de l'inhibition de la croissance par l'acétate chez la bactérie *Escherichia coli*. Cette bactérie produit de l'acétate au cours d'une croissance sur glucose mais elle peut aussi le métaboliser. Le chapitre 2 aborde le métabolisme de l'acétate. Nous y verrons comment la production d'acétate supporte la croissance bactérienne. Enfin, nous essaierons de réunir les différentes causes de l'inhibition de l'acétate décrites dans la littérature au sein d'un même schéma explicatif (chapitre 3).

1. Industrialiser la biologie

1.1. Retour sur une « success story » : l'artémisinine

Chaque minute, un enfant meurt du paludisme en Afrique. La paludisme est dû à des parasites du genre *Plasmodium* transmis d'une personne à une autre par des piqûres de moustiques. Un traitement médicamenteux à base d'artémisinine permet d'éviter que la maladie devienne mortelle. L'artémisinine est naturellement obtenue à partir de la plante *Artemisia annua*. En 2005, 5 à 6 tonnes d'artémisinine étaient produites par an à partir de cette plante. Or pour traiter les centaines de millions de cas de paludisme recensés, il faudrait augmenter les capacités de production jusqu'à 300 tonnes par an (Fioraso, 2012). A cela, s'ajoute la question du prix car ces médicaments sont destinés aux pays en voie de développement et ils doivent donc rester financièrement abordables. Comment peut-on concilier ces deux aspects : produire plus, sans payer plus ? Jay Keasling répond à cette question en faisant produire une artémisinine hémi-synthétique par la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Paddon and Keasling, 2014).

Produire de l'artémisinine avec *S. cerevisiae* est un défi car la levure ne produit pas naturellement cette molécule. Il faut donc lui donner l'information nécessaire (gènes) pour qu'elle puisse la synthétiser. Le contexte dans lequel un gène s'exprime est différent d'un individu à un autre. Certains gènes apportés de la plante *A. annua* peuvent ne s'exprimer que faiblement dans le contexte de *S. cerevisiae*. Faiblement ? ... Je reviens sur ce que j'ai dit juste avant. La difficulté dans la construction d'une telle souche n'est pas tellement de faire produire la molécule d'intérêt - puisqu'elle peut l'être *faiblement* - mais de la faire produire en des quantités d'ordre industriel. Pour que le projet de Keasling soit économiquement viable, la levure *S. cerevisiae* doit synthétiser 25 g/l d'acide artémisinique qui seront alors convertis chimiquement en artémisinine. Il ne s'agit pas seulement d'apporter une voie mais de l'optimiser pour atteindre les objectifs.

On donne du glucose à la bactérie et on souhaite obtenir en retour de l'acide artémisinique. Le glucose est transformé en un premier métabolite par une enzyme. Ce métabolite est transformé en un autre métabolite par une autre enzyme... et ainsi de suite jusqu'au produit final. Le métabolisme de la cellule peut ainsi être vu comme un réseau de routes qui se croisent ou qui se divisent en plusieurs embranchements. Un métabolite peut donc être partagé parmi plusieurs voies. La première étape de la conception de cette levure a consité à identifier sur quelle cible (métabolite ou carrefour) venir embrancher

la voie de biosynthèse de l'acide artémisinique au sein de la levure. L'idée sous-jacente est qu'on peut détourner ce que sait déjà faire la levure pour atteindre notre objectif. En l'occurrence, ici, la levure produit naturellement du FPP (farnésyl diphosphate). Ce dernier est un intermédiaire menant à l'acide artémisinique. Il a suffit de compléter cette voie en apportant les enzymes manquantes. Comme nous pouvons le voir dans la Figure 1.1 , la construction de la levure a nécessité plusieurs étapes de test, erreur et correction. A chaque étape, la productivité de la cellule est évaluée mais aussi sa viabilité. En effet, le métabolisme répond à un certain équilibre dont dépend le bon fonctionnement de la cellule. En construisant une nouvelle voie, on peut rompre cette équilibre ce qui mène par exemple à l'accumulation de l'alcool artémisinique. La production de cet alcool est plus importante que les capacités de la cellule à le convertir en acide artémisinique. Son accumulation engendre un stress qui nuit à la croissance de la levure et qui diminue par conséquent ses rendements de production. Il fallait donc augmenter les capacités enzymatiques des réactions en aval pour draîner le réservoir d'alcool. Les outils de la biologie moléculaire et nos connaissances sur la régulation de l'expression des gènes nous permettent de moduler les capacités des voies métaboliques en jouant sur la disponibilité des enzymes. De la même manière qu'on peut construire une nouvelle voie métabolique, on peut couper toutes les voies qui détournent le flux de matière de la synthèse du produit d'intérêt.

L'objectif fixé pour une production industrielle de l'hémi-artémisinine est atteint. La production de l'artémisinine à partir de la plante *A. annua* prenait dix-huit mois. De plus, elle était tributaire d'un certain nombre de facteurs difficilement contrôlables comme le climat. Si bien que les capacités de production - déjà insuffisantes pour répondre aux besoins mondiaux - variaient aussi d'une année sur l'autre. Les prix étaient alors ajustés en fonction de la disponibilité de l'artémisinine rendant l'accès aux soins économiquement compliqué pour des pays en voie de développement. Le recours à un autre procédé s'avérait donc être indispensable. L'ingénierie de la levure *S. cerevisiae* a permis d'industrialiser la production de l'hémi-artémisinine réduisant les délais de production à quelques semaines et stabilisant sa disponibilité, son prix et l'accès au traitement. Sanofi annonçait d'ailleurs, lors de son communiqué de presse du 12 août 2014, l'expédition des premiers lots d'antipaludiques fabriqués avec la nouvelle artémisinine hémi-synthétique. Sanofi possède actuellement une capacité de production lui permettant de répondre à un tiers des besoins annuels mondiaux (125 millions de traitement).

Aujourd'hui, la biologie peut construire : elle est synthétique ! Dans le contexte d'une population mondiale qui ne cesse de croître et où les besoins sont importants (santé, énergie...), le succès de l'hémi-artémisinine ouvre le champ des possibilités. Il ne s'agit plus d'une simple promesse mais d'une application concrète. « C'est une révolution industrielle » (Fioraso, 2012) qui incitent de grands groupes (Sanofi, BP, Total, L'Oréal...) à investir dans des projets de biologie synthétique. Ils voient en elle un moyen de construire demain. L'hémi-artémisinine n'est qu'un exemple parmi d'autres de produits que l'on peut obtenir à l'échelle industrielle par une alternative plus rapide, plus facile, moins polluante et moins onéreuse (Farmer and Liao, 2000; Warnecke and Gill, 2005). C'est

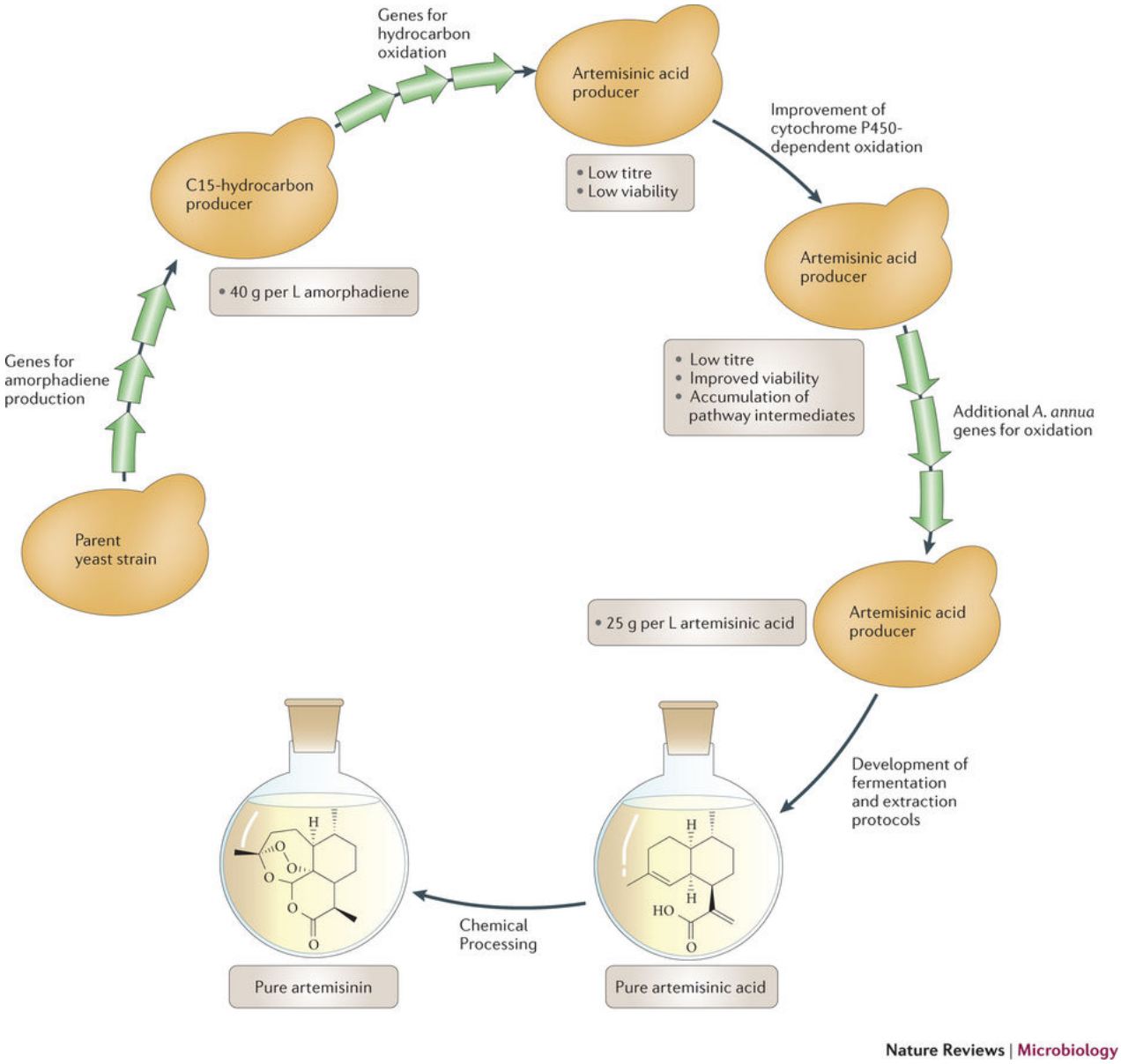


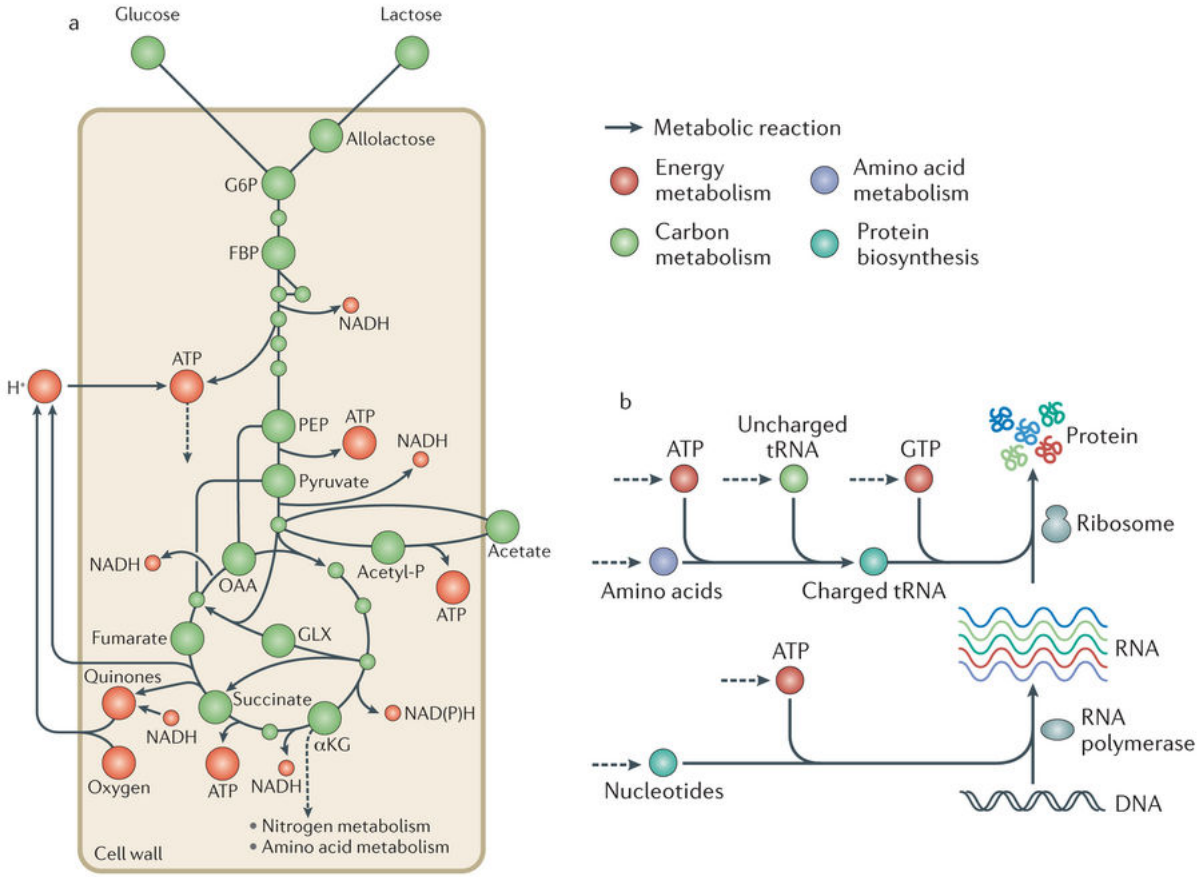
FIGURE 1.1. – **Les principales étapes de la synthèse de l'hémi-artémisinine.** Résumé des différentes étapes qui ont amené la levure *S. cerevisiae* à synthétiser 25 g/l d'acide artémisinique. A chaque étape, la production et l'état de la cellule sont évaluées. Si la viabilité de la levure ou la production est faible, la cause est identifiée afin d'améliorer le procédé. Finalement, l'acide artémisinique est extrait puis converti chimiquement en artémisinine. La figure est extraite de (Paddon and Keasling, 2014).

ainsi que le recours à des micro-organismes se développent. Ils deviennent avec la biologie synthétique des usines vivantes alimentées par des matières premières abondantes et renouvelables (glucose, fructose, hémi-cellulose...). La conception d'une telle usine ne change pas fondamentalement en fonction du produit final à obtenir ou du choix du micro-organisme. Elle se base tout d'abord sur l'exploitation des processus métaboliques et de la machinerie cellulaire déjà présents (Quin and Schmidt-Dannert, 2014). Voyons à présent comment concevoir et construire une usine vivante.

1.2. Conception et construction d'une usine vivante

Un micro-organisme est vivant : il se nourrit, prolifère, détecte un changement environnemental, s'adapte, communique, se déplace... C'est un système dynamique qui a besoin d'un apport de matière et d'énergie (ATP, pour l'adénosine triphosphate) pour assurer son fonctionnement et le renouvellement de ses constituants (les protéines, les lipides, les acides nucléiques et les polysaccharides). Le métabolisme répond à ces besoins en dégradant les nutriments disponibles dans l'environnement (comme le glucose) pour produire les constituants cellulaires. La dégradation et la biosynthèse consistent en des réactions chimiques qui transforment un substrat en un produit en faisant intervenir spécifiquement des enzymes. La voie métabolique de la glycolyse en est un exemple (voir Figure 1.2). Elle transforme le glucose en pyruvate par une succession de réactions enzymatiques. La glycolyse fournit non seulement de l'énergie mais aussi des intermédiaires métaboliques qui peuvent être impliqués dans d'autres voies. Dans le contexte d'une usine vivante, l'un de ces métabolites peut être détourné pour devenir le précurseur de la voie de synthèse d'un produit d'intérêt. C'est ainsi que le FPP, qui est naturellement produit par la levure *S. cerevisiae* à partir du glucose, est utilisé comme une cible sur laquelle on embranche la voie de production de l'acide artémisinique (voir section 1.1). Une voie de production est sous la dépendance de plusieurs enzymes qui peuvent être vues comme des machines exécutant une action particulière. Une enzyme reconnaît un substrat et le transforme en un certain produit. Le micro-organisme construit ces machines en suivant fidèlement un plan contenu dans son acide désoxyribonucléique (ADN). L'information génétique est alors transcrite en ARN messager et traduite en protéine, respectivement par l'ARN polymérase et les ribosomes (voir Figure 1.2).

Une usine vivante est avant tout une cellule (ou châssis) qui possède toute la machinerie pour produire de l'énergie et des métabolites. Nous ne faisons qu'exploiter ce qui est déjà disponible pour former un produit d'intérêt. Il suffit alors de « programmer » le micro-organisme en lui apportant le plan de construction (c'est-à-dire les séquences d'ADN) des enzymes manquantes pour atteindre notre objectif (Voigt, 2006).



Légende à la page suivante

FIGURE 1.2 *(prev. page)* – **Métabolisme central et biosytnhèse des protéines chez *Escherichia coli*** (a) Les sucres (glucose) sont transportés dans la cellule où ils sont phosphorylés pour former du glucose-6-phosphate (G6P). Le G6P emprunte alors la voie de la glycolyse. Une voie métabolique telle que la glycolyse est une succession de réactions enzymatiques (représentées par des traits pleins) qui convertit un métabolite (points verts), ici, le G6P en un autre métabolite, le pyruvate. Ce dernier est alors transformé à son tour en dioxyde de carbone et en eau par deux autres voies métaboliques : le cycle de Krebs (appelé aussi, cycle de l'acide citrique) et par la phosphorylation oxydative. Certains intermédiaires de la glycolyse et du cycle de Krebs servent de précurseurs à la synthèse des marcomolécules qui composent les constituants cellulaires (voir la figure b pour un exemple sur la biosynthèse des protéines). Les réactions de biosynthèse et d'assemblage de ces constituants nécessitent de l'énergie. L'ATP et le NADH sont deux molécules énergétiques (points rouges) issues de la glycolyse et du cycle de Krebs. La phosphorylation oxydative consomme de l'oxygène pour générer à son tour de l'ATP par la phosphorylation de l'ADP. En fait, l'oxydation (perte d'électrons) du NADH au niveau de la NADH déhydrogénase expulsent des protons vers le périplasme de la cellule tandis que les électrons sont acheminés le long de la membrane interne par des quinones jusqu'à l'oxygène, l'accepteur final des électrons. La formation d'eau à partir de l'oxygène par la cytochrome bo oxydase expulse également des protons dans la périplasme. L'expulsion des protons crée un gradient à travers la membrane. La concentration de protons est alors plus importante dans le périsplasme que dans le cytoplasme si bien qu'un flux de proton dirigé vers le cytoplasme se crée. Ce flux génère une force proton motrice nécessaire à la synthèse de l'ATP par l'ATP synthase. Finalement, quand l'influx de carbone issu du glucose dépasse les besoins de la cellule, le pyruvate s'accumule. La cellule contrôle alors la concentration du pyruvate en expulsant le surplus sous la forme d'acétate. Elle maintient ainsi l'équilibre métabolique de ses réactions pour assurer son bon fonctionnement et sa croissance. (b) Biosynthèse des protéines : l'ADN est transcrit en ARN messager par l'ARN polymérase ; puis l'ARN messager est traduit par les ribosomes pour constituer les protéines. La figure est issue de (Chubukov et al., 2014).

La particularité d'une usine vivante est qu'elle ne se limite pas à produire un composé ; mais elle le sur-produit pour atteindre une concentration intéressante pour l'industrie. Il faut donc optimiser la voie de production (Nielsen et al., 2014). Nous l'avons déjà vu, une voie de production est une succession de réactions enzymatiques. La transformation du substrat en produit se fait à une certaine vitesse qu'on appelle aussi un flux métabolique (Kochanowski et al., 2013). L'optimisation consiste à contrôler les flux de matière en augmentant ceux qui favorisent la formation du produit d'intérêt et en réduisant ceux qui nous en éloignent (pertes) (Paddon and Keasling, 2014; Nielsen et al., 2014). Un flux métabolique est modulé par la concentration de l'enzyme et son activité (Chubukov et al., 2014). La régulation de l'expression des gènes notamment à travers le choix du promoteur (transcription) permet de moduler les concentrations d'enzyme et donc les flux (Gerosa and Sauer, 2011; Kochanowski et al., 2013).

Un promoteur représente la manière la plus simple et la plus efficace pour réguler l'expression d'un gène (Quin and Schmidt-Dannert, 2014). Chez *E. coli*, il se caractérise par une séquence située en -10 (TATAAT) par rapport au premier nucléotide à être transcrit (noté +1) et par une séquence en -35 (TTGACA) (Zhou and Yang, 2006). L'ARN polymérase reconnaît ces séquences et s'y fixe pour initier la transcription. La séquence du promoteur détermine sa force (efficacité ou vitesse de transcription). En variant les séquences en -10, -35 et/ou entre les deux, on peut créer une famille de promoteurs de forces différentes (Keasling, 2008), comme celle construite par le Prof. J. Christopher Anderson. Un promoteur est constitutif quand il n'est pas régulé. Dans les autres cas, son activité dépend de la présence d'un activateur ou d'un inhibiteur qui favorise ou empêche le recrutement de l'ARN polymérase (Zhou and Yang, 2006). Ces protéines se lient spécifiquement à des séquences de l'ADN (les opérateurs) qui peuvent être éloignées du promoteur ou le chevaucher. Le promoteur Lac est très largement utiliser pour induire l'expression d'un gène par l'addition d'isopropyl-β-D-thio-galactoside (IPTG). Les protéines LacI reconnaissent et se fixent aux séquences opérateurs *lacO* du promoteur empêchant le recrutement de l'ARN polymérase. L'IPTG se lie aux répresseurs LacI ce qui change leur conformation et entraîne une diminution de leur affinité pour les opérateurs. L'ARN polymérase peut alors initier la transcription. Un tel promoteur est inductible et son activité suit la concentration de l'inducteur (Keasling, 2008). Les promoteurs présentent une grande diversité tant dans leur régulation (un inducteur, la lumière, la température...) que dans leur force (séquence) ce qui permet de moduler l'expression d'un gène à façon. En simplifiant, un promoteur peut être vu comme un élément biologique qui reçoit une information d'entrée et qui génère une réponse adaptée en sortie. Cette réponse est caractérisée par des mesures expérimentales. Dans la collection des promoteurs de JC. Anderson, les forces sont déterminées par la mesure de la fluorescence d'une protéine comme la GFP (en anglais, pour green fluorescent protein). Compte tenu des connaissances que l'on acquiert sur ces promoteurs, on peut sélectionner celui qui donnera à notre construction le comportement escompté.

La biologie moléculaire et le séquençage ont permis d'identifier sur l'ADN des séquences précises et de leur attribuer une fonction. Les promoteurs ne sont qu'un exemple. On

trouve également des sites de fixation du ribosome (en anglais RBS, pour ribosome binding site), des séquences codantes et des terminateurs. Chacun de ces éléments présente une grande diversité que nous utilisons à façon pour construire des usines vivantes et en contrôler le comportement. Ces éléments constituent des briques biologiques qu'il suffit d'assembler entre elles. La biologie synthétique applique à la biologie la vision des ingénieurs afin de rendre la construction d'une souche plus simple et plus rapide. Des mots comme standardisation, abstraction ou modularité deviennent communs dans le vocabulaire du biologiste (Andrianantoandro et al., 2006; Heinemann and Panke, 2006; Keasling, 2008; Leonard et al., 2008; Nielsen et al., 2014; Paddon and Keasling, 2014).

La « Registry of Standard Biological Parts » (http ://parts.igem.org) offre ainsi un catalogue de briques biologiques « BioBricks » (notées BBa_xxxxxx) qui sont des séquences d'ADN codant pour une fonction biologique déterminée. Ces dernières doivent être caractérisées (séquence et données expérimentales). Les BioBricks sont standardisées. Elles doivent être flanquées par les sites de restriction EcoRI et XhoI d'une part ; et par SpeI et PstI d'autre part. Cette particularité permet aux BioBricks d'être facilement assemblées entre elles par restriction puis ligature selon un protocole défini et appelé « 3A Assembly » (voir Figure 1.3). Un kit commercial contenant toutes les enzymes, les tampons et les protocoles pour l'assemblage est d'ailleurs vendu par New England BioLabs. Néanmoins une contrainte existe. En effet, la BioBrick doit être dépourvue des quatre sites de restriction cités afin qu'elle puisse être réutilisée selon le même protocole d'assemblage. Finalement, toutes les BioBricks sont portées par défaut sur un plasmide pSB1C3 répondant aux mêmes standards d'assemblage.

Par ce biais, plusieurs BioBricks sélectionnées dans un but précis peuvent être assemblées sur un plasmide pour constituer un module (Andrianantoandro et al., 2006; Leonard et al., 2008). Un module est une entité capable d'exécuter une tâche particulière comme une voie de production ou encore un détecteur qui en fonction du signal influencerait le comportement de la cellule. Dans tous les cas, un module apporte une partie de la réponse à un problème plus complexe. Farmer and Liao (2000) se sont demandés comment ils pouvaient améliorer la production du lycopène dans l'usine bactérienne *Escherichia coli* (voir Figure 1.4). Cette bactérie ne produit pas naturellement le lycopène. Ils introduisent alors deux plasmides portant chacun un module. Un des plasmides reconstruit la voie de production nécessaire pour former du lycopène à partir du glucose. Toutefois, lors d'une croissance sur glucose la bactérie produit de l'acétate qui constitue une perte de matière carbonée et une source de toxicité nuisant à la synthèse du lycopène. Le deuxième plasmide possède alors un circuit génétique qui détecte le flux vers l'acétate et qui module l'expression de deux enzymes pour rediriger ce flux vers la production du lycopène. La somme de la réponse de chacun des modules optimise la formation du produit d'intérêt.

La création d'une usine vivante (voir Figure 1.5) commence généralement par la formulation d'un problème à résoudre en se basant sur les besoins économiques, sociétaux, ... et qui sert de fil conducteur pour le développement de la souche.

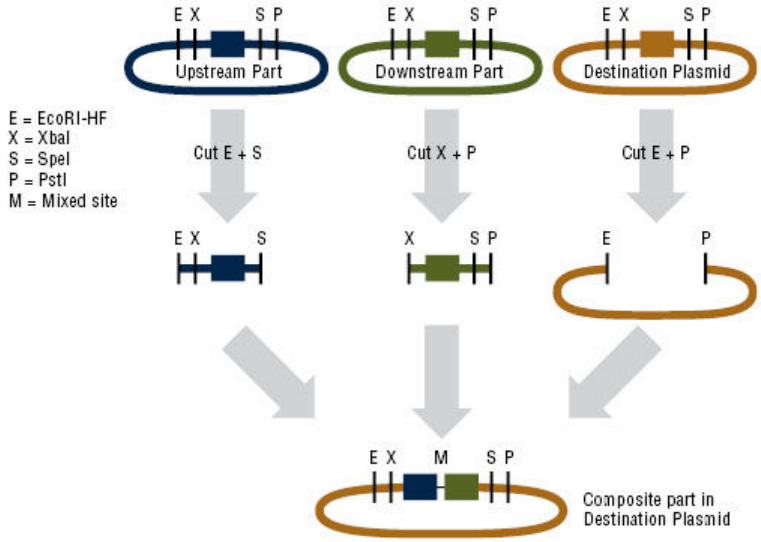


FIGURE 1.3. – **Assemblage standardisé des BioBricks : 3A Assembly** On souhaite associer une brique « upstream part » et une brique « downstream part » sur un plasmide « destination plasmid ». Chacun des plasmides est au format BioBrick c'est-à-dire qu'ils possèdent les sites de restriction EcoRI et XbaI d'une part, et les sites SpeI et PstI d'autre part. La première brique est récupérée en coupant par EcoRI et SpeI. On obtient alors un fragment d'ADN linéaire avec des extrémités cohésives. La deuxième brique est récupérée en digérant par XbaI et PstI, et le plasmide par EcoRI et PstI. A chaque fois des extrémités cohésives sont générées au cours des digestions. Lors de la ligature, le site EcoRI se reforme par la suture des extrémités E de la brique « upstream part » et du plasmide « destination plasmid ». Le site alors reconstitué pourra être à nouveau digéré. Il en est de même pour les extrémités P qui reforment le site PstI. Les extrémités cohésives obtenues par SpeI et XbaI se reconnaissent et forment une cicatrice après ligature. Le site anoté M ne constitue pas un site de restriction pour l'une des quatre enzymes utlisées ici. Le plasmide final porte alors une nouvelle brique qui pourra enrichir le catalogue de la Registry of Standard Biological Parts et être utilisé à son tour pour former une autre brique selon ce même protocole. (Illustration issue de www.neb.com)

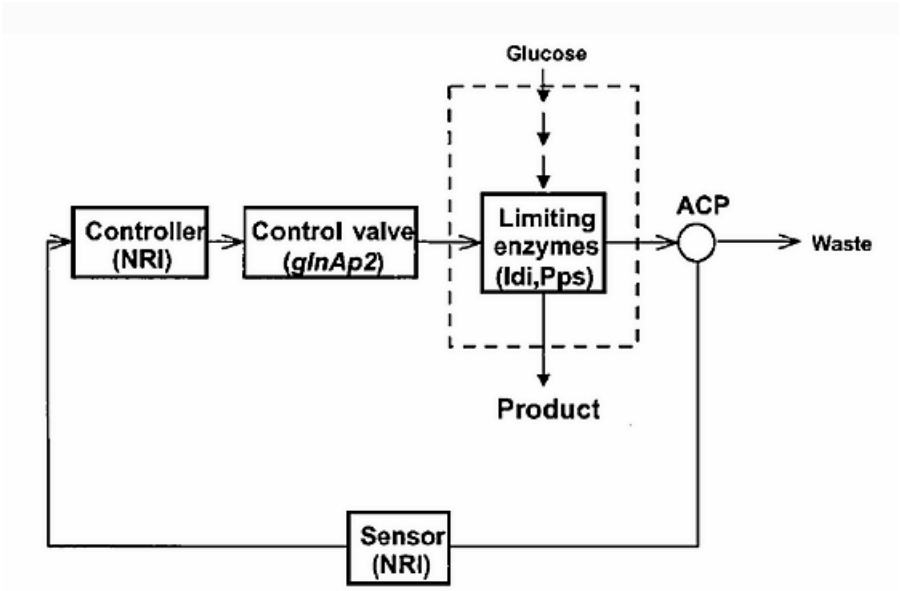


FIGURE 1.4. – **Amélioration de la production du lycopène par un contôleur métabolique synthétique** Le glucose sert de matière première à la biosynthèse du lycopène au cours de laquelle de l'acétate est produit. L'acétate constitue une perte de matière qui pourrait être utilisée pour produire du lycopène. L'acétyl-phosphate (ACP) est un intermédiare dans la voie de production de l'acétate. Il est utilisé, ici, comme un signal reflétant le flux vers l'acétate. L'ACP phosphoryle NR1 qui active alors le promoteur glnAp2. Ce promoteur régule l'expression de deux enzymes clés qui permettent de rediriger les flux vers la formation du lycopène plutôt que vers celle de l'acétate. Figure issue de (Farmer and Liao, 2000)

La phase de conception *in silico* définit la voie de production à reconstruire. Le micro-organisme hôte (ou châssis) et les briques biologiques sont sélectionnés en fonction de leurs propriétés. Ces dernières sont accessibles dans des bases de données comme la Registry of Standard Biological Parts, NCBI, RegulonDB ou EcoCyc Database.

Le recours à un modèle mathématique est nécessaire pour comprendre comment les différents composés de notre système interagissent entre eux (Kitano, 2002). Les simulations prédisent son comportement et identifient les points faibles à corriger pour optimiser la production : niveau d'expression d'une enzyme clé, nécessité de moduler un flux particulier... Un modèle oriente ainsi la construction de la souche. Il ne s'agit plus seulement de sur-exprimer ou d'inactiver un gène mais plutôt d'en réguler finement l'expression. Une conception entièrement assistée par ordinateur serait une approche idéale. Mais elle reste encore difficilement applicable de manière systématique car cette approche se base sur la caractérisation des briques biologiques qui parfois est manquante ou inexploitable. Ce qui donne lieu à une stratégie d'« essai-erreur » où la souche est physiquement construite, évaluée et corrigée de manière cyclique jusqu'à atteindre l'objectif fixé (voir Figure 1.1).

La phase de construction assemble les briques biologiques selon le plan défini au cours de la phase de conception. On peut commander la synthèse d'une partie ou de la totalité du système. Différents protocoles existent pour assembler les briques comme la 3A Assembly (voir Figure 1.3) ou la Gibson Assembly (Gibson et al., 2009).

L'autre aspect de cette phase concerne l'acquisition de données expérimentales (concentrations des métabolites, expression des gènes...) qui sont utilisés pour évaluer les performances de la souche mais aussi son état physiologique. La synthèse d'un produit d'intérêt dépend de la bonne santé du micro-organisme. Or la surproduction peut entraîner l'accumulation d'un intermédiaire toxique ou interférer avec des processus vitaux pour l'usine (allocation des ressources) (Farmer and Liao, 2000). Un retour à l'étape précédente s'avérerait alors nécessaire pour corriger ces effets nuisibles et garantir le meilleur rendement de production.

La biologie synthétique enlève, ajoute et/ou remplace spécifiquement des séquences d'ADN d'un micro-organisme pour lui faire synthétiser un produit d'intérêt. L'assemblage de modules pré-fabriqués, standardisés et caractérisés facilitent la conception et la construction de nouvelles souches. La biologie synthétique crée des usines vivantes. Mais ces souches ne constituent qu'une partie d'un processus industriel. Les usines vivantes doivent résister à ce processus : culture longue, présence de composés toxiques... L'acétate se présente comme la bête noire des industriels tant son accumulation au cours des processus diminue les rendements de production. Dans la suite du manuscrit, nous nous focaliserons sur les mécansimes de l'inhibition de la croissance de la bactérie *E. coli* par l'acétate.

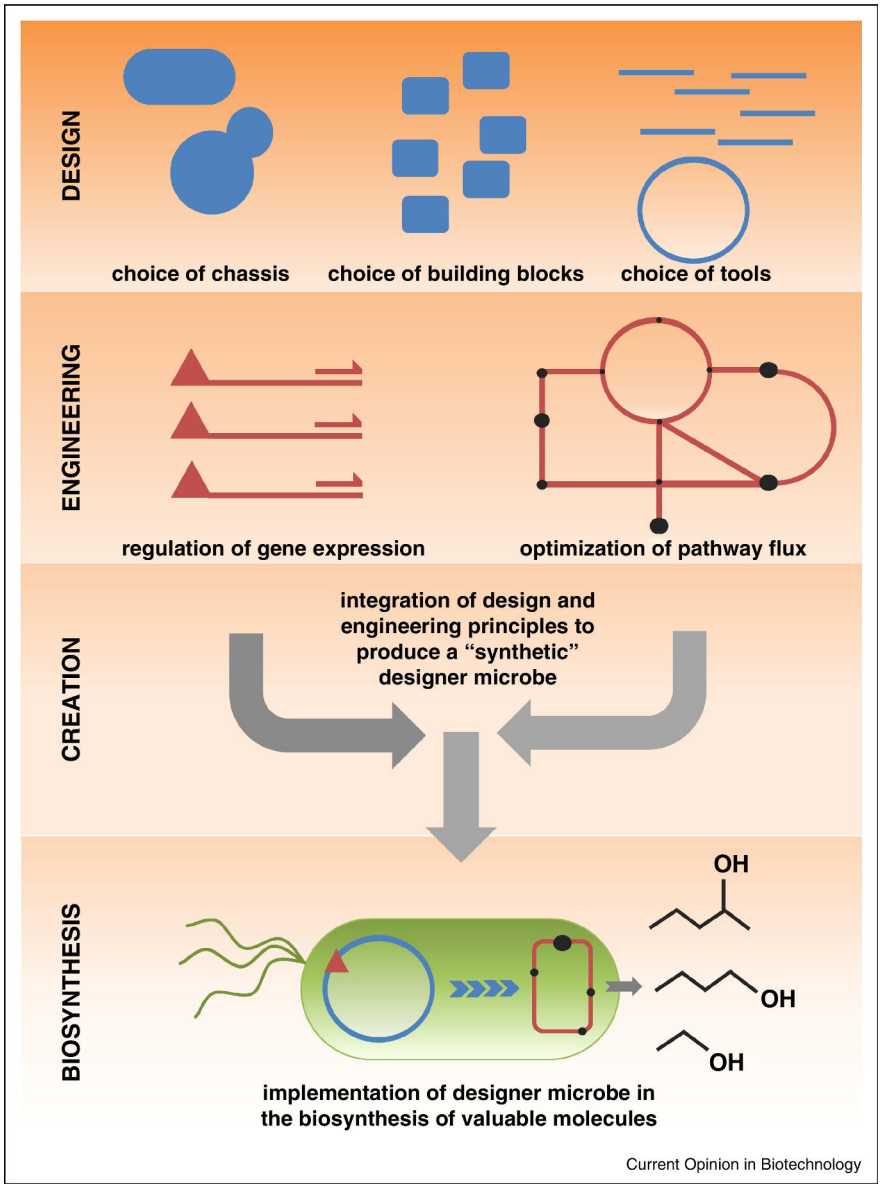


FIGURE 1.5. – **Les différentes étapes du développement d'une usine vivante** Figure issue de (Quin and Schmidt-Dannert, 2014).

1.3. L'acétate : un problème en biotechnologie

L'acétate fait parti des composés qui s'accumulent au cours des processus industriels suite à un traitement chimique ou comme un sous-produit du métabolisme du glucose et de la fermentation (Ling et al., 2014; Mills et al., 2009; Xu et al., 1999). Sa toxicité est directement mesurée par l'inhibition de la croissance (Warnecke and Gill, 2005). Une concentration comprise entre 80 et 120 mM d'acétate réduit le taux de croissance de la bactérie *Escherichia coli* d'environ 50% (Lasko et al., 2000; Roe et al., 1998) (voir Figure 1.6). A titre indicatif, la concentration d'acétate suite au traitement de la lignocellulose peut atteindre 155 mM (Lawford and Rousseau, 1993). On comprend alors que la physiologie de l'usine vivante en soit perturbée au point de diminuer sa productivité... et donc son intérêt industriel (Luli and Strohl, 1990). Il paraît essentiel de réduire l'accumulation de l'acétate pour garantir un haut rendement de production.

Les stratégies mises en place visent à contrôler les conditions de culture et la composition du milieu (agitation, pH, choix et concentration de la source de carbone et d'énergie...) voire à réduire la production d'acétate par des modifications génétiques (contrôle de la glycolyse, inactivation des voies de production de l'acétate...) (Eiteman and Altman, 2006). L'accumulation d'acétate est partiellement ou totalement supprimée permettant une augmentation de la productivité. Néanmoins, ces méthodes sous-estiment le taux de croissance maximal du micro-organisme et ses capacités de production (De Mey et al., 2007). Pour exploiter tout le potentiel d'une usine vivante, il est nécessaire de construire des souches qui soient résistantes à la toxicité de l'acétate.

Comme nous l'avons vu précédemment, toute conception d'une usine vivante implique l'identification de cibles (un promoteur, un gène, une protéine ou un métabolite) sur lesquelles agir et qui orientent la construction génétique. Rendre une souche résistante à l'acétate sous-entend que l'on connaisse les mécanismes de la toxicité de l'acétate. C'est pourquoi cette thèse se propose d'étudier l'effet inhibiteur de l'acétate sur la croissance de la bactérie *Escherichia coli*.

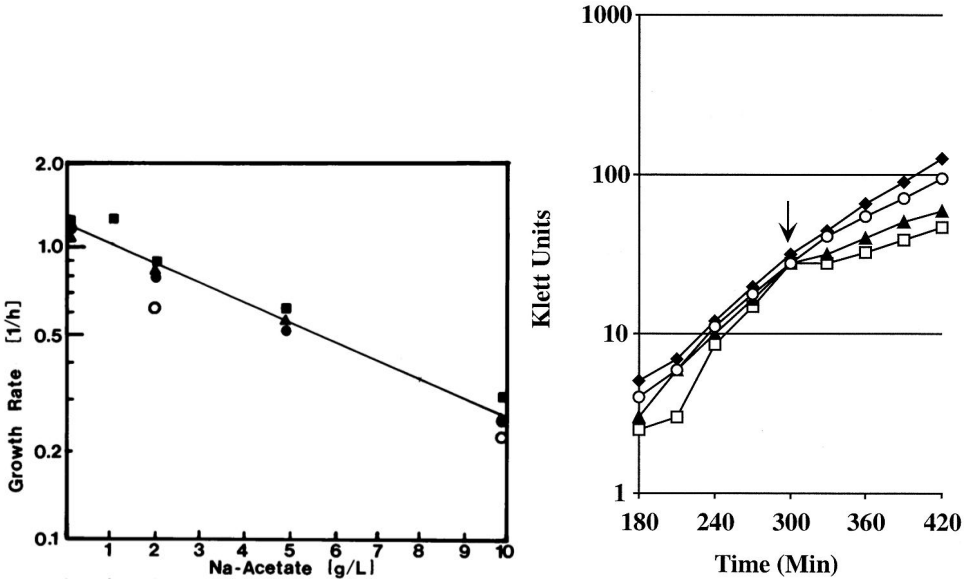


FIGURE 1.6. – **L'acétate inhibe la croissance de la bactérie *E. coli*** (à gauche) Effet de l'ajout de différentes concentrations d'acétate sur le taux de croissance de plusieurs souches d'*E. coli* en milieu SD-7 contenant 2 g/l de glucose (pH 7). Figure extraite de (Luli and Strohl, 1990). (à droite) Effet de l'ajout de l'acétate de sodium (flèche) au cours d'une culture de *E. coli* O157 :H7 à 37°C dans du milieu minimum M63 avec du glucose. La croissance est suivie en mesurant la turbidité avec un colorimère Klett-Summerson. Le sodium d'acétate est à pH 7. Il est ajouté comme suit : 25 mM d'acétate (cercles), 50 mM d'acétate (triangles pleins) ou 100 mM d'acétate (carrés). L'ajout de 100 mM de chlorure de sodium (NaCl) (diamants pleins) est utilisé, ici, comme un témoin reproduisant la même osmolarité que le sodium d'acétate. L'addition de 25 ou de 50 mM de NaCl a le même effet sur le taux de croissance que 100 mM de NaCl (les données ne sont pas montrées dans l'article d'origine). Figure extraite de (Arnold et al., 2001).

