



**HAL**  
open science

# Ingénierie métabolique de *Clostridium acetobutylicum* pour la production d'isopropanol

Simon Dusseaux

► **To cite this version:**

Simon Dusseaux. Ingénierie métabolique de *Clostridium acetobutylicum* pour la production d'isopropanol. Biotechnologies. INSA de Toulouse, 2014. Français. NNT : 2014ISAT0031 . tel-01179195

**HAL Id: tel-01179195**

**<https://theses.hal.science/tel-01179195>**

Submitted on 29 Oct 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.



# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse (INSA de Toulouse)

**Discipline ou spécialité :**

Ingénieries microbienne et enzymatique

CONFIDENTIEL

---

**Présentée et soutenue par :**

**Simon DUSSÉAUX**

Le lundi 21 juillet 2014

**Titre :**

Ingénierie métabolique de *C. acetobutylicum*  
pour la production d'isopropanol

---

### JURY

Chantal TARDIF Professeur, Université Aix Marseille  
Mickaël DESVAUX Chargé de recherche, HDR, INRA, Clermont-Ferrand  
Henri Pierre FIEROBE Directeur de recherche, CNRS, Marseille  
Nicholas LINDLEY Directeur de recherche, CNRS, Toulouse  
Philippe SOUCAILLE Professeur, INSA, Toulouse  
Isabelle MEYNIAL-SALLES Maître de conférences, HDR, INSA, Toulouse

---

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

**Unité de recherche :** Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP)

UMR5504, UMR792

**Directeur(s) de Thèse :** Isabelle MEYNIAL-SALLES

**Rapporteurs :** Chantal TARDIF et Mickaël DESVAUX



Spécialité : Ingénieries microbienne et enzymatique

Prénom : **Simon**

Nom : **Dusséaux**

Titre : **Ingénierie métabolique de *C. acetobutylicum* pour la production d'isopropanol**  
Année : 2014

Lieu : **INSA TOULOUSE**

---

### **Résumé :**

Une stratégie d'ingénierie du métabolisme de *C. acetobutylicum* a été développée afin de construire une souche capable de produire de l'isopropanol à partir de sucres en C<sub>5</sub>, en C<sub>6</sub> ou de substrats plus complexes. Dans un premier temps, une souche de *C. acetobutylicum* a été ingénierée pour la production d'un mélange isopropanol/butanol/éthanol (IBE), ce microorganisme n'étant pas capable de produire naturellement de l'isopropanol. Différents opérons, exprimant une voie synthétique de production d'isopropanol, ont été construits et introduits à partir d'un plasmide dans une souche chez laquelle la voie de synthèse du butyrate a été supprimée (*C. acetobutylicum* ATCC 824  $\Delta cac15\Delta upp\Delta buk$ ). La souche la plus performante a été sélectionnée à partir de cultures réalisées en fermenteur, en mode discontinu à pH 5,0 et s'est avérée être celle exprimant la voie de l'isopropanol sous la dépendance du promoteur *thl*. Une optimisation des paramètres de culture a conduit à la production d'un mélange IBE, à partir de glucose, à une concentration de 21 g.l<sup>-1</sup>, un rendement de 0,34 g.g<sup>-1</sup> et une productivité de 0,8 g.l<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. La production du mélange IBE à partir de xylose ou de xylane comme unique source de carbone a également été démontrée et permet une production IBE de 10,4 g.l<sup>-1</sup> avec un rendement de 0,31 g.g<sup>-1</sup> sur xylose et une production IBE de 4,28 g.l<sup>-1</sup> avec un rendement de 0,28 g.g<sup>-1</sup> sur xylane. Enfin, l'analyse des flux passant par la voie de l'isopropanol a permis d'identifier l'étape limitant la production de ce composé. Cette dernière semble être liée à la concentration en acétate intracellulaire et aux propriétés catalytiques la CoA-transférase, qui possède une faible affinité pour l'acétate. Ainsi, une CoA-transférase synthétique basée sur les caractéristiques de la CoA-transférase AtoAD d'*E. coli*, qui est décrite comme ayant un Km pour l'acétate plus faible, a été conçue et exprimée dans la souche précédemment construite afin de tenter de lever la limitation de la voie de synthèse de l'isopropanol. Dans un deuxième temps, des modifications supplémentaires du métabolisme de *C. acetobutylicum* ont été effectuées afin de produire de l'isopropanol comme unique produit de fermentation à partir de glucose ou de xylose. Différentes stratégies ont alors été évaluées dans le but de contourner le déséquilibre rédox causé par la délétion des voies parasites consommatrices de carbone. Ainsi, des outils permettant la mesure d'activité hydrogénase, *in-vivo* et *in-vitro*, ont été développés pour tester la fonctionnalité de 3 hydrogénases, utilisant la bifurcation d'électrons pour la production d'H<sub>2</sub> à partir de NADH et de ferrédoxine. Une deuxième stratégie utilisant les potentialités de la voie des phosphocétolases pour la métabolisation du xylose en acétyl-CoA a été étudiée et des résultats prometteurs ont été obtenus malgré les limitations actuellement rencontrées.

**Mots clés :** Ingénierie métabolique, *C. acetobutylicum*, Isopropanol, Biocarburant.



Lieu des travaux de recherche :

**Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés**, UMR5504, UMR792, CNRS, INRA, INSA, 135 avenue de Rangueil, 31077 Toulouse.

Titre de la thèse en anglais : **Metabolic engineering of *C. acetobutylicum* for the production of isopropanol.**

**Abstract:**

First, *C. acetobutylicum* was metabolically engineered to produce a biofuel consisting of an isopropanol/butanol/ethanol (IBE) mixture. Different synthetic isopropanol operons were constructed and introduced on plasmids in a butyrate minus mutant strain (*C. acetobutylicum* ATCC 824  $\Delta cac15\Delta upp\Delta buk$ ) in which the butyrate pathway was deleted. The best strain expressing the isopropanol operon from the *thl* promoter was selected from batch experiments at pH 5.0. By further optimizing the pH of the culture, an IBE mixture with almost no by-products was produced at a titer of 21 g.l<sup>-1</sup>, a yield of 0.34 g.g<sup>-1</sup> and productivity of 0.8 g.l<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, values never reached before. IBE production was also shown to be efficient using xylose or xylan as the sole carbon source with 10.4 g.l<sup>-1</sup> IBE produce at a yield of 0.31 g.g<sup>-1</sup> from xylose and 4.28 g.l<sup>-1</sup> IBE produce at a yield of 0.28 g.g<sup>-1</sup> from xylan. Furthermore, by performing *in vivo* and *in vitro* flux analysis of the synthetic isopropanol pathway, this flux was identified to be limited by acetate intracellular concentration and the high  $K_m$  of CoA-transferase for acetate. A synthetic CoA-transferase based on the AtoAD *E. coli* characteristics was designed, synthesized and evaluated *in vivo*. This enzyme, that displays a lower  $K_m$  for acetate, was found to be a good candidate to alleviate the bottleneck of the isopropanol pathway. Secondly, several strategies were evaluated to redraw *C. acetobutylicum* metabolism and finally construct a strain able to produce isopropanol as the only fermentation product from glucose or xylose. To overcome the severe redox imbalance caused by homo-isopropanolic fermentation, several strategies were investigated. On the one hand, a new class of electron bifurcating enzyme, the NADH hydrogenases, that can use NADH and ferredoxin to produce H<sub>2</sub>, were evaluated in *C. acetobutylicum*. This strategy opens the alternative to produce isopropanol and H<sub>2</sub> from glucose without any carbon lost. On the other hand, the use of an alternative catabolic pathway, the phosphocetolase pathway, for xylose utilization and acetyl-CoA production was evaluated. These results allow the identification of the metabolic bottlenecks to overcome to obtain a *C. acetobutylicum* strain able to produce only isopropanol from xylose at high yield.

**Key words :** Metabolic engineering, *C. acetobutylicum*, Isopropanol, Biofuel.



*A mon Père,*



## Remerciements

Ma thèse touche à sa fin, et je voudrais ici remercier tous ceux qui m'ont formé, aidé et soutenu durant cette aventure.

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés au Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP) de l'INSA de Toulouse. Je voudrais donc commencer en remerciant Nic Lindley, directeur du LISBP, de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et d'avoir accepté de présider mon jury de thèse avec la bienveillance qui le caractérise.

Je tiens également à remercier Chantal Tardif et Mickaël Desvaux d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail de thèse, des échanges très intéressants que nous avons eus le jour de la soutenance, ainsi que de leurs remarques très constructives sur le manuscrit.