2. Le métabolisme de l'acétate chez Escherichia coli

2.1. Les voies de la production de l'acétate

Les réactions enzymatiques de la glycolyse ou encore du cycle de Krebs génèrent l'énergie et les précurseurs nécessaires à la biosynthèse des constituants cellulaires (voir Figure 1.2). Certaines de ces réactions libèrent du NADH qui doit être en permanence recyclé en NAD^+ pour permettre à ces voies de poursuivre la transformation du glucose (Castaño-Cerezo et al., 2009). L'oxydation du NADH dépend de la vitesse à laquelle la bactérie peut consommer l'oxygène disponible dans le milieu. Lors d'une croissance exponentielle sur glucose, les capacités respiratoires de la cellule saturent (Eiteman and Altman, 2006) (voir Figure 2.1). Elles ne suffisent pas à oxyder tout le NADH généré par l'influx important de glucose. Le NADH s'accumule. Or ce dernier inhibe, entre autres, l'enzyme citrate synthase qui catalyse la conversion de l'acétyl-CoA en citrate. Cette réaction est la première étape du cycle de Krebs. L'effet inhibiteur du NADH réduit donc le flux de matière empruntant cette voie métabolique. Un goulot d'étranglement se crée ainsi à l'entrée du cycle de Krebs entraînant l'augmentation de la concentration de l'acétyl-CoA puis, du pyruvate (Majewski and Domach, 1990; Vemuri et al., 2006). Ces deux métabolites sont au carrefour de plusieurs voies métaboliques et ils servent de précurseur à de nombreuses voies de biosynthèse. C'est pourquoi la bactérie doit réguler leur concentration pour éviter toute perturbation de son fonctionnement. La solution optimale (van Hoek and Merks, 2012) mise en place par la cellule consiste à détourner le surplus du flux de matière arrivant à l'entrée du cycle de Krebs vers la production de l'acétate (voir Figure 1.2).

2.1.1. La voie Pta AckA

L'acétate est produit à partir de l'acétyl-CoA par la voie Pta AckA. Les gènes *pta* et *ackA* forment un opéron (Kakuda et al., 1994) et ils sont exprimés de manière constitutive. L'enzyme Pta (phosphate acétyltransférase) catalyse la conversion de l'acétyl-coenzyme A et du phosphate inorganique (Pi) en acétyl-phosphate et en coenzyme A (CoASH). Le groupement phosphate de l'acétyl-phosphate est ensuite transféré par l'enzyme AckA (acétate kinase A) à l'ADP pour former de l'ATP et de l'acétate (Wolfe, 2005).

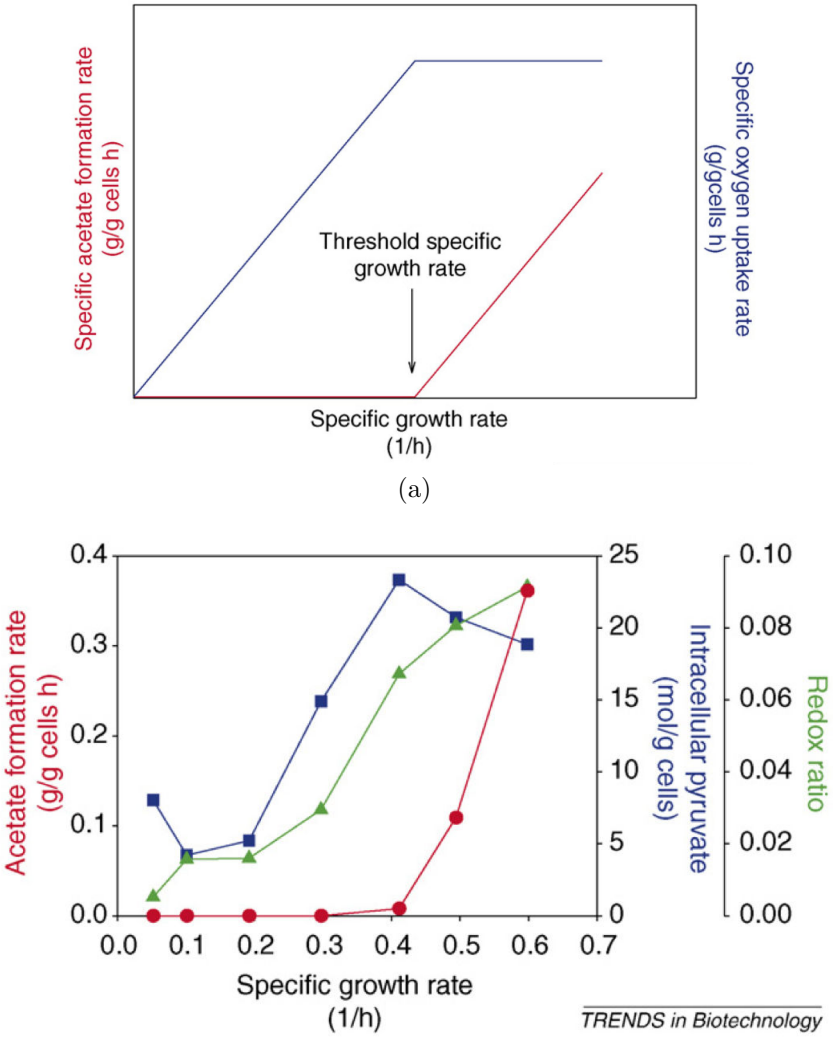
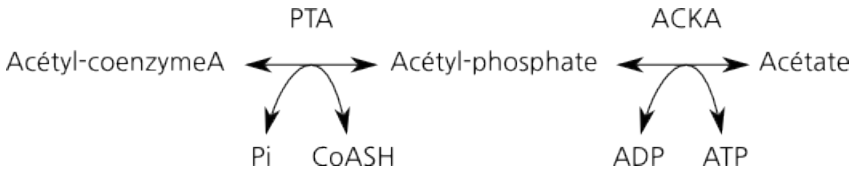


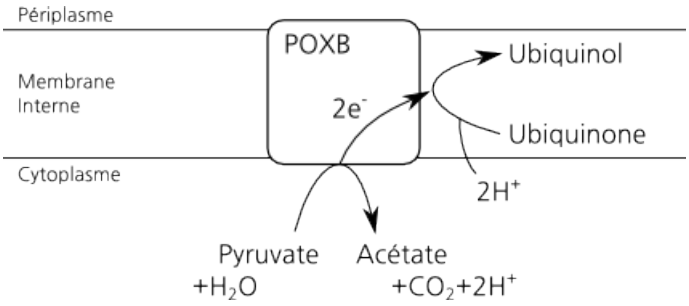
FIGURE 2.1. – **La production de l'acétate est modulée par l'état redox de la cellule** (a) A un taux de croissance élevé, la bactérie ne parvient plus à consommer davantage d'oxygène. On atteint alors un plateau qui indique que les capacités d'oxydation de la cellule sont saturées. En parallèle de l'apparition de ce plateau, on note une production d'acétate. (b) L'apparition d'acétate est corrélée à l'accumulation du pyruvate et à l'augmentation de l'état redox de la cellule. Le NADH n'étant plus recyclé, il s'accumule augmentant ainsi l'état redox de la cellule. Une des conséquences est la répression du cycle de Krebs qui se traduit par une augmentation de la concentration de pyruvate, puis à la formation d'acétate. Les figures sont issues de (Eiteman and Altman, 2006).



La voie Pta AckA produit deux molécules d'ATP par molécule de glucose. Elle se présente donc comme une voie productrice d'énegie mais qui ne libère pas de NADH contrairement au cycle de Krebs. La cellule préfère détourner une partie du flux de matière destiné au cycle de Krebs vers la production d'acétate. Elle maintient ainsi le recyclage du NADH par la phosphorylation oxydative (van Hoek and Merks, 2012). C'est à cette condition qu'à un taux de croissance élevé, les voies de la glycolyse et du cycle de Krebs peuvent fournir plus de trente moles d'ATP par mole de glucose.

2.1.2. La voie PoxB

Une accumulation de pyruvate active l'enzyme PoxB (pyruvate oxydase) probablement pour réduire le flux vers l'acétyl-CoA et réguler ainsi la concentration de ce métabolite (Abdel-Hamid et al., 2001). PoxB se localise dans la membrane interne de la cellule. Elle catalyse la transformation du pyruvate en acétate et en dioxyde de carbone. Cette réaction libère des électrons qui mènent à la réduction de l'ubiquinone en ubiquinol (De Mey et al., 2007). PoxB contribue donc à la chaîne respiratoire.



La transcription du gène *poxB* dépend du facteur sigma S (ou RpoS) de l'ARN polymérase (Chang et al., 1994). Par conséquent, son expression est induite en début de phase stationnaire de croissance. PoxB assure le maintien de la concentration d'acétyl-CoA lors de la transition vers la phase stationnaire de croissance en aérobie. Il prend la relève du complexe enzymatique PDHC (pyruvate dehydrogenase complex) actif en phase exponentielle de croissance en attendant l'induction de l'enzyme PFL (pyruvate formate lyase) en phase stationnaire. Ces deux enzymes catalysent également la formation de l'acétyl-CoA à partir du pyruvate.

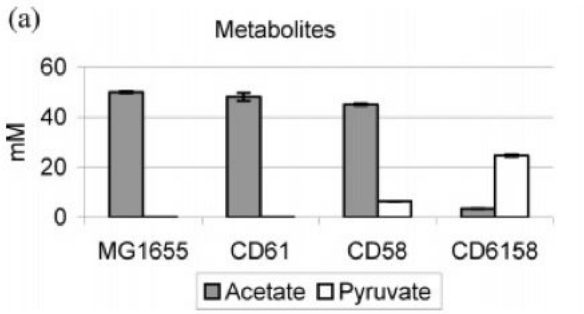


FIGURE 2.2. – **Concentration d'acétate chez des mutants des voies de production de l'acétate** Des mutants du métabolisme de l'acétate de la bactérie *E. coli* MG1655 sont construits. Les concentrations d'acétate sont déterminées pour chaque cas. L'inactivation de la voie Pta AckA, notée CD61, réduit la concentration d'acétate de 4% par rapport à la souche sauvage, notée MG1655. Celle de la voie PoxB, notée CD58, réduit la concentration de 10%. En revanche, l'inactivation des deux voies, notée CD6158, réduit significativement la concentration d'acétate à 7% de celle du sauvage. On note aussi chez CD58 et surtout chez CD6158, une augmentation de l'excrétion du pyruvate. L'inactivation de ces voies pointe sur l'importance de leur rôle dans la régulation de la concentration du pyruvate chez le sauvage. Figure issue de (Dittrich et al., 2005a).

2.1.3. Les autres voies de production de l'acétate

Les voies Pta AckA et PoxB sont les principales voies de la production de l'acétate. L'inactivation d'une de ces deux voies dans la bactérie *E. coli* MG1655 n'altère pas significativement la production d'acétate. En revanche, l'inactivation simultanée des deux voies réduit la production à seulement 7% de celle de la souche sauvage (Dittrich et al., 2005a) (voir Figure 2.2). Il persiste donc une production d'acétate que l'on peut attribuer à la biosynthèse des acides aminés comme la méthionine, la cystéine, l'arginine ou encore la proline (Pey et al., 2013; Valgepea et al., 2010). L'acétate représente alors un produit secondaire.

2.2. Le transport de l'acétate

Dans un milieu aqueux, l'acétate existe sous deux formes : l'acide acétique CH_3COOH (forme AH) et l'anion acétate CH_3COO^- (forme A^-). Sous sa forme AH, l'acétate diffuse rapidement à travers la membrane plasmique de la cellule. La diffusion ne nécessite pas d'énergie. Elle se fait des concentrations les plus élevées vers les plus faibles jusqu'à ce qu'un équilibre des concentrations soit atteint de part et d'autre de la membrane. Selon

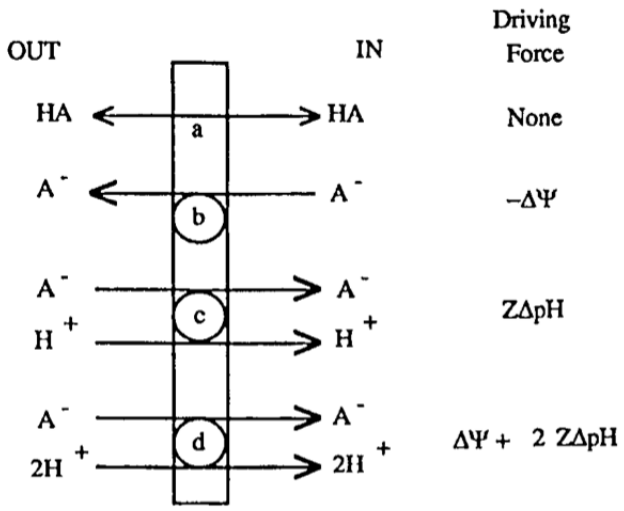


FIGURE 2.3. – **Transport de l'acétate vu par Axe et Bailey (1995)** a) Diffusion simple de l'acide acétique (AH) à travers la membrane ; b) Export de l'ion acétate (Ac^-) par un transporteur selon le potentiel électrochimique de la membrane $\Delta\Psi$; c et d) Import de l'ion acétate via un transporteur symport utilisant le gradient de protons $Z\Delta pH$ ou la force proton motrice $\Delta\Psi+2Z\Delta pH$. Figure extraite de (Russell and Diez-Gonzalez, 1998).

ce procédé, l'orientation du flux d'acétate AH suit le gradient de concentration. Il peut donc être dirigé aussi bien vers l'intérieur que vers l'extérieur de la cellule.

La proportion d'une forme par rapport à l'autre dépend du pH du milieu. En effet, si le pH est supérieur au pKa, alors la forme A^- prédomine sur la forme AH. Le pKa de l'acétate est de 4,76. Autrement dit à pH neutre, l'acétate est à 99% sous sa forme anionique. Comme la membrane plasmique est imperméable aux molécules chargées, la cellule doit posséder des transporteurs pour excréter l'anion acétate. Axe et Bailey (1995) ont émis l'hypothèse de l'existence d'un tel transporteur mais à ce jour il n'a toujours pas été identifié (Axe and Bailey, 1995; Sá-Pessoa et al., 2013) (voir Figure 2.3).

Au cours d'une croissance sur glucose, la bactérie produit et excrète de l'acétate. Lors de la transition vers la phase stationnaire de croissance, les cellules consomment l'acétate qui s'est accumulé dans le milieu externe. Wolfe définit d'ailleurs ce qu'il appelle l'*acetate switch* comme le moment où la production et la consommation d'acétate sont égales (Wolfe, 2005). Ceci implique toutefois que la bactérie soit capable d'importer l'acétate présent dans le milieu pour pouvoir l'utiliser.

Comme nous l'avons vu, l'acétate sous sa forme AH peut diffuser simplement à travers la membrane et donc entrer dans la cellule suivant le gradient de concentration. En effet, ce dernier s'inverse au cours de la croissance alors que la concentration d'acétate augmente dans le milieu externe par rapport au milieu interne. Quand le gradient n'est

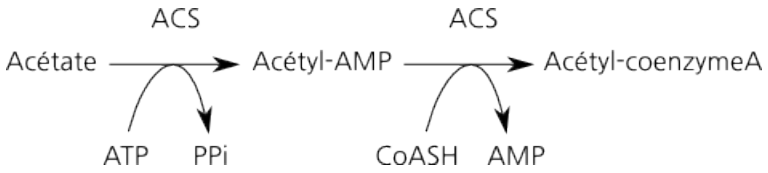
pas suffisant, le recours à des transporteurs est nécessaire pour faire entrer l'ion acétate contre son gradient. Axe et Bailey (1995) suggéraient que l'import des anions acétate se faisait par un co-transport avec des protons (H^+) via des symports (Axe and Bailey, 1995) (voir Figure 2.3). Deux protéines membranaires ont par la suite été identifiées comme des transporteurs de l'ion acétate : ActP et SATP (YaaH) (Gimenez et al., 2003; Sá-Pessoa et al., 2013).

Yaah est un transporteur actif secondaire acétate-proton (Sá-Pessoa et al., 2013) et ActP appartient à la famille des transporteurs symports Na^+ :soluté (Gimenez et al., 2003). Dans les deux cas, l'ion acétate est transporté contre son gradient de concentration ce qui nécessite de l'énergie. Cette énergie est apportée par l'import des protons qui entrent en même temps et dans le même sens que l'ion acétate dans la cellule en suivant leur propre gradient de concentration. C'est ce même gradient de protons qui permet à la cellule de produire de l'ATP (voir Figure 1.2).

YaaH est actif au cours de la phase exponentielle tandis que ActP s'active davantage à l'entrée de la phase stationnaire (Sá-Pessoa et al., 2013). Un mutant *yaaH actP* présente un niveau basal dans l'import de l'acétate dans la cellule, soit environ 8% du transport chez la souche sauvage (Gimenez et al., 2003; Sá-Pessoa et al., 2013). Ceci peut être dû à l'existence d'un autre transporteur ou à la diffusion passive de la forme AH à travers la membrane.

2.3. Les voies de la consommation de l'acétate

Le gène codant pour le transporteur ActP est dans un opéron avec deux autres gènes : le gène *ycjH*, qui code pour une protéine de la membrane interne dont la fonction n'est pas connue ; et le gène *acs*, qui code pour l'enzyme Acs qui transforme l'acétate en acétyl-CoA. La consommation de l'acétate par la voie Acs nécessite de l'ATP et du coenzyme A.



La voie Acs consomme des concentrations d'acétate inférieures à 10 mM (Starai and Escalante-Semerena, 2004). Pour des concentrations supérieures, la bactérie utilise la voie Pta AckA que nous avons déjà détaillée. Les réactions de cette voie sont réversibles. Un mutant Δpta Δacs ne pousse plus dans un milieu où l'acétate est la seule source de carbone. Ceci montre bien que les voies Pta AckA et Acs sont les seules à pouvoir utiliser l'acétate (Castaño-Cerezo et al., 2009).

L'expression du gènes *acs*, et donc du gène *actP*, dépend du facteur de transcription CRP (*catabolite repression protein*). Ce dernier facilite le recrutement de l'ARN polymérase menant ainsi à la transcription de l'opéron. CRP est activé par le messager secondaire AMPc (adénosine monophosphate cyclique) dont la concentration renseigne sur la disponibilité du glucose. En présence de glucose, l'AMPc n'est pas synthétisé ce qui empêche l'activation de CRP (Chubukov et al., 2014), et donc la consommation de l'acétate par la voie Acs. A cela s'ajoute la répression directe ou indirecte de la transcription par les protéines FIS et IHF qui reflètent l'état physiologique de la cellule. C'est ainsi que l'expression de l'opéron ne commence qu'au milieu de la phase exponentielle et se poursuit progressivement jusqu'à l'entrée en phase stationnaire de croissance (Starai and Escalante-Semerena, 2004; Wolfe, 2005).

Nous venons de voir que l'expression de *acs* est régulée au niveau transcriptionnel pour moduler la concentration de l'enzyme. Mais la régulation peut aussi s'exercer au niveau de l'activité enzymatique par l'acétylation/désacétylation de l'enzyme. Généralement, l'acétylation et la phosphorylation sont des modifications post-traductionnelles qui permettent à la cellule d'adapter plus rapidement son métabolisme en modifiant dans un premier temps l'activité des enzymes plutôt que leur disponibilité (expression des gènes) (Chubukov et al., 2014).

L'enzyme Acs s'active quand elle est désacétylée par CobB selon une réaction qui consomme du NAD^+ (Castaño-Cerezo et al., 2011). Or la production de l'acétate vise à permettre la régénération de ce cofacteur. Une consommation d'acétate alors que la cellule n'a pas encore suffisamment de NAD^+ perturberait donc son fonctionnement et sa croissance (Wolfe, 2005). On aurait entre autres une production d'acétyl-CoA alors que la cellule cherche à en diminuer la concentration. La bactérie veille à maintenir l'activité de Acs basse tant qu'elle n' a pas besoin de consommer de l'acétate. C'est pour cela que CRP-AMPc favorise non seulement la transcription du gène *acs* mais aussi celle de l'enzyme PatZ qui inactive Acs en l'acétylant (Castaño-Cerezo et al., 2011).

La complexité de la régulation de la voie Acs tant au niveau transcriptionnel, traductionnel que post-traductionnel montre l'importance de cette voie pour le maintien d'un équilibre métabolique (concentration d'acétyl-CoA, rapport NAD^+/NADH...). Valgepea suggère d'ailleurs que le détournement du surplus du flux de glucose vers la production d'acétate par la voie Pta AckA n'est rendu possible que parce que la voie Acs est réprimée, empêchant ainsi l'acétate produit d'être aussitôt consommé (Valgepea et al., 2010).

Pour le moment, nous avons vu le métabolisme de l'acétate comme un moyen pour réguler la concentration de l'acétyl-CoA. Toutefois au sein des voies de la production et de la consommation de l'acétate figurent des intermédiaires métaboliques essentiels à la croissance d'*E. coli* comme l'acétyl-AMP et l'acétyl-phosphate (Valgepea et al., 2010). Le métabolisme de l'acétate permettrait alors de moduler à façon la concentration de ces deux métabolites. Ils peuvent donner un groupement acétyl et/ou un groupement phosphate, et donc participer aux modifications post-traductionnelles. L'acétylation et

la phosphorylation représentent entre autres un moyen pour réguler rapidement l'activité des enzymes, donc le métabolisme. Si on prend le cas de l'acétyl-phosphate, il participe à la synthèse de l'ATP par la voie AckA, mais aussi à l'acétylation ou encore à la signalisation cellulaire par la phosphorylaion des systèmes à deux composants. Il est donc au carrefour entre le métabolisme et la signalisation cellulaire. C'est pourquoi nous nous intéressons à son rôle au sein de la bactérie.

2.4. L'acétyl-phosphate : entre métabolisme et signalisation

L'acétyle-phosphate est au coeur de la voie Pta AckA. Il peut être synthétisé aussi bien à partir de l'acétate que de l'acétyle-CoA. Il se dote d'un groupement phosphate et d'un groupement acétyle qui lui permettent de participer i) aux modifications post-traductionnelles des protéines par leur phosphorylation et leur acétylation et, ii) à la régulation des gènes par la phosphorylation des systèmes à deux composants. Ils régulent ainsi la formation des flagelles, des pili et de la capsule (Verdin and Ott, 2013) (voir Figure 2.4).

L'acétyle-phosphate peut être considéré comme un donneur de son groupement phosphate. Ceci fait de lui une source d'énergie alternative pour le PTS (*phosphoenolpyruvate-carbohydrate phosphotransferase system*). Il serait alors responsable du transport et de la phosphorylation des sucres comme le glucose (Wolfe, 2005).

L'acétyle-phosphate a surtout été décrit comme phosphorylant les systèmes à deux composants. Ces derniers permettent de réguler l'activité enzymatique ou la transcription d'un gène en réponse à un stimulus environnemental. Ils se constituent d'une histidine kinase (HK) qui transfert un groupement phosphate de l'ATP vers le régulateur de la réponse (RR). Ici, l'acétyle-phosphate se substitue à l'histidine kinase, dans certaines conditions, pour phosphoryler CheY (chémotaxie), KdpE (entrée du potassium), NarL (disponibilté de nitrate), NtrC (utilisation de l'azote), OmpR (adaptation à des changements d'osmolarité, inhibition de l'expression des flagelles, favorise la formation des biofilms et des curli) et RssB (facilite la dégradation de RpoS par la protéase ClpX) (Wolfe, 2005). Il active RcsB qui est impliqué dans la régulation d'environ 5% des gènes du génome de la bactérie *E. coli*. L'acétyle-phosphate peut donc être considéré comme un régulateur global !

L'acétylation chez *E. coli* se fait habituellement par un transfert du groupement acétyle de l'acétyle-CoA par l'enzyme PatZ (anciennement YfiQ) (Hu et al., 2013). Toutefois le récent intérêt porté à l'acétyle-phosphate a révélé que ce dernier participait également à l'acétylation de nombreuses cibles sans avoir besoin de l'intervention d'une enzyme (Weinert et al., 2013). Comme 65% des enzymes impliqués dans le métabolisme sont acétylées, cela représente quasiment autant de cible qui peuvent être régulées par

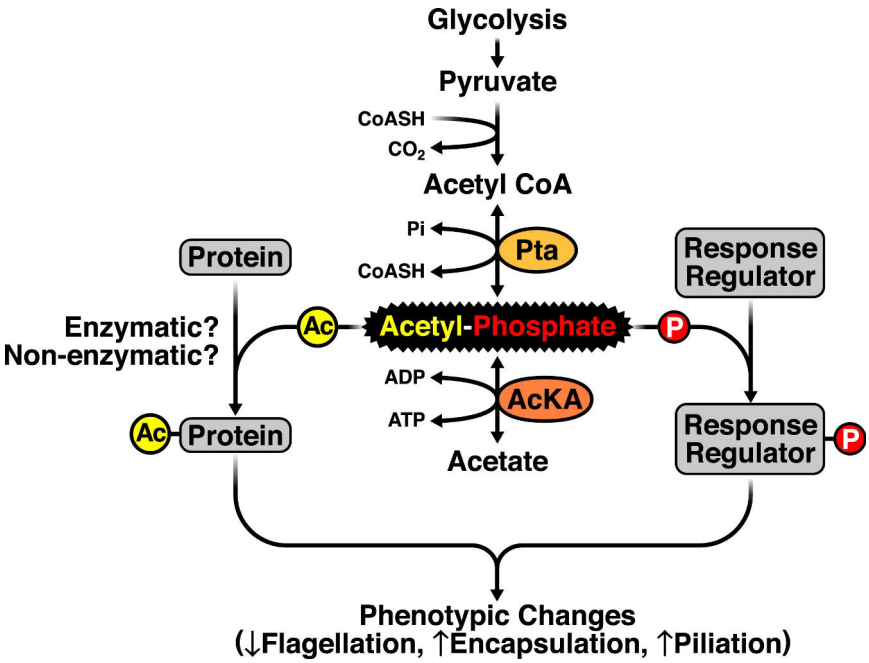


FIGURE 2.4. – **L'acétyle-phosphate, un acteur de la phosphorylation et de l'acétylation chez *E. coli*** L'acétyle-phosphate est un intermédiaire de la voie Pta AckA. Il est au carrefour entre le métabolisme et la signalisation cellulaire. En effet, il peut participer à la régulation des gènes ou des enzymes à travers l'acétylation et/ou la phosphorylation. Il contrôle ainsi la synthèse des flagelles, des capsules et des pili. La figure est issue de (Verdin and Ott, 2013).

l'acétyle-phosphate (Castaño-Cerezo et al., 2014a). L'acétylation contrôle l'activité enzymatique notamment celle de l'ARN polymérase (Weinert et al., 2013). Elle change la taille des protéines, leur conformation, leur affinité pour l'ADN, leur stabilité ou encore les intéractions entre elles (Hu et al., 2013). Weinert et al. (2013) identifient plus de 8000 sites d'acétylation dans *E. coli* qui sont affectés par l'acétyle-phosphate. L'acétyle-phosphate est par conséquent un régulateur de l'acétylation. Bien qu'ils observent une forte acétylation dans des cellules en phase stationnaire de croissance (notamment quand l'azote est limitant) ou dans un mutant $\Delta ackA$, ils concluent que des grands changements dans l'acétylation n'ont qu'un petit impact sur la croissance.

Une même protéine peut être à la fois phosphorylée et acétylée. RcsB en est l'exemple. L'acétyle phosphate donne son groupement phosphate à RcsB pour activer la transcription de *rprA*. Il s'agit d'un petit ARN nécessaire à l'expression de RpoS suite à un choc osmotique. On s'attend donc à avoir une augmentation de l'expression de *rprA* lorsque l'acétyle-phosphate s'accumule. Pourtant ce n'est pas ce qu'il se passe suggérant l'existence d'un autre mécanisme de régulation. L'acétylation du résidu K154 (lysine) empêche ainsi la fixation de ce facteur de transcription à l'ADN. RcsB peut être modifiée par la phosphorylation et/ou l'acétylation. Au total cette protéine peut exister sous l'une de ses 256 isoformes c'est-à-dire 256 réponses différentes (Hu et al., 2013). Ceci diversifie donc la régulation de l'expression des gènes.

Nous venons de faire connaissance avec le métabolisme de l'acétate chez *E. coli*. De part sa place au carrefour entre le métabolisme central et la signalisation cellulaire, la production d'acétate s'avère nécessaire pour assurer le bon déroulement des processus physiologiques et donc garantir une croissance élevée sur glucose. On comprend alors que les stratégies visant à réduire la production de l'acétate par l'inactivation des gènes *pta*, *ackA* et/ou *poxB* causent la réduction du taux de croissance (De Mey et al., 2007). A titre d'exemple, un mutant *poxB* convertit moins efficacement la matière carbonée en biomasse lors d'une croissance en aérobie (une perte de 24%). De plus, l'inactivation de ces voies détournent le flux de carbone vers la production du lactate ou du formate qui, bien que moins toxiques que l'acétate, nuisent toujours à la croissance et au rendement des usines vivantes. Ces stratégies ne font au final que déplacer le problème sur un autre métabolite sans le résoudre pour autant.

C'est pourquoi il est nécessaire de changer la manière d'aborder le problème en ayant recours à la biologie synthétique dans le but de créer des micro-organismes plus résistants aux effets de l'acétate. Ceci nous amène non plus à comprendre comment la cellule produit de l'acétate mais plutôt quels sont les changements du métabolisme ou de l'expression des gènes qui s'opèrent en présence de l'acétate. La dernière partie de cette introduction présente les mécanismes de l'inhibition de la croissance par l'acétate.

3. Les mécanismes de l'inhibition de la croissance par l'acétate

Dans la figure 1.2, les protons sont expulsés hors de la cellule dans le but de produire de l'énergie par l'ATPase avec un flux entrant de protons. Or, le transport de l'acétate du milieu externe vers le cytoplasme de la cellule s'accompagne aussi d'un flux entrant de protons indépendant de l'ATPase. L'acétate est ainsi considéré comme un découplant car en transportant un proton avec lui, il dissocie l'entrée des protons de la production de l'ATP. Les protons s'accumulent dans le milieu où ils diminuent le pH interne. La cellule utilise alors l'ATPase non plus pour faire entrer les protons mais pour les pomper vers l'extérieur en dépensant de l'énergie qui ne peut plus être dédiée à la croissance. La théorie du transport de l'acétate d'Axe and Bailey (1995) suggère l'existence d'un cycle futile dans lequel l'ion acétate pourrait franchir la membrane selon son gradient de concentration (voir Figure 3.1). L'ion acétate récupèrerait alors un proton dans le milieu externe pour l'amener dans le cytoplasme. Un tel cycle conduirait à la dissipation de la force proton motrice qui gouverne la production d'ATP par l'ATPase.

Russell (1992) adresse quelques arguments contre le rôle découplant de l'acétate : i) l'ion acétate est lipophobe si bien qu'il ne peut pas traverser cycliquement la membrane ; ii) la force proton motrice augmente légèrement et ; iii) la quantité d'ATP nécessaire pour expulser les protons est minime face à l'ATP total produit. L'inhibition de la croissance par l'acétate serait alors due à l'accumulation des ions acétate dans le cytoplasme (Roe et al., 2002; Russell, 1992). L'acidification du cytoplasme n'interviendrait que faiblement dans l'inhibition de la croissance. Elle pourrait même n'être qu'une conséquence de l'accumulation des anions acétates.

L'entrée d'acide acétique dans la cellule s'accompagne de l'entrée de protons. Ces derniers s'accumulent dans le cytoplasme et diminuent le pH interne de la cellule. Comme l'activité des enzymes dépend fortement de certains pH, une acidification du milieu interne perturberait la majorité des processus physiologiques (Mills et al., 2009). Cela entraînerait également la dénaturation des protéines, la rupture de l'intégrité de l'ADN (purine) ou encore de la membrane. C'est pourquoi la bactérie *E. coli* doit réguler son pH interne pour le maintenir entre 7,5 et 8. Dans le cas de l'acétate, la cellule chercherait alors à augmenter le pH de son cytoplasme en expulsant des protons.

L'addition de 8 mM d'acétate dans un milieu de croissance à pH 6 se caractérise par une chute immédiate du pH interne (voir Figure 3.2). Toutefois en l'espace de quelques

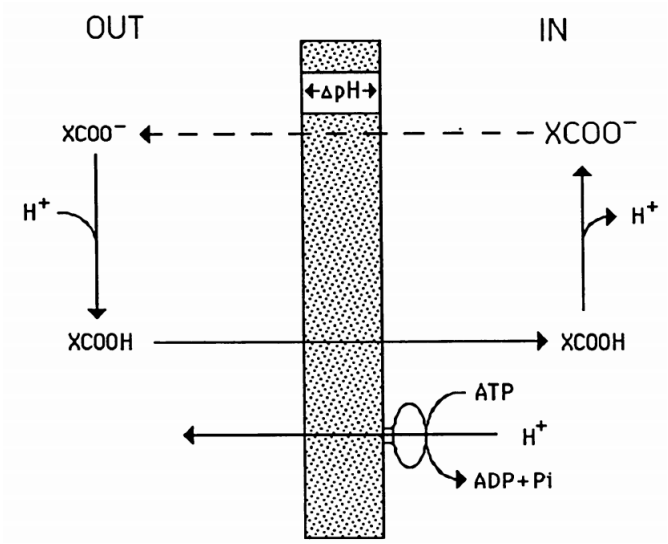
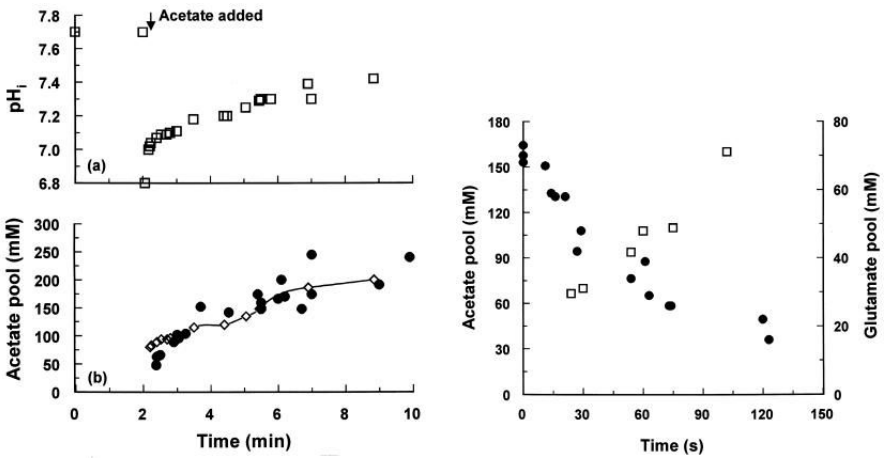


FIGURE 3.1. – **Théorie du découplage** L'acétate protoné (XCOOH) traverse la membrane. Il se dissocie alors en un proton H^+ et en un anion acétate ($XCOO^-$) dans le milieu interne de la cellule. Les protons sont pompés à l'extérieur par l'ATPase tandis que les ions acétate s'accumulent dans le milieu. En effet, de part leur caractère lipophobe, ils ne peuvent pas franchir la membrane selon leur gradient de concentration ΔpH. Or la théorie du découplage impliquerait que l'ion acétate franchisse la membrane pour récupérer un proton dans le milieu extérieur et l'apporter dans le milieu interne. Ce n'est qu'à ce prix qu'un cycle futile peut émerger. Russel propose que ce n'est pas le cas. La figure est extraite de (Russell, 1991).



(a) (b)

FIGURE 3.2. – **Le glutamate régulerait le pH interne de *E. coli*** (a) L'addition de 8 mM entraîne une chute immédiate du pH interne de la cellule. La bactérie *E. coli* rétablit partiellement son pH pendant que l'ion acétate s'accumule dans le cytoplasme. (b) L'accumulation d'acétate dans le cytoplasme est corrélée à la diminution du niveau de glutamate disponible dans la cellule. Ce phénomène est de l'ordre de la seconde. La diminution du glutamate pourrait expliquer la chute brutale du pH interne. Les figures sont issues de (Roe et al., 1998).

minutes, la bactérie rétablit presque totalement son pH interne. La cellule possède des systèmes de transport pour contrôler la concentration de protons. Ces derniers peuvent être exportés en échange de l'import des cations sodium ou potassium. Néanmoins, Roe et al. (1998) ne trouve aucun changement dans la concentration des ions sodium ou potassium lorsqu'il compare une situation avec et sans acétate. En revanche, il note une diminution de la concentration de glutamate dans la cellule. Ceci pourrait être mis en lien avec l'augmentation significative de l'induction des enzymes catalysant la décarboxylation du glutamate (GadA, B et C) lors de l'addition d'acétate (Arnold et al., 2001). Il s'agit d'un moyen indirect pour la cellule d'exporter des protons. Cependant le mutant *gadC* présente toujours une diminution de la concentration de glutamate (Roe et al., 1998) . Bien que ce système fasse partie de la réponse cellulaire à un stress acide, il ne peut pas être la cause de la diminution du glutamate.

En revanche la bactérie *E. coli* est capable d'accumuler jusqu'à 480 mM d'acétate. Dans ce cas il y a quasiment autant d'ions acétate que d'ions potassium dans la cellule si bien qu'il n'y a quasiment plus d'autres anions (Roe et al., 1998). L'addition d'acétate rompt l'équilibre des anions si bien que la bactérie doit expulser certains anions physiologiques comme le glutamate ou l'aspartate pour maintenir son intégrité cellulaire. Tous ces anions ne sont pas identifiés mais il peut s'agir d'intermédiaires métaboliques intervenant dans des voies de biosynthèse. L'addition d'arginine, de méthionine, de thréonine ou de lysine permet par exemple de limiter l'inhibition de la croissance par l'acétate

(Roe et al., 2002; Sandoval et al., 2011). L'inhibition de la croissance pourrait ainsi s'expliquer par la diminution de la concentration de certains métabolites importants. Il a été montré que l'addition d'acétate inhibe la biosynthèse de la méthionine. Pourtant la méthionine est essentielle à la synthèse protéique. De plus, un des précurseurs de la méthionine, l'homocystéine, s'accumule dans le cytoplasme en présence d'acétate alors qu'il est toxique pour la cellule (Roe et al., 2002).

Si on retire l'acétate du milieu, le niveau de glutamate revient en quelques minutes à la valeur avant l'addition d'acétate. Il en est de même pour le pH interne dont le rétablissement est dépendant de la synthèse du glutamate (Roe et al., 1998). Il se pourrait que la diminution du pH interne ne soit qu'une conséquence de la diminution du glutamate suite à son remplacement par des ions acétate dans le cytoplasme. D'ailleurs, l'augmentation du taux de croissance lors de l'addition de la méthionine ne s'accompagne pas d'une amélioration du pH. Ceci montre bien que l'inhibition de la croissance par l'acétate n'est pas strictement liée à la diminution du pH interne (Roe et al., 1998).

L'inhibition de la croissance par l'acétate est multifactorielle et propre à l'acétate. Le benzoate et le formate nuisent à la croissance de la cellule mais dès que les cellules sont transférées dans un milieu sans benzoate ou sans formate, la croissance reprend aussi tôt (Kirkpatrick et al., 2001; Roe et al., 1998). Dans le cas de l'acétate, les effets sur la croissance perdurent suggérant un changement dans l'expression des gènes . On constate ainsi l'induction de nombreux gènes dont l'expression dépend de RpoS (Arnold et al., 2001). Il s'agit d'une sous-unité de l'ARN polymérase qui régule l'expression de nombreux gènes impliqués dans la réponse à un stress oxydant (*katE*), osmotique (*osmC*, *osmY*) ou acide (*hdeA*, *hdeB*). Schellhorn and Stones (1992) identifient l'acétate comme étant l'inducteur de RpoS. Toutefois comme l'acétate est métabolisé, l'induction du gène *rpoS* peut être aussi un résultat du métabolisme de l'acétate. L'étude de l'expression des gènes ou du protéome suite à l'addition d'acétate révèle que la cellule se prépare à résister à un stress qui est habituellement observé en phase stationnaire de croissance. Kirkpatrick et al. (2001) suggère que l'acétate - à travers la concentration d'acétyle-CoA - induirait la phase stationnaire de croissance. Au cours d'une croissance sur glucose, la concentration d'acétate est maximale à l'entrée de la phase stationnaire. L'acétate serait alors un signal de la densité de la population.

4. Objectifs de la thèse

Lors d'une croissance sur glucose, la bactérie *E. coli* détourne une part du flux de carbone vers la production de l'acétate afin de garantir un taux de croissance élevé. Toutefois l'acétate s'accumule dans le milieu et finit par nuire à la croissance. Comprendre comment s'exerce l'inhibition de l'acétate sur la croissance soulève un grand intérêt dans le monde industriel qui a souvent recours à des micro-organismes pour convertir le glucose en médicament ou en carburant, par exemple.

Les causes présentes dans la littérature pointent i) sur l'éventuel rôle découplant de l'acétate ; ii) l'acidification du cytoplasme suite à la dissociation de l'acide acétique en un proton et en un anion acétate ; et iii) l'accumulation des anions acétate qui perturbe entre autres la voie de biosynthèse de la méthionine. Toutefois il est difficile de réunir toutes ces informations dans un schéma expliquant l'effet de l'acétate sur la croissance. D'une part, parce que ces études ont été menées dans des conditions expérimentales différentes (souche, pH, milieu, dispositif) et ; d'autre part, parce que d'autres mécanismes restent sûrement à découvrir.

Cette thèse vise à déterminer quelle est contribution du métabolisme de l'acétate parmi les autres causes déjà décrites dans la littérature.

En effet, comme la cellule peut consommer l'acétate par les voies Pta AckA et Acs, on peut intuitivement penser que l'addition d'acétate dans le milieu de culture au cours d'une croissance sur glucose perturbe le métabolisme par un apport de matière inapproprié (augmentation de la concentration d'acétyle-CoA). De plus, la consommation d'acétate par la voie Pta AckA mène à la production d'acétyle-phosphate qui est impliqué dans la régulation des gènes et dans les régulations post-traductionnelles des protéines (activité enzymatique).