Je remercie tout particulièrement Henri Pierre Fierobe d'avoir accepté de prendre part, aussi bien à mon jury de thèse qu'à mon comité de thèse et ainsi que de m'avoir suivi et conseillé tout au long de mon doctorat.

Je remercie ma directrice de thèse Isabelle Meynial-Salles de m'avoir accueilli dans son équipe et proposé cet ambitieux projet de recherche. Je la remercie de sa disponibilité, ses conseils et de m'avoir permis d'acquérir une plus grande rigueur scientifique.

Je remercie également Philippe Soucaille d'avoir suivi mes travaux et d'avoir régulièrement pris le temps d'en discuter avec moi de manière très enrichissante.

Je n'oublie pas de remercier toutes les personnes du laboratoire que j'ai eu l'occasion de côtoyer et qui m'ont apporté conseils et soutien : Christian, Charles, Benjamin, Liang, Céline, Thao, Mineyong, Sarah, Olga, Mathieu C, Mathieu H et Thomas.

J'exprime toute ma gratitude à ma mère pour son aide et son soutien sans faille durant toutes mes études supérieures.

Pour terminer, un immense merci à Marlène pour sa présence, sa patience et son soutien durant ces quatre années de thèse et sans qui je ne serais certainement pas là où j'en suis aujourd'hui.



# **Table des matières**



<b>I. Présentation du projet de recherche .....</b>	<b>20</b>
I.1. Introduction.....	20
I.2. Objectifs .....	23
<b>II. Etude bibliographique .....</b>	<b>28</b>
II.1. Le microorganisme : <i>Clostridium acetobutylicum</i> .....	28
II.1.1. Généralités .....	28
II.1.2. Historique .....	28
II.2. Métabolisme .....	29
II.2.1. Métabolisme des sucres.....	29
II.2.1.1. Métabolisme du glucose .....	29
II.2.1.2. Métabolisme du xylose .....	29
II.2.2. Les voies métaboliques de production.....	36
II.2.2.1. La réaction phosphoroclastique .....	36
II.2.2.2. Le métabolisme intermédiaire .....	36
II.2.2.3. Les voies de production des acides organiques .....	40
II.2.2.3.1. La voie de l'acétate.....	40
II.2.2.3.2. La voie du butyrate.....	42
II.2.2.4. Les voies de production des solvants .....	45
II.2.2.4.1. La voie de l'éthanol et du butanol.....	45
II.2.2.4.2. La voie de l'acétone.....	49
II.2.2.5. Les voies de production du lactate et de l'acétoïne.....	53
II.2.3. Le flux métabolique d'électrons.....	55
II.2.3.1. Les enzymes impliquées dans le flux d'électrons.....	55
II.2.3.2. Le basculement du flux électronique .....	59
II.2.3.3. Rôle du flux d'électrons dans la régulation du métabolisme .....	59
II.2.4. Les différentes phases fermentaires .....	61

II.2.4.1.	Un métabolisme biphasique.....	61
II.2.4.2.	Paramètres influençant la solvantogénèse .....	62
II.3.	Outils d'ingénierie génétique chez <i>C. acetobutylicum</i> .....	64
II.3.1.	Transformation de <i>C. acetobutylicum</i> avec des vecteurs d'expression .....	64
II.3.2.	Inactivation, insertion et mutation de gènes chez <i>C. acetobutylicum</i> .....	65
II.3.3.	Répression de gènes chez <i>C. acetobutylicum</i> .....	67
II.4.	Ingénierie métabolique de <i>C. acetobutylicum</i> .....	69
II.4.1.	Ingénierie des voies de production des acides organiques.....	69
II.4.2.	Ingénierie de la voie de production de l'acétone.....	72
II.4.3.	Ingénierie des voies de production du butanol et de l'éthanol. ....	74
II.4.4.	Ingénierie du métabolisme central .....	75
II.4.4.1.	Partie haute .....	76
II.4.4.2.	Partie basse .....	77
II.5.	Production d'isopropanol par voie fermentaire .....	79
II.5.1.	Généralités sur l'isopropanol .....	79
II.5.2.	Production d'isopropanol par <i>C. beijerinckii</i> NRRL B593.....	80
II.5.3.	Ingénierie métabolique d' <i>E. coli</i> pour la production d'isopropanol .....	81
II.5.4.	Ingénierie métabolique de <i>C. acetobutylicum</i> pour la production d'isopropanol .....	83
II.6.	La bifurcation d'électrons comme mode de conservation de l'énergie .....	84
II.6.1.	Historique .....	84
II.6.2.	Principe et exemples .....	84

### **III. Matériel et méthodes .....94**

III.1.	Souches et plasmides utilisés .....	94
III.2.	Milieux de culture et conditions de croissance.....	99
III.2.1.	<i>E. coli</i> .....	99
III.2.1.1.	Culture en milieu liquide .....	99
III.2.1.2.	Culture en milieu solide.....	100

III.2.1.3.	Antibiotiques utilisés .....	100
III.2.2.	<i>C. acetobutylicum</i> .....	101
III.2.2.1.	Culture en milieu liquide .....	101
III.2.2.1.1.	Culture en fiole .....	101
III.2.2.1.2.	Culture en bioréacteur de type batch .....	103
III.2.2.1.3.	Culture en bioréacteur de type chémostat .....	103
III.2.2.2.	Cultures en milieu solide .....	104
III.2.2.3.	Antibiotiques utilisés .....	105
III.2.3.	Conditions de stockage des souches .....	105
III.3.	Techniques de génie génétique .....	106
III.3.1.	Isolement et manipulation des acides nucléiques .....	106
III.3.1.1.	Préparation d'ADN plasmidique d' <i>E. coli</i> .....	106
III.3.1.2.	Préparation d'ADN génomique de <i>C. acetobutylicum</i> .....	106
III.3.1.3.	Transformation d' <i>E. coli</i> .....	106
III.3.1.4.	Transformation de <i>C. acetobutylicum</i> .....	107
III.3.1.5.	Techniques de clonage .....	108
III.3.1.6.	Amplification de fragments d'ADN.....	109
III.3.1.7.	Table des oligonucléotides .....	111
III.3.1.8.	Synthèse d'oligonucléotides.....	117
III.3.1.9.	Analyse informatique des séquences.....	117
III.3.1.10.	Construction des vecteurs d'expressions.....	117
III.3.1.10.1.	Vecteur <i>pCLF952/pCLF942</i> .....	117
III.3.1.10.2.	Vecteur <i>pCLF952-thl-atoAD</i> et <i>pCLF952-thl-atoAD-OPT</i> .....	119
III.4.	Techniques analytiques.....	120
III.4.1.	Détermination de la densité optique .....	120
III.4.2.	Dosage des substrats et produits de fermentation.....	120
III.5.	Mesure des activités enzymatiques .....	121
III.5.1.	Préparation des extraits cellulaires .....	121
III.5.2.	Dosage des protéines .....	122
III.5.3.	Activité Thiolase .....	123
III.5.4.	Activité CoA transferase .....	123

III.5.5.	Activité acétoacétate décarboxylase.....	124
III.5.6.	Activité alcool déshydrogénase secondaire .....	125
III.5.7.	Activités hydrogénases.....	125
III.5.7.1.	Activité de consommation de l'hydrogène .....	125
III.5.7.1.1.	Hydrogénase de <i>C. acetobutylicum</i> .....	125
III.5.7.1.2.	Hydrogénase de <i>T. maritima</i> .....	126
III.5.7.1.3.	Hydrogénase d' <i>A. woodii</i> .....	126
III.5.7.2.	Activité de production de l'hydrogène.....	127

#### **IV. Ingénierie métabolique de *C. acetobutylicum* pour la production d'un mélange IBE à partir d'hexoses et de pentoses.....132**

IV.1.	Introduction.....	132
IV.2.	Construction des vecteurs et des souches d'expression.....	132
IV.3.	Expression des vecteurs <i>pCLF942</i> et <i>pCLF952</i> dans les souches <i>824 Δcac15</i> et <i>824 Δbuk</i> de <i>C. acetobutylicum</i> .....	136
IV.4.	Fermentations régulées à pH 5,0 des souches <i>824 Δbuk</i> , <i>824 Δbuk pCLF942</i> et <i>824 Δbuk pCLF952</i> .....	138
IV.4.1.	Cinétique de fermentations .....	138
IV.4.2.	Activités enzymatiques.....	140
IV.5.	Optimisation du pH de fermentation de la souche <i>824 Δbuk pCLF952</i> pour la production d'un mélange IBE à haut titre et rendement .....	142
IV.6.	Impact du pH de fermentation sur la consommation d'acétate et la production d'isopropanol .....	144
IV.7.	Utilisation de la CoA transférase d' <i>E. coli</i> pour la production d'isopropanol chez <i>C. acetobutylicum</i> .....	149
IV.7.1.	Utilisation des gènes <i>atoAD</i> natif d' <i>E. coli</i> .....	152
IV.7.1.1.	Construction du vecteur d'expression .....	152
IV.7.1.2.	Expression du vecteur <i>pCLF952-thl-atoAD</i> chez <i>E. coli</i> .....	152
IV.7.1.3.	Expression du vecteur <i>pCLF952-thl-atoAD</i> chez <i>C. acetobutylicum</i> .....	153