Nous construisons une collection de mutants des voies de la consommation et de la production de l'acétate. Ces mutants sont systématiquement caractérisés par la détermination de leur taux de croissance et la quantification des métabolites produits/consommés au cours de la croissance, avec et sans l'ajout d'acétate lors de la phase exponentielle. Ces données nous permettront d'identifier la contribution i) d'une perturbation des flux métaboliques suite à l'addition d'acétate, ii) de l'acétyle-phosphate, iii) d'une perte d'énergie par un découplage ou, iv) de la méthionine, dans l'inhibition de la croissance bactérienne par l'acétate.

Part II.

Quantitative analysis of the inhibition of bacterial growth by acetate

5. Résumé en français

La bactérie *E. coli* utilise le glucose pour produire les constituants et l'énergie nécessaires à sa croissance. Au cours de ce processus, de l'acétate est libéré dans le milieu de culture. Cette accumulation d'acétate est pointée du doigt dans le monde industriel, car elle diminue la croissance bactérienne et donc le rendement de la bioconversion du glucose en un produit d'intérêt. C'est pourquoi l'identification des mécanismes par lesquels s'exerce cette inhibition suscite un grand intérêt aussi bien du point de vue fondamental qu'applicatif. Cependant, il est difficile de réunir toutes les causes présentes dans la littérature dans un seul et même schéma tant les conditions expérimentales diffèrent d'un laboratoire à un autre (milieu, souche, pH et dispositif). Les explications les plus fréquemment avancées sont : i) l'effet découplant de l'acétate qui rentre dans la cellule sous sa forme protonée et libère le proton dans le cytoplasme. Le proton doit alors être excrété afin de maintenir le potentiel membranaire. Ce cycle futile coûte de l'énergie et réduit ainsi le taux de croissance. ii) L'entrée massive de l'acétate pourrait perturber les flux métaboliques et "imposer" à la cellule un métabolisme de type croissance sur acétate, donc beaucoup plus lent que la croissance sur glucose. iii) La molécule signal acétyl phosphate, Ac∼P, est produite par les voies métaboliques de l'acétate. La concentration de cette molécule pourrait modifier l'expression génique (par phosphorylation de facteurs de transcription) ou l'activité enzymatique (par acétylation de lysines). iv) Le remplacement des anions physiologiques, comme le glutamate, par les ions acétate pourrait perturber différentes réactions métaboliques, comme des voies de biosynthèse de certains acides aminés. Nous avons conçu des expériences pour déterminer la part de chacun de ces mécanismes dans l'inhibition de la croissance par l'acétate.

Afin de distinguer les différents mécanismes, nous avons construit des mutants des voies de la consommation et de la production de l'acétate. Par exemple, en inactivant les deux voies d'assimilation de l'acétate (via Acs et la voie AckA-Pta), nous empêchons l'entrée de l'acétate dans le métabolisme central. Le double mutant $\Delta ackA \Delta pta$ empêche la production d'Ac∼P et peut donc nous renseigner sur l'importance de cette molécule signal dans l'inhibition de la croissance par l'acétate. Nous avons ainsi caractérisé le comportement des différents mutants en mesurant le taux de croissance des souches en présence ou absence d'acétate dans le milieu et en quantifiant les flux métaboliques entrants et sortants de la cellule.

Notre étude ne révèle pas de profonds changements dans le métabolisme central. En revanche, elle suggère que l'acétyl phosphate contribue à environ 20 % de l'inhibition de la croissance. Puisque cette molécule possède des centaines, voire des milliers de cibles,

nous ne pouvons pas identifier les voies particulières qui sont affectées par différentes concentrations d'Ac∼P. Nous pouvons exclure l'explication la plus largement acceptée : nos expériences montrent clairement que l'acétate n'a pas d'effet découplant. En effet, le rendement de biomasse d'une culture bactérienne avec glucose comme seule source de carbone est identique à celle de la culture en présence de 128 mM acétate. Si l'acétate produisait un cycle futile, ce rendement devrait être bien inférieur en présence d'acétate. Nous concluons que l'accumulation des anions acétate dans la cellule contribue majoritairement à l'inhibition de la croissance en diminuant les capacités des voies de biosynthèse comme celle de la méthionine.

Mots clés : croissance, inhibition, acétate, métabolisme

6. Abstract

During rapid, aerobic growth on glucose as a carbon source, *Escherichia coli* excretes acetate into the growth medium, a phenomenon called overflow metabolism. The excreted acetate inhibits growth of the culture. A number of mechanisms have been proposed for explaining growth inhibition by acetate and other organic acids. Here, we systematically and quantitatively test different hypotheses by measuring the growth rate and extracellular metabolite concentrations in different growth conditions and mutant strains, and by integrating this information with a genome-scale model of *E. coli* metabolism. We find that growth inhibition is not relieved when all assimilation pathways of acetate are disabled and that the metabolic flux distributions are very little perturbed by the presence of 128 mM acetate in the growth medium. We estimate that the perturbation of central metabolic fluxes by excess acetate accounts for only 20 % of the growth inhibition. We suggest that this minor effect involves changes in the concentration of the signaling molecule acetyl-phosphate, an intermediate of acetate metabolism. Furthermore, since the growth yield remains unchanged by the addition of acetate to the growth medium, we can exclude the classical explanation that acetate acts a decoupling agent. The only remaining explanation is a major perturbation of the anion balance in the cell. One manifestation of this systemic effect is the inhibition of methionine biosynthesis, contributing about 10 % to growth inhibition. However, the anion imbalance apparently inhibits many other, non-identified cellular processes and we conclude that it is the major cause of growth inhibition by acetate.

7. Introduction

Growth rate is probably the most important physiological parameter characterizing a bacterium. The growth rate of a bacterial culture depends on the composition of the growth medium and the genotype of the particular strain. In its most commonly used growth condition, minimal medium supplemented with glucose as the sole carbon source, the model bacterium *Escherichia coli* secretes acetate, a by-product of glycolysis during fast aerobic growth. This "overflow metabolism" is a function of growth rate. Experiments that vary the rate of glucose utilization by *E. coli* cells growing aerobically show a linear increase of growth rate with the rate of glucose utilization up to 0.9 h^{-1} (Varma et al., 1993). Beyond this growth rate, respiration becomes limiting at 20 mmol of O_2 per gram dry weight (gDW) and h. Since glucose can no longer be fully oxidized to CO_2, the extra redox potential is eliminated by secreting metabolites such as acetate (El-Mansi and Holms, 1989).

The secretion of acetate and other fermentation acids during growth is common in microorganisms and it has been known for a long time that the accumulation of acids in the growth medium inhibits growth (Luli and Strohl, 1990). For example, the growth rate of *E. coli* in minimal medium with glucose is reduced with increasing concentration of acetate, diminishing to half of its reference growth rate in glucose alone when about 100 mM acetate is added to the medium (Luli and Strohl, 1990). This inhibitory effect of acetate and other organic acids on microbial growth is of considerable practical interest. The addition of organic acids is widely used in the food industry to inhibit the growth of microbial pathogens (Carpenter and Broadbent, 2009). Moreover, growth inhibition by acetate and other organic acids is an important problem in biotechnological fermentation processes, limiting their utilization as a substrate for biorefining applications (Warnecke and Gill, 2005) and reducing the production of recombinant proteins in aerobic high cell density cultures (Mey et al., 2007). This has motivated many studies in *E. coli*, searching for mechanism and genes capable of reducing the flux to unwanted anaerobic by-products or increasing the acid tolerance of the cell (Diaz-Ricci et al., 1991).

Several hypotheses have been advanced in the literature for explaining the inhibition of microbial growth by acetate and other organic acids. The classical explanation invokes the uncoupling effect of organic acids. Acetic acid (HAc), the protonated form of acetate, can diffuse freely across the cell membrane (Grime et al., 2008). Inside the cell, HAc dissociates into an acetate anion Ac^- and a proton H^+ because the pK_a of HAc (4.76) is much lower than the intracellular pH (around 7.6, Wilks and Slonczewski (2007)). In order to maintain the membrane potential, the excess protons have to be

expelled from the cell, which may cause an energy expenditure detrimental to growth (Axe and Bailey, 1995; Herrero et al., 1985). The accumulation of acetate anions inside the cell also increases the internal osmotic pressure, which forms the basis for a second explanation (Russell, 1992; Roe et al., 1998). Roe et al. (1998) have observed that, in order to maintain osmotic pressure, the intracellular pools of other anions, most prominently glutamate, are reduced. The resulting perturbation of anion pools may affect the functioning of metabolism and therefore growth. A follow-up study showed that the accumulation of acetate in the cell specifically inhibits a step in the biosynthesis of methionine, leading to the accumulation of the toxic intermediate homocysteine (Roe et al., 2002). The same authors observed that growth inhibition could be substantially relieved by supplying methionine in the medium. A third hypothesis considers another potential effect of the accumulation of acetate inside the cell, namely the perturbation of acetate metabolism and in particular the concentration of acetyl-phosphate (Ac∼P). This signaling metabolite can transfer its phosphate group to regulatory proteins and thus affect the expression of many genes (Wolfe et al., 2003; Wolfe, 2005; Klein et al., 2007). *In-vitro* studies suggest that it may even function as an alternative phosphate donor in the uptake of sugars transported by phosphotransferase systems (PTS) (Fox et al., 1986).

The conclusion of this brief review of the literature (see also Carpenter and Broadbent (2009); Russell (1992)) is that the precise causes of the inhibition of microbial growth by acetate and other organic acids is still little understood and that many questions remain. A major problem in comparing the different hypotheses described above is that they have all been tested in different growth conditions, with different media compositions and external pH, and using different strains. This makes it extremely difficult to investigate, systematically and in a quantitative way, the relative contributions of the proposed mechanisms to growth inhibition. The aim of the present paper is to provide such a systematic quantification, by studying the effect of acetate on the growth of *E. coli* strain BW25113, in well-controlled growth conditions (minimal medium with glucose) and using defined mutants of otherwise isogenic strains.

In particular, we constructed a collection of mutant strains with deletions in genes encoding enzymes involved in acetate metabolism. The metabolic network of acetate excretion and assimilation is represented in Figure 7.1. We constructed mutants in all relevant genes coding for enzymes that connect acetate to central carbon metabolism and produce Ac∼P, *i.e.*, the genes *acs*, *pta*, *ackA*, and *poxB*. We reasoned that, if growth inhibition occurs through the uptake and assimilation of acetate by central carbon metabolism, with the consequent perturbation of fluxes and Ac∼P levels, this effect should be strongly mitigated in the mutant strains. However, since the mutants did not, or only mildly, relieve growth inhibition, the interference of fluxes in acetate metabolism with central carbon metabolism, or the regulation of gene expression or enzyme activity by Ac∼P, play a minor role at most.

In order to test the classical hypothesis that acetate functions as an uncoupling agent, requiring significant energy expenditure to maintain the proton motive force, we charac-

terized the metabolic state of growing *E. coli* cells by quantifying the uptake rate of the sole carbon source, glucose, and the secretion rate of fermentation products like acetate, formate, pyruvate, lactate, and ethanol. These measurements allow us to calculate the biomass yield, defined as the ratio of the growth rate and the glucose uptake rate. If uncoupling plays an important role, one would expect the growth yield to be significantly lower in cultures growing in the presence of high concentrations of acetate in the medium, reflecting the energy-spilling activity of the proton pumps. However, our results indicate that the growth yield of the wild-type, $\Delta acs\,\Delta pta$, and $\Delta acs\,\Delta pta\,\Delta ackA$ strains is the same in the presence or absence of acetate. Moreover, when combining the measured uptake and secretion rates with a genome-scale flux balance model (Feist et al., 2007), the predicted metabolic fluxes during growth with or without acetate are found to be perfectly correlated. The invariance of the metabolic fluxes, up to a constant scaling factor given by the differential growth rates, leads us to conclude that uncoupling does not play a major role either.

By elimination, this leaves the third hypothesis, the perturbation of the anion pools by the large concentrations of acetate accumulating in the cytoplasm as the major candidate for explaining growth inhibition by acetate. We assessed the magnitude of a documented inhibitory effect of acetate on methionine biosynthesis, potentially mediated by a perturbation of the anion composition of the cell. The growth-relieving effect of adding methionine to the medium was only modest. This indicates that other hitherto little characterized metabolic effects of anion balance, either on precursor pools or enzyme activity, play a role. The experimental literature provides many examples of the regulation of enzyme activity by the major ionic constituents of the cytosol (García-Contreras et al., 2012).

We conclude that the major mechanism responsible for growth inhibition by acetate is the perturbation of anion pools by accumulating intracellular acetate. We consider this explanatory hypothesis the most likely, even though it can only be demonstrated indirectly, by quantifying and eliminating all alternative explanations. The results are significant on the level of fundamental research - this is the first time that different hypotheses are considered systematically and quantitatively within same context -, as well as for applied research in biotechnology and food preservation, focusing on ways to alleviate or strengthen growth inhibition by acetate, respectively. Our manuscript also illustrates how the combined application of modeling and experimental tools can yield new insights into a basic phenomenon of biotechnological interest.

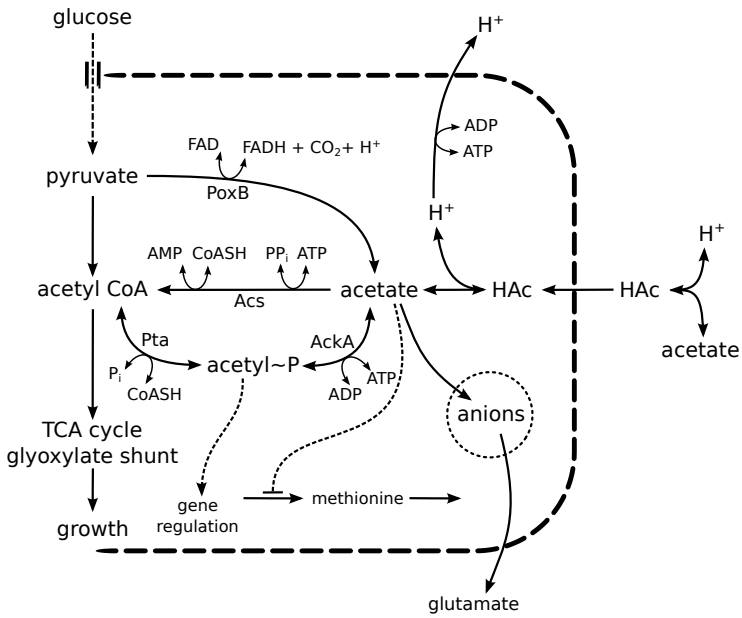


Figure 7.1.: **Schematic representation of the major metabolic pathways of acetate metabolism.** Acetate can be generated directly from pyruvate by decarboxylation (using the enzyme pyruvate oxidase, PoxB) or from acetyl-CoA via the intermediate acetyl-phosphate (Ac∼P) (reactions catalyzed by the enzymes phospho-trans-acetylase, Pta, and acetate kinase, AckA). Acetate can freely diffuse across the cell membrane in the protonated form (Grime et al., 2008), HAc, or as an acetate ion Ac^-, via the transporters ActP or SatP (Sá-Pessoa et al., 2013). In order to preserve the membrane potential, the protons that enter the cell in the form of HAc have to be expelled again at the expense of energy. The enzyme acetyl-CoA synthetase, Acs, efficiently converts intracellular acetate into acetyl-CoA. Acetate is also involved in several metabolic pathways. For example, the biosynthesis of methionine is inhibited by acetate. Excess intracellular acetate perturbs the anion balance in the cell and could thus inhibit other metabolic reactions (Roe et al., 2002). The pool of the major intracellular anion, glutamate, is strongly reduced when the intracellular concentration of acetate is high.

8. Materials and Methods

8.1. Bacterial strains and growth media

The bacteria used in this study were *E. coli* K-12, strain BW25113, that we will call "wild-type" ($rrnB_{T14}$ $\Delta lacZ_{WJ16}$ $hsdR514$ $\Delta araBAD_{AH33}$ $\Delta rhaBAD_{LD78}$). The following deletion mutants were constructed by removing the entire open reading frames of the corresponding genes: Δacs, $\Delta ackA$, $\Delta pta\,\Delta ackA$, $\Delta pta\,\Delta acs$, $\Delta pta\,\Delta ackA\,\Delta acs$, $\Delta pta\,\Delta ackA\,\Delta acs\,\Delta poxB$, and a reversion mutant, $\Delta pta\,\Delta ackA$ $\Delta acs{::}ackA_{wt}$. In this last mutant, a wild-type copy of the *ackA* gene was re-introduced into the mutant strain in order to verify the strain constructions. The resulting phenotype should be identical to $\Delta pta\,\Delta acs$.

The standard minimal medium contained: 110.98 mg/l $CaCl_2$, 240.73 mg/l $MgSO_4$, 5 mg/l thiamine, 1 g/l NH_4Cl, 0.5 g/l NaCl, 3 g/l KH_2PO_4, 8.5 g/l $Na_2HPO_4{\cdot}2H_2O$, 3 mg/l $FeSO_4{\cdot}7H_2O$, 15 mg/l $Na_2EDTA{\cdot}2H_2O$, 4.5 mg/l $ZnSO_4{\cdot}7H_2O$, 0.3 mg/l $CoCl_2{\cdot}6H_2O$, 1 mg/l $MnCl_2{\cdot}4H_2O$, 1mg/l H_3BO_3, 0.4mg/l $Na_2MoO_4{\cdot}2H_2O$, 0.3 mg/l $CuSO_4{\cdot}5H_2O$. As carbon source, 3 g/l glucose was used. Growth medium was supplemented with methionine to a final concentration of 3.3 mM when appropriate. Acetate was added to the growth medium as a concentrated solution of sodium acetate equilibrated to pH 7.4 in order to obtain the desired final concentration of acetate (128 mM in most experiments).

8.2. Construction of E. coli mutants

All of our mutants were derived from strains in the Keio collection (Baba et al., 2006). The kanamycin resistance cassette replacing the coding sequence of the genes was removed such that none of our mutants carry an antiobiotic resistance cassette. The kanamycin resistance cassette is flanked by recognition sites of the Flp recombinase and the cassette can therefore be excised using a plasmid expressing the Flp recombinase (plasmid 705-FLP). This excision creates an in-frame scar sequence (102 bp), reducing polar effects on downstream gene expression. The first mutant to be constructed was the $\Delta ackA$ mutant, by simply removing the kanamycin resistance cassette from the corresponding Keio clone.

We constructed the Δacs and the $\Delta pta\,\Delta ackA$ mutants by replacing the gene *acs* and the operon *pta ackA* with a FRT-flanked kanamycin resistance gene generated by PCR (Datsenko and Wanner, 2000). Primers have 20-nt 3' ends homologous to the kanamycin resistance cassette used in the Keio collection and 50-nt 5' ends of homology targeting the chromosomal region of interest. PCR products were transformed into a BW25113 strain expressing the λ Red recombinase (plasmid pSIM5). Antibiotic-resistant recombinants were then selected and the kanamycin resistance cassette removed.

We constructed the $\Delta pta\,\Delta acs$, $\Delta pta\,\Delta ackA\,\Delta acs$, and $\Delta pta\,\Delta ackA\,\Delta acs\,\Delta poxB$ mutants by P1 transduction (Thomason et al., 2007). The P1 lysate was grown on our $\Delta pta\,\Delta ackA$ *kan* mutant and Δpta *kan* mutant from the Keio collection. These lysates were then used to infect the Δacs strain in order to obtain $\Delta pta\,\Delta ackA$ *kan* Δacs and Δpta *kan* Δacs transductants. The kanamycin resistance cassette was removed as described above. The same procedure was used for moving the $\Delta poxB$ *kan* mutation from the $\Delta poxB$ Keio mutant to our $\Delta pta\,\Delta ackA\,\Delta acs$ strain. The kanamycin resistance cassette was also removed to obtain a $\Delta pta\,\Delta ackA\,\Delta acs\,\Delta poxB$ mutant.

We re-introduced the gene *ackA* into the $\Delta pta\,\Delta ackA\,\Delta acs$ mutant precisely into the same locus as in the $\Delta pta\,\Delta acs$ mutant. Primers pta-CCDB1 and ackA-KN1 were used to amplify a *kanamycin*::pBAD::*ccdB* cassette (to be published). The PCR product was transformed into a $\Delta pta\,\Delta ackA\,\Delta acs$ mutant expressing the λ Red recombinase (plasmid pSIM5). Antibiotic-resistant recombinants were selected. Primers Y2-ACKA and ackA_pta_left_PCR_verif were used to amplify the sequence between the initiation codon of *ackA* and the initiation codon of *pta* of the $\Delta pta\,\Delta acs$ mutant. The PCR product was recombined into the chromosome in place of the cassette. Recombinants were selected on a medium containing arabinose for activation of the suicide-gene *ccdB* that kills cells that have not recombined the *ackA* gene.

All mutants were verified by PCR and DNA sequencing. The list of primers used in this study can be found in Table 8.2.

8.3. Growth in shake flasks

For each strain, a seed flask (50 ml capacity), containing 10 ml of filtered minimal medium with glucose, was inoculated from glycerol stock. The culture in the seed flask was grown overnight at 37°C with and orbital agitation of 200 rpm. At the same time, 50 ml of filtered minimal medium with glucose (and methionine when appropriate) were pipetted into different 250-ml flasks (as many as there are experimental conditions and replicas) and stored overnight at 37°C without shaking. The following day, each 250-ml flask was inoculated to an optical density of 0.02 OD_{600} from the seed flask. For each strain, two 250-ml flasks were used: one for the addition of 2 ml of filtered minimal medium with acetate and the other for the addition of 2 ml of filtered minimal medium

Primer name	Sequence (5' to 3')	Purpose
acs1P1	GTTACCGACT CGCATCGGGC AATTGTGGGT TACGATGGCA TCGCGATAGC ATTCCGGGGA TCCGTCGACC	construction
acs2P2	AACGCTTATG CCACATATTA TTAACATCCT ACAAGGAGAA CAAAAGCATG TGTAGGCTGG AGCTGCTTCG	construction
acs-Right-PCR-verif	AAAACTGCCA ATACCCCT	verification
acs-Left-PCR-verif	TTTTAATTCC CGCTCCCT	verification
ackA-pta-Left-Primer	TGGCTCCCTG ACGTTTTTTT AGCCACGTAT CAATTATAGG TACTTCCATG ATTCCGGGGA TCCGTCGACC	construction
ackA-pta-Right-Primer	GCAGCGCAAA GCTGCGGATG ATGACGAGAT TACTGCTGCT GTGCAGACTG TGTAGGCTGG AGCTGCTTCG	construction
ackA-pta-Left-PCR-verif	CCCTGACGTT TTTTTAGCC	verification
ackA-pta-Right-PCR-verif	CAGCGCAGTT AAGCAAGA	verification
ackA-Right-PCR-verif	TATCCTCTTT CGTTACCGCC	verification
pta-Left-PCR-verif	GGCGGTAACGAAAGAGGA	verification
poxB-seq-Rev	CTCCTTTCTC TCCCATCCC	verification
poxB-seq-Fwd	TAAACGTCGT CCCCAACC	verification
pta-CCDB1	CTTTCTAGAG AATAGGAACT TCGAACTGCA GGTCGACGGA TCCCCGGAAT TTATATTCCC CAGAACATCA GG	construction
ackA-KN1	TGGCTCCCTG ACGTTTTTTT AGCCACGTAT CAATTATAGG TACTTCCatg ATAGGAACTT CAAGATCC	construction
Y2-ACKA	CTTTCTAGAG AATAGGAACTT CGAACTGCAG GTCGACGGAT CCCCGGAATc acGGTTTATC CTCTTTCGT	construction
ackA compl verif	CGCAAAATGG CATAGACTCA A	verification

Table 8.2.: **Oligonucleotides used in this study.** Note that ackA-Right-PCR-verif and ackA-pta-Left-PCR-verif were used to verify the *ackA* deletion, pta-Left-PCR-verif and ackA-pta-Right-PCR-verif were used to verify the *pta* deletion, and ackA-pta-Right-PCR-verif and ackA-compl-verif for verifying the *ackA* complementation.

without any carbon source (control). Cultures were grown at 37°C with orbital shaking at 200 rpm. Growth of the strains was monitored every 30 minutes by removing a sample of 1 ml. Samples were used to measure the optical density. The remaining volume was centrifuged at 14000g for 3 min at 4°C. The supernatant was frozen at -20°C for the quantification of metabolites. Acetate stock solution was prepared in concentrated form such that 2 ml of the stock solution, added to 44 ml of culture, would give a final concentration of 128 mM acetate. Minimal medium with acetate and minimal medium without any carbon source were stored at 37°C before addition to the growing culture. Acetate was added when an optical density reached 0.2 OD_{600}.

8.4. pO_2, pH and DO measurements

Cell growth was monitored by measuring the optical density with a spectrophotometer (Eppendorf BioPhotometer) at 600 nm. Dilutions were done when appropriate in order to stay in the range of linearity of the instrument. The partial oxygen pressure, pO_2, and the pH were measured with a Clark electrode (LAMBDA fermentor) and a pH probe (Mettler Toledo), respectively.

8.5. Quantification of metabolite concentrations in the medium

D-glucose, acetic acid, formic acid, pyruvic acid, D-lactate, and ethanol were assayed by enzymatic assay kits according to the manufacturer's recommendations; respectively Boehringer Mannheim, R-Biophar No 10 716 251 035, Megazyme K-ACETRM, Megazyme K-FORM, Megazyme K-LATE, Megazyme K-PYRUV and Megazyme K-ETOH. All measurement procedures are based on coupled enzyme assays.

Quantifications were done in 96-well microplates (clear flat-bottomed, plastic). Depending of the metabolite we wanted to quantify, different enzymatic reactions led to the consumption or the production of NADH. The concentration change of NADH was quantified by measuring the difference in absorbance at 340 nm ($\Delta A_{\text{metabolite}}$) with a microplate reader (Perkin Elmer Fusion Alpha). The concentration of the sample $C_{\text{metabolite}}$ (diluted in order to remain within the linearity region of the assay) is then calculated as:

$$C_{\text{metabolite}} = \frac{\Delta A_{\text{metabolite}}}{\Delta A_{\text{standard}}} \cdot C_{\text{standard}}$$

where $\Delta A_{\text{standard}}$ and C_{standard} are the measured absorbance difference and the concentration of the metabolite standard. The metabolite standard solution was provided with

each kit. $\Delta A_{\text{metabolite}}$ and $\Delta A_{\text{standard}}$ are the difference between the absorbance before starting the reactions (A_1) and the absorbance at the end of the reactions (A_2). A_1 and A_2 were read ten times at regular time intervals in order to ensure that the reaction had reached equilibrium. In order to compensate for drift in the measurements, we fitted a straight line to the repreated measurements of A_1 and A_2. Using this straight-line extrapolation, the absorbance difference, $\Delta A = A_2 - A_1$, was calculated at the time of addition of the last enzyme that starts the reactions. Metabolite concentrations were corrected to take into account the dilution due to the addition of 2 ml of medium with or without acetate. Concentrations are given as the mean of at least three independent experiments. Error bars are equal to twice the standard error of the mean.

8.6. Estimation of growth rates and growth yields

In order to compute growth rates for the different strains, grown in the presence or absence of acetate, we used the exponential growth model

$$\frac{d}{dt}B(t) = \mu \cdot B(t),$$

with $B(t)$, B_0 the time-varying and initial biomass, respectively, and μ the growth rate [h^{-1}]. This model has the explicit solution

$$B(t) = B_0 \cdot e^{\mu t} \tag{8.1}$$

The above equation was fitted to each individual time-series of optical density measurements. We checked that within the chosen time interval, the underlying assumption of exponential growth at a constant rate is satisfied. The reported growth rate values are the mean of at least three independent experiments. Error estimates are reported as twice the standard error of the mean.

In order to compute growth yields, we combined the growth model with the glucose consumption model

$$\frac{d}{dt}G(t) = -r_{glc} \cdot B(t),$$

which has the explicit solution

$$G(t) = G_0 - (B_0/Y) \cdot (e^{\mu t} - 1), \tag{8.2}$$

where $G(t), G_0$ are the time-varying and initial glucose concentrations [mM], respectively, and Y the growth yield [mM OD_{600}^{-1}], defined as the ratio of the glucose uptake rate r_{glc}

[mM OD_{600}^{-1} h^{-1}] and the growth rate, that is, $Y = r/\mu$. We simultaneously fitted Eqs 8.1-8.2 to each individual time-series data set of glucose concentrations and optical densities, obtained in a single growth experiment. For each of the six conditions considered (the three strains, wild-type, Δ*acs pta*, and Δ*acs pta ackA*, in the two growth condition, 0 or 128 mM acetate added to the glucose minimal medium) an estimate of Y was obtained. The reported values are the mean of four independent replicate experiments. Error estimates are reported as twice the standard error of the mean.

The glucose uptake rate can be calculated in a straightforward manner from the above estimates, by dividing the estimate of the growth rate by the estimate of the growth yield. In order to obtain the secretion rate of the fermentation by-products, used in the flux balance model, we again fitted Eq. 8.2 to the data, but replacing the glucose uptake rate by the appropriate secretion rate and using the values of μ and B_0 obtained from the estimation of the growth yield. All uptake and secretion rates are computed from four independent replicate experiments with error estimates given by twice the standard error of the mean.

8.7. Flux balance analysis

A slightly modified version of the genome-scale reconstruction iAF1260-flux1 of *Escherichia coli* metabolism was used for all simulations (Feist et al., 2007). These were performed using the COBRAv2 Toolbox Schellenberger et al. (2011) with Gurobi 5 as the linear programming solver (Gurobi Optimization, Inc., Houston, TX, USA). The transport reaction of acetate anions through ActP was added to the model and the growth-associated maintenance flux was set to 120 mmol gDW^{-1}. The lower bound of exchange fluxes was set to zero, except for components of the *in-silico* growth medium (water, vitamin, salt, traces, and glucose), which were left unconstrained, and for the oxygen uptake rate, which was limited to -20 mmol gDW^{-1}. The upper bound of the exchange fluxes was set to zero for secreted products, except for those detected in the external medium in our experiments, namely acetate, formate, lactate, pyruvate, and ethanol. These fluxes were set to their measured values. A theoretical flux of carbon dioxide was determined based on the carbon mass balance. The upper bound of the proton exchange reaction was set to zero to take into account the gradient of pH favoring the entry of protons into the cell, even in the absence of excess acetate in the growth medium. Fourteen additional reactions were constrained by literature data to allow normal functioning of the glycolysis and the pentose phosphate pathway. Reactions allowing glycogen consumption were blocked, as well as fluxes through reactions catalyzed by putative sugar phosphatase and aldehyde dehydrogenase. Simulation of acetate addition to the growth medium was performed by forcing incoming fluxes of acetate and protons from the external medium to the cytoplasm, as well as an outgoing flux of acetate to the periplasm. Biomass was optimized in all simulations to account for the fact that the growth yield was very similar in all strains and conditions, suggesting that in these cases

the catabolism of glucose and anabolism proceed with the same (optimal) efficiency as in the wild-type strain. The biomass function Ec_biomass_iAF1260_core_59p81M was used (Feist et al., 2007). The reported flux distribution is a representative solution in the set of alternative optimal solutions (Smallbone and Simeonidis, 2009), computed by means of the `geometricFBA` function in Cobra.

9. Results

9.1. Growth inhibition by acetate

In order to dissect the mechanism of growth inhibition by small organic acids, we adapted a standardized, well-controlled experimental setup from Luli and Strohl (1990). We use the *Escherichia coli* BW25113 strain and tested the growth-inhibitory effect of acetate, the most widely used organic acid in previous studies. *E. coli* bacteria from an overnight pre-culture in minimal medium supplemented with 0.3% glucose were inoculated at an initial optical density of 0.02 OD_{600} in the same medium and grown in a shake flask batch culture. The growth characteristics of our strain are identical to those measured for similar strains of *E. coli* (Enjalbert et al., 2013). As shown in Figure 9.1, after about 7 hours of growth, the bacteria reach a final optical density of 3.5 OD_{600}. pH and oxygen pressure decrease continuously during the exponential growth phase due to the increasing number of bacteria consuming oxygen and secreting acidic by-products. During the entire growth of the culture, the partial oxygen pressure, pO_2, never falls below 40%, meaning that the bacteria grow aerobically (Enjalbert et al., 2013). The pH remains close to neutral (pH 7) in the beginning of the experiment, but drops to a value of 6.4 at the end of exponential phase.

In order to quantify the effect of acetate on the growth of the culture, identical starting cultures were split at the beginning of the experiment and grown in separate shake flasks. When the OD_{600} reached 0.2, *i.e.*, after 3 hours, a solution with a defined concentration of acetate was added to the medium in one flask and a solution without acetate to the medium in another flask (Figure 9.2). Growth of both the acetate-treated and the control culture were followed until the end of exponential phase, eight hours and four hours later, respectively. At regular time intervals, typically once every 30 min, we took samples from the growing cultures. The samples were used for measuring extra-cellular metabolites (see Section 9.3) and the optical density (OD_{600}). From these measurements we computed the growth rate by fitting an exponential curve to the data, as described in Section 8.6. The growth rate was determined from optical densities below 1 OD_{600}, since above this value the oxygen pressure decreases to a point that it no longer allows maximum growth supported by the medium. Moreover, in the fast-growing control culture, acidification of the medium due to overflow metabolism sets in at higher optical densities (Figure 9.1), thus confounding the effect from external acetate addition.

Growth inhibition by acetate is quantified using a so-called inhibition index, defined as

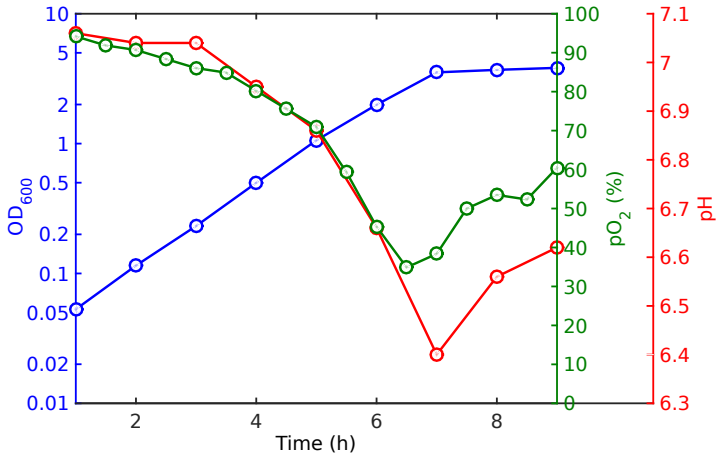


Figure 9.1.: **Growth characteristics of strain BW25113 grown in minimal glucose medium.** The curves show the main parameters characterizing the growth of this *E. coli* strain: optical density in blue, oxygen pressure in green, and pH of the growth medium in red. The cells grow exponentially for about 7 hours after inoculation. The growth characteristics are identical to profiles measures for similar strains of *E. coli* (Enjalbert et al., 2013).

$$i = \frac{\mu_{control} - \mu_{acetate}}{\mu_{control}},$$

where $\mu_{control}$ denotes the growth rate in the culture without added acetate and $\mu_{acetate}$ the growth rate in the culture with added acetate. Notice that the value of the inhibition index varies between 0 and 1. An inhibition index of 0 means no growth inhibition by acetate, whereas an inhibition index of 1 corresponds to full growth inhibition.

Figure 9.3 shows the measured growth rate of the wild-type strain after the addition of different concentrations of acetate to a culture growing in the reference conditions described above. As can be seen, the growth rate drops from 0.75 h^{-1} to 0.4 h^{-1} when the acetate concentration increases from 0 to 128 mM. Previous reports (Luli and Strohl, 1990) had suggested an exponential decrease of growth rate as a function of the concentration of added acetate. When allowing for an offset of the exponential function (which would roughly correspond to the growth rate on acetate as the sole carbon source), we obtain the best exponential fit with a a baseline of the exponential at about 0.3 h^{-1}. This value corresponds indeed to the growth rate of *E. coli* on acetate as the sole carbon source (Oh et al., 2002). Although the data can thus be described by an exponential curve, based on the error estimates in Figure 9.3, we cannot strictly exclude a linear decrease of the growth rate with increasing concentrations of added acetate.

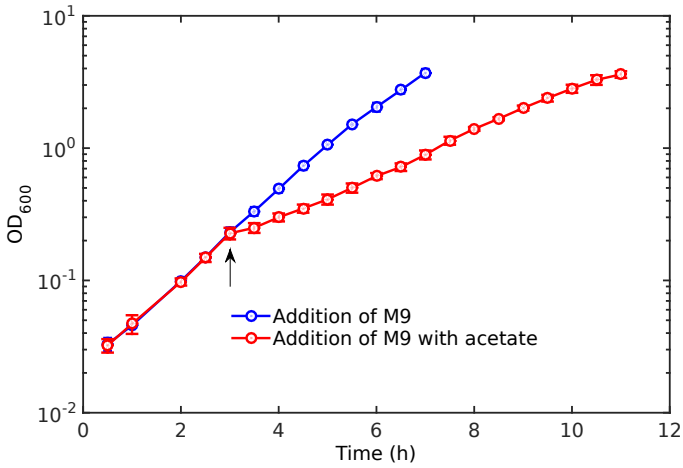


Figure 9.2.: **Growth inhibition by acetate.** The inoculated culture is split and cultured in separate shake flasks containing minimal medium with glucose (as in Figure 9.1). A small volume of minimal medium with acetate is added to one culture (red) and an identical volume of minimal medium without acetate to the second, control culture (blue). The moment of acetate addition is indicated by the black arrow. The optical density measurements represent the mean of three experiments. The error bars (mostly smaller than, and therefore hidden by the circles showing the data-points) are two times the standard error of the mean. The data shown correspond to the wild-type strain and a final concentration of acetate of 128 mM.

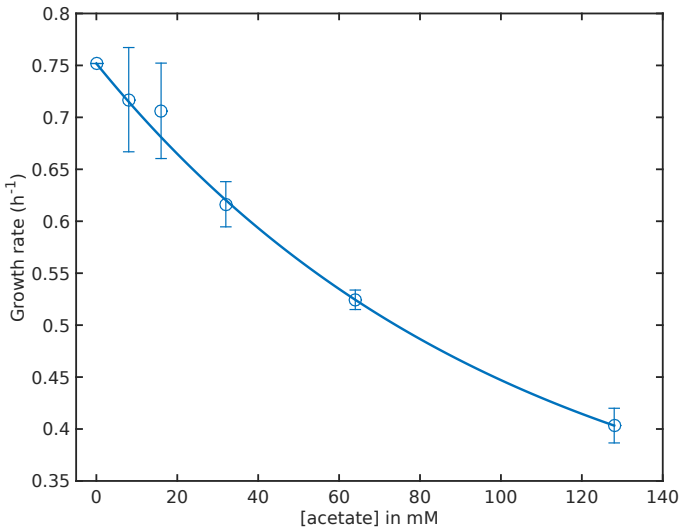


Figure 9.3.: **Growth inhibition by different concentrations of acetate.** Experiments as in Figure 9.2 were carried out for different concentrations of acetate. Each data point shows the mean of the growth rate of three independent experiments, as well as twice the standard error of the mean. An exponential function with baseline 0.3 h^{-1} , corresponding to the growth-rate on acetate as a sole carbon source, was fit to the data.

Given that the growth inhibition is a monotonic function of the acetate concentration and that the industrially relevant concentration of acetate are on the order of 100 mM, we have decided to carry out all subsequent experiments at 128 mM acetate. The qualitative effect of acetate is probably the same at all concentrations, but quantitative estimates are much more easily obtained for larger effects. We next explored the different proposed mechanisms of growth inhibition by acetate presented in the Introduction.

9.2. The perturbation of acetate metabolism plays a minor role in growth inhibition

While growing at a high rate in aerobic conditions, *E. coli* redirects some of the glycolytic flux towards the production of acetate, since limited respiration capabilities do not allow all carbon intermediates to enter the tricarboxylic acid (TCA) cycle (El-Mansi and Holms, 1989). Conversion of acetyl-CoA into acetate involves the phosphotransacetylase, Pta, and the acetate kinase, AckA. Acetate can also produced from pyruvate, the metabolite just before acetyl-CoA in glycolysis, by pyruvate oxidase, PoxB (Figure 7.1). When *E. coli* cells are growing on acetate, the Pta-AckA pathway operates in reverse direction, converting acetate into acetyl-coenzyme A (AcCoA), but the main route for acetate assimilation involves the acetyl-CoA synthetase Acs (Wolfe et al., 2003). Recent work has shown that, even in the absence of acetate secretion, the Pta-AckA and Acs pathways are actively recycling acetate (Valgepea et al., 2010). While the advantage of this energy-wasting process is not entirely clear, it may involve the maintenance of the level of acetyl-phosphate (Ac∼P), the intermediate of the PtA-AckA pathway. This signaling molecule plays an important role in the regulation of cellular processes, typically by modifying the activity of response regulators of two-component systems (Klein et al., 2007) but also by transferring the acetyl group onto lysines (Weinert et al., 2013). Recently, hundreds of enzymes were found to be targets of lysine acetylation (Castaño-Cerezo et al., 2014a).

Does the reduction of growth of *E. coli* in the presence of excess acetate in the medium originate in perturbations of acetate metabolism? In the presence of high acetate concentrations in the medium, the acetate anions accumulating inside the cell could interfere with the proper functioning of acetate metabolism, by imposing an acetate flux into central carbon metabolism and thus perturbing the delicate balance of metabolic fluxes sustaining optimal growth on glucose. The resulting flux distribution might be close to that supporting growth on acetate as the sole carbon source, at a much lower rate. Another consequence of changing fluxes in acetate metabolism may be the perturbation of Ac∼P levels, thus modifying directly or indirectly the expression of specific genes necessary for growth or the acetylation of their products. The deletion of the only known deacetylase in *E. coli*, CobB, reduces the growth rate of *E. coli* on acetate by almost twofold (Castaño-Cerezo et al., 2014b), suggesting that an excess of Ac∼P in the cell might have similar effects.

In order to test these hypotheses, and dissect the contribution of acetate metabolism to the growth inhibition by acetate, we constructed mutants that cut different parts of the acetate utilization and synthesis pathways. All these mutants are derived from the wild-type strain, BW25113 and their genotype is listed in Table 9.1. The single mutant, Δ*acs*, still allows acetate utilization through the Pta-AckA pathway. However, mutants that inactivate both *acs* and genes coding for a member of the Pta-AckA pathway can no longer assimilate acetate. Any effect on growth rate by externally added acetate in these mutants therefore has to be unrelated to the flux of acetate into central carbon metabolism *per se*.