IV.7.2.	Design de gènes <i>atoAD</i> dont la séquence est optimisés pour une expression optimale chez <i>C. acetobutylicum</i> .....	156
IV.7.2.1.	Design des gènes <i>atoAD</i> synthétiques .....	156
IV.7.2.2.	Construction du vecteur d'expression .....	160
IV.7.2.3.	Expression du vecteur <i>pCLF952-thl-atoAD-OPT</i> chez <i>C. acetobutylicum</i> .....	160
IV.7.2.3.1.	Culture à pH non régulé .....	160
IV.7.2.3.2.	Culture à pH régulé .....	162
IV.8.	Production d'un mélange IBE par la souche <i>824Δbuk pLCF952</i> à partir de xylose .....	167
IV.9.	Production d'une mélange IBE par la souche <i>824 Δbuk pCLF952</i> à partir de xylanes .....	169

## **V. Ingénierie métabolique de *C. acetobutylicum* pour la production d'isopropanol comme unique produit de fermentation.....174**

V.1.	Introduction.....	174
V.2.	Utilisation d'hydrogénases NADH dépendantes.....	178
V.2.1.	Introduction.....	178
V.2.2.	Mise au point d'un outil de criblage <i>in-vitro</i> de l'activité hydrogénase.....	180
V.2.2.1.	Présentation de la souche <i>824 ΔbukΔpSOL</i> .....	180
V.2.2.2.	Mesure de l'activité hydrogénase présente dans la souche <i>824 ΔbukΔpSOL</i> .....	182
V.2.2.3.	Mesure de l'activité de la NADH hydrogénase de <i>T. maritima</i> .....	184
V.2.2.4.	Mesure de l'activité de la NADH hydrogénase d' <i>A. woodii</i> .....	185
V.2.3.	Mise au point d'une méthode de criblage <i>in-vivo</i> de l'activité hydrogénase .....	186
V.2.3.1.	Présentation de la souche <i>824 Δbuk hydA ::int</i> .....	187
V.2.3.2.	Construction de la souche <i>824 Δbuk hydA ::int pTLS_hydAWT</i> .....	188
V.2.3.3.	Expression de la NADH hydrogénase de <i>C. beijerinckii</i> NCIMB 8052 .....	189
V.2.4.	Discussion.....	193
V.3.	Utilisation de la voie des phosphocétolases .....	194
V.3.1.	Adaptation du métabolisme de la souche <i>824 ΔbukΔpSOL</i> sur xylose .....	202
V.3.2.	Implémentation de la voie de l'isopropanol .....	205
V.3.2.1.	Expression du vecteur <i>pCLF952-thl</i> .....	207

V.3.2.2.	Optimisation de l'expression du gène <i>thl</i> .....	210
V.3.2.3.	Discussion .....	215
V.4.	Changement de la spécificité en co-facteur de l'enzyme Sadh.....	218
V.4.1.	Introduction.....	218
V.4.2.	Stratégie .....	219
V.4.3.	Evaluation de la fonctionnalité des protéines chimères chez <i>E. coli</i> . .....	221
<b>Conclusion générale .....</b>		<b>224</b>
<b>Références bibliographiques : .....</b>		<b>232</b>
<b>Liste des figures :.....</b>		<b>246</b>
<b>Liste des tableaux :.....</b>		<b>254</b>
<b>Abréviations:.....</b>		<b>258</b>
<b>Annexes: .....</b>		<b>264</b>
<b>Publication.....</b>		<b>268</b>

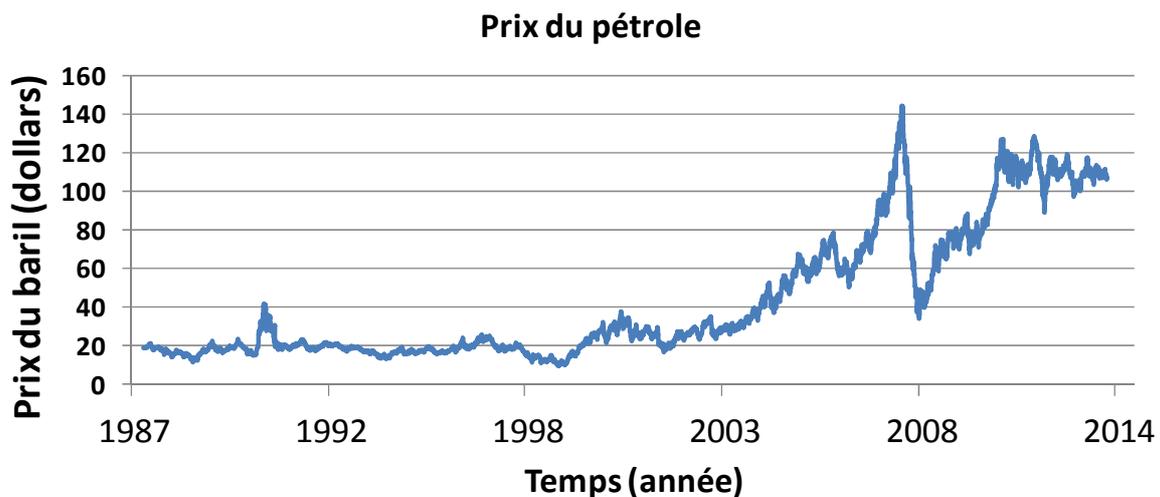
# **Présentation du projet de recherche**



## I. Présentation du projet de recherche

### I.1. Introduction

La production de biocarburants et de produits chimiques à partir de ressources renouvelables constitue un des enjeux majeurs de ces dernières décennies, notamment avec l'augmentation du prix des ressources pétrolières et la nécessité d'effectuer une transition vers des énergies plus « vertes » et renouvelables.



**Figure 1** : Evolution du prix du baril de pétrole brut entre 1987 et 2014 (US Energie Information Administration., 2014).

L'augmentation drastique du prix du pétrole depuis ces 30 dernières années (figure 1), qui est passé de 20 \$ le baril en 1987 à près de 110 \$ le baril en 2014 (Energy Information Administration., 2014), ainsi que sa raréfaction, encourage de plus en plus les industries à rechercher des ressources énergétiques moins coûteuses. De plus, les problèmes environnementaux soulevés par l'utilisation massive de matières premières fossiles amènent les gouvernements à promouvoir un basculement vers des ressources renouvelable moins polluantes.

C'est dans ce contexte socio-économique qu'a été initié le projet Européen BIOCORE, dans lequel s'inscrit ce projet de thèse, dont l'objectif est de concevoir et d'analyser la faisabilité industrielle d'une bioraffinerie lignocellulosique permettant de convertir les résidus agricoles et forestiers en biocarburants de seconde génération, en produits

chimiques à haute valeur ajoutée et en polymères plastiques biodégradables. Ce projet de grande envergure regroupait, sur une durée de quatre ans, une vingtaine de partenaires dont dix entreprises, une ONG (Organisation Non Gouvernementale) et 13 universités ou organismes de recherche publique.

Un des points de départ de ce projet est le procédé ORGANOSOLV développé par la société CIMV (Compagnie Industrielle de la Matière végétale), qui permet un fractionnement de la biomasse lignocellulosique en ses trois composantes principales: la cellulose, l'hémicellulose et la lignine. Pour chacune de ces composantes, sont alors investigués différents moyens de les traiter de manière à en exploiter le plus grand potentiel économique et environnemental (Figure 2).