Strain	**Origin**
BW25113	Keio collection
BW25113 Δ*ackA*	this study
BW25113 Δ*ackA* Δ*pta*	this study
BW25113 Δ*acs*	this study
BW25113 Δ*pta* Δ*acs*	this study
BW25113 Δ*ackA* Δ*pta* Δ*acs*	this study
BW25113 Δ*ackA* Δ*pta* Δ*acs* Δ*poxB*	this study
BW25113 Δ*ackA* Δ*pta* Δ*acs::ackA*$_{\mathrm{wt}}$	this study

Table 9.1.: **Strains used to dissect different mechanisms of growth inhibition by acetate.** All strains are derived from BW25113 (Baba et al., 2006). This strain will be called wild-type. All deletions are constructed without leaving antibiotic resistance cassettes on the chromosome. The last strain, Δ*ackA* Δ*pta* Δ*acs::ackA*$_{\mathrm{wt}}$, is used as a control. The wild-type allele of *ackA* is restored in this strain.

During fast growth on glucose as a carbon source, an ackA mutant accumulates about 60 times more Ac∼P than the wild-type strain (Weinert et al., 2013). At the same time, wild-type cells that are in a growth-arrested state (because of a lack of a nitrogen source in the medium), in the presence of 160 mM acetate, have a much higher degree of lysine acetylation than the ΔackA derivative (Weinert et al., 2013), which may be indicative of an increased Ac∼P concentration. The above results can be interpreted in light of the reaction scheme of Figure 7.1. During growth on glucose, Ac∼P is produced by Pta from acetyl-CoA and accumulates in an ackA mutant because it is no longer dephosphorylated. In the absence of growth and therefore glucose uptake, but in the presence of high concentrations of acetate, Ac∼P is expected to be mostly generated by acetylation of acetate. This reaction no longer takes place in a ΔackA strain and the concentration of Ac∼P will be lower than in a strain with a functional AckA enzyme. Mutants with deletions of the two genes ackA and pta eliminate all reactions that can produce Ac∼P in the cell, thus resulting in a strain devoid of Ac∼P. For our purpose, the triple mutant Δ*acs* Δ*ackA* Δ*pta*, as well as the quadruple mutant, Δ*acs* Δ*ackA* Δ*pta* Δ*poxB*, may be most interesting, since they eliminate all pathways of acetate utilization by the cell as well as the production of Ac∼P (Figure 7.1).

We first tested whether the mutant strains affect growth on glucose as a sole carbon source. Acetate is secreted when E. coli grows fast on glucose and this overflow metabolism is supposed to optimize the growth rate of the bacteria. Our mutant strains cut some or all of the metabolic pathways that generate acetate during overflow metabolism. We therefore measured the growth rate of all strains in our reference conditions (growth on glucose minimal medium). As can be seen in Figure 9.4, none of the mutants significantly reduce the growth rate on glucose, in agreement with previous observations for the BW25113 strain in comparable growth conditions (Castaño-Cerezo et al., 2009).

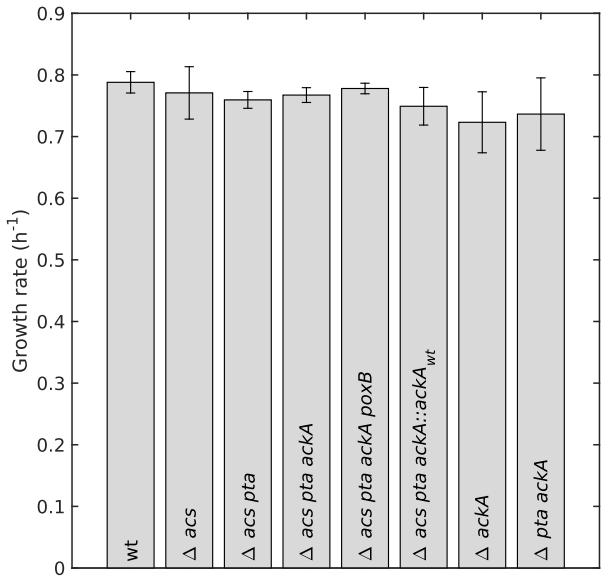
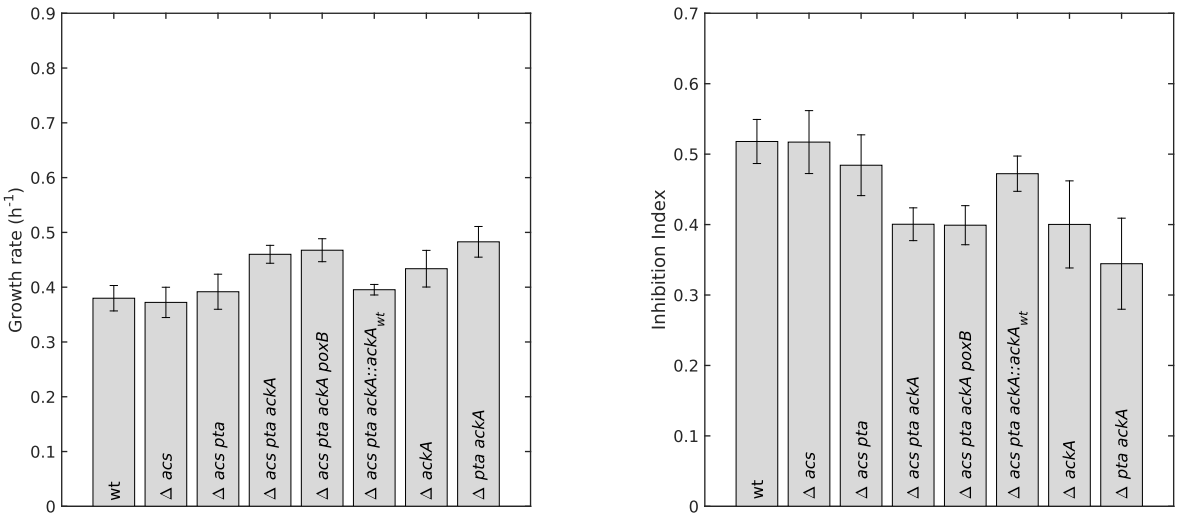


Figure 9.4.: **Growth rate of mutant strains on minimal glucose medium.** The growth rate of all mutant strains was measured in a standard shake flask culture as in Figure 9.2 and computed from the data as described in the *Materials and Methods*. We report the average of four independent experiments and error estimates representing twice the standard error of the mean.

We next measured the effect of acetate on the growth rate of these strains by experiments analogues to the one shown in Figure 9.2. The results are shown in Figure 9.5(a). The wild-type and all mutant strains are strongly inhibited by the addition of 128 mM acetate to the growth medium. Even though all strains are strongly affected, we observe two distinct groups: strains that carry the *ackA* deletion grow slightly faster than strains that carry a wild-type copy of the gene. The inhibition indices of Δ*ackA* strains are around 0.4, whereas the inhibition indices of all other strains are around 0.5 (Figure 9.5(b). The differential effect of the *ackA* deletion is not caused by a decreased flux of acetate into central carbon metabolism since the *pta* deletion, which interrupts the

same pathway, does not have this effect. One possible interpretation is that the *ackA* deletion modifies the intracellular concentration of Ac∼P. As argued above, assuming that growth inhibition by acetate involves an increase in the concentration of Ac∼P, a Δ*ackA* mutation might partially compensate for this increase by disrupting one of the Ac∼P synthesis reactions.



(a) Growth rate after addition of 128 mM acetate

(b) Inhibition index calculated for the data in (a)

Figure 9.5.: **Growth rate of mutant strains in the presence of 128 mM acetate.** The growth rate of all mutant strains was measured in a standard shake flask culture as in Figure 9.2 and computed from the data as described in the *Materials and Methods*. We report the mean of at least three independent experiments. The error bars represent twice the standard error of the mean. The growth rate is shown in (a) and the inhibition index in (b).

As a control of the proper functioning of the mutant strains, and to preclude the possibility of unmapped, secondary mutations being responsible for the differential effect in Δ*ackA* strains, we decided to construct a revertant of the phenotype of *ackA* deletion. In strain Δ*ackA* Δ*pta* Δ*acs::ackA*$_{\mathrm{wt}}$, the wild-type allele of *ackA* was restored. The slight growth advantage of this strain in acetate, reflected by the smaller inhibition indices of Δ*ackA* mutants (0.4 *vs* 0.5), disappears in the complemented strain. The inhibition index increases to about 0.47 and reaches the same level as the equivalent Δ*pta* Δ*acs* strain (Figure 9.5(b)). We conclude that, even though the construction of the triple mutant has involved many growth and selection steps, the observed phenotypes of the mutants are not due to secondary mutations somewhere else in the chromosome.

The main conclusion from our experiments is that growth inhibition by acetate is *not*

due to the perturbation of the functioning of acetate metabolism, since growth inhibition persists when cutting any one or all of the pathways of acetate assimilation. For example, the double mutant $\Delta pta\,\Delta acs$ has the same acetate inhibition index as the wild-type strain (Figure 9.5), even though both pathways of acetate assimilation have been interrupted. These observations exclude the possibility that an excess flux of acetate into central carbon metabolism is responsible for growth inhibition. Clearly, in these mutants, acetate is *not* metabolized, but growth inhibition remains very strong. A small decrease of the inhibition index (on the order of 20%) is observed in the $\Delta ackA$ strains, probably due to an increased concentration of Ac∼P with pleiotropic effects on gene regulation (by protein phosphorylation) and protein activity (by lysine acetylation). Notwithstanding this partial relief, we conclude that the perturbation of acetate metabolism plays only a minor role in growth inhibition by acetate.

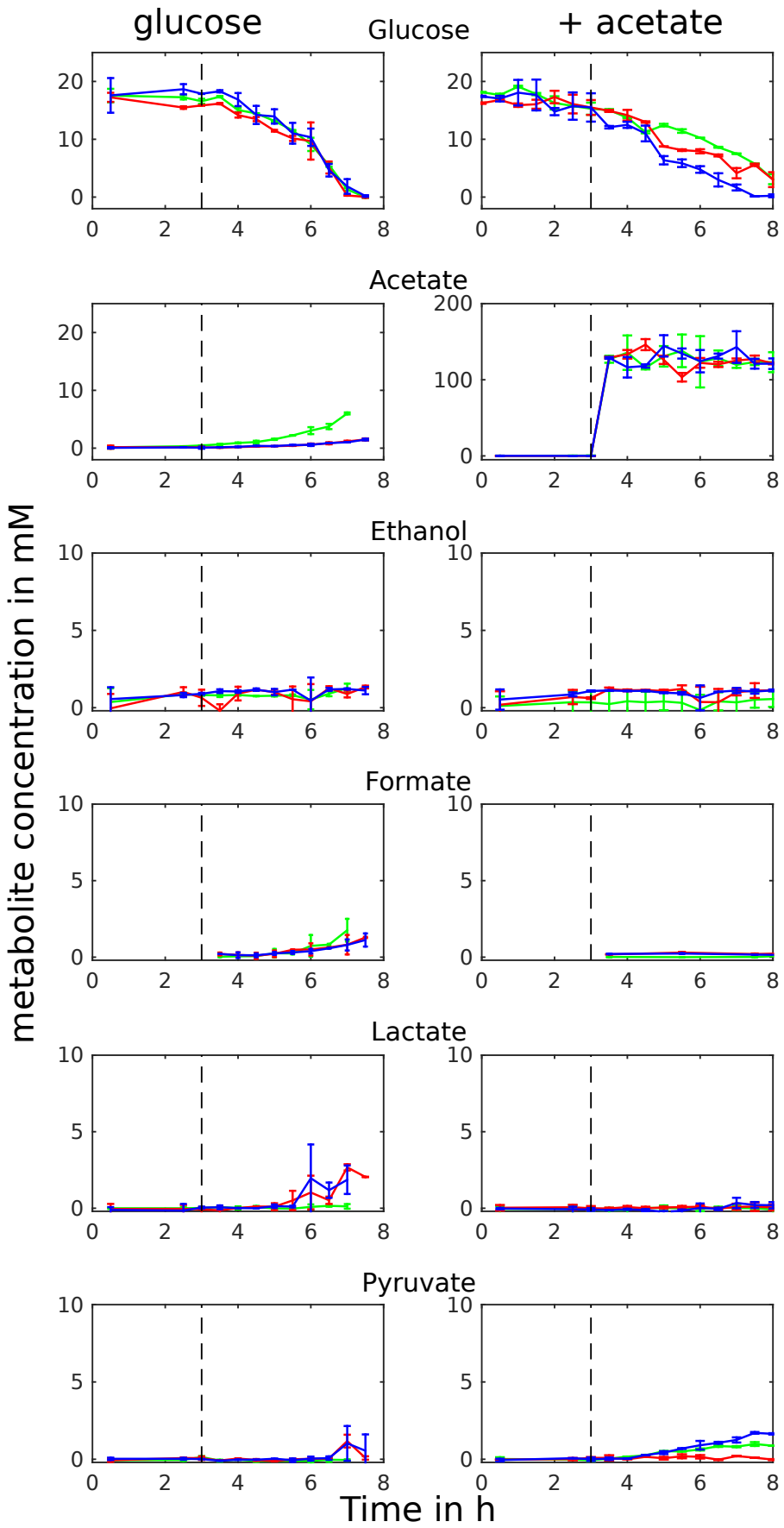
9.3. Metabolic characterization of central carbon metabolism during growth inhibition by acetate

Although the previous section excludes an excess influx of acetate into central metabolic pathways or regulation by Ac∼P as major causes of growth inhibition by acetate, it remains possible that high concentrations of acetate perturb numerous enzymatic reactions, even slightly, but that the cumulated effect be a profound reorganization of metabolism. It would be interesting to know whether the very similar growth rates attained by the different mutant strains hide important metabolic adaptations or only local adjustments. This information will also be helpful when investigating other potential causes of growth inhibition by acetate, the uncoupling effect and the perturbation of the anion balance, in the next sections.

In order to characterize the state of central carbon metabolism on a coarse-grained level (Holms, 1986), we measured the extracellular concentration of glucose and the major fermentation products known to accumulate during aerobic growth of E. coli on glucose, in the wild-type strains and in strains carrying mutations of genes encoding enzymes in acetate metabolism (Castaño-Cerezo et al., 2009). In particular, we quantified acetate, ethanol, formate, lactate and pyruvate during growth experiments as in Figure 9.1. We chose to analyze the wild-type and mutant strains that eliminate the major pathways of acetate production and assimilation, i.e., the Acs and Pta-AckA pathways. The double mutant $\Delta pta\,\Delta acs$ falls within the category of strains with the same inhibition index as the wild-type strain, whereas the triple mutant $\Delta ackA\,\Delta pta\,\Delta acs$ has a slightly reduced inhibition index, possibly due to a reduced production of Ac∼P (Figure 9.3).

The results in Figure 9.6 (left column) show the expected overflow metabolism during growth of the wild-type strain on glucose, namely the secretion of formate and especially acetate (Enjalbert et al., 2013). This overflow metabolism is almost completely abolished in the mutants, confirming that the major pathways of acetate production are

interrupted. In order to dissipate the extra reducing equivalents, other metabolites, in particular lactate and pyruvate, are secreted during growth of the mutants on glucose. When 128 mM acetate is added to the growth medium (right column of Figure 9.6), the growth rate slows and the glucose uptake rate diminishes accordingly. As a consequence of the lower growth rate, there is no longer any detectable overflow metabolism, except for some pyruvate in the wild type and triple mutant. Notice that the uptake of acetate is undetectable since there is a large excess of acetate in the growth medium in this condition. Diminished pyruvate excretion in the $\Delta pta\,\Delta acs$ mutant may be an unknown regulatory effect mediated by Ac∼P, since, as explained in the previous section, the additional deletion of ackA in the triple mutant prevents the synthesis of this signaling molecule. The slight relief of growth inhibition by acetate in the triple mutant is consistent with the somewhat higher glucose uptake rate in this strain (the blue curve in the right column of Figure 9.6).



Caption on next page

Figure 9.6 *(prev. page)*: **Measurement of metabolites excreted by *E. coli*.** Bacteria were grown in a shake flask, as described in Figure 9.2, and samples were removed at regular intervals. The samples were centrifuged to remove bacteria, and the supernatant was analyzed for the different metabolites. The left column shows cultures grown on glucose alone. 128 mM acetate was added to the cultures in the right column after three hours of growth (indicated by the dashed, vertical line). The metabolite measured is indicated on top of each row. The measurements were carried out in quadruplicate in the wild-type strain (green), the $\Delta pta\,\Delta acs$ mutant (red), and the $\Delta ackA\,\Delta pta\,\Delta acs$ mutant (blue). The error bars indicate twice the standard error of the mean. Note that the ordinate scale is five-times smaller for the metabolites of the bottom four rows and the ordinate scale of acetate measurements with added acetate is much larger than the others.

Despite some small differences between strains, the data in Figure 9.6 show that the pattern of uptake and secretion of carbon compounds by the cell is not greatly perturbed by the addition of large concentrations of acetate to the growth medium. Using these uptake and secretion patterns as proxies for the functioning of central metabolic pathways, we hypothesize that addition of acetate does not entail a profound reorganization of metabolism, apart from a global rescaling of fluxes due to the reduced growth rate.

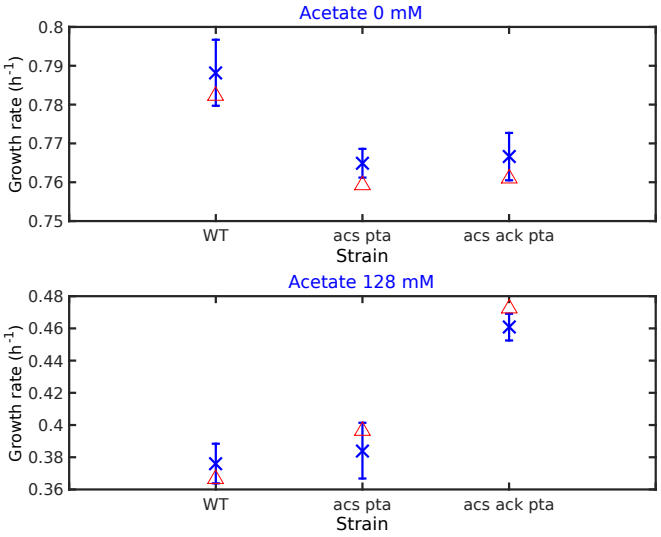
In order to further investigate this hypothesis, we used a genome-scale reconstruction of *E. coli* metabolism to predict how intracellular fluxes change in the presence of excess acetate in the growth medium (Feist et al., 2007). From the data in Figure 9.6 we computed the glucose uptake rate and the secretion rates of glucose, acetate, ethanol, formate, lactate, and pyruvate, which were integrated into the model to constrain the exchange fluxes. We also formulated a limited number of additional constraints that are directly motivated by the composition of the growth medium and the utilization of glucose as the sole carbon source (Section 8.7). The resulting model was capable of predicting the growth rate of the wild-type, the double mutant, and the triple mutant in the absence of acetate in the growth medium, under the assumption that the bacteria optimize biomass synthesis (Figure 9.7 a). The predictions from the model also concur remarkably well with the measured growth rates when excess acetate is present in the growth medium. Recall that in the latter case we could not measure the acetate uptake rate. However, the constraints imposed by the stoichiometry of the reaction network in combination with the other measured uptake and secretion rates require an acetate influx for a solution to exist, consistent with the experimental data (Roe et al., 1998; Russell, 1992).

In each of the conditions, wild-type and mutant strains growing in the presence or

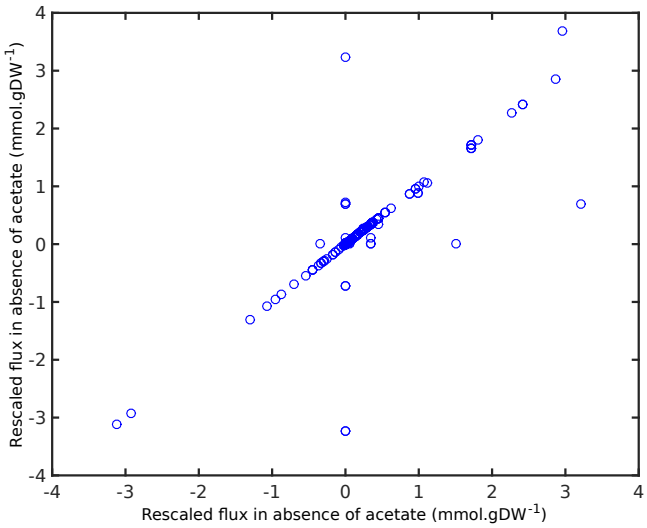
absence of acetate, a space of intracellular flux distributions is predicted by flux balance analysis. Different approaches have been used to analyze this space of solutions, but here we chose the technique proposed by Smallbone and Simeonidis (2009) to pick a unique and representative solution from the space of solutions, approximating the center of the convex hull that defines the solution space. In order to test if this flux distribution remains invariant when acetate is added to the growth medium, up to a growth-rate determined scaling factor, we plot in Figure 9.7 b the predicted fluxes in the wild-type strain growing in the presence of acetate vs the fluxes in the same strain in the absence of acetate, both rescaled with respect to their growth rate. The scatter plot shows the flux values for all 2400 reactions in the *E. coli* model. As can be immediately seen, there is a very strong, almost perfect correlation between the two solutions. When correcting for the difference in growth rate in the acetate-treated and control cultures, the overwhelming majority of predicted fluxes are equal in the two conditions and clustered along the diagonal. In agreement with the intuitive conclusions drawn from inspection of Figure 9.6, this high correlation indicates that the inhibitory effect of acetate does not profoundly change the functioning of metabolism, but rather leads to a proportional rescaling of all fluxes. This conclusion will be important for investigating other possible mechanisms underlying the growth inhibition of acetate in the next sections.

9.4. Uncoupling has no effect on growth inhibition by acetate

The classical explanation for the growth inhibitory effect of acetate and other organic acids rests on their presumed uncoupling effect. HAc is known to diffuse freely into the cell (Grime et al., 2008), where it dissociates into an acetate anion Ac^- and a proton H^+ as the intracellular pH (around 7.6, Wilks and Slonczewski (2007)) is much higher than the pK_a of HAc (4.76). While the acetate anion cannot freely diffuse through the membrane, the acetate transporters ActP and YaaH can exclude it from the cell (Sá-Pessoa et al., 2013). This gives rise to a futile cycle leading to a net increase of protons inside the cell, which lowers the intracellular pH and reduces the proton motive force (Axe and Bailey, 1995; Herrero et al., 1985). Since the proton motive force drives transport and other reactions, its maintenance by the cell is essential for growth. In order to counteract the decrease in ΔpH, trans-membrane ATP synthases or electron transport systems pump the protons outside. However, the resulting ATP expenditure decreases the amount of energy available for growth, leading to a reduction of growth rate (Herrero et al., 1985; Russell, 1992).

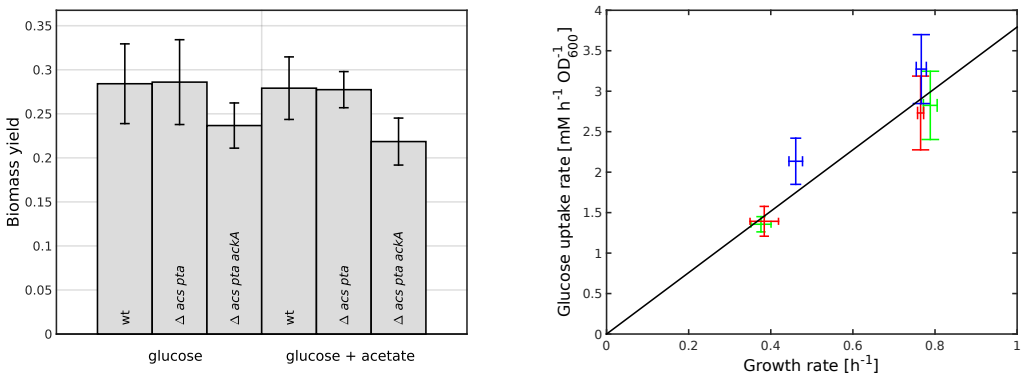


(a) Predicted growth rate



(b) Metabolic fluxes

Figure 9.7.: **Prediction of metabolic flux distribution using a genome-scale model of *E. coli* metabolism.** (a) The measurements of extracellular metabolites in Figure 9.6 were used to compute uptake and secretion rates in each of the conditions, as outlined in the Materials and methods. These rates were used as constraints on the exchange fluxes on a genome-scale model of E. coli metabolism (Feist et al., 2007). We used flux balance analysis to predict the growth rate of all strains of Figure 9.6 in the absence and presence of acetate. The red triangles show the predicted growth rate and the blue crosses (with error bars) the measured growth rate from Figures 9.4 and 9.5. (b) The addition of acetate to the growth medium leaves most metabolic fluxes unchanged. The figure shows almost 2400 flux values in the absence (abscissa) or presence (ordinate) of acetate in the wild-type strain, rescaled with respect to their growth rate. Most points are not visible because they are superimposed on other points. The scatter plot shows a very strong correlation between the two predicted flux distributions, indicating that the vast majority of metabolic fluxes is simply rescaled with the growth rate, but that metabolic functioning does not fundamentally change when acetate is added to the growth medium.



(a) Biomass yield

(b) Correlation between growth rate and glucose uptake rate

Figure 9.8.: **Growth yield and glucose uptake rate.** (a) Growth yield of different strains grown on glucose without acetate (left) or glucose with 128 mM acetate (right). The growth yields have been estimated from the measured glucose concentrations in the medium (Figure 9.6) and the corresponding optical densities, as described in the *Materials and methods*. Each bar is the mean of four independent replicates and the error bars correspond to ± two standard errors of the mean. (b) Correlation between the glucose uptake rate and the growth rate. The glucose uptake rate was computed by multiplying the growth yields in (a) with the growth rate, following the definition $Y = r_{glc}/\mu$. The strains are as in Figure 9.6: wild type (green), $\Delta pta\,\Delta acs$ (red), and $\Delta ackA\,\Delta pta\,\Delta acs$ (blue). The error bars represent ± two standard errors of the mean. The slope of the linear segment is defined as the mean of the six growth yields in (a).

An expected direct consequence of energy wasting due to uncoupling is a lower growth yield. In our conditions, where glucose is the sole carbon source, the growth yield Y is conveniently defined as the ratio of the glucose uptake rate and the growth rate, i.e., $Y = r_{glc}/\mu$. Is the growth yield indeed lower in the presence of acetate, as would be expected from the uncoupling hypothesis? In order to test this, we used the glucose concentrations from Figure 9.6 in combination with optical densities measured in the same experiment, and fitted a combined growth and glucose consumption model to the data. This allows an estimate of the growth yield to be obtained, as explained in the Materials and methods. The results are shown in Figure 9.8.

While the estimations are not extremely precise, with error bars on the order of $\pm 10 - 20\%$, mainly due to the uncertainty of the metabolite measurements, it is nevertheless clear from Figure 9.8(a) that the growth yields of the corresponding strains with and without acetate are essentially equal. While the growth yield is somewhat smaller in the triple mutant, this occurs for growth in both the presence and absence of acetate,

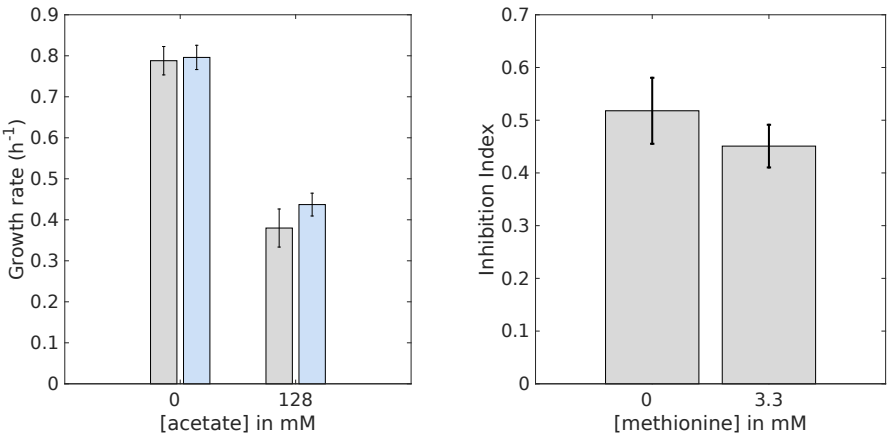
indicating that the diminution of growth efficiency is a consequence of the genetic background of the strain rather than excess acetate in the medium. We conclude that, if restoring the proton gradient incurs an energy cost detrimental to growth, this effect is not significant in the conditions considered here and cannot account for the growth inhibition observed in Figure 9.5(b).

The absence of a significant impact of uncoupling can be further illustrated by means of Figure 9.8(b), where the glucose uptake rates are plotted as a function of the growth rate. If the growth yield remains approximately constant over the different situations considered, then there should be a strong linear correlation between the data points in the graph. Any decrease in growth efficiency in the presence of acetate would show up as outlying data points above the diagonal. The data points are fairly well correlated, with a weighted correlation coefficient slightly above 0.9. These observations are consistent with the metabolic measurements in Figure 9.6, where the by-product secretion pattern did not change between conditions, and with the strong correlation between predicted intracellular fluxes in the presence and absence of acetate, indicating that the functioning of metabolism varies little.

Our conclusion that uncoupling plays no role goes against the standard explanation of growth inhibition by acetate and other organic acids, but is not an isolated observation. Russell (1992) gives other examples of cases in which acetate addition to the medium of growing bacteria did not lead to a significant decrease in yield and calculated that the ATP costs of expelling protons from the cell amounts to only a few percent of ATP production.

9.5. Methionine supplementation does not relieve growth inhibition

While the uncoupling hypothesis focuses on the accumulation of protons following the influx of acetic acid (HAc) inside the cell, another consequence is the accumulation of acetate anions, Ac^-. Although some acetate can be exported through dedicated transporters like ActP or SatP (Sá-Pessoa et al., 2013), their transport capacities are much lower than the rate of diffusion of acetic acid across the membrane (Grime et al., 2008). The concentration of Ac^- in the cell is therefore dependent of the concentration of HAc and the pH inside the cell. For instance, Roe et al. (1998) have observed that in a minimal medium with glucose at pH 6 with 8 mM of acetic acid, E. coli cells divide their growth rate by two and the intracellular acetate concentration rises to 230 mM. A simple calculation shows that the intracellular concentrations of acetate are of the same order of magnitude in our experiments. The latter concentration should be compared with that of the most abundant anion in normal conditions, glutamate, which is present at 60 mM, almost four times less (Roe et al., 1998). These authors also observe that in order to maintain turgor pressure, the cell compensates the influx of massive amounts of acetate



(a) Growth rates

(b) Inhibition index calculated from the data in (a)

Figure 9.9.: **Effect of methionine on growth inhibition by acetate.** (a) The growth rate of the wild-type strain in the absence (gray) or presence (blue) of 3.3 mM methionine was measured. The addition of acetate is indicated below the bar graph. The error bars are twice the standard error of the mean of at least three independent experiments. (b) Bar graph representing the same data in terms of the inhibition index as defined in 9.1.

by the reduction of the concentration of other anions, in particular glutamate, and they argue that acetate almost completely replaces the pools of anions that normally balance free K^+. The resulting imbalance of the anion pools may have important regulatory consequences, for example on enzyme activity. Could changes in enzyme activity and other effects of the anion imbalance explain growth inhibition by acetate?

Little is known about the effect of acetate accumulation on enzyme activity, but Roe et al. (2002) made the intriguing observation that cells treated with acetic acid accumulate homocysteine, a toxic intermediate of the methionine biosynthesis pathway, and that the supplementation of methionine to the medium could restore 75%-80% of the growth-rate diminution due to acetate. The authors ascribe this effect to the specific inhibition of an upstream reaction step in methionine biosynthesis. It is not clear if these conclusions carry over to our conditions, however, since the above experiments were carried out in an acidic growth medium (pH 6), and an acid stress response may have contributed to their observations. We therefore tested whether supplementing the growth medium with methionine in our conditions could offset the growth defect provoked by acetate addition. In particular, we tested a change in growth rate of the wild-type strain by adding 128 mM of acetate in the absence of methionine and in the presence of 3.3 mM methionine, comparable to the concentration of 2 mM used by Roe et al. (2002). The results of this experiment are shown in Figure 9.9.

The inhibition index in the presence of 3.3 mM methionine is slightly lower than the

inhibition index without added methionine, although the error bars do not make it possible to draw unambiguous conclusions. At any rate, we do not observe a significant restoration of growth rate by the added methionine. Why do Roe et al. observe a relief of growth inhibition by methionine? More recent data (Mordukhova and Pan, 2013) also demonstrate a slight relief of acetate inhibition by the addition of methionine to the medium. However, the magnitude of the effect is closer to what we observe. Their inhibition index is reduced from 0.71 to 0.53, in experiments carried out at pH 6, as by Roe et al. (2002). Mordukhova and Pan (2013) also identify the enzyme, MetE, that seems to be inhibited by acetate.

We have to conclude that the inhibition of methionine metabolism by acetate is not a major contributor to growth inhibition at neutral pH, accounting for a decrease of the inhibition index of at most 10%. While this excludes a simple explanation by locating the growth-inhibitory effect of acetate at a single step in the metabolic network, the results are not incompatible with the hypothesis that the decrease of the growth rate is due to a perturbation of the anion pools. A perturbation of the anion pools may affect multiple enzymatic reactions in the large metabolic network and their combined effect entail a reduction of the growth rate

10. Discussion

We set out to identify the molecular mechanisms underlying growth inhibition of Escherichia coli cultures by excess acetate in the growth medium. The question is of fundamental interest for understanding the physiology of this bacterium, but may also have important implications for applications in biotechnology. The potential mechanisms explaining the observed growth inhibition are debated since many decades (Farmer and Jones, 1976). The major hypotheses put forward to explaining growth inhibition by acetate were the uncoupling effect of weak acids, specific inhibition of methionine biosynthesis, and anion accumulation in the cell (Axe and Bailey, 1995; Roe et al., 1998, 2002; Russell and Diez-Gonzalez, 1998; Russell, 1992; Russell and Diez-Gonzalez, 1997). More recently, regulatory perturbations centered on Ac∼P have been proposed to play an important role in acetate metabolism (Castaño-Cerezo et al., 2014a,b; Wang et al., 2010; Weinert et al., 2013; Wolfe et al., 2003).

Evaluating the relative importance of the different proposed mechanisms is extremely difficult based on the available data in the literature, since each publication focuses on a different mechanism, studied with a different strain in different growth media, pH, and acetate concentrations. Here, we have attempted to dissect the contributions of the different mechanisms in a systematic way, by using comparable strains and well-defined conditions throughout, and by designing experiments that specifically test one or more of the hypotheses advanced. Moreover, we have tried to quantify the different effects, by estimating maximum bounds on the relative contribution to the growth inhibition index.

A key contribution of the present work is the development of a series of mutant strains that probe relevant parts of the metabolic pathways of acetate utilization. In particular, we constructed mutant strains that prevent external acetate from being metabolized by the cell by deleting both the Acs and the Pta-AckA pathways. Within the Pta-AckA pathway, we can allow the production of Ac∼P by deleting just one of the genes, or prevent all synthesis of Ac∼P, therefore probing potential regulatory roles of this molecule. For all these mutants we have measured growth rates and extracellular concentrations of a number of by-products of central carbon metabolism, known to accumulate in the growth medium in wild-type *E. coli* strains and strains deleted for the genes encoding the enzymes involved in acetate metabolism.

Confirming previous observations, our results show that the inhibition by acetate in the medium is a monotonic function: increasing concentrations of acetate cause an increasing

growth inhibition (Figure 9.1). A 50% growth inhibition is reached when a little more than 100 mM acetate is added to the medium. Our study was done at neutral pH, whereas some of the previous studies had been carried out at pH 6 (Roe et al., 2002). At this lower pH, much less acetate has to be added to obtain the same growth defect (8 mM in the case of Roe et al. (2002)). The concordance of our results with such results at lower pH suggests that growth inhibition is intimately related with the accumulation of acetate anions in the cell. Assuming that the protonated form of acetate diffuses rapidly and freely across the membrane (Grime et al., 2008), and thus attains the same concentration in the medium and inside the cell, the intracellular concentration of the acetate ion, Ac^-, is roughly the same in both conditions: on the order of 200 to 300 mM.

We can imagine several ways by which acetate anions in the cell affect growth rate. The large concentration of these anions could possibly "overload" the metabolic pathways of acetate utilization and therefore perturb the carbon metabolism of the cell. This hypothesis is clearly not supported by our data, since the deletion of *pta* and *acs* prevents acetate utilization by the cell, but in no way relieves growth inhibition by acetate (see Figure 9.2). Furthermore, the flux distribution of carbon compounds, as judged from import and export fluxes, is not greatly perturbed by the addition of acetate to the growth medium (Section 9.3). This observation was confirmed by integrating the data with a genome-scale model of *E. coli* metabolism to predict intracellular fluxes, which also indicates that when a scaling factor due to the growth-rate difference is accounted for, the metabolic flux distribution is essentially the same before and after acetate addition. It seems therefore most likely that the acetate anion acts by controlling metabolic fluxes rather than participating in these fluxes.

One way to control fluxes is to modify the activity of enzymes, either by covalent modifications or by allosteric regulations. Since acetate is phosphorylated to Ac∼P by AckA, it is conceivable that the acetate effect be mediated by Ac∼P. This molecule contains a high energy bond between phosphate and the acetyl-moiety and can therefore transfer either the phosphate group to an appropriate acceptor, in this case two-component response regulators (Klein et al., 2007), or the acetyl-group to lysines of target proteins (Weinert et al., 2013). Since the number of targets of both regulatory mechanisms are in the hundreds or thousands, we can not individually assess all these interactions. However, we can measure the global effect of growth rate of preventing or allowing the production of Ac∼P. Our results (see Section 9.1) show that Ac∼P has a modest effect, explaining about 20% of the growth inhibitory effect of acetate.

We are therefore left with a more global, indirect effect of acetate on the growth rate of *E. coli*. Acetate could non-competitively inhibit enzymes, affect the rates of reversible reactions that produce acetate (several biosynthetic pathways produce acetate) or act even more indirectly by perturbing the anion balance of the cell. It has been shown previously that acetate inhibits methionine biosynthesis, and more particularly the activity of the MetE enzyme (Mordukhova and Pan, 2013). However, even in this very specific case, there is no evidence that acetate acts directly on the enzyme. It remains possible that enzyme inhibition be mediated by a secondary effect, for example another anion

that changes in concentration as a response to acetate addition to the medium. Indeed, we confirm the specific effect of acetate on methionine biosynthesis (see Section 9.5), but the magnitude of the effect accounts only for roughly 10% of the growth inhibition by acetate.

The commonly accepted, major explanation of the acetate effect is "uncoupling" (Axe and Bailey, 1995). This mechanism implies that the protonated form of acetate, HAc, rapidly enters the cell by diffusion, where it dissociates to form Ac^- and H^+ (see Figure 7.1). The excess protons have to be excreted from the cell using energy that is no longer available for growth. The acetate anion will also leave the cell in order to restore electrical neutrality. Other transporters may participate in the process since the known acetate transporter, ActP, co-transports the acetate anion with a sodium cation. A futile cycle of this type requires that the rate of diffusion of HAc across the membrane be much larger than the transport of Ac^- across the membrane and that the total flux remain sufficiently high to cause a real energy expenditure of the cell. These conditions seem to apply to *E. coli*. In this scenario, energy is diverted to a futile cycle instead of serving for biomass production. We should therefore observe a significant reduction in growth yield (biomass produced per quantity of glucose consumed). This quantity could be easily estimated from our data and we observed no reduction of growth yield (see Section 9.4). We therefore conclude that uncoupling does not significantly contribute to the reduction of growth rate by acetate. This conclusion is in stark contrast to the widely held view that uncoupling is the major cause of growth inhibition by acetate.

Assuming that the different contributions to the reduction of growth rate by acetate are independent, we can assess their respective impact. Regulation by Ac∼P seems to account for roughly 20% of the effect and the inhibition of methionine biosynthesis contributes another 10%. Uncoupling does not contribute to growth inhibition. This leaves the majority of the effect, about 70%, unexplained. The only remaining, explanatory hypothesis that is consistent with our data is the perturbation of the anion composition of the cell. While this conclusion is contrary to the currently accepted view, its possibility has been proposed previously and, in the absence of a causal explanation on the molecular level, much circumstantial evidence has accumulated (Roe et al., 1998; Russell, 1992). The major anion in the cell during normal growth on glucose is glutamate (Bennett et al., 2009). This amino acid is also involved in numerous metabolic reactions. In the presence of large concentrations of acetate in the cell, the concentration of glutamate decreases to on quarter of the value measured during growth on glucose. By elimination of all other possibilities we have to conclude that the major effect of acetate addition to the medium seems to be a pleiotropic modification of the anion balance of the cell. A major challenge for further work will be to better understand the precise molecular mechanisms by which this anion imbalance impacts the growth rate of the cell.

Troisième partie .

iGEM

Le monde industriel utilise des micro-organismes comme la bactérie *E. coli* pour produire du carburant, des molécules d'intérêt... Comme nous l'avons vu dans les chapitres précédents, ces micro-organismes sont génétiquement modifiés pour i) atteindre un rendement de production élevé et ii) être résistants aux stress qui nuisent à la production - comme l'accumulation d'acétate au cours du processus industriel. La biologie synthétique conçoit et construit ces usines vivantes. Mais ceci ne représente qu'une des applications de la biologie synthétique. Très brièvement, elle supprime, remplace ou ajoute des fragments d'ADN dans un micro-organisme pour en modifier son comportement dans un but précis. Ainsi, on peut tout aussi bien construire des bactéries pour lutter contre l'érosion des sols [1] (environnement) ou contre la tuberculose [2] (santé), que pour détecter si la viande qu'on a laissée dans son réfrigérateur est encore bonne à la consommation [3] (alimentation). La biologie synthétique ne se limite pas à la seule production industrielle comme en témoigne la grande diversité des projets présentés lors de la compétition iGEM.

En 2014, iGEM (*international Genetically Engineered Machine*) a fêté son dixième anniversaire au cours d'un jamboree réunissant près de 2300 étudiants. Depuis sa création, cette compétition internationale n'a cessé de prendre de l'ampleur. Elle est à présent un rendez-vous incontournable pour ceux qui s'intéressent et qui font la biologie synthétique.

Tous les ans, des équipes d'étudiants élaborent un projet scientifique d'ingénierie du vivant. Ils trouvent une idée, conçoivent un réseau génétique et le construisent. Ils ont six mois pour concrétiser leur idée. Leur projet est alors évalué par un jury international aux cours des sélections, puis éventuellement lors de la grande finale à Boston, selon différents critères comme son avancement, son originalité, les applications éventuelles ou tout simplement la qualité du travail (projet, présentation, wiki, poster). Les meilleurs projets sont alors récompensés.

Les équipes sont pluridisciplinaires car la conception, la construction et l'exploitation d'un réseau génétique dans un but précis fait appel à des connaissances et à un savoir-faire en biologie moléculaire et en modélisation mathématique. Un échange permanent est nécessaire entre ces deux compétences pour orienter la construction du réseau génétique selon l'objectif à atteindre, en comprendre son comportement et bien souvent identifier les erreurs à corriger. Le concours iGEM repose sur l'apprentissage par la pratique. Les étudiants sont invités à aller au-delà de leurs compétences et à s'ouvrir à d'autres champs disciplinaires.

C'est dans cet état d'esprit que trois projets ont pu émerger à Grenoble. En 2011, Mercuro-Coli visait à détecter et à quantifier le mercure dans un échantillon d'eau. En

1. http ://2011.igem.org/Team :Imperial_College_London
2. http ://2013.igem.org/Team :Paris_Bettencourt
3. http ://2012.igem.org/Team :Groningen

2012, sEnsiColi s'attaquait à réduire le développement des résistances aux antibiotiques dans le monde hospitalier en proposant un moyen de détecter plus finement un pathogène. Finalement, en 2013, TalkE'coli unissait le vivant et la machine pour contrôler le nombre de cellules vivantes au sein d'une population bactérienne. Nous développons juste après les projets Mercuro-Coli et TalkE'coli.

11. Mercuro-Coli, détecter et quantifier le mercure (2011)

Etudiants, Geoffrey Bouchage, Felix Ciceron, Marion Cristea, Morgane DeGasperi, Eric Durandeau, Maxime Huet, Jean-Baptiste Lugagne, Clément Masson, Feriel Melaine, Samia Menad, Robin Pinilla

Encadrant, **Stéphane Pinhal**

Professeurs, Robert Baptist, Franz Bruckert, Roberto Calemczuk, Hidde de Jong, Hans Geiselmann, Delphine Ropers, Marianne Weidenhaupt

Wiki de l'équipe, http ://2011.igem.org/Team :Grenoble

Récompenses, médaille d'or et « Advance to Championship »

Les activités humaines comme l'industrie chimique libèrent dans l'environnement du mercure. Il s'agit d'un métal lourd qui s'accumule dans les eaux, puis dans les poissons. Il remonte alors la chaîne alimentaire jusqu'aux êtres humains provoquant des troubles physiques et neurologiques permanents. L'intoxication au mercure inquiète si bien que le contrôle de l'accumulation du mercure dans l'eau est une préoccupation majeure. La législation européenne limite la concentration de mercure à 50 $\mu g.l^{-1}$ dans les rejets industriels. La quantification du mercure utilise des techniques complexes en laboratoire. Ici, nous proposons une alternative moins chère, plus simple d'utilisation et adaptée aux études sur le terrain : Mercuro-Coli. Il se présenterait alors sous la forme d'une plaque de la taille d'une carte de crédit (voir Figure 11.1). L'utilisateur n'aurait qu'à retirer la plaque de son emballage pour ajouter l'échantillon d'eau à analyser. La concentration de mercure serait matérialisée par l'apparition d'une bande rouge le long d'une graduation.

Au cours des années précédentes, d'autres équipes iGEM ont construit des réseaux visant à quantifier une molécule. Pour pouvoir balayer une fenêtre de concentrations assez large, plusieurs souches devaient alors être développées. Chacune possédait un réseau génétique différent lui permettant de quantifier une gamme de concentration au sein de cette

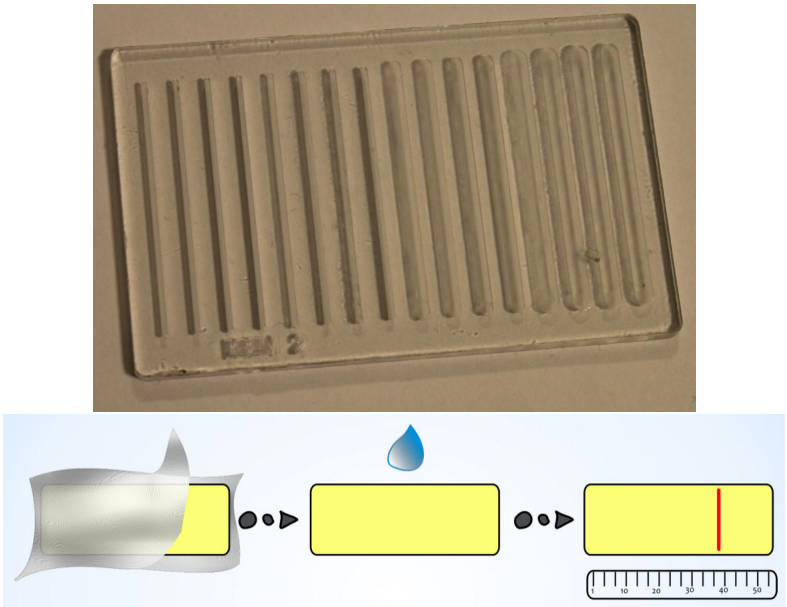


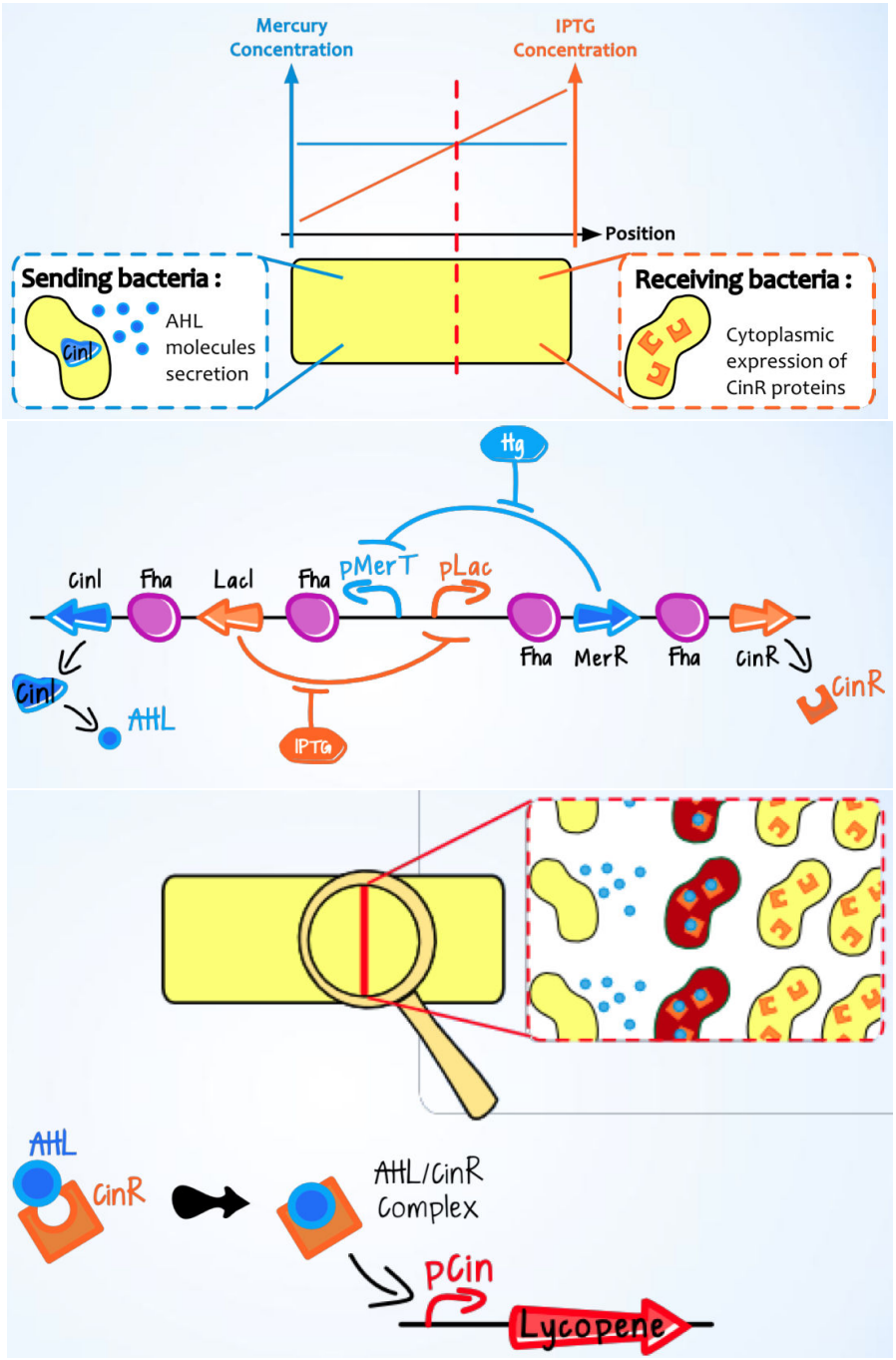
FIGURE 11.1. – **Visuelle de la plaque Mercuro-Coli et son mode d'emploi** Sur le terrain ou en laboratoire, un utilisateur qui souhaite quantifier le mercure dans un échantillon d'eau n'a qu'à ouvrir l'emballage de Mercuro-Coli pour y découvrir une plaque de la taille d'une carte de crédit. Cette plaque est constituée de canaux dans lesquels on trouve des cellules *E. coli* synthétique. Chaque canal contient une concentration différente d'IPTG. Cette concentration est connue et elle sert de référence pour déterminer la concentration de mercure. En ajoutant l'échantillon d'eau, le système réagit en une heure en faisait apparaître une coloration rouge dans un des canaux. L'utilisateur n'a qu'à se référer à la graduation pour lire à quelle concentration de mercure correspond la coloration rouge.

fenêtre. Pour simplifier les constructions, nous avons voulu utiliser une seule et même souche bactérienne. La concentration de la molécule serait alors déterminée par rapport à la concentration d'une référence, ici l'IPTG. Un gradient de concentration d'IPTG serait alors déposé le long de la plaque de la gauche vers la droite. La bactérie serait en mesure de «lire» ce gradient et la concentration de mercure. Lorsque les concentrations seraient égales, la cellule produirait une coloration rouge visible à l'oeil nu. La position de la bande colorée sur la plaque indiquerait la concentration du mercure.

Voyons à présent comment on peut concevoir une bactérie synthétique pour déterminer la concentration de mercure dans un échantillon d'eau par rapport à un gradient d'IPTG.

11.1. Conception du réseau génétique

La conception du réseau génétique se base sur l'utilisation d'un interrupteur (*toggle switch*) qui autoriserait notre système à basculer entre deux comportements en fonction du rapport des concentrations du mercure et de l'IPTG (Gardner et al., 2000). Lorsque la concentration d'IPTG est inférieure à celle du mercure, les bactéries adopteraient le comportement 1 en émettant une molécule de signalisation. En revanche, lorsque la concentration d'IPTG est supérieure à celle du mercure, les bactéries adopteraient le comportement 2 en produisant le récepteur à ce signal. Deux zones distinctes se définissent ainsi sur la plaque chacune avec un des deux comportements. A l'interface, les bactéries possédant le récepteur synthétiseraient une coloration rouge en réponse au signal perçu. Cette bande rouge donnerait la concentration de mercure dans l'échantillon selon une graduation le long de la plaque. Plus la bande est éloignée de la bordure gauche de la plaque et plus la concentration de mercure est élevée (voir Figure 11.2).



Légende à la page suivante

FIGURE 11.2 *(prev. page)* – **Principe de la quantification de la concentration du mercure par des bactéries synthétiques** La plaque Mercuro-Coli contient un gradient d'IPTG. L'ajout de l'échantillon d'eau à la surface de la plaque permet d'avoir la même concentration de mercure en n'importe quel point de la plaque. Dès lors, lorsque la concentration de mercure est supérieure à celle de l'IPTG, les bactéries basculent dans le comportement dit « sending bacteria ». Elles produisent alors la molécule de signalisation AHL. Lorsque la concentration de mercure est inférieure à celle de l'IPTG, les bactéries adoptent un comportement dit « receiving bacteria ». Dans ce cas, elles produisent le récepteur à la molécule AHL. Ces deux comportements se répartissent distinctement sur la plaque de part et d'autre d'une limite identifiée par l'apparition d'une coloration rouge. En effet, AHL traverse librement les membranes. Sa fixation à son récepteur déclenche la production du pigment rouge, le lycopène. Le « toggle switch » ou encore « l'interrupteur à bascule » permet de bloquer les bactéries dans un des deux comportements. Ainsi, la production de la molécule de signalisation par CinI s'accompagne aussi de la production de LacI qui inhibe le promoteur pLac. Ceci implique que la bactérie ne peut pas produire simultanément le récepteur et la molécule de signalisation. De même, la production du récepteur CinR s'accompagne de l'inhibition de la voie dépendant du promoteur pMerT. Le mercure et l'IPTG lèvent respectivement la répression exercée sur les promoteurs pLac et pMerT. Le rapport entre les concentrations de ces deux molécules joue un rôle décisionnel dans le choix du comportement de la bactérie.

Le comportement 1 se définit par la production de la molécule de signalisation AHL (*N-acyl-L-homoserine lactone*) par l'enzyme CinI (Balagaddé et al., 2008). La synthèse de CinI est contrôlée par le promoteur pMerT qui contrôle aussi la production de LacI. Le comportement 2 se définit par la production du récepteur CinR à la molécule de signalisation AHL. La synthèse de CinR est contrôlée par le promoteur pLac qui contrôle aussi la production de MerR.

LacI et MerR répriment respectivement les promoteurs pLac et pMerT en empêchant la fixation de l'ARN polymérase au promoteur. L'ajout d'IPTG dans le milieu change la conformation de LacI qui ne peut plus se lier à l'ADN menant à l'expression des gènes *merR* et *cinR*. Il en résulte que l'IPTG inhibe la production de la molécule de signalisation (comportement 1) et favorise le comportement 2. Le récepteur est produit.

De même, l'addition de mercure dé-réprime le promoteur pMerT. Les gènes *cinI* et *lacI* s'expriment favorisant le comportement 1 et la répression du comportement 2. La molécule de signalisation est produite. L'ajout d'IPTG ou de mercure bascule et bloque la bactérie dans un des deux comportements.

Finalement, la molécule de signalisation diffuse librement à travers la membrane hors des cellules bloquées dans le comportement 1. Elle pénètre alors dans les cellules à proximité bloquées dans le comportement 2 dans lesquelles elle se lie à son récepteur cytoplasmique. Ceci conduit à la production du lycopène c'est-à-dire de la coloration rouge.

Compte tenu que le choix d'un des deux comportements réprime l'expression de l'autre, on comprend que le rapport des concentrations d'IPTG et de mercure ne suffise pas pour décider du comportement à adopter. Il faut considérer également la répression par LacI et MerR. Dans ce cas, quel est le rapport des concentrations nécessaire pour faire basculer l'interrupteur dans un comportement plutôt que dans l'autre ? Quel est le temps de réaction du système ? Peut-on utiliser un tel réseau génétique pour quantifier le mercure dans un échantillon d'eau ? Nous avons recours à un modèle mathématique pour caractériser le *toggle switch* et répondre à ces questions.

11.2. Caractérisation du toggle switch

A cette étape du projet, il s'agit de vérifier que le *toggle switch* puisse être utiliser pour faire basculer et bloquer notre système dans la production d'une molécule de signalisation (comportement 1) ou du récepteur à cette molécule (comportement 2). Ce module est donc au coeur du projet. Nous préférons travailler dans un premier temps sur une preuve de concept où l'anhydrotétracycline (aTc), le promoteur pTet et l'inhibiteur TetR remplacent respectivement le mercure, le promoteur pMerT et la protéine MerR (voir Figure 11.3).

11.2.1. Modéliser le toggle switch

Nous définissons deux équations différentielles qui traduisent l'évolution des concentrations des protéines LacI (comportement 1) et TetR (comportement 2) au cours du temps. La valeur des différents paramètres utilisés est issue de la littérature.

$$\frac{d[LacI]}{dt} = \frac{k_{pTet}[pTet]_{tot}}{1 + \left(\frac{[TetR_{total}]}{K_{pTet} + \frac{K_{pTet}[aTc]}{K_{TetR-aTc}}}\right)^{\gamma}} - \delta_{LacI}[LacI] \tag{11.1}$$

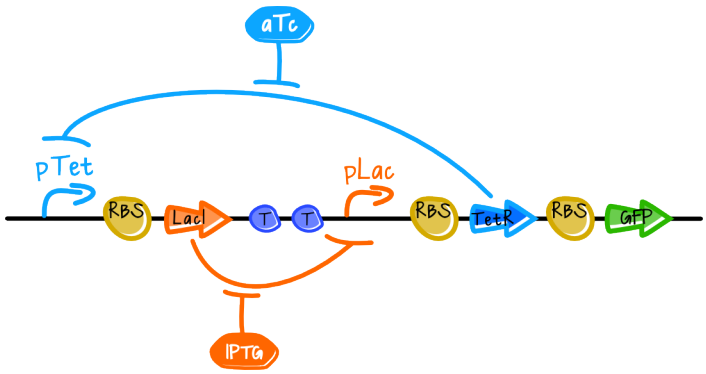


FIGURE 11.3. – **Réseau génétique de la preuve de concept** Nous travaillons sur une preuve de concept où l'anhydrotétracycline (aTc), plus simple d'utilisation et plus sécuritaire, remplace le mercure. L'aTc lève l'inhibition du promoteur pTet par la protéine TetR. Le « toggle switch » est au coeur de notre système. La preuve de concept consiste à caractériser son comportement afin de valider son utilisation dans la quantification du mercure. Ce réseau ne tient ainsi pas compte de la signalisation cellulaire ni du module de la coloration. En revanche, un gène codant pour une protéine fluorescente, la GFP, est ajouté. Ceci nous permet de visualiser le blocage dans une des deux voies en fonction du rapport des concentrations d'IPTG et d'aTc.

$$\frac{d[TetR]}{dt} = \frac{k_{pLac}[pLac]_{tot}}{1 + \left(\frac{[LacI_{total}]}{K_{pLac} + \frac{K_{pLac}[IPTG]}{K_{LacI-IPTG}}}\right)^{\beta}} - \delta_{TetR}[TetR] \tag{11.2}$$

où :

- $k_{pTet}[pTet]_{tot}$ et $k_{pLac}[pLac]_{tot}$ sont les taux de synthèse des protéines $TetR$ et $LacI$
- K_{pTet} et K_{pLac} sont les constantes de dissociation entre la protéines $TetR$ et le promoteur $pTet$; puis entre $LacI$ et $pLac$
- $K_{TetR-aTc}$ et $K_{LacI-IPTG}$ sont les constantes de dissociation entre la protéines $TetR$ et l'activateur aTc ; puis entre $LacI$ et $IPTG$
- δ_{TetR} et δ_{LacI} sont les constantes de dégradation des protéines $TetR$ et $LacI$
- β et γ représentent la coopérativité de la liaison des protéines $TetR$ au promoteur $pTet$; et de $LacI$ à $pLac$

Dans l'équation 11.1, TetR inhibe la production de LacI. Le degré de cette inhibition est modulé par la concentration d'aTc. Plus il y a d'aTc et moins la production de LacI est inhibée par TetR. Or l'évolution de la concentration de TetR est donnée par l'équation 11.2. On note que ces deux équations sont couplées. Le principe reste le même pour l'équation 11.2.

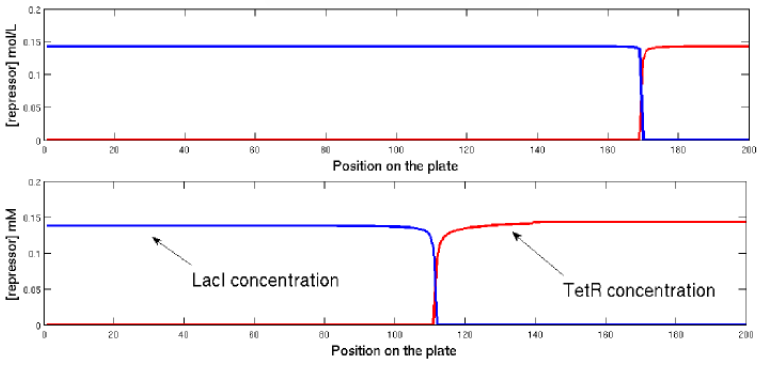


FIGURE 11.4. – **Prédictions sur le comportement du *toggle switch*** Pour observer le basculement de notre système dans une des deux voies possibles, nous suivons les concentrations de LacI (voie de la production de la molécule de signalisation) et de TetR (voie de la synthèse du récepteur) le long d'une plaque possédant un gradient d'IPTG allant de $1.10^{-6}M$ à $1.10^{-2}M$. Deux concentrations d'aTc sont testées : $5.10^{-5}M$ (graphe du haut) et $5.10^{-6}M$ (graphe du bas). On constate dans les deux cas i) l'émergence de deux zones distinctes, chacune caractérisée par l'installation d'une des deux voies (mono-stabilité du système), ii) à la limite entre ces deux zones, les deux comportements sont co-localisés permettant la détermination de la concentration, et iii) cette limite se déplace en fonction de la concentration de l'aTc. Il semble donc possible de déterminer la concentration de mercure par rapport à une référence en utilisant le « toggle switch ».

Des expériences *in silico* sont menées pour un gradient d'IPTG allant de $1.10^{-6}M$ à $1.10^{-2}M$ et pour une concentration d'aTc de $5.10^{-6}M$. Sur l'équivalent d'une plaque, deux zones distinctes apparaissent correspondant aux deux comportements attendus. L'un où LacI domine sur TetR, et inversement pour la seconde zone. Comme nous l'avions suggéré, le passage d'un comportement à un autre ne se fait pas pour une concentration d'IPTG égale à celle d'aTc. Ceci est dû à des différences dans les valeurs des paramètres des équations qui caractérisent l'inhibition par LacI et TetR.

Cette observation ne remet pas en cause l'utilisation du *toggle switch*. Les concentrations d'aTc devront être déduites à partir des concentrations d'IPTG selon une loi qu'il reste à déterminer.

Lorsqu'on augmente la concentration d'aTc, le passage d'un comportement à un autre est déplacé sur la droite de la plaque. On valide ainsi le modèle mathématique mais aussi l'utilisation du *toggle switch* qu'il faut maintenant construire (voir Figure 11.4).

11.2.2. Construction et caractérisation du toggle switch in vivo

Un *toggle switch* est construit sur un plasmide en assemblant différentes BioBricks disponibles dans la *Registry of Standard Biological Parts* : BBa_0040, BBa_Q04121, BBa_B0034, BBa_C0040 et enfin BBa_E0240. La souche *E. coli* BW25113 est transformée avec ce plasmide.

La modélisation a orienté la construction de notre système en révélant la nécessité de diminuer la durée de vie des protéines LacI et TetR. C'est pourquoi, nous avons choisi des LacI et des TetR possèdant une étiquette LVA.

La BioBrick BBa_E0240 code pour la GFP, une protéine fluorescente, qu'on utilisera en tant que rapporteur pour observer le blocage dans le comportement 2 (production de TetR).

On teste la capacité de notre système à basculer d'un comportement à un autre. Pour cela, on commence par bloquer une population bactérienne dans le comportement produisant LacI. La GFP ne peut pas être exprimée. Dans une microplaque, chacun des 96 puits possèdent une combinaison différente des concentrations d'aTc et d'IPTG. Une même quantité de ces cellules pré-traitées est introduite dans chacun de ces puits. On suit alors l'apparition de la fluorescence pendant dix heures. Si on mesure de la fluorescence c'est que le système a basculé de la production de LacI à la production de TetR, et donc de la GFP.

Pour une même concentration d'IPTG ($1mM$), on observe au bout de trois heures un changement de comportement entre une concentration de $50ng/ml$ d'aTc et $150ng/ml$ d'aTc. Ceci est confirmé par le modèle mathématique où le même résultat est obtenu (voir Figure 11.5). Néanmoins, on trouve expérimentalement un niveau de fluorescence plus élevé que prévu avec $150ng/ml$ d'aTc. Nous attribuons cela à la grande stabilité de la GFP (plus de 10h) qui rend la suppression de la fluorescence impossible au cours des dix heures de l'expérience. C'est d'ailleurs à cause de cela que nous n'observons pas de changement de comportement lorsqu'on soumet des cellules bloquées dans la production de la GFP et mise en présence de différentes combinaisons des concentrations d'aTc et d'IPTG. Nous conseillons le recours à une GPF avec une étiquette LVA afin d'en contrôler la dégradation.

Le cas étudié ci-dessus est un exemple caractéristique du changement de comportement. Toutefois, certains puits montrent un niveau de fluorescence intermédiaire comme si les cellules n'avaient pas pleinement basculé dans un des deux états possibles. Nous avons essayé d'expliquer ce fait par la modélisation.

L'étude de la stabilité du système montre que sur une plaque, deux zones distinctes existent. Chacune d'elle se constitue de bactéries n'adoptant qu'un seul des deux comportements possibles. Toutefois la population bactérienne à la frontière de ces deux

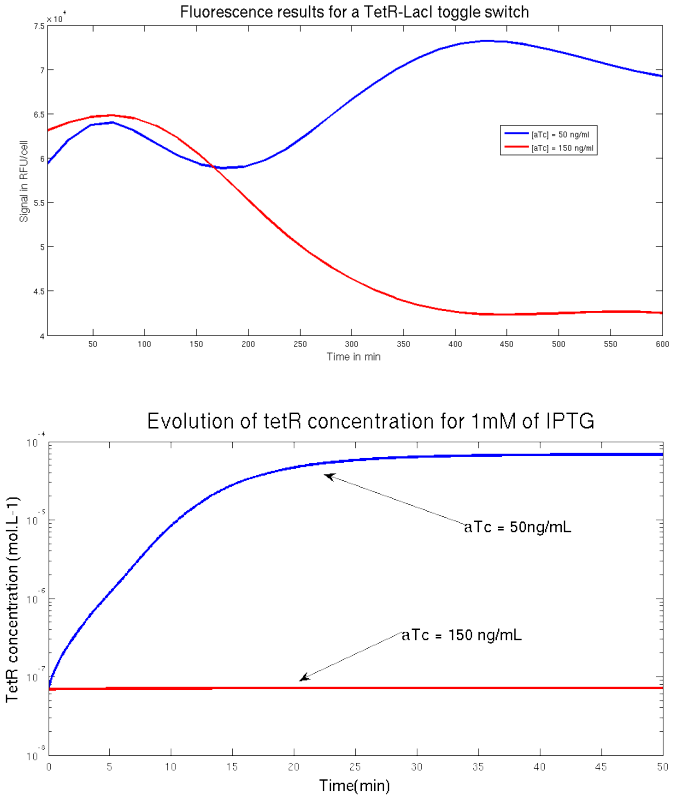


FIGURE 11.5. – **Les expériences valident le modèle mathématique et l'utilisation du *toggle switch*** Ces graphes représentent un cas caractéristique où pour une même concentration d'IPTG, deux comportements sont obtenus en fonction de la concentration d'aTc : $50\,ng/ml$ (en bleu) et $150\,ng/ml$ (en rouge). Le comportement des données expérimentales (en haut) suivent les prédictions du modèle (en bas). Les données expérimentales sont obtenues en mesurant la fluorescence exprimée lorsque la bactérie se bloque dans la production du récepteur à la molécule de signalisation. Ici, le système se bloque dans une des deux voies selon la concentration d'aTc. Cette expérience valide le modèle mathématique et surtout l'utilisation du toggle switch pour quantifier le mercure par rapport à une molécule de référence comme l'IPTG.

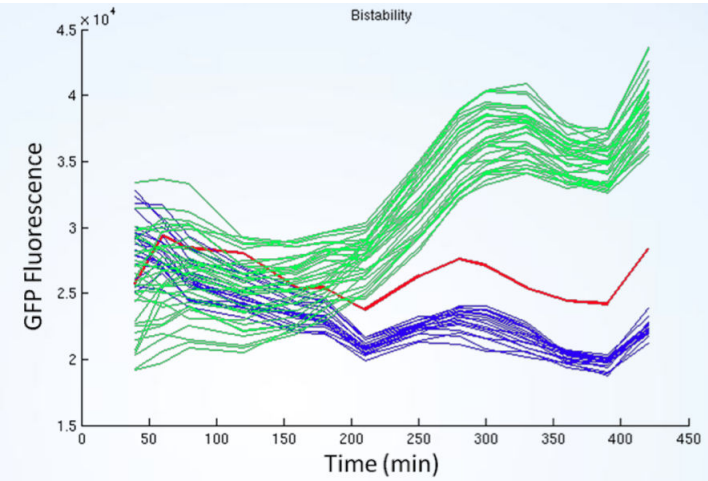


FIGURE 11.6. – **La bi-stabilité du système permet la coloration** Dans une plaque 96 puits, chaque ligne correspond à une concentration d'aTc et chaque colonne correspond à une concentration d'IPTG. Un même volume de bactéries est introduit dans chacun de ces puits. On mesure alors la fluorescence de ces puits. Les courbes en vert montrent les puits exprimant de la fluorescence : les bactéries sont bloquées dans la production du récepteur. Les courbes en bleu montrent que les cellules sont bloquées dans la production de la molécule de signalisation. On représente en rouge une courbe ayant un niveau de fluorescence intermédiaire. Ce niveau de fluorescence est dû au fait que seule une partie de la population exprime de la fluorescence. Cette expérience révèle que pour certains rapports entre les concentrations d'aTc et d'IPTG, le système peut être bi-stable autorisant une co-localisation de la molécule de signalisation et de son récepteur. Ceci est nécessaire pour l'émergence d'une coloration rouge.

zones est constituée de cellules produisant LacI (comportement 1) et d'autres produisant TetR (comportement 2). Les puits pour lesquels on mesure un signal de fluorescence intermédiaire sont très intéressants. Car ce sont ces conditions de concentrations qui permettront l'émergence de la coloration rouge, et donc a posteriori la quantification du mercure. En effet, dans ces puits, on trouve aussi bien des cellules produisant la molécule de signalisation que des cellules capables de recevoir (récepteur CinR) et d'interpréter ce signal (production de la coloration) (voir Figure 11.6).

Nous venons de voir que le *toggle switch* pouvait être utilisé pour quantifier l'aTc. Il nous faut néanmoins des expériences supplémentaires pour établir la conversion d'une concentration d'IPTG quelconque en une concentration d'aTc. Mais ces résultats préliminaires sont prometteurs.

Une des caractéristiques de cette quantification est l'obtention d'un résultat facilement observable à l'oeil nu. Pour cela, nous avons décidé de coupler le *toggle switch* à un

système de signalisation cellulaire qui contrôlerait la production d'une coloration rouge. Nous avons alors étendu le modèle mathématique pour qu'il tienne compte de la signalisation cellulaire.

11.3. La signalisation cellulaire contrôle la coloration rouge

Cette partie du projet est essentiellement *in silico* et elle vise à prédire l'apparition de la bande rouge sur la plaque. Nous avons vu précédemment qu'il fallait se focaliser sur une zone où le système est bi-stable pour obtenir la concentration d'aTc à partir de celle d'IPTG. A présent il s'agit de rendre cette zone facilement observable à l'oeil nu sur la plaque. Lorsque la bactérie se bloque dans la production de LacI, elle synthétiserait le récepteur cinR (comportement 2). Si la bactérie se bloque dans la production de TetR, elle synthétiserait la molécule de signalisation (comportement 1). L'apparition d'une bande colorée dépend de la co-localisation de ces deux comportements.

Le modèle s'enrichit alors de quatre nouvelles équations qui traduisent les différentes étapes menant à la production du lycopène (voir Figure 11.7) :

1. la molécule de signalisation AHL est produite
2. la molécule de signalisation diffuse à travers la membrane hors de la cellule
3. la molécule de signalisation diffuse dans le milieu
4. la molécule de signalisation diffuse à travers la membrane dans une cellule voisine
5. la molécule de signalisation se complexe avec son récepteur pour l'activer
6. le récepteur actif permet la production de la coloration

On obtient alors :

$$\frac{d[QS_i]}{dt} = \eta([QS_e] - [QS_i]) - \delta_{QS_i}[QS_i] + k'_{QS-production}[CinI] \tag{11.3}$$

$$\frac{d[QS_e]}{dt} = \rho\nu_c\eta([QS_i] - [QS_e]) - \delta_{QS_e}[QS_e] + D_{diff}\frac{\partial^2[QS_e]}{\partial x^2} \tag{11.4}$$

$$\frac{d[CinR^*]}{dt} = k_{comp}[CinR][QS_i] \tag{11.5}$$

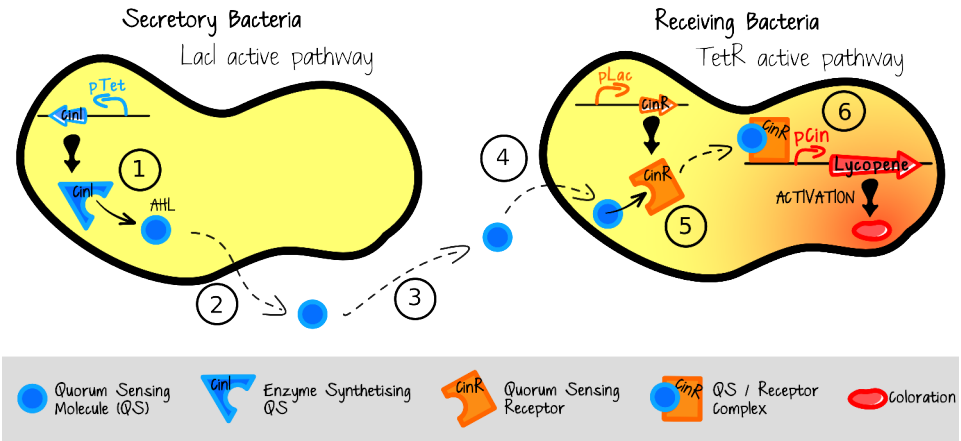


FIGURE 11.7. – **La signalisation cellulaire contrôle l'apparition de la coloration rouge** (1) L'enzyme CinI catalyse la production de la molécule de signalisation AHL. (2) AHL traverse librement la membrane et s'accumule dans le milieu où elle diffuse (3). Elle entre alors dans les cellules voisines (4) . Si une de ces cellules est bloquée dans la production du récepteur CinR, AHL se lie à lui et l'active (5). Le complexe AHL-CinR déclenche alors la production du lycopène (6). Une coloration rouge apparaît en réponse à la molécule de signalisation.

$$\frac{d[Lyco]}{dt} = k_{pCin}[pCin][CinR^*] \tag{11.6}$$

où :

- $[QS_e]$ est la concentration d'AHL à l'extérieur de la cellule
- $[QS_i]$ est la concentration d'AHL à l'intérieur de la cellule
- $\eta([QS_e] - [QS_i])$ et $\rho\nu_c\eta([QS_i] - [QS_e])$ décrivent la diffusion d'AHL à travers la membrane
- $\delta_{QS_i}[QS_i]$ et $\delta_{QS_e}[QS_e]$ décrivent la dégradation d'AHL
- $k'_{QS-production}[CinI]$ est la synthèse d'AHL par l'enzyme CinI
- $D_{diff}\frac{\partial^2[QS_e]}{\partial x^2}$ tient compte de la diffusion d'AHL dans le milieu externe
- $[CinR]$ est la concentration du récepteur libre
- $[CinR^*]$ est la concentration du récepteur activé par AHL
- k_{comp} est la constante d'affinité d'AHL pour CinR
- $[Lyco]$ est la concentration de lycopène
- $k_{pCin}[pCin][CinR^*]$ traduit la synthèse du lycopène par l'activation du promoteur pCin par CinR*

Les équations 11.1 et 11.2 donnent les concentrations de LacI et de TetR. Comme la production de CinI se fait conjointement à celle de LacI, et la production de CinR à celle

de TetR, on considère que les évolutions des concentrations de CinI et de CinR suivent ces mêmes équations. Ces deux concentrations sont alors utilisées pour déterminer la concentration de lycopène selon les équations 11.3 à 11.6. Ainsi, les équations décrivant le *toggle switch* sont couplées à celles de la signalisation cellulaire et de la production de la coloration. La résolution de ces équations donne l'évolution de la concentration du lycopène (notion de temps) ; mais aussi la position de cette production sur la plaque le long du gradient d'IPTG (notion d'espace). Les simulations confirment que la position de la coloration change en fonction de la concentration d'aTc.

Toutefois comme la molécule AHL diffuse dans le milieu externe, on n'obtient pas une bande nette mais plutôt une zone colorée qui rendrait la lecture d'une concentration moins précise. On décide d'adapter le format de notre plaque en creusant des canaux afin de limiter la diffusion. Chaque canal aurait une concentration déterminé d'IPTG. La coloration se limiterait alors à un seul canal.

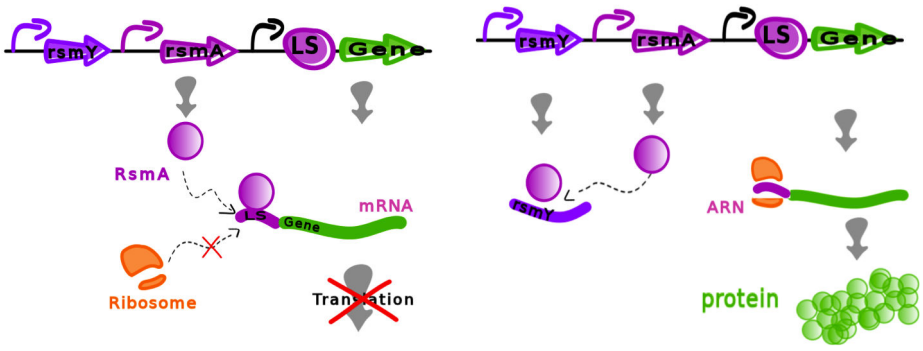
Avant que l'utilisateur n'introduise l'échantillon, ici l'aTc, le système est en présence d'IPTG. Les bactéries sont donc initialement bloquées dans le comportement 2 qui mène à la production du récepteur cinR. En présence, d'une concentration d'aTC suffisante, certaines de ces bactéries vont basculer de comportement pour produire la molécule de signalisation. L'AHL ainsi produite pourra alors activer le récepteur CinR déjà présent dans le cytoplasme. Ceci induirait une coloration dans les canaux qui fausserait la détermination de la concentration. La modélisation révèle que, pour palier à ce problème, les concentrations de LacI et de TetR doivent être quasiment nulles.

On doit donc compléter notre système par un module de contrôle garantissant qu'il n'y ait pas de production de LacI ou de TetR. Ce module doit i) contrôler simultanément l'expression de LacI et celle de TetR et ii) s'activer quand l'utilisateur souhaite procéder à la quantification. On s'oriente alors sur le système FHA/RsmA/rsmY qui permet un contrôle de la traduction chez *Pseudomonas aeruginosa*.

11.4. Un nouvel outil pour le contrôle de la traduction

Chez *P. aeruginosa*, la séquence FHA régule l'initiation de la traduction (Brencic and Lory, 2009). Cette séquence forme des structures secondaires sur l'ARNm juste avant le RBS. La protéine RsmA se lie à ces structures secondaires empêchant les ribosomes d'accéder au RBS pour initier la traduction. L'ARNm est alors dégradé. L'inhibition de la traduction par la protéine RsmA peut néanmoins être levée par le petit ARN non codant rsmY. Ce dernier séquestre la protéine RsmA qui ne peut plus se lier à la séquence FHA. Le RBS redevient accessible aux ribosomes (voir Figure 11.8).

Nous proposons d'ajouter dans la réseau final les séquences FHA devant les RBS des gènes *lacI* et *merR* dont on souhaite contrôler l'expression. Le gène *rsmA* serait sous



(a) (b)

FIGURE 11.8. – **Fonctionnement d'un nouveau module pour le contrôle de la traduction chez *E. coli*** (a) La protéine RsmA se fixe à la séquence FHA en amont de la séquence RBS du gène (représenté par une flèche verte). Le ribosome ne peut plus accéder au RBS. L'ARNm n'est pas traduit et sera dégradé. (b) La production du petit ARN non codant rsmY séquestre la protéine RsmA dont l'affinité est plus grande pour rsmY que pour la séquence RBS. Le ribosome se lie au RBS et la traduction de l'ARNm peut commencer : une protéine est alors produite.

le contrôle d'un promoteur constitutif pour bloquer la traduction des deux cibles par défaut. Le gène *rsmY* quant à lui serait sous le contrôle d'un promoteur inductible par l'ajout d'une molécule dans le milieu par l'utilisateur au moment de la quantification. Ceci autoriserait la production de LacI et de TetR.

La *Registry of Standard Biological Parts* ne possède pas de BioBrick avec FHA, RsmA ou rsmY. Nous avons dû les apporter de *P. aeruginosa* chez *E. coli*. Nous enrichissons ainsi la collection de BioBricks avec BBa_K545005, BBa_K545007 et BBa_K545008 ; où l'on trouve respectivement la séquence FHA (et un RBS), la séquence codante de *rsmA* et enfin la séquence codante de *rsmY*. Le comportement de ces nouvelles briques doit être caractérisé avant de les intégrer à notre système.

On construit un plasmide exprimant constitutivement la protéine fluorescente GFP mais dont la traduction est sous le contrôle de BBa_K545005 qu'on souhaite tester. On suit le niveau de fluorescence dans des cellules co-transformées avec des plasmides exprimant BBa_K545007, puis BBa_K545008. On s'attendrait à voir une baisse de la fluorescence dans les cellules possédant RsmA et un retour de la fluorescence pour les cellules produisant en plus rsmY.

Les expériences montrent que le niveau de fluorescence est vingt fois plus faible dans les cellules avec RsmA. Cependant, la présence de rsmY n'augmente pas significativement le niveau de la fluorescence (voir Figure 11.9).