Parmi les valorisations possibles, la production d'isopropanol par voie biologique à partir d'hexoses ou de pentoses s'avère particulièrement attrayante dans la mesure où ce composé possède un large champ d'applications allant des carburants aux plastiques et que sa synthèse se fait actuellement à partir de ressources fossiles. En effet, les applications industrielles de l'isopropanol sont variées et il est utilisé aussi bien pour la fabrication de garnitures de stérilisation, que pour la production de dissolvants, de décapants et de dégraissants. L'isopropanol est également un précurseur dans la voie de production des polyoléfines, constituants de certains plastiques. Une des caractéristiques particulièrement intéressante de l'isopropanol est la possibilité de le déshydrater afin d'obtenir du propylène, unité de base des plastiques en polypropylène. Finalement l'isopropanol possède également des propriétés intéressantes dans le domaine des carburants. En effet, il a été montré qu'il permet d'augmenter l'indice d'octane, ce qui en fait un additif de choix pour la production de (bio)carburants (Rassadin et al., 2006). A cet égard, la production d'isopropanol par voie biologique attire de plus en plus l'intérêt des industriels et une forte compétition, aussi bien au plan national qu'international, pour le développement de souches de production a vu le jour au cours de ces trois dernières années (Collas et al., 2012; Dai et al., 2012; Jang et al., 2013; Kusakabe et al., 2013; Lee et al., 2012).

## Schéma général BIOCORE

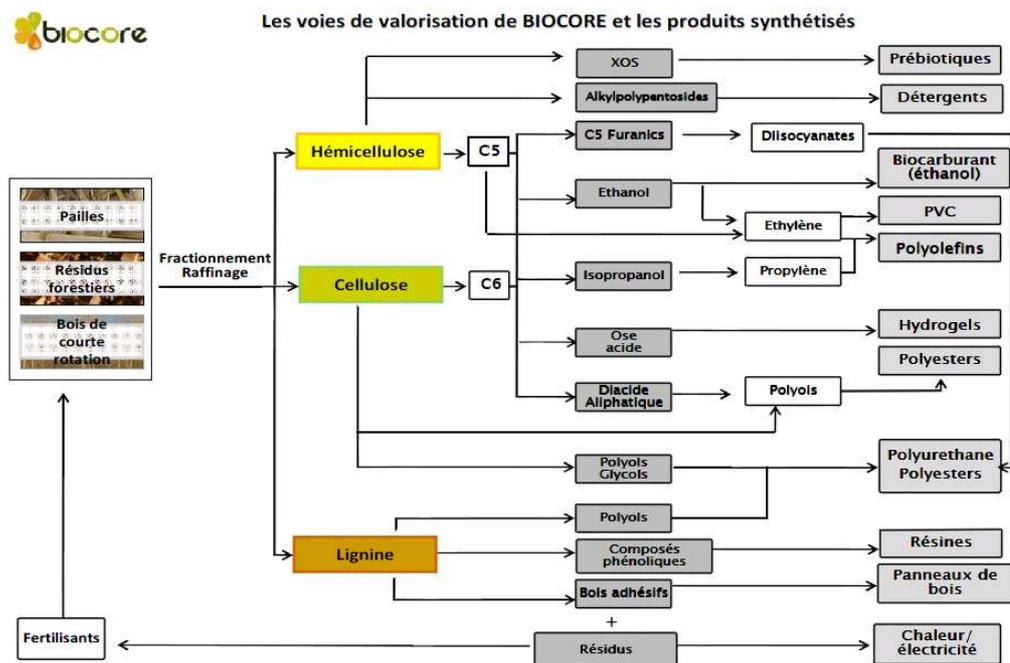


Figure 2 : Schéma général de l'organisation du projet Biocore

Certains microorganismes sont naturellement capables de produire de l'isopropanol. C'est le cas notamment de certaines souches de *Clostridium beijerinckii* chez qui la conversion de l'acétone en isopropanol a été démontrée (Chen and Hiu, 1986 ; George et al., 1983). Cependant, peu d'outils génétiques sont disponibles pour modifier et réorienter le métabolisme de *C. beijerinckii*. La production d'isopropanol chez cette souche reste minoritaire, avec seulement 0,5 g.l<sup>-1</sup> d'isopropanol produit à partir de 20 g.l<sup>-1</sup> de glucose. Ainsi, une réorientation de son métabolisme et une optimisation des conditions de production est nécessaire afin de pouvoir développer un procédé économiquement viable.

Au contraire, *C. acetobutylicum*, organisme modèle pour les bactéries du genre *Clostridium* est largement étudié depuis de nombreuses années notamment en raison de ses capacités de production de solvants à l'échelle industrielle, déjà démontrées lors de la première guerre mondiale. De plus, depuis les années 1980s, principalement en réponse au choc pétrolier des années 1970s, le nombre de recherches, aussi bien académiques

qu'industrielles, conduites sur la fermentation ABE (Acétone, butanol, éthanol) et en particulier sur *C. acetobutylicum*, a augmenté de manière exponentielle. Ceci s'explique notamment par le fait que le développement de technologies permettant la production de molécules d'intérêt à partir de matières premières renouvelables est devenu une priorité majeure à l'échelle mondiale. Les inquiétudes grandissantes sur le réchauffement climatique et les agendas gouvernementaux sur la transition énergétique, de la pétrochimie vers le renouvelable, sont les moteurs de cette recherche. Néanmoins, ces technologies ne seront adoptées à l'échelle industrielle qu'à la seule condition que leur rentabilité soit au moins équivalente à celle des technologies actuellement en place.

Si les aspects techniques liés au procédé de fermentation ont été largement étudiés dans le but d'optimiser la production, le nombre d'approches d'ingénierie métabolique a fortement augmenté ces 15 dernières années notamment grâce au développement d'outils génétiques permettant de modifier et réorienter le métabolisme de base de cet organisme (vecteur d'expression sous la dépendance de différents promoteurs, insertion/délétion de gènes du chromosome) (Soucaille et al., 2006; Heap et al., 2007; Al-Hinai et al., 2012). Tout d'abord orientées vers l'optimisation de souche de *C. acetobutylicum* pour la production de butanol, les approches d'ingénierie métabolique se sont, par la suite, diversifiées et ont visées l'ensemble des voies métaboliques. Elles ont permis d'approfondir les connaissances sur la physiologie de cet organisme et d'augmenter le panel de molécules d'intérêt produites (1-3 propandiol, glutathion, riboflavine...).

Par ailleurs, *C. acetobutylicum* est capable de métaboliser les sucres en C<sub>5</sub> et notamment les xylanes (Lee et al., 1985). Cette caractéristique constitue un attrait supplémentaire de cet organisme dans la mesure où l'utilisation de substrats riches en xylanes permettrait de valoriser des parties de la biomasse peu coûteuses et jusqu'ici sous-exploitées, telle que l'hémicellulose.

## 1.2. Objectifs

Le premier objectif de ces travaux de thèse a été de mettre en place une stratégie d'ingénierie du métabolisme de *C. acetobutylicum* pour la conversion de l'acétone en

isopropanol, couplée à une surexpression de la voie de l'acétone. La production d'isopropanol chez *C. acetobutylicum* peut être effectuée sur le même modèle que chez *C. beijerinckii* en convertissant l'acétone naturellement produit en isopropanol. Afin de réaliser cette étape, il a été choisi d'introduire chez *C. acetobutylicum* le gène codant pour l'alcool déshydrogénase secondaire Sadh de *C. beijerinckii* NRRL B593, enzyme démontrée comme étant la plus efficace pour la réduction d'acétone en isopropanol.

Cette stratégie a pour but, d'une part, d'augmenter le rendement massique en solvants et, d'autre part, la production d'un mélange IBE (Isopropanol-Butanol-Ethanol) directement utilisable comme biocarburant (dans la mesure où l'isopropanol est un « booster » de l'indice d'octane (Rassadin et al., 2006)). En effet, le butanol, naturellement produit par *C. acetobutylicum*, est connu pour être une très bonne alternative au pétrole comme carburant, avec des propriétés énergétiques plus intéressantes que celles de l'éthanol. Néanmoins, sa production à l'échelle industrielle, par ce microorganisme, est limitée par : (i) un faible rendement massique en solvants dû à la coproduction d'acétate et de butyrate, et (ii) par la production d'acétone, composé corrosif pour certaines parties des moteurs, qui contraint à la mise en place de procédures de purification coûteuses. Pour répondre à cette problématique, la suppression de la voie de l'acétone a été entreprise avec succès dans plusieurs études (Cooksley et al., 2012; Lehmann et al., 2012; Tummala et al., 2003) mais les souches mutantes ainsi obtenues produisent significativement moins de butanol, ce qui a pour effet de diminuer d'autant le rendement en solvants. D'un autre côté, la conversion de l'acétone en isopropanol apporte une valeur ajoutée importante à la fermentation ABE et la rend plus attrayante d'un point de vue économique.