L'utilisation d'un module FHA/RsmA/rsmY n'est pas à rejeter pour autant. Les expériences

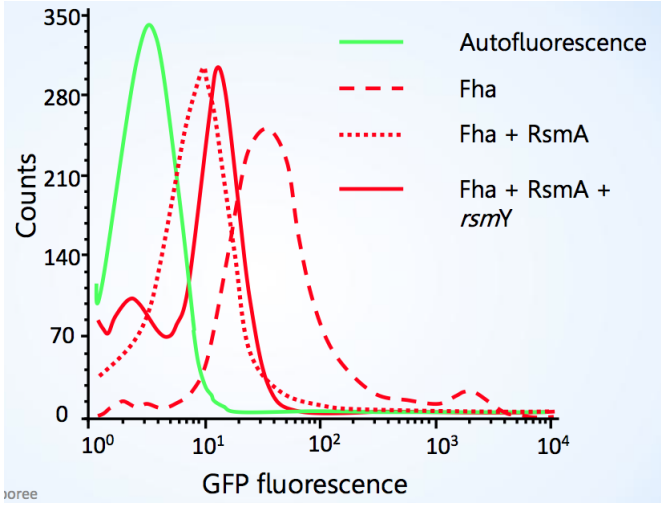


FIGURE 11.9. – **Caractérisation du module FHA/RsmA/rsmY** On quantifie le nombre de cellules en fonction de leur fluorescence. La courbe verte représente l'auto-fluorescence d'une souche *E. coli* n'ayant pas de vecteur exprimant la GFP. Cette souche est utilisée comme contrôle. Trois autres souches sont utilisées : i) une souche annotée Fha possède un vecteur exprimant la GFP mais aussi la séquence FHA ; ii) une souche annotée Fha+RsmA, exprime en plus la protéine RsmA ; et enfin iii) la dernière souche annotée Fha+RsmA+rsmY produit également rsmY. Le but de cette expérience est d'observer la répression de la traduction par RsmA et la levée de cette répression par rsmY. En présence de RsmA, on note une perte de la fluorescence. La comparaison avec le contrôle montre que cette répression n'est pourtant pas totale : les cellules produisent encore de la GFP. L'expression de rsmY permet un léger retour de la fluorescence mais ceci n'est pas significatif par rapport à la fluorescence des cellules annotées Fha. La levée de la répression de la traduction par rsmY n'est pas suffisante.

méritent d'être refaites en variant quelques conditions. Nous avons par exemple évalué la force du RBS de BBa_K545008 à seulement 18,2% de celle du RBS consensus qui sert de référence chez *E. coli*. D'autre part, dans la mesure où rsmY séquestre RsmA, il est important de vérifier qu'on produise suffisamment de rsmY pour atteindre une levée de la répression. On pourrait jouer sur la force des promoteurs et des RBS ou le nombre de copie de chacun de ces deux acteurs. rsmZ se présente aussi comme une alternative à rsmY dont il faudrait évaluer l'efficacité pour éventuellement l'intégrer à notre système de quantification à la place ou en complément de rsmY.

11.5. Conclusions et Perspectives

Nous avons entrepris de construire un détecteur biologique pouvant quantifier le mercure dans un échantillon d'eau. Le support se présenterait sous la forme d'une plaque de la taille d'une carte de crédit. Plusieurs critères ont été fixés comme i) l'utilisation d'une seule souche bactérienne, ii) une quantification du mercure par rapport à un gradient d'IPTG déposé sur la plaque et iii) l'émergence d'une bande rouge sur la plaque graduée indiquant à l'utilisateur la concentration de mercure.

Une souche d'*E. coli* BW25113 doit être génétiquement modifiée pour atteindre cet objectif. En fonction du rapport des concentrations de mercure et d'IPTG, la bactérie pourrait adopter deux comportements : produire une molécule de signalisation ou un récepteur à cette molécule. La liaison de la molécule de signalisation à son récepteur déclencherait une réponse menant à la coloration rouge.

Nous avons alors conçu un réseau génétique composé de trois modules différents : i) un *toggle switch* qui permet à la cellule d'adopter un des deux comportements possibles, ii) un module de signalisation cellulaire produisant la molécule AHL ou son récepteur CinR, et iii) la voie de biosynthèse du lycopène qui mène à la coloration rouge.

A la fin des six mois de travail, nous pouvons dire qu'en théorie la quantification du mercure par comparaison à une référence comme l'IPTG est possible et que le résultat peut être identifié par une bande rouge. Nous validons ainsi l'utilisation du toggle switch au coeur même de notre système. Nous nous sommes néanmoins focalisés sur l'établissement d'une preuve de concept quantifiant l'anhydrotétracycline (aTc) au lieu du mercure. Il faut donc adapter le système pour la quantification du mercure. Les modules de la coloration et de la communication cellulaire CinI/CinR restent encore à construire. Les expériences *in silico* ont montré qu'on pouvait théoriquement quantifier jusqu'à 20 $\mu g.l^{-1}$ de mercure par ce biais - alors que la législation européenne limite la concentration de mercure à 50 $\mu g.l^{-1}$ dans les rejets industriels.

L'utilisation du toggle switch restreint le choix des molécules à détecter. Il implique que la molécule que l'on cherche à quantifier puisse lever la répression exercer sur l'une des

deux voies comme le mercure empêche la fixation de la protéine MerR sur le promoteur pMerT, ou comme l'IPTG se lie à lacI pour permettre l'expression du promoteur pLac.

Au cours du projet, nous avons dû adapter le support avec des canaux pour limiter la propagation de la coloration et donc garder un résultat net. De même, les expériences ont suggéré que l'on adapte le réseau génétique avec un module supplémentaire FHA/RsmA/rsmY. Ce module est comparable à un interrupteur qui permettrait à l'utilisateur d'activer le détecteur uniquement lorsqu'il souhaite quantifier. On obtiendrait ainsi une plus grande précision.

Nous avons extrait le système FHA/RsmA/rsmY de *P. aeruginosa* pour l'utiliser dans la bactérie *E. coli*. La caractérisation préliminaire tend à dire que ce système n'est pas adapté. Cependant nous n'en sommes qu'aux prémices. Des expériences complémentaires sont nécessaires pour optimiser le fonctionnement de ce module. Ce n'est qu'après cela qu'on pourra valider l'utilisation ou le rejet de ce nouvel outil de contrôle de la traduction chez *E. coli*.

Beaucoup de nos conclusions reposent malgré tout sur des simulations. Il reste à construire et à caractériser les modules manquants, puis à les assembler au sein d'un même système pour passer de la preuve de concept à un produit prêt à être utilisé sur le terrain.

12. TalkE'coli, contrôler la croissance bactérienne par la lumière (2013)

Etudiants, Sarah Amblard, Hélène Arduin, Alexis Félix, Stewart Humble, Quentin Lubart, Simon Pacouret, Adrien Rapeaux, Nicolas Roehri, François Rousse

*Encadrant*s, Geoffrey Bouchage, Pierre Pautré, **Stéphane Pinhal**

Professeurs, Robert Baptist, Franz Bruckert, Hidde de Jong, Valérie Forest, Hans Geiselmann, Delphine Ropers, Marianne Weidenhaupt

Wiki de l'équipe, http ://2013.igem.org/Team :Grenoble-EMSE-LSU

Récompenses, médaille d'or et « Best Model »

Les bactéries font partie des organismes les plus répandus sur la planète. Elles peuvent s'adapter dans quasiment tous les types d'environnement. Certaines peuvent d'ailleurs doubler leur population en à peine dix minutes. Bien que la croissance bactérienne suit certaines lois mathématiques simples, de nombreux paramètres restent incompris. Ceci rend la croissance en laboratoire difficile à contrôler. Ces paramètres représentent pourtant un challenge notamment en ce qui concernent les questions de santé publique. Nous avons développé un système, TalkE'coli, permettant aux chercheurs de contrôler le nombre de cellules vivantes dans une culture. Nous espérons fournir ainsi un outil pour améliorer les connaissances sur la croissance bactérienne : caractériser les mécanismes de résistance à un stress, suivre la consommation des nutriments du milieu de culture... ou tout simplement faire en sorte que la culture laissée le vendredi soir au laboratoire soit dans le même état le lundi matin.

TalkE'coli se présente sous la forme d'une boîte facilement adaptable à n'importe quel incubateur de laboratoire. Cette boîte est reliée à un ordinateur sur lequel l'utilisateur précise l'objectif à atteindre c'est-à-dire la concentration de cellules vivantes qu'il souhaite obtenir. L'utilisateur n'aurait alors plus qu'à déposer sa fiole, contenant un milieu inoculé, à l'emplacement indiqué dans la boîte. L'ordinateur prendrait la relève pour

atteindre et maintenir la population au nombre de cellule programmé. Il doit pour cela être capable de suivre l'évolution de la population bactérienne et d'agir à façon dessus. TalkE'coli reposerait ainsi sur une communication permanente entre la machine et la cellule.

Nous partons sur l'utilisation de la lumière pour établir une telle communication. Tabor et al. (2011) considère d'ailleurs la lumière comme un outil puissant pour manipuler le comportement des cellules vivantes. Il propose deux modules qui détectent la lumière verte ou rouge, et qui contrôlent la transcription d'un ou plusieurs gènes en réponse au signal lumineux détecté. En équipant TalkE'coli d'un système optique (lampe LED, miroir dichroïque et filtres), l'ordinateur peut potentiellement agir sur la croissance de la population bactérienne par la lumière. De plus, grâce à une photodiode, il serait capable de suivre la croissance de la population bactérienne en mesurant la fluorescence émise naturellement par les cellules ou par l'expression d'une protéine fluorescente.

L'ordinateur et les cellules peuvent « communiquer » mais cela ne nous indique pas comment un contrôle du nombre de cellule vivante est possible par la lumière. Si la population bactérienne augmente naturellement, le maintien à une concentration donnée et sa diminution impliquent en revanche que l'on soit capable de maîtriser la mort des cellules. Nous orientons alors la conception de notre réseau génétique vers l'utilisation de KillerRed. Il s'agit d'une protéine fluorescente qui tue 96% d'une population bactérienne *E. coli* en seulement 10 min d'irradiation avec de la lumière blanche (1 W/cm^2) (Bulina et al., 2006). On peut tuer les cellules mais aucune étude à notre connaissance ne montre un contrôle du nombre de cellule morte avec KillerRed. Notre projet commence par la caractérisation du comportement de KillerRed dans différentes conditions afin d'en évaluer le potentiel dans le contrôle du nombre de cellule vivante dans une fiole par la lumière.

12.1. Caractérisation de KillerRed

KillerRed est un photosensibilisateur qui s'excite dans le vert (maximum à 585 nm) et qui émet dans le rouge (maximun à 610 nm) (Bulina et al., 2006). Son chromophore génère alors des dérivés réactifs de l'oxygène (que nous appellerons par la suite ROS, l'abréviation anglaise). Les ROS entraînent des lésions de l'ADN et des protéines conduisant à la mort de la cellule. KillerRed se présente donc comme un bon candidat pour contrôler le nombre de cellule vivante par la lumière.

12.1.1. Construction de la souche et conditions expérimentales

Le gène KillerRed est cloné dans le plasmide pQE30 sous le contrôle du promoteur T5, puis il est introduit dans la souche *E. coli* M15. Cette souche exprime constitutivement

la protéine LacI (plasmide pREP4) qui empêche la fixation de l'ARN polymérase au promoteur T5, et donc la transcription du gène *KillerRed*. L'IPTG lève cette répression. La concentration de KillerRed dans la cellule dépend donc de la concentration de l'IPTG ajouté par l'utilisateur dans le milieu de culture. Cette construction définit notre support biologique pour la caractérisation de KillerRed. Nous la proposons dans la *Registry of Standard Biological Parts* sous l'intitulé BBa_K1141001 (bien qu'elle ne soit pas au format BioBrick).

Nous souhaitons que la production de la protéine KillerRed soit maximale sans altérer pour autant la croissance des cellules maintenues dans l'obscurité. En effet, les protéines KillerRed, comme beaucoup de protéines fluorescentes, expriment une certaine toxicité même sans être excitées. Il faut donc veiller à ne pas sur-produire KillerRed ce qui reviendrait à se mettre dans une situation où la croissance serait inhibée sans le vouloir. Un compromis a alors été trouvé pour une concentration d'IPTG de 0.05 mM. Nous utiliserons cette concentration au cours de ce projet.

Les croissances sont étudiées en milieu minimum M9 avec glucose comme seule source de carbone. Les antibiotiques Kanamycine et Ampicilline nécessaires au maintien des plasmides pREP4 et pQE30 sont ajoutés dans le milieu, ainsi que la concentration d'IPTG définie ci-dessus. Les cultures sont agitées à 200 rpm et à 37°C. Les fioles ne sont remplies qu'au quart de leur volume maximal pour garantir une bonne oxygénation de la culture. Elles sont soumises à différentes conditions d'intensité et de temps d'illumination. Régulièrement au cours des cinétiques, un échantillon de la culture est prélevé pour suivre l'évolution de i) la fluorescence de KillerRed, qui renseigne sur le niveau d'expression de la protéine dans la cellule ; ii) la densité optique à 610 nm, qui renseigne sur la biomasse mais qui ne permet pas de distinguer entre les cellules vivantes et mortes ; et enfin iii) l'UFC (pour *unité formant une colonie*), qui renseigne sur le nombre de cellule vivante dans un échantillon.

12.1.2. Caractérisation de BBa_K1141001

Nous vérifions dans un premier temps que dans nos conditions d'étude KillerRed tue les cellules. Deux fioles contenant le même milieu sont inoculées et maintenues dans l'obscurité. On retrouve des croissances semblables dans chacune de ces fioles. Au bout de 180 min, une des deux fioles est alors soumise à une lumière blanche de 0.03 µW/cm^2 jusqu'à la fin de la cinétique. Le nombre de cellule vivante diminue significativement dans la fiole illuminée par rapport à la fiole maintenue dans l'obscurité (voir Figure 12.1).

On constate toutefois que le nombre de cellule vivante ne diminue qu'à partir de 300 min, soit 120 min après le début de l'illumination. De même, la densité optique augmente jusqu'à 300 min mais selon un taux de croissance plus faible que dans la fiole restée à l'obscurité. La densité optique se stabilise après 300 min. En comparant à l'UFC, on

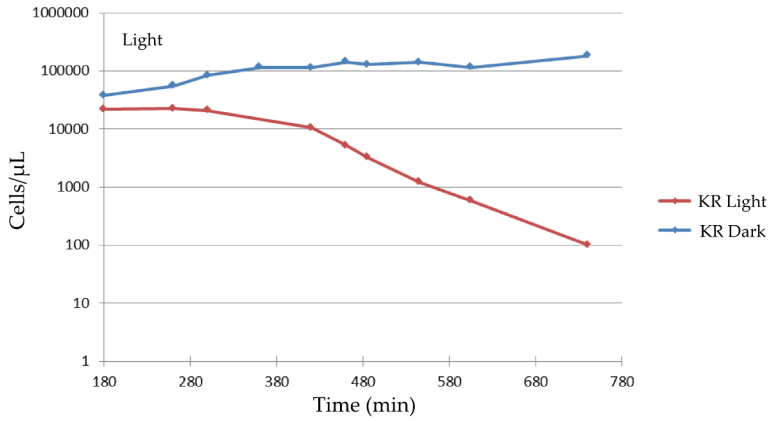


FIGURE 12.1. – **KillerRed tue la bactérie *E. coli*** Pendant 180 minutes, les bactéries *E. coli* sont maintenues à l'obscurité : elles se divisent et expriment la protéine fluorescente KillerRed. La population est alors soumise à de la lumière blanche jusqu'à la fin de l'expérience. Nous voulons ainsi tester la capacité de KillerRed à tuer les bactéries. En effet, sous l'effet de la lumière blanche, KillerRed génère des ROS qui s'accumulent, provoquent des lésions dans l'ADN et les protéines, et entraînent la mort de la cellule. Ici, on observe que le nombre de cellules vivantes (renseigné par l'UFC) se stabilise pendant 120 minutes après le début de l'illumination, puis décroît (courbe rouge). KillerRed tue mais un délais est nécessaire. Nous attribuons ce délais à la nécessité d'accumuler suffisamment de ROS au sein de la cellule pour pouvoir tuer. La courbe bleue est utilisée comme contrôle : les cellules maintenues dans l'obscurité se divisent.

constate que cette stabilisation s'accompagne de la mort cellulaire. Nous supposons qu'une certaine quantité de ROS doit s'accumuler avant de pouvoir observer une chute du nombre de cellule vivante expliquant que les effets ne soient observés que 120 min après le début de l'illumination. Les systèmes de réparation de la bactérie seraient alors dépassés face à l'importante quantité de ROS. Tant que ce seuil n'est pas atteint, la croissance semble être simplement ralentie.

La fluorescence aussi augmente jusqu'à 300 min. Cette augmentation peut être due à la poursuite de la production de KillerRed et/ou à l'existence d'un temps de maturation de la protéine KillerRed. La fluorescence se stabilise alors puis diminue. Nous avons évalué la durée de vie de la protéine KillerRed supérieure à la durée de l'expérience. Il en résulte que cette diminution ne peut être due qu'au photoblanchiment c'est-à-dire à la dégradation du chromophore de la protéine KillerRed.

Nous considérons que KillerRed peut tuer les cellules dans nos conditions expérimentales. Néanmoins, la croissance est sensible à de nombreux paramètres comme la température voire la lumière. Nous effectuons donc la même expérience mais avec des cellules exprimant la protéine fluorescente mCherry en parallèle de celles exprimant KillerRed. La mCherry émet également dans le rouge mais elle est décrite dans la littérature comme ne produisant pas de ROS. Cette expérience nous permettrait de valider que la mort des cellules observée est strictement dépendante de l'accumulation des ROS au sein de la cellule (voir Figure 12.2).

Les cellules avec KillerRed ou avec la mCherry subissent le même traitement. Les cultures sont illuminées au bout de 180 min. Les résultats révèlent que la densité optique des cellules exprimant la protéine KillerRed se stabilise. Ceci signifie que les cellules meurent comme nous l'avons vu précédemment. Aucune stabilisation n'est observée pour les cellules exprimant la mCherry qui poursuivent alors leur croissance. Il en résulte que seul KillerRed provoque la mort des cellules quand la population bactérienne est illuminée avec de la lumière blanche. La mort des cellules demande un certain délais. Avec le nombre de cellule qui diminue, la quantité de KillerRed diminue, et donc la quantité de ROS produite diminue aussi. Nous nous sommes alors demandé si le retour à une phase d'obscurité autoriserait une reprise de la croissance.

Les cellules exprimant KillerRed sont illuminées pendant deux heures. La dynamique de la densité optique ralentit et atteint un plateau comme dans les expériences précédentes. Toutefois la densité optique augmente à nouveau au bout de 100 min après le retour à l'obscurité. KillerRed tue les cellules mais une reprise de la croissance est possible lors d'un retour dans l'obscurité. A ce stade du projet, on peut augmenter et diminuer le nombre de cellule vivante d'un population bactérienne. Ces deux comportements semblent étroitement lié à l'intensité lumineuse. Lorsqu'on allume la lampe (intensité maximale, 100%), on tue les cellules. Lorsqu'on éteint la lampe (intensité nulle, 0%), les cellules se divisent (voir Figure 12.3). Pour obtenir, un nombre de cellule constant, il faut atteindre un équilibre c'est-à-dire qu'il y ait autant de cellules qui apparaissent

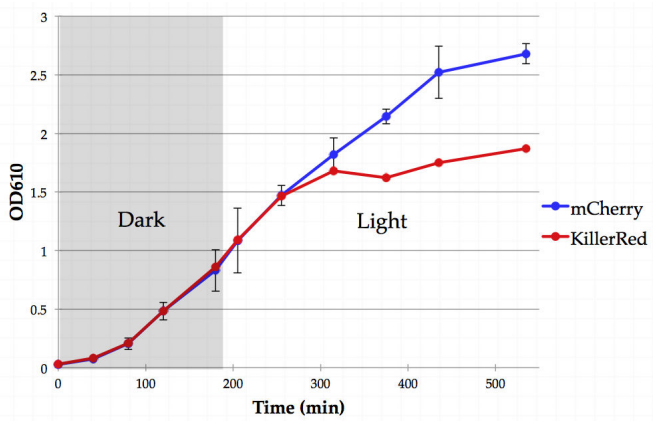


FIGURE 12.2. – **Les ROS générés par KillerRed sont responsables de la mort des cellules** On souhaite vérifier si la mort cellulaire observée en illuminant avec de la lumière blanche est due à KillerRed. Pour cela, nous traitons exactement de la même façon des cellules exprimant KillerRed et des cellules exprimant la mCherry. Bien que la mCherry soit également une protéine fluorescente émettant dans le rouge, elle ne génère pas de ROS comme KillerRed. On observe que les cellules exprimant la mCherry poursuivent leur croissance alors que celle des cellules exprimant KillerRed se stabilise. Nous suivons, ici, la densité optique qui ne distingue pas les cellules mortes des cellules vivantes. Ainsi, un arrêt de la DO signifie que les cellules meurent. Comme le seul paramètre qui change entre les deux conditions est la production de ROS, nous attribuons l'arrêt de la croissance, et donc la mort cellulaire, aux ROS générés lors de l'exposition de KillerRed à la lumière blanche.

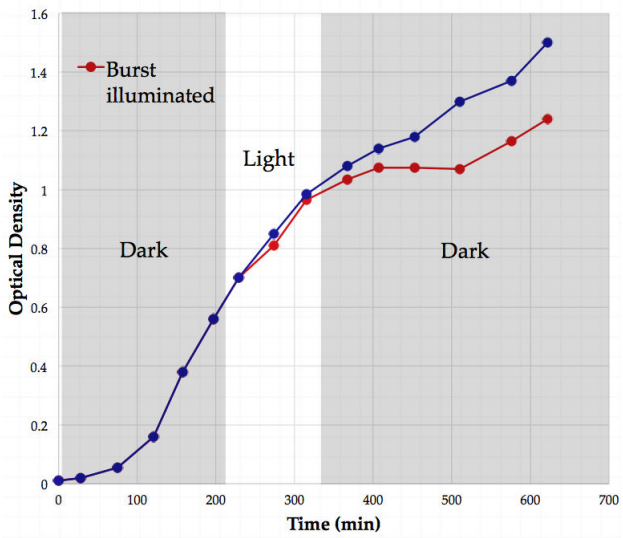


FIGURE 12.3. – **Un retour à l'obscurité autorise une reprise de la croissance** La courbe bleue représente des cellules exprimant KillerRed mais maintenues à l'obscurité pendant toute la durée de l'expérience : elles se divisent. La courbe rouge permet de suivre l'évolution de la densité optique de cellules maintenues dans un premier temps dans l'obscurité, puis soumises à la lumière blanche pendant deux heures et enfin remises dans l'obscurité. Comme nous l'avons déjà vu, la densité optique ralentit et se stabilise lorsque les cellules sont exposées à la lumière blanche : les cellules meurent. Mais la mort n'est pas spontanée si bien que des cellules sont encore vivantes. Le retour à l'obscurité arrête la production de ROS permettant aux cellules « survivantes » de se diviser : la croissance reprend.

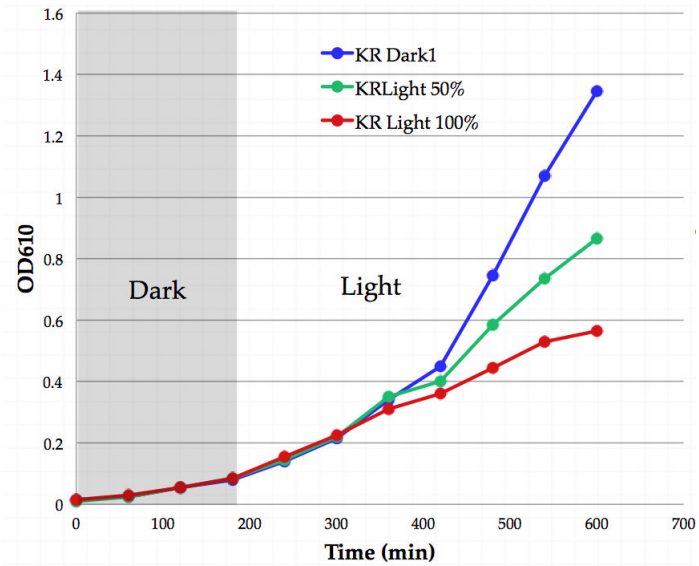


FIGURE 12.4. – **La mort des bactéries par KillerRed dépend de l'intensité de la lumière** Nous nous intéressons aux variations de l'intensité lumineuse sur la mort des bactéries par KillerRed. On suit la densité optique de trois populations exprimant KillerRed mais chacune est soumise à une intensité lumineuse différente : 0% (en bleu), 50% (en vert) et 100% (en rouge). On constate que plus l'intensité lumineuse est forte, plus la croissance est ralentie. Il semble donc possible de moduler les effets de KillerRed (et des ROS) sur la croissance bactérienne en variant l'intensité lumineuse de la lumière blanche.

que de cellules qui meurent. Un tel comportement peut-il être obtenu avec une intensité d'illumination intermédiaire entre le tout (100%) ou rien (0%) ?

Après une période d'obscurité comme dans les expériences précédentes, on illumine une culture de cellules exprimant KillerRed à différentes intensités : 0, 50 et 100%. 120 min après le début de l'illumination, les cellules exposées à 50% d'intensité ont une densité optique intermédiaire entre les deux extrêmes (0 et 100%). On n'atteint pas un équilibre. Néanmoins on montre que l'on peut contrôler la croissance d'une population bactérienne exprimant KillerRed en modulant l'intensité de la lumière blanche (voir Figure 12.4).

Le maintien du nombre de cellule vivante à une valeur donnée est plus complexe. Nous avons vu que KillerRed permettait de tuer progressivement des bactéries grâce à la lumière blanche. Mais ce processus dépend de l'intensité lumineuse appliquée ; si bien qu'un retour à l'obscurité s'accompagne d'une reprise de la croissance. Il paraît donc que des paramètres comme la maturation de KillerRed, les capacités de réparation de la cellule, les concentrations de KillerRed ou de ROS, le photoblanchiment et les délais observés jouent un rôle non négligeable. La prochaine étape consiste à réunir toutes ces informations dans un modèle mathématique pour éventuellement prédire comment maintenir le nombre de cellule vivante constant au cours du temps.

12.2. Vers le contrôle du nombre de cellule vivante par la lumière

Notre objectif consiste à cette étape du projet à développer un modèle mathématique permettant de prédire comment l'ordinateur (ou l'utilisateur) doit physiquement intervenir sur la population de bactérie pour obtenir un nombre de cellule vivante constant au cours du temps. La densité optique et la fluorescence seront les entrées du modèle ; et l'intensité de la lumière blanche en sera la sortie.

12.2.1. Construction du modèle mathématique

Le modèle doit commencer par prédire le nombre de cellule vivante C au cours du temps. On obtient :

$$\frac{dC}{dt} = rC - kIK \tag{12.1}$$

où :
- r est le taux de croissance
- k est la toxicité de KillerRed
- I est l'intensité de la lumière blanche
- K est la quantité de KillerRed fluorescente dans la cellule
- rC rend compte de la division cellulaire
- kIK correspond aux cellules vivantes tuées par KillerRed et la lumière

On constate que l'évolution de C dépend de K. Or ce dernier évolue aussi au cours du temps. Son évolution se traduit mathématiquement par

$$\frac{dK}{dt} = aC - bIK\text{-}kI\frac{K^2}{C} \tag{12.2}$$

où :
- a est le taux de production de KillerRed par bactérie
- b est l'efficacité du photoblanchiment
- aC représente la production de KillerRed
- bIK est la quantité de KillerRed photoblanchie (perte de la fluorescence)
- $kI\frac{K^2}{C}$ est la quantité de KillerRed contenue dans les cellules mortes

C et K sont des variables qu'on peut difficilement mesurer contrairement à la densité optique et la fluorescence de la population. Néanmoins ces deux derniers paramètres ne distinguent pas les cellules vivantes des cellules mortes. Il est cependant nécessaire d'en prendre compte car les cellules mortes ne contribuent plus à la croissance et les protéines

KillerRed piégées dans ces cellules ne participent plus à diminuer la densité optique. Il faut donc ajouter à notre modèle deux équations supplémentaires pour suivre l'évolution de la concentration de cellule morte D et de KillerRed K_D dans ces mêmes cellules :

$$\frac{dD}{dt} = kIK \tag{12.3}$$

$$\frac{dK_D}{dt} = kI\frac{K^2}{C} - bIK_D \tag{12.4}$$

Il en résulte que la densité optique $(C+D)$ et la fluorescence $(K+K_D)$ peuvent s'écrire :

$$\frac{d(C+D)}{dt} = rC \tag{12.5}$$

$$\frac{d(K+K_D)}{dt} = aC - bI(K+K_D) \tag{12.6}$$

La densité optique est alors proportionnelle au nombre de cellules vivantes. Ainsi, une croissance linéaire caractérise une population constante. La production de cellules vivantes est équivalente à la proportion de cellules qui meurent. On émet, ici, l'hypothèse que les cellules mortes et les cellules vivantes ont la même densité optique dans la mesure où KillerRed n'entraîne pas la lyse des cellules. La fluorescence quant à elle ne dépend plus que de la production de KillerRed et de son photoblanchiment.

Bien que le modèle permette de retrouver les données expérimentales pour la densité optique, il n'est pas adapté pour les données de fluorescence (voir Figure 12.5). Ceci montre que des mécanismes supplémentaires doivent être pris en compte. Toutefois la résolution de ces équations révèlent la possibilité de stabiliser le nombre de cellule vivante par une intensité constante I_0.

$$I_0 = \frac{r^2}{ak - rb} \tag{12.7}$$

On enrichit le modèle en prenant en compte

i) la maturation de KillerRed qui permet à la protéine de devenir fluorescente (mise en place du chromophore)

ii) l'accumulation des lésions causées par les ROS au sein de la cellule. En effet, nous avons considéré jusqu'à maintenant que les ROS tuaient immédiatement une partie de la

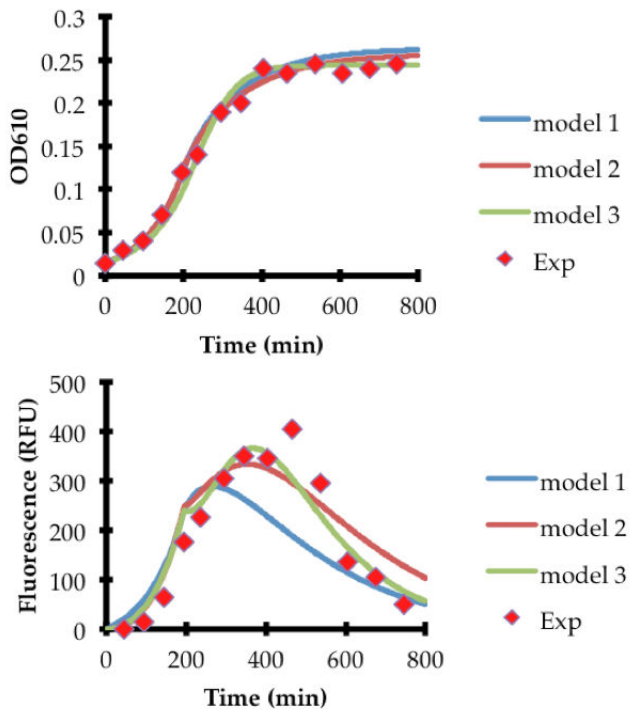


FIGURE 12.5. – **Les trois étapes de la construction du modèle mathématique** Un modèle mathématique est nécessaire pour prédire l'intensité lumineuse à laquelle une population bactérienne doit être exposée pour atteindre et maintenir un nombre de cellules vivantes défini. Nous avons à notre disposition des données expérimentales qui nous permettent de suivre l'évolution de la population bactérienne : la densité optique et la fluorescence. Avant d'utiliser le modèle mathématique pour prédire l'intensité lumineuse, il faut commencer par le valider en le confrontant aux données expérimentales. Le meilleur modèle est celui qui reste fidèle aux données (carré rouge). Le modèle 1 (en bleu) prédit bien la densité optique mais sous-estime la fluorescence. Le modèle 2 (en rouge) évolue en prenant en compte la maturation de la protéine KillerRed. L'ajustement à la densité optique reste correcte mais cette fois-ci la fluorescence est sur-estimée. Le modèle 3 (en vert) est le meilleur compromis obtenu à ce jour. Nous y avons ajouté un terme qui considère que l'effet de KillerRed observé à un instant t est la combinaison d'un effet immédiat et d'un effet résiduel d'un temps antérieur qui s'estompe au cours du temps. Ce modèle prédit aussi bien la densité optique que la fluorescence. Nous le validons : il peut être utilisé pour prédire les intensités.

population sans prendre en compte que ces effets pouvaient perdurer un certain temps. Nous considérons que la cellule n'est pas capable de réparer instantanément toutes les lésions qui s'accumulent et qui les mènent à la mort. Autrement dit une concentration de KillerRed $K(u)$ à un instant u donné, illuminée par une lumière blanche d'une intensité $I(u)$, affecte la croissance cellulaire à un instant t plus tard que u. Ces effets se dissipent selon $e^{-p(t-u)}$. On obtient alors les équations suivantes :

$$\frac{dC}{dt} = rC - \int_{u=0}^{t} k' I(u)K(u)e^{-p(t-u)}du \tag{12.8}$$

$$\frac{dK_i}{dt} = aC - kI\frac{K_i^2}{C} - mK_i \tag{12.9}$$

$$\frac{dK_m}{dt} = -kI\frac{K_m^2}{C} - bIK_m + mK_i \tag{12.10}$$

$$\frac{dD}{dt} = kIK_m \tag{12.11}$$

$$\frac{dK_{Di}}{dt} = kI\frac{K_i^2}{C} - mK_{Di} \tag{12.12}$$

$$\frac{dK_{Dm}}{dt} = kI\frac{K_m^2}{C} - bIK_{Dm} + mK_{Di} \tag{12.13}$$

où :

- p est la capacité de la cellule à réparer ses lésions en une minute
- K_m est la concentration de KillerRed mature dans les cellules vivantes
- K_i est la concentration de KillerRed immature dans les cellules vivantes
- K_{Dm} est la concentration de KillerRed mature dans les cellules mortes
- K_{Di} est la concentration de KillerRed immature dans les cellules mortes
- m est le taux de maturation de la protéine KillerRed

Les modifications successives ont permis d'obtenir un modèle mathématique plus fidèle aux données expérimentales aussi bien pour la densité optique que pour la fluorescence. Il nous reste à présent à déterminer la valeur des paramètres r, a, b, m, k et l. Le paramètre l correspond au taux de réparation de la cellule pendant un pas de temps τ. Il est lié à p par

$$p = \frac{ln(l)}{\tau} \tag{12.14}$$

Les paramètres sont déterminés par un algorithme génétique qui « sélectionne » le jeu de paramètres fournissant la « meilleure adaptation » c'est-à-dire l'écart le plus petit entre les résultats de la simulation et les données expérimentales. Sur les cinq expériences menées *in silico*, les paramètres b, k et l présentent une grande variabilité. Ils devront être déterminés pour chaque expérience. Pour les trois autres paramètres, on utilise la valeur moyenne de ces cinq expériences. On a ainsi : $r = 8,3.10^{-3}\ min^{-1}$, $a = 140\ RFU.OD^{-1}.min^{-1}$ et $m = 6,3.10^{-3}\ min^{-1}$.

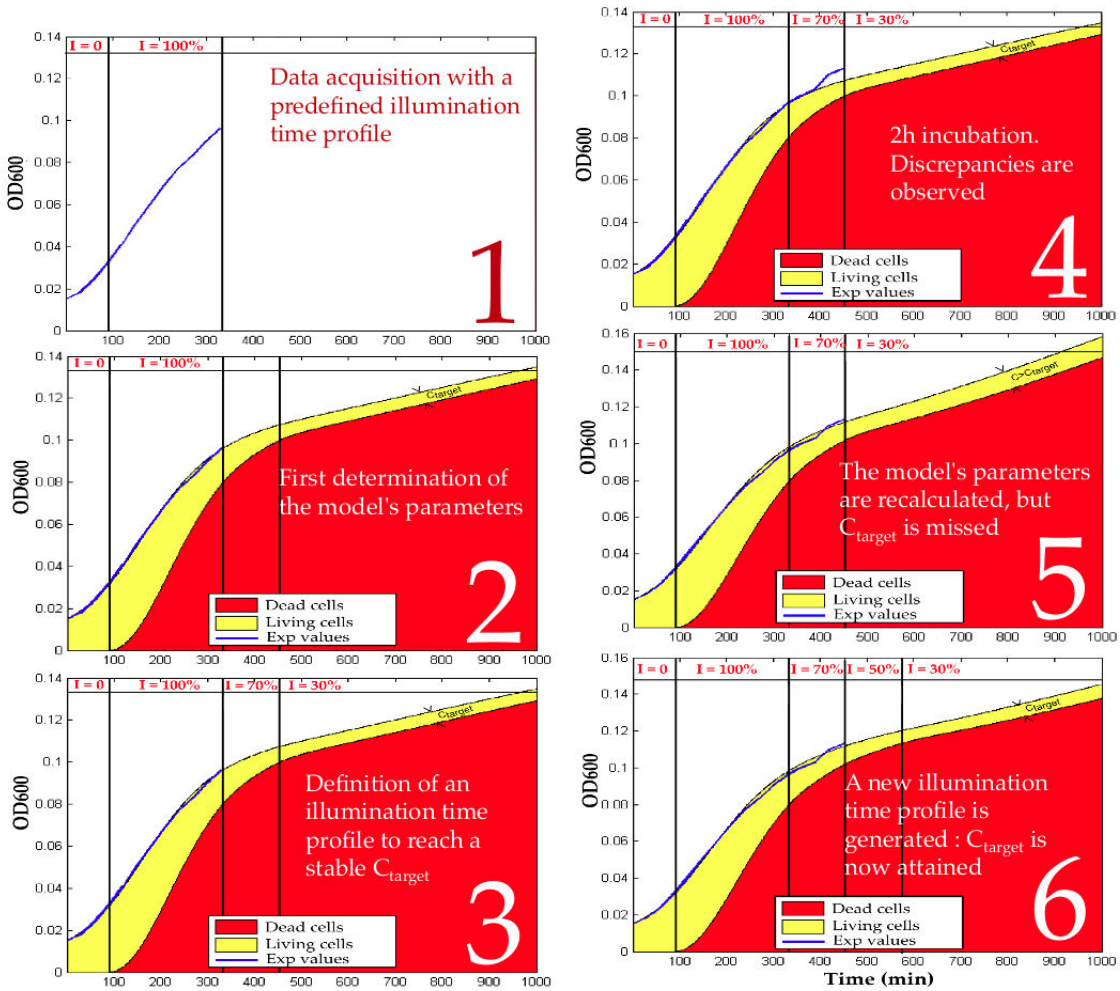
Les paramètres b, k et l sont déterminés au début de l'expérience. Les cellules sont maintenues à l'obscurité pour qu'elles puissent se diviser et produire la protéine KillerRed. Nous n'avons alors que des cellules vivantes. Au bout de 100 min, les cellules sont soumises à une illumination maximale. Plus la période d'illumination est longue et plus grande sera la précision sur les trois paramètres qu'on cherche à fixer. Une fois ces paramètres obtenus, le modèle peut être calibré pour prédire une intensité lumineuse à laquelle la population doit être soumise. Si l'intensité est trop forte, on tue les cellules. Si l'intensité est trop faible, les cellules adoptent une croissance exponentielle. Mais comme nous l'avons vu précédemment, il existe malgré tout une intensité lumineuse qui autorise une croissance linéaire, et donc un nombre de cellule vivante constant. C'est cette intensité qui constitue la sortie du modèle. L'utilisateur (ou l'ordinateur) applique alors l'intensité recommandée et il suit la réponse de la population bactérienne à travers les données de densité optique et de fluorescence prélevées de manière régulière. Si ces données s'écartent des prédictions, il faut déterminer à nouveau une valeur pour ces trois paramètres à partir de ces nouvelles informations, puis prédire une nouvelle valeur d'intensité à appliquer. Il est temps à présent de tester les prédictions de notre modèle en appliquant cette procédure.

12.2.2. Validation du modèle

Nous réalisons deux expériences dont le but est de maintenir le nombre de cellules vivantes à une concentration fixe. Nous nous focalisons sur le suivi de la densité optique. En effet, comme nous l'avons une croissance linéaire de la densité optique signifie que le nombre de cellules vivantes est constant. La configuration de notre équipe iGEM fait que les expériences sont menées à Grenoble, tandis que l'exploitation des données et du modèle sont élaborées à Saint-Etienne. Un échange permanent entre ces deux villes est nécessaire pour suivre l'évolution de la population bactérienne et savoir quelle intensité lumineuse appliquer. Pour l'expérience décrite ci-dessous, nous fixons arbitrairement la densité optique des cellules vivantes à 0,02. Ceci constitue l'objectif à atteindre.

Les paramètres b, k et l sont déterminés en maintenant dès le début de l'expérience les cellules dans l'obscurité (ici, pendant 1.5h), puis en les soumettant pendant 4h à la lumière blanche avec une intensité maximale (100%). On procède alors à l'ajustement des données expérimentales à l'aide de notre modèle mathématique pour obtenir la valeur des paramètres recherchés.

Une fois calibré, le modèle prédit que pour atteindre l'objectif fixé, l'intensité de la lumière blanche doit être à 30% de l'intensité maximale (voir Figure 12.6).



Légende à la page suivante

FIGURE 12.6 *(prev. page)* – **Démarche pour contrôler le nombre de cellules vivantes** On souhaite maintenir le nombre de cellules vivantes constant à une densité optique cible C_{target}. Nous présentons, ici, les six premières étapes de l'expérience de validation de notre modèle. (1) Les données expérimentales de la densité optique (en bleu) permettent de suivre l'évolution du système au cours du temps. (2) Le modèle possède des paramètres qui doivent être déterminés au début de l'expérience selon un schéma prédéfini : une période à l'obscurité (0%) suivie d'une exposition à la lumière blanche avec une intensité maximale (100%). Les cellules à l'obscurité sont vivantes (en jaune). L'exposition à la lumière augmente la proportion de cellules mortes (en rouge). (3) Une fois calibré sur les données expérimentales, le modèle prédit un profil d'intensité pour atteindre et maintenir la C_{target}. Une illumination à 70% pendant deux heures puis une illumination à 30% devraient suffire. (4) Les données expérimentales s'éloignent des prédictions. (5) Les paramètres du modèle sont re-déterminés avec ces nouvelles données. Mais si on maintient l'exposition à 30%, la C_{target}n'est plus atteinte. (6) Un nouveau profil d'illumination est alors prédit pour atteindre la C_{target}. Le modèle prédit la nécessité d'illuminer à 50% pendant deux heures avant d'illuminer à 30%. On procède ainsi jusqu'à la fin de l'expérience : confrontation des données expérimentales aux prédictions et corrections de l'intensité.

Toutefois, le temps nécessaire pour atteindre l'objectif à cette intensité est bien trop long. Nous souhaitons que l'objectif soit atteint plus rapidement pour éviter une éventuelle contamination ou l'épuisement des nutriments. Nous décidons alors d'appliquer une intensité à 70% du maximum pendant deux heures, puis de maintenir la population avec une lumière blanche à une intensité de 30%. Les données expérimentales montrent que l'illumination à 30% n'est pas suffisante pour obtenir une croissance linéaire. La densité optique s'écarte des prédictions. Nous réutilisons le modèle avec ce nouveau jeu de données pour obtenir un nouveau plan de travail. Le modèle préconise d'appliquer une intensité de 50% pendant deux heures avant d'illuminer à 30%. Nous procédons ainsi jusqu'à la fin de l'expérience en corrigeant si besoin les intensités d'après les données expérimentales et les prédictions du modèle.

Nous avons réussi à maintenir la densité optique linéaire pendant quatre heures consécutives. Cette observation est confirmée par la détermination des UFC (voir Figure 12.7). Notre modèle est validé d'autant plus que l'objectif fixé initialement est atteint : la population

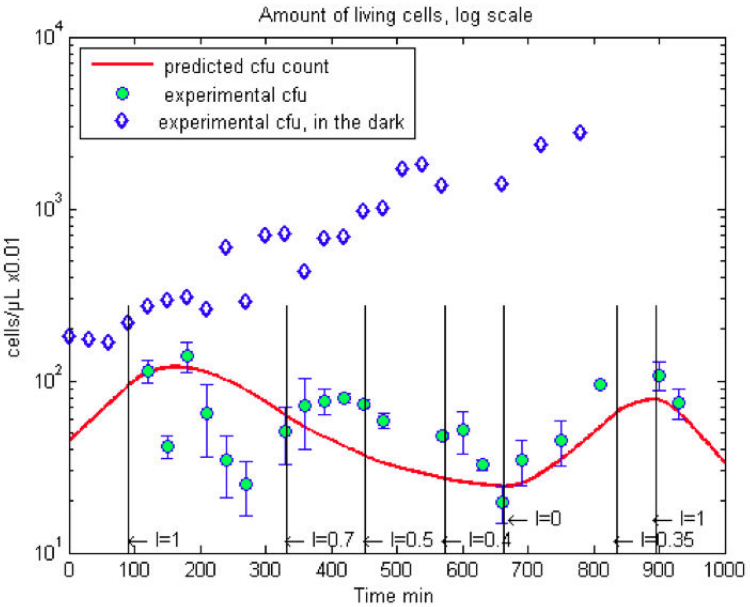


FIGURE 12.7. – **Les prédictions du modèle permettent de maintenir le nombre de cellules vivantes constant grâce à la lumière** L'expérience de validation du modèle s'achève par la détermination des UFC. Le nombre de cellules vivantes a été maintenu constant de 360 min à 630 min (point vert) alors que pendant ce même laps de temps la population bactérienne maintenue à l'obscurité augmentait.

est restée constante à 0,02. Au cours de l'expérience, des corrections de l'intensité ont néanmoins été nécessaires. Notre modèle sous sa forme actuel permet un contrôle du nombre de cellules vivantes dans une population. Toutefois des améliorations semblent encore nécessaires pour optimiser la détermination des intensités et éviter les écarts observés entre les prédictions et les données expérimentales.

12.3. Conclusions et Perspectives

Notre projet consistait à contrôler à façon le nombre de cellules vivantes au sein d'une population bactérienne. Il est facile de laisser croître une population ou de la faire diminuer. En revanche, la maintenir stable pendant plusieurs heures s'avère être un véritable challenge. Cela est toutefois possible en contrôlant des paramètres auxquels la croissance bactérienne est sensible comme l'apport en nutriment, le pH du milieu ou encore la température. Mais nous voulions simplifier toute la logistique nécessaire en n'ayant recours qu'à la lumière sans modifier le milieu ou les conditions de culture. Nous avons alors développer TalkE'coli.

TalkE'coli est la réunion entre un ordinateur et le vivant. Il se présente sous la forme d'une boîte facilement adaptable à n'importe quel incubateur dans un laboratoire. L'utilisateur déposerait tout simplement une fiole contenant le milieu inoculé à l'intérieur de la boîte et préciserait à l'ordinateur l'objectif de cellules vivantes à atteindre. L'ordinateur prendrait alors la relève en surveillant la croissance de la population, en élaborant le meilleur plan pour atteindre l'objectif fixé et en agissant en conséquence sur la population. L'intégralité du système fonctionnerait en autonomie. Ceci implique que les bactéries présentes dans le milieu possèdent un réseau génétique pour interpréter les ordres de l'ordinateur ; et augmenter, diminuer ou stabiliser leur croissance (voir Figure 12.8).

Il existe des modules qui permettent d'agir sur la transcription d'un gène-cible en réponse à la réception d'un signal lumineux. Toutefois il reste à déterminer le gène-cible. Nous nous sommes orientés vers l'exploitation du gène KillerRed. Ce dernier code pour une protéine fluorescente qui sous l'effet de la lumière blanche génère des ROS. Les ROS sont connus pour causer des lésions dans l'ADN et dans les protéines. En l'occurrence, il est décrit dans la littérature que dans certaines conditions d'intensité lumineuse, 96% d'une population bactérienne peut être tuer en dix minutes. KillerRed se présente donc comme une bonne cible à condition de pouvoir en moduler ses effets. Pour avoir un nombre de cellules vivantes constant, il faut alors déterminer les conditions qui permettent d'avoir autant de cellules qui apparaissent que de cellules qui meurent sous l'effet de KillerRed.

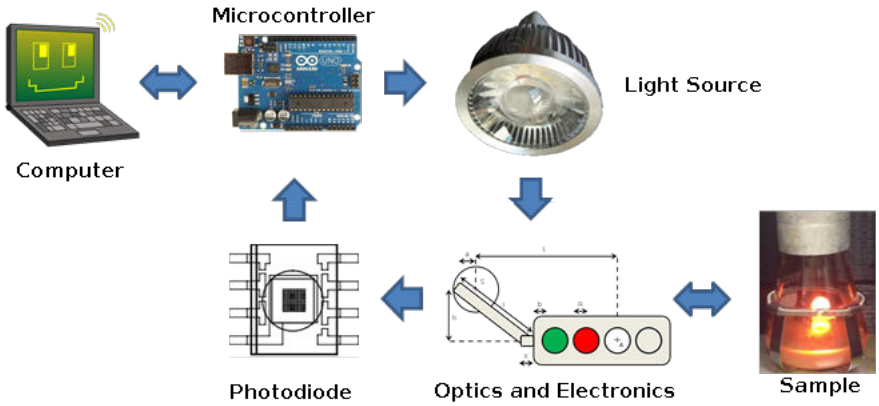


FIGURE 12.8. – **Fonctionnement de TalkE'coli** La lampe LED émet de la lumière blanche qui traverse un filtre d'excitation vert. Le rayon est alors dirigé sur la population bactérienne où les cellules contiennent la protéine KillerRed. Excitée par la lumière verte, KillerRed émet un rayonnement dans le rouge. Ce rayonnement est capté par la photodiode qui traduit le signal lumineux en un signal électrique. L'ordinateur peut ainsi suivre l'évolution de la population bactérienne en interprétant la fluorescence. Un servomoteur permet de changer le filtre. La culture peut ainsi être également excité par une lumière rouge qui induit la production de KillerRed. En effet, la cellule est génétiquement modifiée de sorte à produire la protéine KillerRed quand un signal lumineux rouge est détecté. Finalement, la population peut également être directement illuminée par de la lumière blanche dont l'ordinateur peut faire varier l'intensité. On tue alors plus ou moins les cellules. C'est ainsi que TalkE'coli contrôle le nombre de cellules vivantes à façon au sein d'une fiole. Une vidéo de démonstration est disponible à l'adresse **www.youtube.com/watch ?v=OY0-y8JZme0**

Nous développons un modèle mathématique basé sur notre caractérisation du comportement de KillerRed. Le modèle prédit le nombre de cellules vivantes en tenant compte de la production de KillerRed, de sa toxicité, des capacités des cellules à réparer les lésions causées par les ROS. Il révèle la possibilité de maintenir le nombre de cellules vivantes constant en soumettant la population à de la lumière blanche avec une intensité donnée. En alimentant le modèle avec les données expérimentales (densité optique et fluorescence), le modèle prédit une valeur pour cette intensité. Toutefois, certains paramètres du modèle doivent être déterminé au début de chaque expérience. Une routine visant à déterminer ces paramètres est alors mise en place. Nous avons validé le modèle en stabilisant pendant quatre heures le nombre de cellules vivantes à une valeur objectif fixée au début de l'expérience. Certaines corrections ont été nécessaires au cours de l'expérience notamment dans le but d'atteindre plus rapidement notre objectif. Bien qu'une optimisation semble nécessaire, la preuve de concept est là : il est possible de maintenir une population bactérienne constante avec la lumière.

Dans cette preuve de concept, l'utilisateur intervient pour obtenir les données expérimentales, déterminer l'intensité lumineuse et l'appliquer à la population. La prochaine étape consiste à rendre notre système pleinement autonome. Si la boîte de TalkE'coli est équipée et prête à être utilisée, deux axes restent cependant encore à travailler : i) le réseau génétique et ii) le développement d'un programme Java pour automatiser la routine.

Le gène *KillerRed* doit être intégrer dans un réseau génétique plus large pour contrôler la production et la dégradation de cette protéine par la lumière, et donc la production des ROS.

La preuve de concept a été effectuée en se basant essentiellement sur les données de la densité optique. Pour rendre le système autonome, il faut tester si le modèle permet un contrôle du nombre de cellule en suivant uniquement les données de fluorescence. TalkE'coli est en effet capable de détecter la fluorescence émise par une population bactérienne.

De plus, lors des comptages des UFC, nous avons remarqué que certaines colonies étaient rouges et d'autres blanches. La quantité de colonie blanche augmentent progressivement au cours de l'expérience. Nous supposons que ces cellules ont perdu le plasmide exprimant KillerRed peut être par la dégradation de l'antibiotique censé le maintenir dans la cellule. Cette observation peut expliquer nos difficultés à pouvoir avoir des prédictions qui suivent les données expérimentales vers la fin de l'expérience. Lorsqu'on mesure la densité optique, on mesure aussi bien les cellules mortes, que les cellules vivantes exprimant KillerRed (rouge) ou ne l'exprimant pas (blanche). Néanmoins, ces cellules apportent un biais car elles ne sont plus sensibles aux effets de KillerRed. Il est nécessaire de caractériser plus précisément l'émergence de cette population pour la limiter ou la prendre en compte dans nos prédictions.

Ceci lève aussi une autre question relative au devenir des cellules qui ont subi un traitement par KillerRed. Nous avons vu qu'elles pouvaient retrouver une croissance exponentielle par un retour dans l'obscurité. Mais le fait de les avoir soumises à un tel stress a peut être altéré leur fonctionnement. Nous avions prévu de faire des tests pour évaluer leurs capacités à être transformée avec un plasmide et à produire une protéine d'intérêt. Notre système se présente malgré tout comme un modèle propice à l'étude des effets des ROS sur la cellule et des mécanismes de résistance à ce stress. TalkE'coli offre la possibilité de maîtriser le niveau des ROS en modulant l'expression de KillerRed dans les cellules.

Quatrième partie .

Discussion

13. L'acétate, un problème qu'il reste à comprendre

L'acétate nuit à la croissance. C'est indéniable ! En revanche il est difficile de faire la part des choses quant aux causes de cette nuisance. A ma connaissance, il n'y a aucun article ou chapitre de livre qui décrive précisément ce qu'il se passe lorsque l'acétate est ajouté à une culture d'*E. coli* au cours d'une croissance sur glucose et en aérobie. Si on prend des articles actuels faisant l'état de l'art sur le sujet, les mêmes références sont citées à chaque fois. L'introduction de ce manuscrit de thèse ne fait pas exception à la règle. Une des plus récentes références généralement citées date de 2002. Dans cet article, Roe (Roe et al., 2002) avance que l'acétate perturbe la biosynthèse de plusieurs acides aminés, essentiellement la méthionine. Ce que je trouve intéressant dans cet article, c'est le soin de l'auteur à dire que malgré toutes les informations que nous possédons sur le sujet, dont sa contribution, la lumière n'est pas encore faite sur l'impact de l'acétate sur la croissance.

L'acétate, sous sa forme protonée, traverse la membrane de la cellule et se dissocie dans le cytoplasme en un anion acétate et en un proton... Cette phrase sonne maintenant comme un leitmotiv tant elle introduit la plupart des articles touchant de près ou de loin à l'inhibition de la croissance par l'acétate. Le transport des protons par l'acétate, l'acidification du milieu ou encore l'accumulation des anions ont ainsi déjà étudiés. Mais des questions subsistent.

Une des stratégies mises en place par la cellule pour résister aux effets de l'acétate serait de le consommer. Comme l'acétate peut être métabolisé, il peut rompre l'équilibre au niveau de l'acétyle-CoA et perturber ainsi l'ensemble du métabolisme central. La croissance sur glucose serait alors diminuée. Au cours de cette thèse, nous avons essayé de déterminer la part du métabolisme de l'acétate dans l'émergence de l'inhibition de la croissance de *E. coli*.

Pour cela, nous avons construit une collection de mutants des voies de la production et/ou de la consommation de l'acétate. Certains de ces mutants sont déjà décrits dans la littérature pour leur capacité à croître dans un milieu avec acétate comme seule source de carbone ou pour leur capacité à produire moins d'acétate lors d'une croissance sur glucose. Cette thèse est, à notre connaissance, la première étude qui réunit jusqu'à six mutants différents du métabolisme de l'acétate dans un même contexte : une croissance sur glucose avec l'addition d'acétate en milieu de phase exponentielle. Ces mutants ont

ainsi pu être caractérisés avant et après l'addition d'acétate, puis comparés entre eux, sur la base de leur taux de croissance et de leurs produits de sécrétion. Ces informations nous renseignent sur l'état de la cellule suite à l'addition d'acétate.

13.1. La construction difficile du mutant △acs

La première étape de ce projet de thèse a consisté à construire la collection de mutants. Les techniques de modification du chromosome étaient déjà présentes au laboratoire. Nous avions aussi en notre possession trois simples mutants *pta*, *ackA* et *acs* issus de la collection Keio (Baba et al., 2006). Ces derniers se caractérisent par la substitution du gène d'intérêt par une cassette contenant un gène de résistance à la kanamycine. Cette cassette peut être retirée aboutissant à la formation d'une cicatrice sur le chromosome. Nous avons alors vérifié chacun de ces mutants par PCR et par séquençage pour valider la présence de la cicatrice. Les résultats indiquaient que tous les mutants possédaient la bonne structure. Le mutant *acs* a par la suite servi de base à la construction des autres mutants Δpta Δacs, Δpta Δacs $\Delta ackA$ et Δpta Δacs $\Delta ackA$ $\Delta poxB$.

Une fois tous ces mutants construits, nous avons suivi leur croissance sur glucose sans ajouter d'acétate au cours de la phase exponentielle. Ceux qui portaient une suppression du gène Δacs avaient un taux de croissance plus faible que la souche sauvage BW25113. Castaño-Cerezo (Castaño-Cerezo et al., 2009) avait publié un article dans lequel la souche sauvage et le mutant Δacs de la collection Keio avaient le même taux de croissance (0.74 h^{-1}). Cette valeur est de l'ordre de grandeur du taux de croissance que nous obtenons pour le sauvage (voir Figure 9.4). Les conditions expérimentales étant très similaires, la seule différence majeure résidait dans la présence/absence de la cassette kanamycine. Castaño-Cerezo ne l'avait pas supprimé contrairement à nous. En suivant la croissance du mutant Δacs de Keio avec la cassette kanamycine, on retrouvait un taux de croissance similaire à celui de la souche sauvage. Cette expérience indiquait très clairement que le fait d'avoir retiré la cassette kanamycine avait engendré une perte dans la croissance. Tous les mutants Δacs sans la cassette kanamycine que nous avions obtenu au cours de nos différentes tentatives présentaient un déficit systématique de la croissance. Nous avons alors entrepris de construire *de novo* la délétion *acs* en partant de la souche sauvage. Lorsqu'on enlève la cassette, le taux de croissance n'était plus diminué (voir Figure 13.1). Nous avons déduit que le mutant Δacs fourni dans la collection Keio devait très probablement avoir une altération du chromosome indépendamment de la mutation du gène *acs*.

13.2. L'importance des conditions expérimentales.

Les différentes souches utilisées dans notre étude ont un taux de croissance similaire en absence d'acétate. Les souches ayant la voie Pta AckA (voire même PoxB) inactivée ne

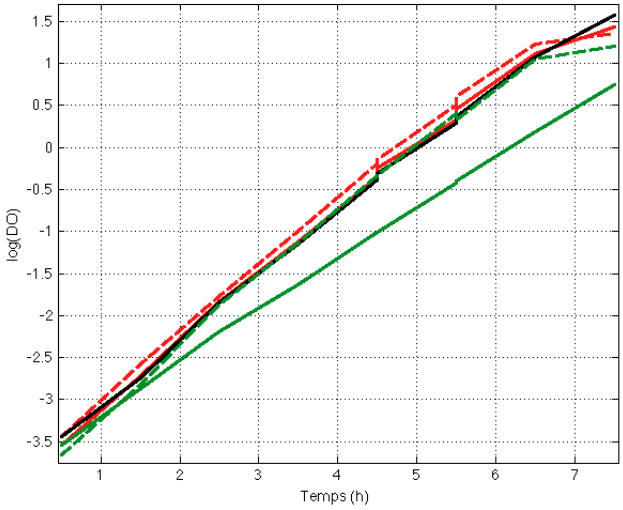


FIGURE 13.1. – **Croissance des différents mutants Δ*acs*** Comparaison de la croissance de la souche sauvage BW25113 (noir), du mutant Δ*acs* de Keio avec la cassette kanamycine (trait vert pointillé), du mutant Δ*acs* de Keio sans la cassette kanamycine (trait vert plein), du mutant Δ*acs* construit *de novo* avec la cassette kanamycine (trait rouge pointillé), du mutant Δ*acs* construit *de novo* sans la cassette kanamycine (trait rouge plein). Les cinétiques ont été réalisées de la même manière pour chacune des souches. Seul le mutant Δ*acs* de Keio sans la cassette kanamycine présente une croissance plus faible.

sont plus capables de produire une grande quantité d'acétate. Le peu d'acétate produit est issu de la biosynthèse des acides aminés. Les cellules compensent alors par la production du lactate et du pyruvate afin de maintenir le niveau d'acétyle-CoA constant. Les mutants Δpta Δacs et Δpta $\Delta ackA$ Δacs présentent ainsi les mêmes profils de sécrétion (voir Figure 9.4 et 9.6). Ici, les conditions expérimentales prennent toute leur importance. Il est décrit que des mutants Δpta $\Delta ackA$ consomment moins bien le glucose ou que la voie PoxB est nécessaire pour garantir une croissance sur glucose en aérobie (Abdel-Hamid et al., 2001; Dittrich et al., 2005b). Pourtant nous n'observons pas de retard de croissance ou des profils de consommation de glucose différents (voir Figure 9.4).

En revanche, d'autres études confirment nos observations comme dans (Castaño-Cerezo et al., 2009). Ceci soulève sans doute une des difficultés que l'on rencontre à mettre la lumière sur la question de l'acétate. Les souches, la composition du milieu, les volumes de culture, le pH ou l'oxygénation sont autant de critères qui influencent la croissance. Chaque laboratoire utilise ses conditions. Il est donc difficile de réunir toutes ces conclusions dans un seul et même schéma expliquant les causes de l'inhibition de la croissance par l'acétate. Certaines explications relatives à l'acidification du milieu par exemple n'ont du sens que pour des pH compris entre 2 et 4,5. On imagine très bien que la réponse (expression des gènes et changements métaboliques) mise en place par la cellule à des pH si bas ne correspond pas à ce qu'il se passe à un pH neutre.

Le choix des conditions expérimentales nous a pris un peu plus d'un an. Nous avions commencé par réaliser nos cinétiques dans des microplaques à 96 puits. Le volume de culture n'excédait pas les 150 µl. Il était difficile d'interpréter les résultats, car nous ne savions pas ce que nous observions. En effet, pour une même souche et une même condition, on avait plusieurs régimes de croissance possibles que nous avons attribué à l'état d'oxygénation de la culture (aérobie, microaérobie, anaérobie...). Nos différents mutants avaient des taux de croissances différents. A l'époque, je me posais la question de savoir comment j'allais pouvoir étudier l'effet de l'acétate avec des souches qui avaient déjà des croissances différentes en absence d'acétate. Nous avons ainsi décidé de travailler dans des fioles où les volumes sont plus importants (50 ml) et où les conditions sont plus facilement maîtrisées (pO_2 et pH) (voir Figure 9.1). La phase exponentielle de croissance était clairement identifiée. Ces changements ont d'ailleurs fait que toutes les souches aient le même taux de croissance en absence d'acétate (voir Figure 9.4). L'étude des effets de l'addition de l'acétate devenait plus simple car les souches pouvaient à présent être comparées en elles.

13.3. La voie AckA cause environ 20% de l'inhibition de la croissance par l'acétate.

L'addition de 128 mM d'acétate mène à l'émergence de deux groupes de mutants : i) ceux qui possèdent le gène *ackA* et dont la croissance sur glucose est inhibée à 50% et ; ii) ceux qui n'ont pas le gène *ackA* et dont la croissance sur glucose est inhibée à 40% (voir Figure 9.5). La différence n'est que de l'ordre de 10% si bien que pour être sûr que deux groupes bien distincts existent, nous avons reconstruit le gène *ackA* sur le chromosome du mutant Δpta $\Delta ackA$ Δacs. On obtient alors un mutant Δpta Δacs dont l'addition d'acétate inhibe à nouveau environ 50% de la croissance. La voie AckA joue ainsi un rôle dans la toxicité de l'acétate. Dans les souches Δpta Δacs et Δpta $\Delta ackA$ Δacs, la voie Pta est inactivée. On en déduit qu'une partie de l'acétate ajouté dans le milieu de culture est transformé par l'enzyme AckA en acétyle-phosphate. A travers sa capacité à phosphoryler ou à acétyler, l'acétyle-phosphate peut modifier l'expression des gènes ou l'activité enzymatique. Nous avons alors essayé de voir si la concentration d'acétyle-phosphate augmentait lors de l'addition d'acétate dans le milieu.

13.4. La quantification de l'acétyle-phosphate.

L'acétyle-phosphate peut être quantifié de manière indirecte en utilisant un gène rapporteur dont l'expression dépend du promoteur *glnAp2* (Wolfe, 2005). Nous avons ainsi cloné le promoteur *glnAp2* devant un gène codant une protéine fluorescente GFP. On s'attend à ce que la fluorescence suive la concentration d'acétyle-phosphate. L'expérience a été menée en microplaque pour la souche BW25113 sauvage et pour les mutants Δpta Δacs et Δpta $\Delta ackA$ Δacs. Les résultats obtenus n'étaient pas concluants : le niveau de fluorescence était faible dans chacun des cas. Cela peut s'expliquer soit parce qu'il n'y a pas d'accumulation d'acétyle-phosphate, soit parce que la méthode n'est pas adaptée pour le quantifier. En principe, la méthode nécessite l'inactivation du gène *glnL* afin que l'acétyle-phosphate soit l'activateur principal du promoteur. Ici, nous ne sommes pas tellement dans une situation où le promoteur serait activé par un autre partenaire vu qu'il n'y a pas de fluorescence nette mesurée. Nous n'avons pas jugé qu'il était important d'inactiver ce gène pour la quantification. L'activation par l'acétyle-phosphate mène probablement à une fluorescence trop faible pour être détectée par l'appareil.

13.5. L'acétate perturbe faiblement le métabolisme central.

Dans la figure 9.5, on peut être un peu plus pointilleux quant à l'existence de seulement deux groupes : avec ou sans le gène *ackA*. En effet, il me semble que l'inactivation du gène

pta s'accompagne d'une « légère » amélioration du taux de croissance. Nous pourrions reconstruire le gène *pta* dans le mutant Δpta Δacs pour voir si cette légère différence a un sens. Chez le sauvage, l'acétate ajouté dans le milieu emprunterait la voie Pta AckA augmentant la concentration d'acétyle-phosphate d'une part et d'acétyle-CoA d'autre part. Dans un mutant Δpta Δacs (et très probablement dans un simple mutant Δpta), l'acétate ne pourrait être transformé qu'en acétyle-phosphate. Finalement, un mutant Δpta $\Delta ackA$ Δacs ne pourrait transformer l'acétate ajouté au milieu ni en acétyle-CoA, ni en acétyle-phosphate ; ce qui mènerait à une meilleure croissance.

L'addition d'acétate pourrait perturber le métabolisme central en rompant l'équilibre au niveau de l'acétyle-CoA (voir 2.1). Cependant nos quantifications de métabolites en présence d'acétate ne révèlent pas de grands changements dans les profils de sécrétion mise à part une production de pyruvate plus importante pour le mutant $\Delta ackA$ Δpta Δacs que nous n'expliquons pas avec les données en notre possession (voir Figure 9.6). L'essentiel de l'action du métabolisme de l'acétate sur la croissance serait donc lié à la régulation de l'expression des gènes ou de l'activité enzymatique par l'acétyle-phosphate. Toutefois notre étude montre que près de 80% de l'inhibition de la croissance par l'acétate s'exprime autrement que par la voie Pta AckA.

Kirkpatrick (Kirkpatrick et al., 2001) suggérait que l'acétyle-CoA pouvait être un signal de la densité des cellules au sein d'une population et qu'il serait un signal de l'entrée en phase stationnaire de croissance. Nous venons de voir qu'une éventuelle accumulation d'acétyle-CoA ne pouvait pas expliquer tout l'effet de l'acétate sur la croissance de *E. coli*. Lors de l'addition d'acétate, la croissance de la cellule diminue mais elle continue à transformer efficacement le glucose consommé en biomasse (voir Figure **??**). Ceci confirme qu'il n'y a pas de perte d'énergie associée à un découplage par l'acétate. Nous pouvons conclure que, contrairement à l'explication la plus répandue, l'acétate n'agit pas comme un agent découplant (voir chapitre 3). De plus, au cours de nos cinétiques, le pH externe diminue de moins d'une unité de pH (voir Figure 9.1) si bien que le pH interne reste constant car la cellule est capable de tamponner naturellement cette acidification (Russell, 1992). Autrement dit le maintien du pH interne en expulsant des protons ne peut pas non plus représenter une source de perte d'énergie expliquant la diminution du taux de croissance que nous observons dans la figure 9.2. La rupture de l'équilibre des anions au sein du cytoplasme et une régulation de l'activité des enzymes par l'acétate pourraient expliquer la plus grande partie de l'inhibition de la croissance. Les ions acétate remplacent des anions physiologiques comme le glutamate qui ne peuvent plus être utilisés en tant que précurseurs dans différentes voies de biosynthèse. L'acétate inhibe l'activité enzymatique notamment de l'enzyme MetE ce qui rompt la voie de biosynhtèse de la méthionine (Roe et al., 2002). La méthionine ne peut plus être produite. On comprend alors que les processus physiologiques s'en retrouvent perturbés au point de ralentir la croissance. La méthionine représenterait 10% de l'inhibition de la croissance (voir Figure 9.9). Il ne s'agit pas d'un cas à part. En effet, la synhtèse de d'autres acides aminés semblent aussi être perturbées (Roe et al., 1998; Sandoval et al., 2011).

14. Développement d'une souche pour faire face au problème de l'acétate dans l'industrie

L'industrie développe des stratégies pour limiter voire supprimer l'effet de l'acétate sur la croissance et améliorer le rendement de production des usines vivantes. Mais ces méthodes n'exploitent pas tout le potentiel d'une usine vivante. Elles peuvent d'ailleurs être onéreuses, entraîner des changements dans le métabolisme ou conduire à la production de d'autres produits. Comme l'accumulation d'acétate est au coeur du problème, une des approches consiste à retirer l'acétate du milieu de culture par la filtration ou par la dialyse. Toutefois ces procédés s'accompagnent d'une perte de nutriments. A cela s'ajoute une perte du glucose qui continue à être transformé en acétate alors que cette matière carbonée pourrait être dédiée à la synthèse du produit d'intérêt. Nous nous sommes alors demandés s'il n'était pas possible de retirer l'acétate du milieu de culture en s'affranchissant des pertes grâce à la biologie synthétique.

14.1. Le concept

L'idée serait de développer une souche bactérienne synthétique capable de consommer l'acétate malgré la présence du glucose. Cette souche serait co-cultivée avec une usine vivante dans un bioréacteur. L'usine vivante consomme le glucose et produit de l'acétate qui serait utilisé par la souche synthétique comme une source de carbone et d'énergie. La souche synthétique éviterait l'accumulation de l'acétate qui ne pourrait plus nuire à la croissance et au rendement des usines vivantes.

Les deux souches seraient présentes ensemble dès le début de la culture alors qu'il n'y a pas encore d'acétate dans le milieu. Notre souche synthétique doit commencer par consommer le glucose pour pouvoir se divisier le temps que l'acétate soit produit. Elle doit également être capable de sonder son environnement pour identifier la présence de l'acétate et savoir à quel moment elle doit déclencher une réponse la forçant à consommer l'acétate au lieu du glucose.

La répression catabolique se présente comme un frein à la conception de cette souche synthétique. En effet, la cellule possède plusieurs circuits de régulation qui instaurent un

ordre dans la consommation des substrats présents dans le milieu. C'est ainsi que lorsque la cellule détecte la présence du glucose, elle inhibe le transport et la consommation des autres sources de carbone. Les gènes *acs* et *actP* qui codent respectivement pour la consommation et l'entrée de l'acétate sont soumis à cette régulation. C'est pourquoi, lors de la phase exponentielle de croissance alors que le glucose est encore présent, la cellule ne peut pas utiliser l'acétate par la voie Acs.

Deux questions se posent alors i) comment la cellule peut-elle détecter l'acétate dans le milieu externe ? et ii) comment peut-on forcer la cellule à consommer l'acétate bien que le glucose ne soit pas encore épuisé ?

14.2. Conception du réseau : détection de l'acétate externe

Bulter et al. (2004) présente un circuit de communication entre cellules qui utilise l'acétate comme une molécule de signalisation. Le gène *pta* est inactivé mais une production d'acétate est toujours autorisée notamment par la biosynthèse des acides aminés. La voie AckA reste néanmoins active et transforme l'acétate en acétyle-phosphate. Ce dernier phosphoryle NR1 qui induit en retour l'expression du promoteur $glnAp_2$. Or NR2 donne naturellement son groupement phosphate à NR1. L'inactivation du gène *glnL*, qui code pour NR2, est donc nécessaire pour que l'induction du promoteur $glnAp_2$ soit uniquement liée l'acétate présent dans le milieu.

Ceci nous montre que l'acétyle-phosphate peut constituer le signal de la présence de l'acétate dans le milieu externe. De plus, il peut aussi déclencher une réponse en mettant un gène cible sous la dépendance du promoteur $glnAp_2$. L'expression de ce gène cible forcerait la cellule à consommer l'acétate au lieu du glucose. Un mutant Δpta $\Delta glnL$ est alors construit pour servir de châssis ou de support à la construction de notre souche synthétique. Il nous reste à présent à identifier le gène cible. Notre attention s'est alors portée sur le comportement du mutant $\Delta csrA$ qui ne peut plus effectuer la glycolyse et donc consommer le glucose (Timmermans and Van Melderen, 2009). En revanche, le recours à une source de carbone secondaire comme le pyruvate permet à ce mutant de croître. Nous avons vu dans le gène *csrA* une cible pour forcer la cellule à consommer l'acétate à la place du glucose.

14.3. Conception du réseau : forcer la cellule à consommer l'acétate

Un mutant $\Delta csrA$ n'est pas viable sur glucose. Toutefois notre souche synthétique doit pouvoir survivre avec le glucose tant qu'il n'y a pas d'acétate dans le bioréacteur. Ceci

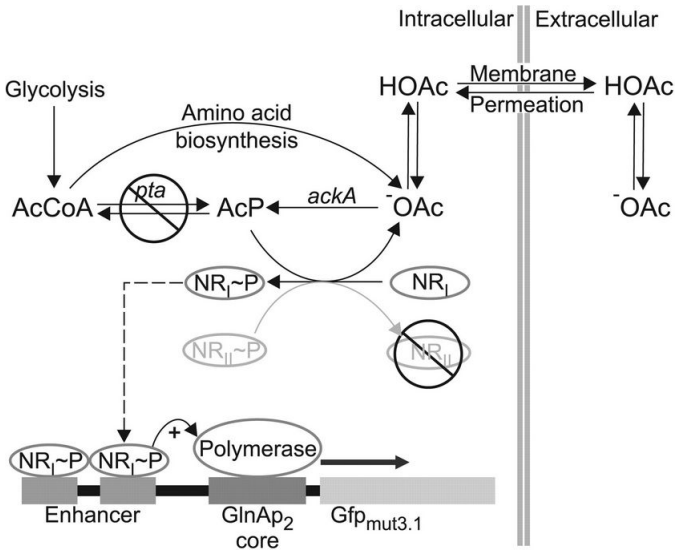


FIGURE 14.1. – **La communication cellule-cellule utilisant l'acétate** Malgré l'inactivation de la voie Pta, la cellule produit de l'acétate qui s'accumule dans le milieu au cours de la croissance. L'acétate diffuse à travers la membrane. Il est transformé en acétyle-phosphate par la voie AckA. L'acétyle-phosphate donne son groupement phosphate à NR1 qui se fixe aux séquences « enhancer » pour faciliter le recrutement de l'ARN polymérase sur le promoteur $glnAp_2$. L'expression de la GFP, ici, est alors possible. L'inactivation de NR2 est nécessaire pour que l'expression de la GFP se fasse strictement en réponse à la concentration de l'acétate externe. La figure est issue de (Bulter et al., 2004).

soulève la question de savoir comment on peut obtenir l'équivalent d'un mutant $\Delta csrA$ à un moment voulu c'est-à-dire quand la cellule détecte la présence d'acétate dans le milieu.

Le gène *csrA* code pour la protéine CsrA qui est un des acteurs de la régulation post-transcriptionnelle chez *E. coli* (Timmermans and Van Melderen, 2010). CsrA inhibe la traduction en empêchant la fixation du ribosome au RBS. L'inhibition peut être levée par l'ARN non codant csrB qui séquestre la protéine CsrA. Compte tenu du taux de synthèse naturel de csrB, seulement 30% des protéines CsrA peuvent être bloquées. En sur-exprimant le gène *csrB*, on peut théoriquement bloquer un nombre plus important de protéines CsrA. On se propose alors de mettre l'expression du gène *csrB* sous la dépendance du promoteur $glnAp_2$. L'acétate serait alors converti en acétyle-phosphate qui phosphorylerait NR1 pour activer l'expression du gène *csrB*. Nous ne connaissons cependant pas le niveau d'expression du gène *csrB* requis pour obtenir l'équivalent d'une inactivation du gène *csrA*. Il faut donc le déterminer.

Dans un premier temps, nous proposons de contrôler le niveau d'expression du gène *csrB* avec un promoteur inductible à l'IPTG dans une souche mutante Δpta $\Delta glnL$. Cette expérience permettrait de vérifier si la sur-expression de *csr*B permet d'obtenir un équivalent de l'inactivation de *csrA* dans nos conditions expérimentales. Par la suite, nous voulons que cette production soit sous le contrôle du promoteur $glnAp_2$. Rien ne nous garantit que le promoteur $glnAp_2$ aura la capacité de produire assez de csrB ou que la quantité d'acétate produite au cours de la croissance sera suffisante pour activer ce promoteur selon nos besoins. Pour vérifier tous ces paramètres d'autres constructions seraient nécessaires. Beaucoup de conditions expérimentales devront être testées si bien que le recours à un modèle mathématique semble nécessaire pour orienter la construction du système. La dernière étape consisterait à mettre le gène *csrB* sous le contrôle du promoteur $glnAp_2$ selon les paramètres déterminés aux étapes précédentes.

Comme le niveau de csrB dépend de la concentration d'acétate, on imagine très bien que le blocage total de CsrA requiert une concentration d'acétate. Tant qu'on est en-dessous de cette concentration, il n'y a pas de blocage et les cellules consomment le glucose. En revanche si on est au-dessus de cette concentration, il y a un blocage et les cellules consomment l'acétate disponible. Dans tous les cas, cette concentration constitue la limite de notre système. Nos cellules synthétiques ne consommeront pas tout l'acétate présent dans le milieu mais elles baisseront son niveau jusqu'à cette concentration limite. Un niveau d'acétate sera ainsi en permanence présent dans le milieu de culture. Le tout est de savoir maintenant si cette concentration est suffisamment faible pour ne pas avoir d'effets négatifs sur la croissance et le rendement de production.

De plus, compte tenu qu'une croissance sur acétate est plus lente qu'une croissance sur glucose, on peut se demander s'il y aura assez de cellules synthétiques pour faire face à tout l'acétate produit par les usines vivantes. Un modèle mathématique pourrait nous aider à prédire ce qui se passe au sein même du bioréacteur en prenant en compte la

production d'acétate, sa consommation, la croissance des usines vivantes et celle de notre souche synthétique.

14.4. Construction du réseau : un problème technique inexpliqué

Ce projet reste du domaine de l'hypothèse car nous n'avons pas réussi à prouver que la sur-expression de *csrB* pouvait bloquer la totalité des protéines CsrA. Nous avons rencontré des difficultés lors du clonage du gène *csrB* sur le plasmide commercial pQE80 en utilisant la méthode de la Gibson Assembly (Gibson et al., 2009).

Très brièvement, cette méthode consiste à réunir des produits de PCR entre eux pour reconstruire un plasmide entier (voir Figure 14.2). Un fragment est conçu de sorte à avoir une séquence d'homologie d'une vingtaine de paires de bases avec le fragment qui le précède et celui qui le suit sur le plasmide. Cette méthode repose sur un équilibre entre la vitesse à laquelle l'exonucléase dégrade l'ADN et la vitesse à laquelle l'ADN polymérase les répare. Les produits de PCR sont double brin. L'exonucléase génère alors des extrémités cohésives permettant aux fragments de se reconnaître et de s'hybrider entre eux au niveau de leurs séquences d'homologie. Tous les fragments peuvent ainsi être assemblés dans l'ordre en une seule étape. C'est pourquoi la Gibson Assembly est intéressante car elle permet d'obtenir un plasmide fini en moins d'une semaine contrairement à la restriction-ligature.

Les résultats du séquençage de cette construction révélaient une perte systématique de 32 paires de bases au niveau de la région promotrice. Cette dernière possède plusieurs séquences identiques *lacO*. Nous avons attribué cette perte à l'appariement de ces régions identiques entre elles au niveau de l'ADN simple brin généré par l'exonucléase. L'ADN polymérase aurait alors sauté la lecture de cette structure secondaire résultant en la perte de 32 paires de bases qui correspondent à la longueur de la séquence entre deux régions *lacO*. Il semblerait que la mise en oeuvre de la Gibson Assembly implique de concevoir des zones d'homologie dépourvues de séquences répétées. Néanmoins un point reste incompris car j'ai malgré tout réussi à cloner le gène *acs* sur le plasmide pQE80. Le clonage sur le pQE80 est donc possible avec la Gibson Assembly malgré les séquences *lacO* sur ou à proximité des zones d'homologie. Je n'explique donc pas pourquoi le clonage de *csrB* n'a pas abouti.

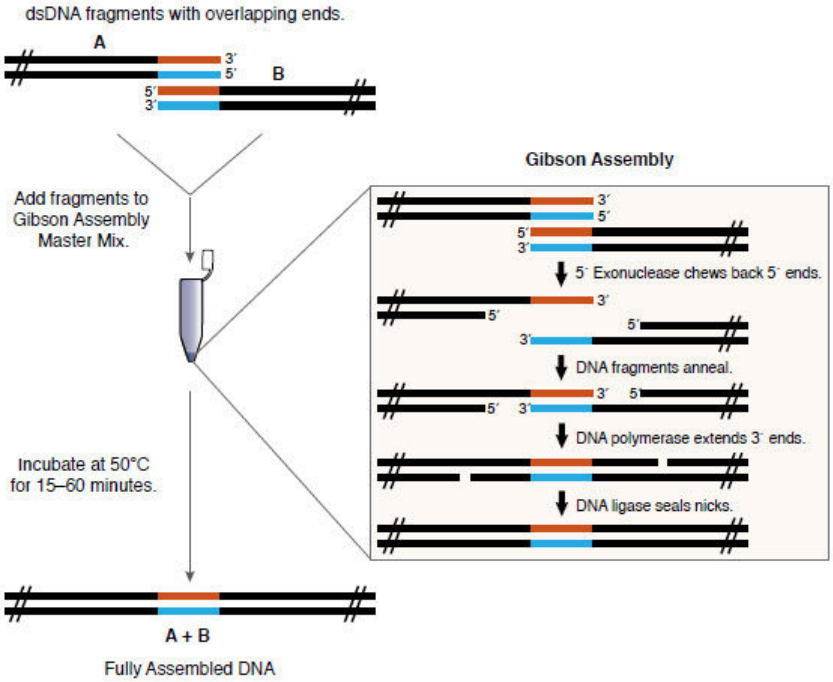


FIGURE 14.2. – **La méthode de la Gibson Assembly** On souhaite assembler les produits de PCR A et B. Ces deux fragments sont réunis dans un tube contenant un mélange de plusieurs enzymes et des tampons. Le tout est incubé à 50°C pendant une heure. On récupère à la fin un fragment d'ADN contenant A+B. Les produits de PCR sont conçus de sorte à ce que la fin de A coïncide avec le début de B. L'exonucléase grignote les brins à partir de leur extrémité 5' ce qui génère des bouts cohésifs. La fin de A et le début de B sont complémentaires et s'hybrident sur leur zone d'homologie. L'ADN polymérase et la ligase reconstituent alors les brins d'ADN au complet. La figure est issue du kit vendu par New England BioLabs. Ce kit contient le mélange des enzymes. Au laboratoire, nous faisons nous-même notre mélange pour une efficacité comparable si ce n'est supérieure à celle obtenue avec le kit commercial. L'efficacité de cette technique dépend de la concentration et de la taille des fragments A et B qui déterminent le volume à introduire dans le mélange des enzymes.