Dans la première partie de cette étude, une première génération de souches mutantes de *C. acetobutylicum*, capables de produire à haut rendement un mélange Isopropanol/Butanol/Ethanol (IBE), a été construite. Cette étape a permis de valider la faisabilité de la production d'isopropanol chez *C. acetobutylicum* et d'obtenir des informations supplémentaires sur les dynamiques qui régissent la voie métabolique.

La deuxième partie de ces travaux concerne la construction d'une souche mutante de *C. acetobutylicum* rendue homo-isopropanolique, capable d'effectuer la conversion de différents types de sucres en isopropanol à haut rendement. Afin de surmonter les

différentes difficultés posées par la réorientation du métabolisme de *C. acetobutylicum* pour la production d'isopropanol comme unique produit de fermentation, plusieurs stratégies innovantes ont été testées. Tout d'abord, trois hydrogénases différentes, appartenant à une nouvelle classe d'enzymes, capable d'utiliser le NADH et la ferrédoxine comme co-facteur pour la production d'H<sub>2</sub> ont été introduites chez *C. acetobutylicum* dans le but de rétablir l'équilibre rédox dans la cellule. Ces travaux décrivent à ce jour la première tentative d'expression hétérologue de ce nouveau genre d'hydrogénase, encore très peu étudié, et présentant un fort intérêt d'un point de vue fondamental. Dans un deuxième temps, la possibilité d'utiliser une voie alternative de métabolisation du substrat, plus favorable en termes de rendement de production, a été examinée chez *C. acetobutylicum*. Cette stratégie a permis de démontrer le potentiel de cette voie mais aussi ses limites d'utilisation actuelles.

# **Etude bibliographique**



## II. Etude bibliographique

### II.1. Le microorganisme : *Clostridium acetobutylicum*

#### II.1.1. Généralités

Le genre des *Clostridies* est composé de plus de 80 espèces Gram positives ce qui en fait un des plus grands dans le règne des procaryotes. Ce genre est classifié sous la base de quatre critères : métabolisme anaérobie strict, formation d'endospores, incapacité à réduire les sulfates et présence d'une paroi cellulaire de type Gram<sup>+</sup>. *Clostridium acetobutylicum* se présente à l'état végétatif sous la forme de bâtonnets arrondis et dont la mobilité est assurée par des flagelles péritriches. La taille de cette bactérie varie entre 2,4 x 0,6 µm et 4,7 x 0,9 µm selon la souche considérée. Les spores formées pendant sa croissance sont quant à eux ovoïdes, mesurent 1,2 x 2,4 µm et sont facilement indentifiables de part leur réfringence. Tolérantes à l'oxygène et thermorésistantes, ces spores ont la capacité de pouvoir germer après de très longues périodes « d'hibernation » lorsque l'environnement redevient favorable. *Clostridium acetobutylicum* est devenu un organisme modèle pour la production de solvants par voie fermentaire et de nombreuses données physiologiques sont connues à son sujet. La séquence complète du génome de la souche ATCC 824 est connue (Nolling et al., 2001).

#### II.1.2. Historique

*Clostridium acetobutylicum* a été un des premiers microorganismes utilisé dans l'industrie pour la production de solvants. Pendant la première guerre mondiale, le procédé Weizmann est utilisé pour produire de l'acétone nécessaire à la fabrication d'un explosif : la cordite. Entre les deux guerres mondiales, du butanol va également être produit par fermentation et sert d'intermédiaire notamment dans la fabrication de caoutchoucs synthétiques. Ces procédés ont été remplacés dans les années 50 par des procédés de pétrochimie alors plus rentables. Actuellement, l'épuisement des ressources en pétrole, la forte augmentation du prix du baril ainsi que les enjeux écologiques suscitent de nouveaux intérêts pour la production biologique de solvants.

Un des facteurs qui a limité l'utilisation industrielle des Clostridies est le phénomène de dégénérescence observé après de nombreux repiquages ou lors de cultures continues et qui est caractérisé par la perte de la capacité du micro-organisme à produire des solvants (acétone et butanol) et à sporuler. Il a été montré que la perte de la production de solvants était concomitante à la perte d'un méga-plasmide de 210 kb (pSOL1) et s'explique par le fait qu'une partie des gènes associés à la production de solvants sont portés par pSOL1 (Cornillot et al., 1997). Ce phénomène de dégénérescence de la souche peut être évité en condition de limitation phosphate où une sélection s'effectue vers une souche stable productrice de solvants (Bahl et al., 1982) (Bellamacina, 1996).

## II.2. Métabolisme

### II.2.1. Métabolisme des sucres

Le métabolisme primaire de *C. acetobutylicum* convertit les hexoses et les pentoses en pyruvate, ATP et NADH.

#### II.2.1.1. Métabolisme du glucose

Les hexoses sont dégradés par la voie d'EMBDEN-MEYERHOF-PARNAS où une mole d'hexose est convertie en 2 moles de pyruvate, 2 moles d'ATP et 2 moles de NADH (figure 3). Les trois étapes les plus importantes de la glycolyse sont catalysées par la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (Gapdh), la phosphoglycérate kinase (Pgk) et la pyruvate kinase (Pyk). La Gapdh convertit le glycéraldéhyde 3-phosphate en 1,3 biphosphoglycérate avec production de NADH. La Pgk transforme le 1,3 biphosphoglycérate en 3-phosphoglycérate avec production d'un ATP et la Pyk quant à elle, convertit le phosphoénolpyruvate en pyruvate avec production d'un ATP.

#### II.2.1.2. Métabolisme du xylose

*C. acetobutylicum* est capable de métaboliser un certain nombre de pentoses dont le xylose via la voie des pentoses-phosphates. Avant son entrée dans la voie des pentoses-

phosphates, le xylose est importé dans la cellule à l'aide d'un transporteur puis converti en xylulose-5-P par une réaction d'isomérisation (en xylulose) suivie d'une réaction de phosphorylation. Le xylulose-5-P est ensuite converti, via une séquence transcétolase/transaldolase, en fructose-6-P et glycéraldéhyde-3-P pour rejoindre le circuit classique de la glycolyse (figure 4 et 5).

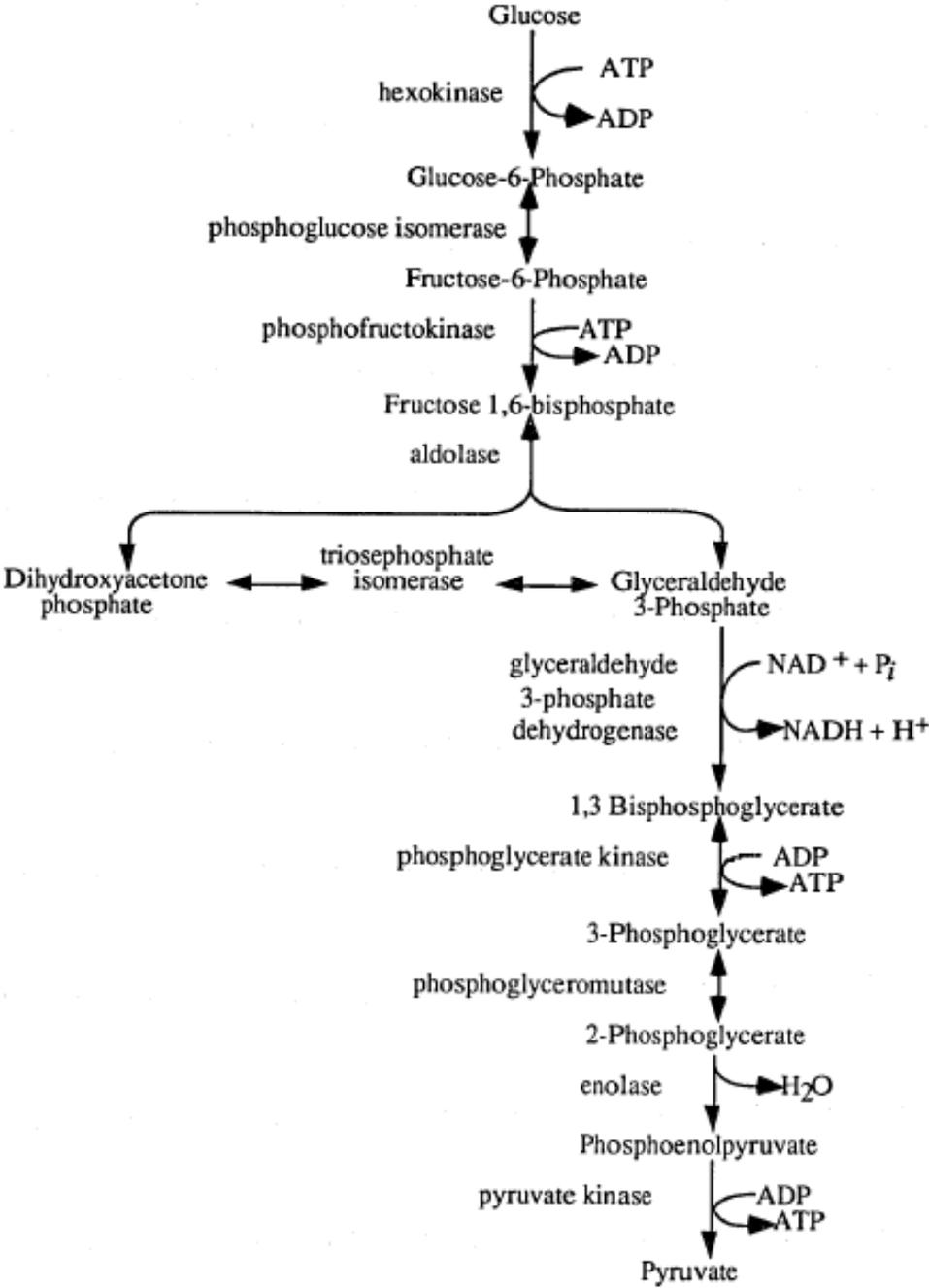
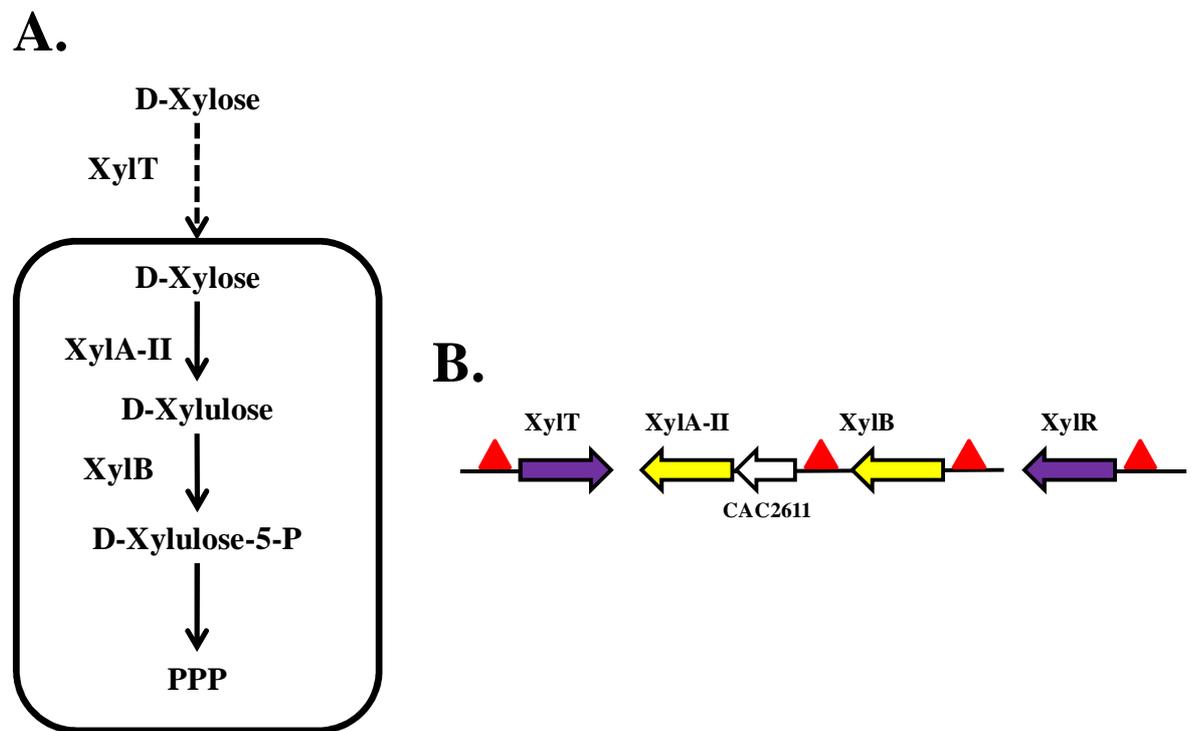


Figure 3 : Voie de la glycolyse de *C. acetobutylicum*.

Gu et al (2010) ont récemment identifié une grande majorité des gènes responsables de l'utilisation du xylose chez *C. acetobutylicum*. Le transporteur permettant l'entrée du xylose dans la cellule est encodé par le gène *xyIT* (*cac1345*) et des expériences de mutagenèse chez *C. acetobutylicum* ainsi que de complémentation chez *E. coli* ont permis de montrer son implication dans le transport du xylose *in-vivo*. La xylose isomérase de *C. acetobutylicum* XylA-II (*cac2610*) a également été identifiée et purifiée. Son activité spécifique est similaire à la xylose isomérase XylA présente chez *E. coli* et son expression dans une souche d'*E. coli*  $\Delta$ *xyIA* permet de restaurer sa capacité à métaboliser le xylose. Il est cependant notable que cette xylose isomérase présente très peu de similarité avec celles d'autres Clostridies, d'*E. coli* et de *B. subtilis*. Le même protocole expérimental leur a permis d'identifier la xylulose kinase XylB (*cac2612*) de *C. acetobutylicum* et de valider son rôle *in-vivo*. L'activité spécifique mesurée pour la xylulose kinase de *C. acetobutylicum* est bien plus faible que celle d'*E. coli* ce qui pourrait en partie expliquer le faible taux de croissance de cet organisme sur ce substrat. La présence d'une protéine régulatrice de l'expression des gènes de la voie du xylose a été proposée et vérifiée chez un certain nombre d'organismes comme *B. subtilis*. Chez *C. acetobutylicum*, un répresseur XylR (*cac3673*) est également présent et reconnaît un motif de l'ADN composé de 25 paires de bases inversées répétées. L'implication de ce répresseur dans la régulation de la voie du xylose est supportée par le fait que les gènes *xyIA-II* et *xyIB* sont organisés en opéron et présentent un site de fixation de XylR en amont du gène *xyIA-II*. Un tel motif de fixation de XylR est également retrouvé en amont du gène *xyIT* (Figure 4B).

En plus de la régulation par XylR, la voie du xylose est soumise chez *B. subtilis* à une répression catabolique induite par le facteur de transcription CcpA. L'utilisation du xylose par *C. acetobutylicum* est également connue pour être sujette à ce phénomène de répression catabolique dans la mesure où il a été montré que la présence de glucose bloque de manière réversible le métabolisme du xylose (et des pentoses en général) (Grimmler et al., 2010). La présence de cette répression catabolique est un des facteurs limitant l'utilisation de *C. acetobutylicum* pour la fermentation d'hydrolysats lignocellulosiques dans la mesure où ils contiennent généralement à la fois du glucose et du xylose. Ren et al (2010) ont identifié sur le génome de *C. acetobutylicum* un gène (*cac3037*) codant putativement pour la protéine CcpA. Afin de vérifier l'implication ou non de cette protéine dans le

mécanisme de répression catabolique, ils ont construit, à l'aide de la méthode Clostron, une souche mutante de *C. acetobutylicum* chez laquelle le gène *cac3037* (*824CcpA*) a été inactivé.



**Figure 4** : Enzymes impliquées dans l'utilisation du xylose chez *C. acetobutylicum*. XylT : transporteur de xylose; XylA-II : xylose isomérase ; XylB : xylulose kinase (Gu et al.,2010). A : Schéma simplifié de la voie d'utilisation du xylose. B : Organisation chromosomique des gènes impliqués dans l'utilisation du xylose. Les sites impliqués dans la régulation par XylR sont indiqués par un triangle rouge.

L'analyse du niveau d'expression des gènes *xylA-II* et *xylB* révèle une transcription bien plus active dans la souche *824CcpA* en comparaison avec la souche sauvage. Cultivée dans un milieu comportant un mélange de glucose et de xylose, cette souche mutée s'avère capable d'utiliser les deux substrats simultanément mais présente une incapacité presque totale à réassimiler le butyrate, causant une baisse de la croissance et de la production de solvants. L'ajout de carbonate de calcium dans le milieu de culture (connu pour ses capacités de tampon pH et pour améliorer la fermentation du xylose (Kanouni et al., 1998)) permet d'améliorer la consommation des sucres et d'atteindre des productions d'acétone (4,42 g.l

<sup>1</sup>), de butanol (9,9 g.l<sup>-1</sup>) et d'éthanol (0,78 g.l<sup>-1</sup>) bien supérieures à celles obtenues avec la souche sauvage sur le même milieu (acétone: 2,62 g.l<sup>-1</sup>; butanol: 8,56 g.l<sup>-1</sup>). La concentration finale en butyrate de la souche *824CcpA* reste néanmoins 4 fois plus élevée que pour la souche sauvage entraînant une baisse du rendement solvant/substrat. Les raisons de l'impact de l'inactivation du régulateur CcpA sur la reconsommation des acides restent à être élucidées, même si la baisse du niveau de transcription de l'opéron *ctfAB*, observé par les auteurs de ces travaux, constitue un début d'explication.