14.5. Une nouvelle hypothèse : la sur-expression du gène acs

Nous ne pouvons pas vérifier que la sur-expression du gène *csrB* force la cellule à consommer l'acétate avant de consommer le glucose. En revanche le clonage du gène *acs* sur le plasmide pQE80 nous permet de tester une nouvelle hypothèse. Cette dernière nous a été suggérée par Hugues Berry lors de mon comité de suivi de thèse. Hugues se demandait ce qui se passerait si la cellule consommait de l'acétate alors qu'elle n'était pas censée le faire. Lors d'une croissance sur glucose, la voie ACS est inactivée par la répression catabolique. Que se passerait-il si on passait outre ce verrou ? Est-ce qu'on forcerait la cellule à consommer l'acétate au lieu du glucose ? Est-ce que cela serait suffisant pour nettoyer le milieu dans un bioréacteur ?

C'est pourquoi j'ai cloné le gène *acs* sur le plasmide pQE80. La production de l'enzyme Acs dépend de la concentration d'IPTG ajouté dans le milieu. Nous testons différentes concentrations d'IPTG pour éliminer les cas d'une induction trop importante entraînant un ralentissement de la croissance en absence d'acétate. Les résultats indiquent que pour une même concentration d'acétate ajouté, les cellules exprimant plus de Acs ont une croissance plus lente (voir Figure 14.3). Il semble donc que les cellules consomment plus ou moins d'acétate en fonction des capacités enzymatiques de la voie ACS et cela malgré la présence du glucose. En revanche, nous ne pouvons pas dire si le glucose continue d'être utilisé. Les quantifications de l'acétate et du glucose seraient nécessaires pour caractériser ce qui se passe précisément. Bien que ces résultats ne soient que préliminaires, ils nous orientent vers la conception d'une nouvelle souche synthétique - plus épurée - pour retirer l'acétate produit par les usines vivantes dans les bioréacteurs. Dans cette souche, l'expression du gène *acs* ne serait plus soumise à la répression catabolique exercée par le glucose.

La résolution du projet basé sur l'inactivation de CsrA était lourde. De nombreuses hypothèses auraient dû être validées. Il demandait aussi beaucoup de constructions génétiques, de caractérisation et d'étalonnage pour aboutir à quelque chose de concret. A l'opposé, la seule sur-expression du gène *acs* semble déjà répondre en partie à la question que l'on se posait : peut-on forcer les cellules à consommer l'acétate malgré la présence du glucose dans le milieu ? Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour déterminer comment cette souche peut être utilisée pour nettoyer l'acétate produit par les usines vivantes au sein d'un bioréacteur. Quel niveau d'expression du gène *acs* est requis ? Quelle proportion de cellules sur-exprimant *acs* est nécessaire ?

Théoriquement, l'acétate ne s'accumulerait plus dans le milieu. On devrait donc s'attendre à améliorer le rendement de production. Toutefois une part du glucose présent dans le milieu continue d'être orientée vers la production de l'acétate plutôt que vers la formation du produit d'intérêt. Bien que l'acétate soit utilisée comme une source de carbone et d'énergie par les cellules sur-exprimant le gène *acs*, sa production constitue toujours une perte de la matière carbonée. Dans le bio-réacteur co-habitent deux

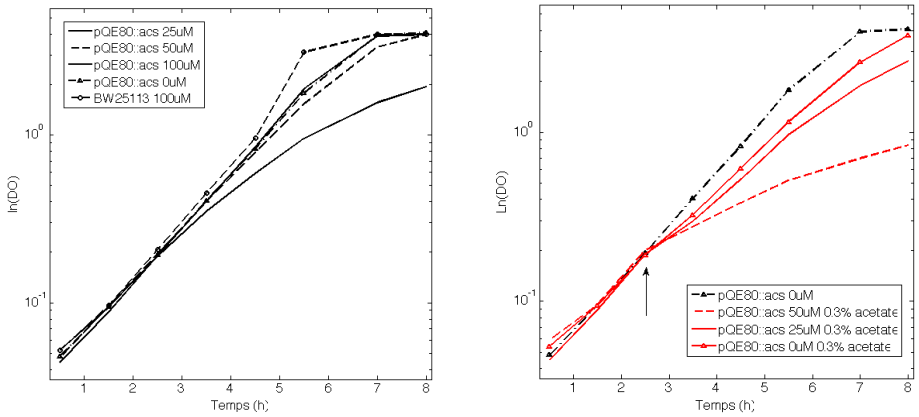


FIGURE 14.3. – **Effets de la sur-expression du gène *acs* sur la croissance d'*E. coli*** (à gauche) Au bout de deux heures de croissance sur glucose, un même volume d'IPTG, mais à des concentrations différentes, est ajouté à une culture d'*E. coli*. L'IPTG à 100 µM n'agit pas sur la croissance des cellules BW25113. Ainsi l'effet observé est strictement lié au niveau d'expression du gène *acs*. A une concentration de 100 µM, la croissance est réduite dans une souche BW25113 portant le vecteur pQE80 : :*acs*. La sur-expression du gène *acs* nuit à la croissance en absence d'acétate. On travaille donc avec des concentrations n'excédant pas les 50 µM. (à droite) L'induction du gène *acs* débute au bout de deux heures de culture par l'ajout d'IPTG. La flèche indique le moment de l'ajout d'acétate. On constate que plus les cellules expriment le gène *acs* et plus l'addition d'acétate ralentit leur croissance. On attribue cela au fait que les capacités augmentées de la voie ACS autorisent la cellule à consommer davantage d'acétate pendant la phase exponentielle de croissance.

populations : les usines vivantes qui forment un produit d'intérêt ; et les cellules qui consomment l'acétate mais qui ne font rien de plus que se diviser. Ceci nous amène à nous interroger sur la possibilité de valoriser ces cellules par la production d'une molécule d'intérêt. D'autant plus que ces cellules conservent leur capacité d'utiliser le glucose en absence d'acétate voire même pendant qu'elles consomment l'acétate.

Nous avons entrepris de construire une souche consommant l'acétate avant le glucose dans le but de réduire l'accumulation d'acétate dans les bioréacteurs. Un premier réseau a été conçu. Mais sa complexité explique sans doute qu'il n'ait pas abouti. Il s'est avéré au final plus judicieux de partir du simple changement de la régulation du gène *acs*. Cette souche constitue une base sur laquelle on peut ajouter des modules supplémentaires. On retrouve cette idée dans la compétition iGEM. Généralement l'avancement des projets dépend de leur complexité et du nombres de constructions à faire. Les projets simples au départ sont souvent ceux qui finissent sur le podium car ils ont eu le temps d'être éprouvés, améliorés et adaptés pour répondre à la question posée.

15. La compétition iGEM & l'évolution de la biologie synthétique

L'idée de concevoir une cellule qui nettoierait le milieu de l'acétate accumulé au cours d'un processus industriel relève de la biologie synthétique. En effet, on supprime et on ajoute des fragments d'ADN pour en modifier le comportement dans un but précis. Naturellement, la cellule consomme le glucose et génère de l'acétate qui s'accumule dans le milieu. Lorsque le glucose est épuisé, la cellule peut consommer l'acétate et l'utiliser comme une source de carbone et d'énergie. Ici, nous voulions faire en sorte que la cellule consomme l'acétate malgré la présence du glucose. On change ainsi fortement son comportement en la forçant à adopter une croissance lente au lieu d'une croissance rapide censée augmenter ses chances de survie. La construction de cette souche représentait un challenge car il s'agissait d'aller contre une loi profondément ancrée dans les bactéries. Et je dois vous avouer que c'est ce qui est la base de ce projet de thèse. L'application industrielle d'une telle souche n'est venue que bien plus tard avec l'étude de l'effet de l'acétate sur la croissance.

Beaucoup de projets en biologie synthétique sont ainsi motivés par la seule nature d'un challenge à relever. La biologie synthétique est jeune ce qui explique qu'elle ait pu partir dans tous les sens. Il faut maintenant trouver une application à tout ce qui a déjà pu être construit et à tout ce qui le sera à l'avenir. Cette idée est véhiculée depuis plusieurs années déjà par la tête emblématique de la compétition iGEM, Randy Rettberg. La compétition iGEM reflète sans aucun doute l'évolution de la biologie synthétique voire initie les changements et les réflexions.

On peut voir que la nature des projets iGEM est de plus en plus appliquée. Au début, les étudiants construisaient des bactéries qui sentent la banane. L'intérêt n'était que très minime mais c'était une étape nécessaire et qui a ouvert la voie à des projets bien plus complexes et aboutis. Les projets gagnent en complexité ouvrant le champ des possibilités. Ils trouvent leur application aussi bien dans les domaines de l'énergie, de l'environnement, de l'alimentaire, de la santé que dans le traitement du signal. Les étudiants regardent autour d'eux pour identifier où le recours à un micro-organisme peut s'avérer utile. « J'ouvre mon réfrigérateur et je tombe sur un steack, je ne me souviens plus depuis quand il est au frais, est-il encore bon à la consommation ? ... et si on créait un kit permettant de répondre à cette question, après tout il est peut être encore bon et ca serait dommage de gâcher de la nourriture en le jetant dans le doute à la

poubelle »[1]. C'est ce genre de réflexion qui lance à présent un projet iGEM. Tous les ans, de nouvelles catégories font leur apparition ce qui montre que la biologie synthétique peut être utilisée un peu partout. Grenoble est une ville tournée vers l'environnement. C'est donc tout naturellement que les étudiants ont débouché sur un projet visant à quantifier un polluant dans l'eau en 2011. Ils sont allés à la rencontre d'un industriel présent dans la région, Arkema, et dont l'activité libère du mercure dans l'eau. Cette rencontre a permis de mieux définir certains aspects du projet pour qu'il réponde à un réel besoin. En revanche, le projet de 2013 n'avait pas d'application. On se proposait juste de contrôler le nombre de cellules vivantes. C'était ludique et un véritable défi scientifique à relever. Mais l'absence d'un but clairement affiché a sans doute été préjudiciable. La qualité du travail scientifique a été récompensée par le prix du meilleur modèle mathématique lors des sélections européennes. Toutefois l'équipe n'a pas été sélectionnée pour aller défendre son titre au niveau mondial tant les réponses aux questions relatives à l'utilité de notre système restaient floues. Les projets iGEM s'inscrivent définitivement dans une volonté de répondre à un besoin.

Comme les projets iGEM sont tournés vers des applications concrètes, il est important de communiquer au près du grand public sur les OGMs, le concours et la biologie synthétique. Dans un élan de vouloir installer une culture de la biologie synthétique à Grenoble, j'ai lancé un club *SynBio*Gre ouvert à tous et surtout aux étudiants participant à iGEM. Au cours d'une des séances, j'ai invité Nayla Farouki, philosophe et conseillère scientifique au CEA, sur la thématique « parler de biologie synthétique dans le contexte grenoblois ». Grenoble est connue pour son pôle scientifique centré sur les nanosciences mais aussi pour ses opposants - assez virulents - comme le groupe « Pièces et main d'oeuvre » qui voit en la biologie synthétique un nouveau danger. Nayla comparait les débuts de la biologie synthétique à ceux des nanonsciences où les scientifiques tenaient différents discours : i) ceux qui voyaient dans les nanosciences de grandes promesses pour révolutionner le monde, ii) ceux qui estimaient qu'elles causeraient notre perte, et enfin iii) ceux qui faisaient tout simplement de la recherche et qui développaient des applications à la hauteur de leur recherche. Le cinéma a amplifié le phénomène si bien que dans l'esprit du grand public les nanosciences contrôleraient le cerveau humain ou déboucheraient sur de nouvelles armes. La réalité est pourtant bien différente.

Nous devons communiquer correctement autour de la biologie synthétique. Il faut informer les gens en trouvant le juste équilibre pour ne pas leur faire peur ou leur vendre du rêve. Il s'agit de leur donner les outils nécessaires pour qu'ils puissent prendre du recul et comprendre les avancées dans ce domaine. Le discours nécessite donc d'être travaillé sur le fond et la forme pour qu'il soit accessible. Au cours de la compétition iGEM, les questions de biosûreté, de biosécurité, de bioéthique et l'impact sociétal de la biologie synthétique sont discutés. Certains projets iGEM se contentent de développer des outils pour permettre à « un scientifique qui fait de la biologie synthétique de prendre conscience du monde dans lequel il travaille et doit évoluer » selon les mots des organisateurs de la compétition.

1. http ://2012.igem.org/Team :Groningen

Le concours iGEM voit évoluer tous les ans des étudiants qui seront les chercheurs de demain. Ces chercheurs seront en mesure d'identifier les besoins de la société dont ils font parti. Ils essaieront de répondre à ses attentes par la biologie synthétique. Ils sauront aussi comment interagir justement avec le public qui sera confronté aux applications de la biologie synthétique et qui peut avoir des questions sur les dangers et le fonctionnement inhérents à ces systèmes synthétiques. Toutefois la biologie synthétique est jeune et les applications au quotidien sont encore rares. En effet, à part l'artémisinine et la « vie synthétique » présentée par Craig Venter, la biologie synthétique ne sort pas des laboratoires.

16. Conclusion

Une conclusion en quelques chiffres...

... 6 comme le nombre de mutants des voies de la consommation et de la production de l'acétate de la bactérie *Escherichia coli* construits et systématiquement caractérisés au cours d'une croissance sur glucose sans et avec l'ajout de 128 mM d'acétate. La détermination du taux de croissance et la quantification des principaux métabolites (glucose, acétate, éthanol, lactate, pyruvate et formate) nous ont permis de répondre à la question: quelle est la part du métabolisme de l'acétate dans l'inhibition de la croissance bactérienne par l'acétate?

... 20 comme le pourcentage de l'inhibition de la croissance de la bactérie *Escherichia coli* sur glucose mettant en jeu la voie Pta AckA. L'acétate présent dans le milieu est converti en acétyle-phosphate. Cet intermédiaire métabolique fait la liaison entre le métabolisme central (conversion en acétyle-CoA) et la régulation de l'expression des gènes ou de l'activité enzymatique (phosphorylation et acétylation). Toutefois nous n'avons pas pu développer davantage cet aspect en identifiant d'éventuelles cibles de l'acétyle-phosphate. Dans nos conditions expérimentales, la majorité de l'inhibition serait due à l'accumulation des anions acétate dans le cytoplasme. Ces derniers se substituent aux anions physiologiques comme le glutamate. Les processus physiologiques de la cellule en seraient alors perturbés comme la biosynthèse de la méthionine (10% de l'inhibition). L'ajout de l'acétate au milieu de culture au cours d'une croissance sur glucose n'altère pas l'efficacité de la cellule à convertir le glucose en biomasse mais ses capacités à le faire seraient amoindries (entrée du glucose, voie de biosynthèse...).

... 30 comme le nombre d'étudiants encadrés au cours des trois participations grenobloises au concours iGEM. Le projet Mercuro-coli souhaitait quantifier le mercure dans un échantillon d'eau. Il ne le fait pas. En revanche, il valide l'utilisation du toggle switch au coeur du réseau génétique pour la quantification du mercure par rapport à une molécule de référence. Le projet TalkE'coli quant à lui permet de contrôler le nombre de cellules vivantes au sein d'une population en modulant l'intensité de la lumière selon les prédictions d'un modèle mathématique.

Bibliography

Abdel-Hamid, A. M., M. M. Attwood, and J. R. Guest: 2001, 'Pyruvate oxidase contributes to the aerobic growth efficiency of *Escherichia coli*'. *Microbiology* **147**(6), 1483–1498.

Abil, Z., X. Xiong, and H. Zhao: 2014, 'Synthetic Biology for Therapeutic Applications'. *Molecular pharmaceutics*.

Almquist, J., M. Cvijovic, V. Hatzimanikatis, J. Nielsen, and M. Jirstrand: 2014, 'Kinetic models in industrial biotechnology–Improving cell factory performance'. *Metabolic engineering* **24**, 38–60.

Andrianantoandro, E., S. Basu, D. K. Karig, and R. Weiss: 2006, 'Synthetic biology: new engineering rules for an emerging discipline'. *Molecular systems biology* **2**(1).

Arnold, C. N., J. McElhanon, A. Lee, R. Leonhart, and D. A. Siegele: 2001, 'Global analysis of *Escherichia coli* gene expression during the acetate-induced acid tolerance response'. *Journal of bacteriology* **183**(7), 2178–2186.

Axe, D. and J. Bailey: 1995, 'Transport of lactate and acetate through the energized cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*'. *Biotechnol. Bioeng.* **47**(1), 8–19.

Baba, T., T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, K. A. Datsenko, M. Tomita, B. L. Wanner, and H. Mori: 2006, 'Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection'. *Mol. Syst. Biol.* **2**, 2006.0008.

Balagaddé, F. K., H. Song, J. Ozaki, C. H. Collins, M. Barnet, F. H. Arnold, S. R. Quake, and L. You: 2008, 'A synthetic Escherichia coli predator–prey ecosystem'. *Molecular systems biology* **4**(1).

Bennett, B. D., E. H. Kimball, M. Gao, R. Osterhout, S. J. V. Dien, and J. D. Rabinowitz: 2009, 'Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli*'. *Nat Chem Biol* **5**(8), 593–599.

Brencic, A. and S. Lory: 2009, 'Determination of the regulon and identification of novel mRNA targets of Pseudomonas aeruginosa RsmA'. *Molecular microbiology* **72**(3), 612–632.

Bulina, M. E., K. A. Lukyanov, O. V. Britanova, D. Onichtchouk, S. Lukyanov, and D. M. Chudakov: 2006, 'Chromophore-assisted light inactivation (CALI) using the phototoxic fluorescent protein KillerRed'. *Nature protocols* **1**(2), 947–953.

Bulter, T., S.-G. Lee, W. W. Wong, E. Fung, M. R. Connor, and J. C. Liao: 2004, 'Design of artificial cell–cell communication using gene and metabolic networks'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(8), 2299–2304.

Carpenter, C. and J. Broadbent: 2009, 'External concentration of organic acid anions and pH: key independent variables for studying how organic acids inhibit growth of bacteria in mildly acidic foods'. *J. Food Sci.* **74**(1), R12–5.

Castaño-Cerezo, S., V. Bernal, H. Post, T. Fuhrer, S. Cappadona, N. C. Sanchez-Diaz, U. Sauer, A. J. Heck, A. M. Altelaar, and M. Canovas: 2014a, 'Protein acetylation affects acetate metabolism, motility and acid stress response in *Escherichia coli*'. *Mol. Syst. Biol.* **10**(11), 762–762.

Castaño-Cerezo, S., V. Bernal, T. Röhrig, S. Termeer, and M. Cánovas: 2014b, 'Regulation of acetate metabolism in *Escherichia coli* BL21 by protein Nϵ-lysine acetylation'. *Applied Microbiology and Biotechnology.*

Castaño-Cerezo, S., V. Bernal, J. Blanco-Catalá, J. L. Iborra, and M. Cánovas: 2011, 'cAMP-CRP co-ordinates the expression of the protein acetylation pathway with central metabolism in *Escherichia coli*'. *Molecular microbiology* **82**(5), 1110–1128.

Castaño-Cerezo, S., J. M. Pastor, S. Renilla, V. Bernal, J. L. Iborra, and M. Cánovas: 2009, 'An insight into the role of phosphotransacetylase (pta) and the acetate/acetyl-CoA node in *Escherichia coli*'. *Microbial cell factories* **8**(1), 54.

Chang, Y.-Y., A.-Y. Wang, and J. E. Cronan: 1994, 'Expression of *Escherichia coli* pyruvate oxidase (PoxB) depends on the sigma factor encoded by the rpoS (katF) gene'. *Molecular microbiology* **11**(6), 1019–1028.

Chen, X., L. Zhou, K. Tian, A. Kumar, S. Singh, B. A. Prior, and Z. Wang: 2013, 'Metabolic engineering of *Escherichia coli*: A sustainable industrial platform for bio-based chemical production'. *Biotechnology advances* **31**(8), 1200–1223.

Chubukov, V., L. Gerosa, K. Kochanowski, and U. Sauer: 2014, 'Coordination of microbial metabolism'. *Nature Reviews Microbiology* **12**(5), 327–340.

Church, G. M., M. B. Elowitz, C. D. Smolke, C. A. Voigt, and R. Weiss: 2014, 'Realizing the potential of synthetic biology'. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.*

Cox, R. A.: 2004, 'Quantitative relationships for specific growth rates and macromolecular compositions of]textitMycobacterium tuberculosis, *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Escherichia coli* B/r: an integrative theoretical approach'. *Microbiology* **150**(5), 1413–1426.

Datsenko, K. A. and B. L. Wanner: 2000, 'One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products'. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**(12), 6640–6645.

De Mey, M., S. De Maeseneire, W. Soetaert, and E. Vandamme: 2007, 'Minimizing acetate formation in *E. coli* fermentations'. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* **34**(11), 689–700.

Dennis, P. P. and H. Bremer: 1974, 'Macromolecular composition during steady-state growth of *Escherichia coli* B-r.'. *J Bacteriol* **119**(1).

Diaz-Ricci, J., L. Regan, and J. Bailey: 1991, 'Effect of alteration of the acetic acid synthesis pathway on the fermentation pattern of *Escherichia coli*'. *Biotechnol. Bioeng.* **38**(11), 1318–24.

Dittrich, C., R. Vadali, G. Bennett, and K.-Y. San: 2005a, 'Redistribution of metabolic fluxes in the central aerobic metabolic pathway of *E. coli* mutant strains with deletion of the *ackA-pta* and *poxB* pathways for the synthesis of isoamyl acetate'. *Biotechnol. Prog.* **21**(3), 627–31.

Dittrich, C. R., G. N. Bennett, and K.-Y. San: 2005b, 'Characterization of the Acetate-Producing Pathways in Escherichia coli'. *Biotechnology progress* **21**(4), 1062–1067.

Eiteman, M. A. and E. Altman: 2006, 'Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations'. *TRENDS in Biotechnology* **24**(11), 530–536.

El-Mansi, E. M. and W. H. Holms: 1989, 'Control of carbon flux to acetate excretion during growth of *Escherichia coli* in batch and continuous cultures'. *J. Gen. Microbiol.* **135**(11), 2875–83.

Enjalbert, B., F. Letisse, and J.-C. Portais: 2013, 'Physiological and Molecular Timing of the Glucose to Acetate Transition in *Escherichia coli*'. *Metabolites* **3**(3), 820–837.

Farmer, I. S. and C. W. Jones: 1976, 'The energetics of *Escherichia coli* during aerobic growth in continuous culture'. *European Journal of Biochemistry* **67**(1), 115–122.

Farmer, W. R. and J. C. Liao: 2000, 'Improving lycopene production in *Escherichia coli* by engineering metabolic control'. *Nature biotechnology* **18**(5), 533–537.

Feist, A. M., C. S. Henry, J. L. Reed, M. Krummenacker, A. R. Joyce, P. D. Karp, L. J. Broadbelt, V. Hatzimanikatis, and B. Ø. Palsson: 2007, 'A genome-scale metabolic reconstruction for *Escherichia coli* K-12 MG1655 that accounts for 1260 ORFs and thermodynamic information.'. *Mol. Syst. Biol.* **3**, 121.

Fioraso, G.: 2012, 'Les enjeux de la biologie de synthèse'. *Office parlementaire des choix scientifiques et technologiques* **15**.

Fox, D., N. Meadow, and S. Roseman: 1986, 'Phosphate transfer between acetate kinase and enzyme I of the bacterial phosphotransferase system'. *J. Biol. Chem.* **261**(29), 13498–503.

García-Contreras, R., P. Vos, H. Westerhoff, and F. Boogerd: 2012, 'Why *in vivo* may not equal *in vitro* - new effectors revealed by measurement of enzymatic activities under the same *in vivo*-like assay conditions'. *FEBS J* **279**(22), 4145–59.

Gardner, T. S., C. R. Cantor, and J. J. Collins: 2000, 'Construction of a genetic toggle switch in Escherichia coli'. *Nature* **403**(6767), 339–342.

Geddes, C. C., I. U. Nieves, and L. O. Ingram: 2011, 'Advances in ethanol production'. *Current opinion in biotechnology* **22**(3), 312–319.

Gerosa, L. and U. Sauer: 2011, 'Regulation and control of metabolic fluxes in microbes'. *Current opinion in biotechnology* **22**(4), 566–575.

Gibson, D. G., L. Young, R.-Y. Chuang, J. C. Venter, C. A. Hutchison, and H. O. Smith: 2009, 'Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases'. *Nature methods* **6**(5), 343–345.

Gimenez, R., M. F. Nuñez, J. Badia, J. Aguilar, and L. Baldoma: 2003, 'The gene yjcG, cotranscribed with the gene acs, encodes an acetate permease in *Escherichia coli*'. *Journal of bacteriology* **185**(21), 6448–6455.

Grime, J. M., M. A. Edwards, N. C. Rudd, and P. R. Unwin: 2008, 'Quantitative visualization of passive transport across bilayer lipid membranes'. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**(38), 14277–14282.

Heinemann, M. and S. Panke: 2006, 'Synthetic biology—putting engineering into biology'. *Bioinformatics* **22**(22), 2790–2799.

Herrero, A., R. Gomez, B. Snedecor, C. Tolman, and M. Roberts: 1985, 'Growth inhibition of *Clostridium thermocellum* by carboxylic acids: a mechanism based on uncoupling by weak acids'. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**(1), 53–62.

Holms, W.: 1986, 'The central metabolic pathways of *Escherichia coli*: relationship between flux and control at a branch point, efficiency of conversion to biomass, and excretion of acetate'. *Curr. Top. Cell. Regul.* **28**, 69–105.

Hu, L. I., B. K. Chi, M. L. Kuhn, E. V. Filippova, A. J. Walker-Peddakotla, K. Bäsell, D. Becher, W. F. Anderson, H. Antelmann, and A. J. Wolfe: 2013, 'Acetylation of the response regulator RcsB controls transcription from a small RNA promoter'. *Journal of bacteriology* **195**(18), 4174–4186.

Kakuda, H., K. Hosono, and S. Ichihara: 1994, 'Identification and characterization of the ackA (acetate kinase A)-pta (phosphotransacetylase) operon and complementation analysis of acetate utilization by an ackA-pta deletion mutant of *Escherichia coli*'. *Journal of biochemistry* **116**(4), 916–922.

Keasling, J. D.: 2008, 'Synthetic biology for synthetic chemistry'. *ACS chemical biology* **3**(1), 64–76.

Kirkpatrick, C., L. M. Maurer, N. E. Oyelakin, Y. N. Yoncheva, R. Maurer, and J. L. Slonczewski: 2001, 'Acetate and formate stress: opposite responses in the proteome of Escherichia coli'. *Journal of bacteriology* **183**(21), 6466–6477.

Kitano, H.: 2002, 'Systems biology: a brief overview'. *Science* **295**(5560), 1662–1664.

Klein, A. H., A. Shulla, S. A. Reimann, D. H. Keating, and A. J. Wolfe: 2007, 'The Intracellular Concentration of Acetyl Phosphate in *Escherichia coli* Is Sufficient for Direct Phosphorylation of Two-Component Response Regulators'. *J. Bacteriol.* **189**(15), 5574–5581.

Kochanowski, K., U. Sauer, and V. Chubukov: 2013, 'Somewhat in control—the role of transcription in regulating microbial metabolic fluxes'. *Current opinion in biotechnology* **24**(6), 987–993.

Lasko, D., N. Zamboni, and U. Sauer: 2000, 'Bacterial response to acetate challenge: a comparison of tolerance among species'. *Applied microbiology and biotechnology* **54**(2), 243–247.

Lawford, H. G. and J. D. Rousseau: 1993, 'Effects of pH and acetic acid on glucose and xylose metabolism by a genetically engineered ethanologenicEscherichia coli'. *Applied biochemistry and biotechnology* **39**(1), 301–322.

Leonard, E., D. Nielsen, K. Solomon, and K. J. Prather: 2008, 'Engineering microbes with synthetic biology frameworks'. *Trends in biotechnology* **26**(12), 674–681.

Li, J. and P. Neubauer: 2014, 'Escherichia coli as a cell factory for heterologous production of nonribosomal peptides and polyketides'. *New biotechnology.*

Li, M. and I. Borodina: 2014, 'Application of synthetic biology for production of chemicals in yeast Saccharomyces cerevisiae'. *FEMS yeast research.*

Ling, H., W. Teo, B. Chen, S. S. J. Leong, and M. W. Chang: 2014, 'Microbial tolerance engineering toward biochemical production: from lignocellulose to products'. *Current opinion in biotechnology* **29**, 99–106.

Luli, G. W. and W. R. Strohl: 1990, 'Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations.'. *Applied and environmental microbiology* **56**(4), 1004–1011.

Majewski, R. and M. Domach: 1990, 'Simple constrained-optimization view of acetate overflow in *E. coli*'. *Biotechnology and Bioengineering* **35**(7), 732–738.

Mey, M. D., M. D. Maeseneire, W. Soetaert, and E. Vandamme: 2007, 'Minimizing acetate formation in *E. coli* fermentations'. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **34**(11), 689–700.

Mills, T. Y., N. R. Sandoval, R. T. Gill, et al.: 2009, 'Cellulosic hydrolysate toxicity and tolerance mechanisms in *Escherichia coli*'. *Biotechnol Biofuels* **2**(1), 26.

Mordukhova, E. A. and J.-G. Pan: 2013, 'Evolved Cobalamin-Independent Methionine Synthase (MetE) Improves the Acetate and Thermal Tolerance of *Escherichia coli*'. *Applied and environmental microbiology* **79**(24), 7905–7915.

Na, D., S. M. Yoo, H. Chung, H. Park, J. H. Park, and S. Y. Lee: 2013, 'Metabolic engineering of *Escherichia coli* using synthetic small regulatory RNAs'. *Nature biotechnology* **31**(2), 170–174.

Nahku, R., K. Valgepea, P.-J. Lahtvee, S. Erm, K. Abner, K. Adamberg, and R. Vilu: 2010, 'Specific growth rate dependent transcriptome profiling of *Escherichia coli* K12 MG1655 in accelerostat cultures'. *J. Bacteriol.* **145**(1), 60–65.

Nielsen, J., M. Fussenegger, J. Keasling, S. Y. Lee, J. C. Liao, K. Prather, and B. Palsson: 2014, 'Engineering synergy in biotechnology'. *Nature chemical biology* **10**(5), 319–322.

Oh, M.-K., L. Rohlin, K. C. Kao, and J. C. Liao: 2002, 'Global expression profiling of acetate-grown *Escherichia coli.*'. *J Biol Chem* **277**(15), 13175–13183.

Oldiges, M., B. J. Eikmanns, and B. Blombach: 2014, 'Application of metabolic engineering for the biotechnological production of l-valine'. *Applied microbiology and biotechnology* pp. 1–12.

Paddon, C., P. Westfall, D. Pitera, K. Benjamin, K. Fisher, D. McPhee, M. Leavell, A. Tai, A. Main, D. Eng, et al.: 2013, 'High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin'. *Nature* **496**(7446), 528–532.

Paddon, C. J. and J. D. Keasling: 2014, 'Semi-synthetic artemisinin: a model for the use of synthetic biology in pharmaceutical development'. *Nature Reviews Microbiology* **12**(5), 355–367.

Pey, J., K. Valgepea, A. Rubio, J. E. Beasley, and F. J. Planes: 2013, 'Integrating gene and protein expression data with genome-scale metabolic networks to infer functional pathways'. *BMC systems biology* **7**(1), 134.

Phue, J.-N., S. J. Lee, J. B. Kaufman, A. Negrete, and J. Shiloach: 2010, 'Acetate accumulation through alternative metabolic pathways in *ackA - pta - poxB* - triple mutant in *E. coli* B (BL21)'. *Biotechnology Letters* **32**(12), 1897–1903.

Quin, M. B. and C. Schmidt-Dannert: 2014, 'Designer microbes for biosynthesis'. *Current opinion in biotechnology* **29**, 55–61.

Renilla, S., V. Bernal, T. Fuhrer, S. Castaño-Cerezo, J. M. Pastor, J. L. Iborra, U. Sauer, and M. Cánovas: 2011, 'Acetate scavenging activity in *Escherichia coli*: interplay of acetyl–CoA synthetase and the PEP–glyoxylate cycle in chemostat cultures'. *Applied Microbiology and Biotechnology* **93**(5), 2109–2124.

Rodrigues, A. L., N. Trachtmann, J. Becker, A. F. Lohanatha, J. Blotenberg, C. J. Bolten, C. Korneli, A. O. de Souza Lima, L. M. Porto, G. A. Sprenger, et al.: 2013, 'Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of the antitumor drugs violacein and deoxyviolacein'. *Metabolic engineering* **20**, 29–41.

Roe, A., D. McLaggan, I. Davidson, C. O'Byrne, and I. Booth: 1998, 'Perturbation of anion balance during inhibition of growth of *Escherichia coli* by weak acids'. *J. Bacteriol.* **180**(4), 767–72.

Roe, A. J., C. O'Byrne, D. McLaggan, and I. R. Booth: 2002, 'Inhibition of *Escherichia coli* growth by acetic acid: a problem with methionine biosynthesis and homocysteine toxicity'. *Microbiology* **148**(7), 2215–2222.

Russell, J.: 1992, 'Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling'. *J. Appl. Bacteriol.* **73**(5), 363–70.

Russell, J. and F. Diez-Gonzalez: 1998, 'The effects of fermentation acids on bacterial growth'. *Adv. Microb. Physiol.* **39**, 205–34.

Russell, J. B.: 1991, 'Resistance of Streptococcus bovis to acetic acid at low pH: relationship between intracellular pH and anion accumulation.'. *Applied and environmental microbiology* **57**(1), 255–259.

Russell, J. B. and F. Diez-Gonzalez: 1997, 'The effects of fermentation acids on bacterial growth'. *Advances in microbial physiology* **39**, 205–234.

Sá-Pessoa, J., S. Paiva, D. Ribas, I. J. Silva, S. C. Viegas, C. M. Arraiano, and M. Casal: 2013, 'SATP (YaaH), a succinate–acetate transporter protein in *Escherichia coli*'. *Biochemical Journal* **454**(3), 585–595.

Sandoval, N. R., T. Y. Mills, M. Zhang, and R. T. Gill: 2011, 'Elucidating acetate tolerance in E. coli using a genome-wide approach'. *Metabolic engineering* **13**(2), 214–224.

Schellenberger, J., R. Que, R. M. T. Fleming, I. Thiele, J. D. Orth, A. M. Feist, D. C. Zielinski, A. Bordbar, N. E. Lewis, S. Rahmanian, J. Kang, D. R. Hyduke, and B. Ø. Palsson: 2011, 'Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox v2.0.'. *Nature protocols* **6**(9), 1290–307.

Schellhorn, H. E. and V. L. Stones: 1992, 'Regulation of katF and katE in Escherichia coli K-12 by weak acids.'. *Journal of bacteriology* **174**(14), 4769–4776.

Sigala, J. C. J., S. Flores, N. Flores, C. Aguilar, R. de Anda, G. Gosset, and F. Bolívar: 2009, 'Acetate metabolism in *Escherichia coli* strains lacking phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system; evidence of carbon recycling strategies and futile cycles.'. *J Mol Microbiol Biotechnol* **16**(3-4), 224–235.

Smallbone, K. and E. Simeonidis: 2009, 'Flux balance analysis: a geometric perspective.'. *J. Theor. Biol.* **258**(2), 311–5.

Smirnova, G. and O. Oktyabr'skii: 1988, 'Effect of activity of primary proton pumps on growth of *Escherichia coli* in the presence of acetate'. *Microbiology (USSR)* **57**, 446–51.

Smith, M. T., K. M. Wilding, J. M. Hunt, A. M. Bennett, and B. C. Bundy: 2014, 'The emerging age of cell-free synthetic biology'. *FEBS letters* **588**(17), 2755–2761.

Starai, V. and J. Escalante-Semerena: 2004, 'Acetyl-coenzyme A synthetase (AMP forming)'. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* **61**(16), 2020–2030.

Stephanopoulos, G.: 2012, 'Synthetic biology and metabolic engineering'. *ACS synthetic biology* **1**(11), 514–525.

Tabor, J. J., A. Levskaya, and C. A. Voigt: 2011, 'Multichromatic control of gene expression in Escherichia coli'. *Journal of molecular biology* **405**(2), 315–324.

Thomason, L. C., N. Costantino, and D. L. Court: 2007, '*E. coli* Genome Manipulation by P1 Transduction'. In: F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl (eds.): *Current Protocols in Molecular Biology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., pp. 1.17.1–1.17.8.

Timmermans, J. and L. Van Melderen: 2009, 'Conditional essentiality of the csrA gene in Escherichia coli'. *Journal of bacteriology* **191**(5), 1722–1724.

Timmermans, J. and L. Van Melderen: 2010, 'Post-transcriptional global regulation by CsrA in bacteria'. *Cellular and molecular life sciences* **67**(17), 2897–2908.

Valgepea, K., K. Adamberg, R. Nahku, P.-J. Lahtvee, L. Arike, and R. Vilu: 2010, 'Systems biology approach reveals that overflow metabolism of acetate in *Escherichia coli* is triggered by carbon catabolite repression of acetyl-CoA synthetase'. *BMC Systems Biology* **4**(1), 166.

van Hoek, M. J. and R. M. Merks: 2012, 'Redox balance is key to explaining full vs. partial switching to low-yield metabolism'. *BMC systems biology* **6**(1), 22.

Varma, A., B. W. Boesch, and B. O. Palsson: 1993, 'Stoichiometric interpretation of *Escherichia coli* glucose catabolism under various oxygenation rates.'. *Applied and environmental microbiology* **59**(8), 2465–2473.

Veit, A., T. Polen, and V. F. Wendisch: 2007, 'Global gene expression analysis of glucose overflow metabolism in *Escherichia coli* and reduction of aerobic acetate formation'. *Applied Microbiology and Biotechnology* **74**(2), 406–421.

Vemuri, G., E. Altman, D. Sangurdekar, A. Khodursky, and M. Eiteman: 2006, 'Overflow metabolism in *Escherichia coli* during steady-state growth: transcriptional regulation and effect of the redox ratio'. *Applied and environmental microbiology* **72**(5), 3653–3661.

Verdin, E. and M. Ott: 2013, 'Acetylphosphate: a novel link between lysine acetylation and intermediary metabolism in bacteria'. *Molecular cell* **51**(2), 132–134.

Voigt, C. A.: 2006, 'Genetic parts to program bacteria'. *Current opinion in biotechnology* **17**(5), 548–557.

Volkmer, B. and M. Heinemann: 2011, 'Condition-Dependent Cell Volume and Concentration of *Escherichia coli* to Facilitate Data Conversion for Systems Biology Modeling.'. *PLoS One* **6**(7), e23126.

Wang, Q., Y. Zhang, C. Yang, H. Xiong, Y. Lin, J. Yao, H. Li, L. Xie, W. Zhao, Y. Yao, Z.-B. Ning, R. Zeng, Y. Xiong, K.-L. Guan, S. Zhao, and G.-P. Zhao: 2010, 'Acetylation of metabolic enzymes coordinates carbon source utilization and metabolic flux'. *Science* **327**(February), 1004–1007.

Warnecke, T. and R. Gill: 2005, 'Organic acid toxicity, tolerance, and production in *Escherichia coli* biorefining applications'. *Microb. Cell Fact.* **4**, 25.

Weinert, B. T., V. Iesmantavicius, S. A. Wagner, C. Schölz, B. Gummesson, P. Beli, T. Nyström, and C. Choudhary: 2013, 'Acetyl-Phosphate Is a Critical Determinant of Lysine Acetylation in *E. coli*'. *Molecular Cell* **51**(2), 265–272.

Wendisch, V. F.: 2014, 'Microbial production of amino acids and derived chemicals: Synthetic biology approaches to strain development'. *Current opinion in biotechnology* **30**, 51–58.

Wilks, J. C. and J. L. Slonczewski: 2007, 'pH of the Cytoplasm and Periplasm of *Escherichia coli*: Rapid Measurement by Green Fluorescent Protein Fluorimetry'. *J. Bacteriol.* **189**(15), 5601–5607.

Wolfe, A., D. Chang, J. Walker, J. Seitz-Partridge, M. Vidaurri, C. Lange, B. Prüss, M. Henk, J. Larkin, and T. Conway: 2003, 'Evidence that acetyl phosphate functions as a global signal during biofilm development'. *Mol. Microbiol.* **48**(4), 977–88.

Wolfe, A. J.: 2005, 'The acetate switch'. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**(1), 12–50.

Xu, B., M. Jahic, G. Blomsten, and S.-O. Enfors: 1999, 'Glucose overflow metabolism and mixed-acid fermentation in aerobic large-scale fed-batch processes with *Escherichia coli*'. *Applied microbiology and biotechnology* **51**(5), 564–571.

Yang, Y.-T., G. Bennett, and K.-Y. San: 1999, 'Effect of inactivation of *nuo* and *ackA-pta* on redistribution of metabolic fluxes in *Escherichia coli*'. *Biotechnol. Bioeng.* **65**(3), 291–7.

Zhao, J. and K. Shimizu: 2003, 'Metabolic flux analysis of *Escherichia coli* K12 grown on ^{13}C-labeled acetate and glucose using GC-MS and powerful flux calculation method'. *Journal of Biotechnology* **101**(2), 101–117.

Zhou, D. and R. Yang: 2006, 'Global analysis of gene transcription regulation in prokaryotes'. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* **63**(19-20), 2260–2290.