Xiao et al en 2011 arrivent également à lever la répression catabolique par le glucose chez *C. acetobutylicum* en inactivant le gène *glcG* qui encode l'enzyme II du système phosphotransférase (PTS), dépendant du phosphoénolpyruvate (PEP), permettant le transport du glucose. La souche mutante obtenue (*824glcG*) voit sa consommation de xylose augmenter de près de 50 % lors de fermentations effectuées en présence de glucose. Ils remarquent que la capacité de la souche à consommer le glucose n'est pas affectée par l'inactivation du gène *glcG*, supposant la présence de voies alternatives de transport du glucose. De plus, la surexpression des gènes *xyIT*, *xyIA-II* et *xyIB* permet à la souche d'augmenter encore sa capacité à utiliser le xylose avec 16,82 g.l<sup>-1</sup> de xylose consommé dans un milieu contenant 40 g.l<sup>-1</sup> de glucose et 20 g.l<sup>-1</sup> de xylose.

Dans la voie des pentoses-phosphates, une transaldolase catalyse la réaction entre le septulose 7-P et le glycéraldéhyde 3-P menant à la formation d'érythrose 4-P et de fructose 6-P. Le glycéraldéhyde 3-P étant un intermédiaire également partagé avec la (très active) voie de la glycolyse, son pool intracellulaire est potentiellement limitant pour la voie des pentoses-phosphates dans le cas de figure où l'activité transaldolase serait substantiellement inférieure à l'activité glycéraldéhyde 3-P déshydrogénase. Il en résulterait une accumulation de septulose 7-P et un ralentissement du métabolisme du xylose. Gu et al (2009) ont confirmé cette hypothèse en montrant que l'expression du gène *talA* codant pour une transaldolase d'*E. coli* augmente la quantité de xylose consommée par *C. acetobutylicum* d'environ 15%.

Des expériences d'analyse des flux métaboliques, basées sur l'utilisation de xylose 1-C<sup>13</sup> couplée à de la spectrométrie de masse ont permis de mettre en évidence l'existence d'une seconde voie de métabolisation du xylose chez *C. acetobutylicum* : la voie des

phosphocétolases (Liu et al., 2012). La phosphocétolase catalyse le clivage du xylulose 5-P en acétyl-P et glycéraldéhyde 3-P. Le glycéraldéhyde 3-P rentre alors dans la glycolyse tandis que l'acétyl-P peut être converti en acétate, permettant la génération d'un ATP supplémentaire. Néanmoins, la voie des pentoses-phosphates, composée de 13 réactions et produisant 5 acétyl-CoA et 8 ATP à partir de 3 xylulose 5-P est énergétiquement plus efficace que la voie des phosphocétolases qui fait intervenir 8 réactions enzymatiques et produit 6 acétyl-CoA et 6 ATP à partir de 3 xylulose 5-P (figure 5). Liu et al ont montré que pour une concentration en xylose de 10 g.l<sup>-1</sup> dans le milieu, la majeure partie du xylose est métabolisé par la voie des pentoses-phosphates, et seulement 15% par la voie des phosphocétolases. Par contre, pour une concentration en xylose dans le milieu de 20 g.l<sup>-1</sup>, ils observent un doublement de la vitesse spécifique d'utilisation du xylose, accompagné d'une augmentation de la proportion de xylose passant par la voie des phosphocétolases allant jusqu'à 40%. Cet effet est croissant jusqu'à des concentrations en xylose de 60 g.l<sup>-1</sup>. La limitation de la voie des pentoses-phosphates au niveau de la transaldolase peut en partie expliquer l'augmentation de la proportion de xylose pris en charge par la voie des phosphocétolases, lorsque la vitesse d'utilisation du xylose augmente. Liu et al ont cloné et purifié chez *E. coli* le gène *cac1343*, codant putativement pour une phosphocétolase et ont confirmé son activité xylulose 5-P phosphocétolase. L'enzyme possède une activité spécifique similaire à son équivalent chez *B. subtilis*. La surexpression du gène *cac1343* chez *C. acetobutylicum* sous la dépendance du promoteur *Ptb*, entraîne une légère amélioration du taux de croissance et de l'utilisation du xylose en phase acidogène. Au contraire, en phase de solvantogénèse, cette souche montre une baisse importante d'utilisation du xylose ainsi que de la production de solvants. L'impact le plus important de la surexpression de la phosphocétolase est la plus grande accumulation d'acétate et sa faible réassimilation comparé à une souche sauvage. Étonnamment, l'inactivation du gène *cac1343* chez *C. acetobutylicum*, ne semble pas impacter de manière significative l'utilisation du xylose et une activité phosphocétolase demeure toujours détectable dans les extraits cellulaires. Ceci semble indiquer la présence d'autres phosphocétolases capables de compléter la perte de la protéine CAC1343.

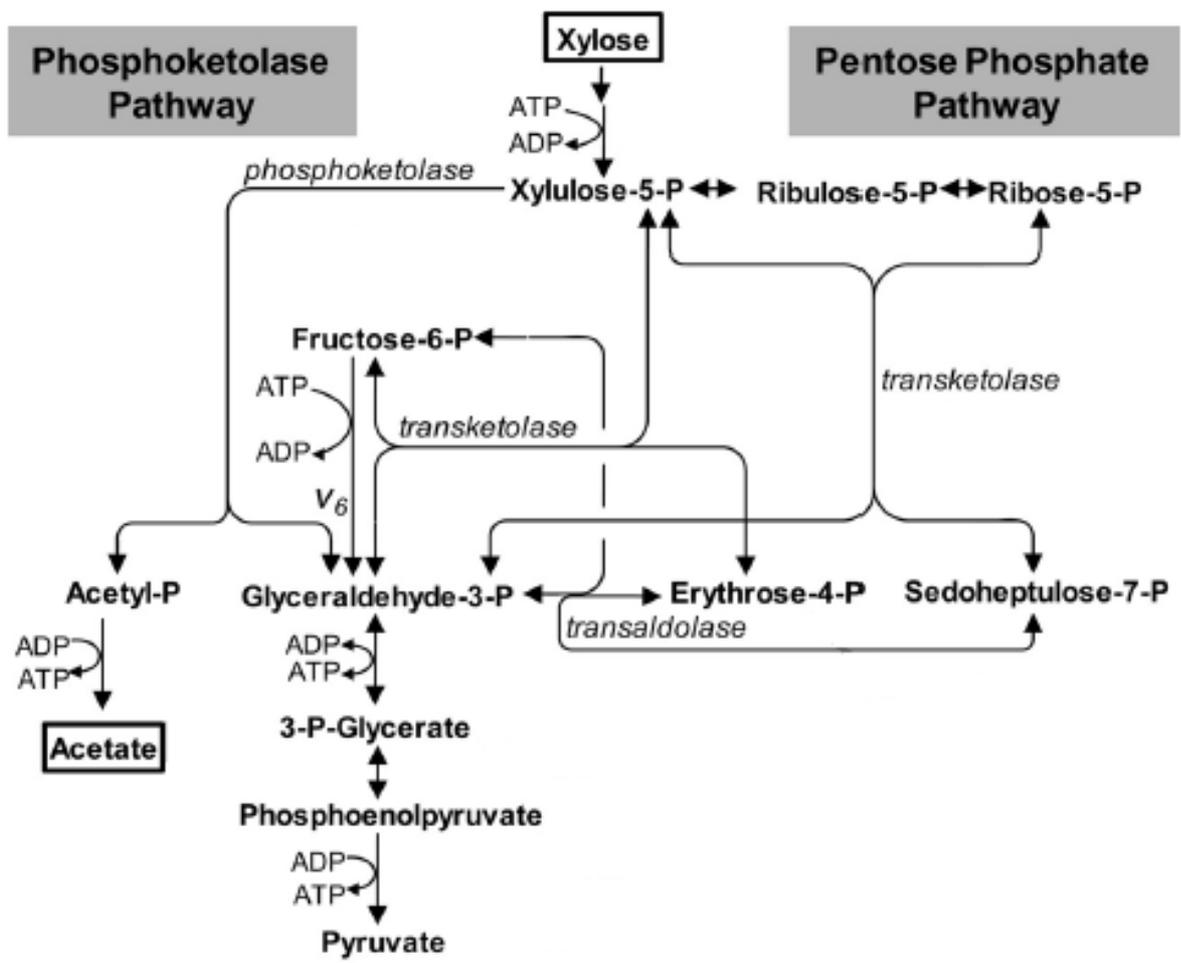


Figure 5 : Les deux voies métaboliques permettant l'utilisation du xylose par *C. acetobutylicum* (Liu et al., 2012).

## II.2.2. Les voies métaboliques de production

### II.2.2.1. La réaction phosphoroclastique

Le pyruvate produit durant la glycolyse va subir une décarboxylation oxydative par une pyruvate-ferrédoxine oxydoréductase conduisant à la production d'acétyl-CoA, de ferrédoxine réduite et de CO<sub>2</sub>. Cette réaction nécessitant la présence de phosphate, de coenzyme A et de ferrédoxine est nécessairement couplée à une autre réaction permettant de régénérer la ferrédoxine oxydée. Ce couplage s'effectue soit avec l'hydrogénase FeFe pour la production d'H<sub>2</sub> en phase d'acidogénèse, soit avec une des NAD(P)-ferrédoxine oxydoréductase pour la production de nucléotides réduits en phase de solvantogénèse.

### II.2.2.2. Le métabolisme intermédiaire

Le métabolisme intermédiaire de *C. acetobutylicum*, menant à la formation de butyryl-CoA à partir de l'acétyl-CoA, fait intervenir quatre enzymes que sont la thiolase (*thl*), la β-hydroxybutyryl-CoA déshydrogénase (*hbd*), la crotonase (*crt*) et la butyryl-CoA déshydrogénase (*bcd*) (figure 7).

La thiolase (acétyl-CoA : acétyl-CoA-acétyltransférase, EC 2.3.1.9), qui catalyse la condensation de deux acétyl-CoA en acétoacétyl-CoA (avec libération d'un CoASH), est une enzyme clé dont le niveau d'activité va distribuer le flux de carbone vers les composés à deux carbones (éthanol, acétate), les composés à trois carbones (acétone) ou les composés à quatre carbones (butyrate et butanol) (Girbal and Soucaille, 1998). La thiolase de *C. acetobutylicum* est une enzyme tétramérique composée de quatre sous-unités identiques ayant chacune une masse moléculaire de 44 kDa. Elle présente un Km pour l'acétoacétyl-CoA et le CoASH de 4,7 μM et 32 μM (à 30°C et pH 8,0) respectivement lors de la réaction de thiolyse et un Km de 0,27 mM (à 30°C et pH 7,4) pour l'acétyl-CoA lors de la réaction de condensation. La réaction de condensation de deux acétyl-CoA en acétoacétyl-CoA présente une énergie libre de Gibbs de 22,19 kJ.mol<sup>-1</sup> ce qui la rend défavorable d'un point de vue thermodynamique (Mavrovouniotis, 1991; Zheng et al., 2009). Ceci implique qu'*in-vivo* la présence de réaction déplaçant efficacement l'équilibre en faveur de la production d'acétoacétyl-CoA est indispensable au fonctionnement de l'enzyme dans le sens

physiologique de la réaction. L'enzyme est inhibée par le CoASH suivant un mécanisme du type ping-pong BI BI et elle est sensible même à un très faible ratio CoASH/acétyl-CoA (Wiesenborn et al., 1988). Mann and Lütke-Eversloh (2013) ont montré que cette inhibition par le CoASH est en partie induite par les résidus R133, H156 et G222 et que le remplacement de ces acides aminés diminue significativement cette inhibition (voir partie II.4.4.2). Pendant la phase acidogène, la thiolase est en compétition avec la phosphotransacétylase pour la prise en charge de l'acétyl-CoA et va alors promouvoir la formation d'acide butyrique au détriment de l'acide acétique. La régulation de la thiolase est donc importante dans le maintien du ratio entre les acides en C<sub>2</sub> et les acides en C<sub>4</sub> et impacte le niveau énergétique de la cellule (production nette d'un ATP par acétyl-CoA pour l'acétate et 0,5 ATP par acétyl-CoA pour le butyrate). Le rapport relatif entre l'acétyl-CoA et le CoASH a été suggéré comme étant le principal mécanisme de la régulation de l'activité thiolase, même si le butyryl-CoA et l'ATP, également inhibiteur de l'activité thiolase (à forte concentration), pourraient jouer le rôle de rétroinhibiteurs. Le pH ne semble pas être un élément de cette régulation dans la mesure où l'activité reste constante dans une gamme de pH allant de 5,5 à 7,0, ce qui correspond aux valeurs de pH intracellulaire mesurées chez *C. acetobutylicum* (Huang et al., 1985) (Gottwald and Gottschalk, 1985). Cette observation, en contradiction avec ce qui a été observé chez *C. pasteurianum* (Berndt and Schlegel, 1975), peut s'expliquer par son rôle dans la production d'acétone, de butanol et de butyrate. La thiolase est également impliquée dans la reconsommation des acides puisqu'elle contrôle le niveau d'acétoacétyl-CoA disponible pour la CoA transférase. Le niveau d'activité de la thiolase a été montré comme étant jusqu'à deux fois supérieur en phase de solvantogénèse en comparaison avec la phase d'acidogénèse (Wiesenborn et al., 1988)(Hartmanis and Gatenbeck, 1984), ce qui souligne son importance pour la production de solvants. Le rôle vital de la thiolase dans le métabolisme de *C. acetobutylicum* a été montré par Cooksley et al., (2012) qui mettent en évidence l'impossibilité d'obtenir un mutant où le gène *thl* est le seul à être inactivé (voir partie II.4.4.2).

La  $\beta$ -hydroxybutyryl-CoA déshydrogénase (L-3-hydroxyacyl-CoA: NAD<sup>+</sup> oxydoréductase, EC 1.1.1.35) de *C. acetobutylicum* (Hbd) catalyse la formation de  $\beta$ -hydroxybutyryl-CoA à partir de l'acétoacétyl-CoA. Une 3-hydroxybutyryl-CoA déshydrogénase a été purifiée chez *C. beijerinckii* NRRLB 593 (Colby and Chen, 1992). Elle

possède une masse moléculaire de 213 kDa, un Km pour le NADH de 8,6  $\mu\text{M}$  et pour l'acétoacétyl-CoA de 14  $\mu\text{M}$ . Son Km pour le NADPH est de 150  $\mu\text{M}$ , ce qui suggère que cette enzyme est essentiellement NADH dépendante. Chez *C. kluyveri* une L(+)-3-hydroxybutyryl-CoA déshydrogénase présentant une spécificité uniquement pour le NADPH a été trouvée (Madan et al., 1973). Des études semblent cependant indiquer que chez *C. acetobutylicum*, la  $\beta$ -hydroxybutyryl-CoA déshydrogénase utiliserait le NADH comme co-facteur et aucune activité n'a été détectée avec le NADPH (Hartmanis and Gatenbeck, 1984). En effet, Boynton et al en 1996 clonent et expriment l'opéron *bcs* (butyryl-CoA synthesis), constitué des gènes *hbd*, *crt* et *bcd*, ainsi que les gènes *etfA* et *etfB* chez *E. coli* et mesurent une activité HBD dépendante du NADH de 11,6  $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$  (Boynton et al., 1996). En 2013, Sommer et al clonent l'enzyme de *C. acetobutylicum* ATCC824 chez *E. coli* et parviennent à la purifier. Ils montrent alors que l'enzyme est effectivement majoritairement dépendante du NADH avec une efficacité catalytique bien plus élevée avec le NADH ( $K_{\text{cat}}/K_m = 2,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ) qu'avec le NADPH ( $K_{\text{cat}}/K_m = 3,8 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ). L'activité de réduction de l'acétoacétyl-CoA mesurée est 5 fois supérieure à l'activité d'oxydation du  $\beta$ -hydroxybutyryl-CoA, ce qui est en accord avec la fonction *in-vivo* de l'enzyme. Ils remarquent également que l'enzyme Hbd de *C. acetobutylicum* semble être spécifique de l'énantiomère S du  $\beta$ -hydroxybutyryl-CoA. L'enzyme possède une très grande thermostabilité avec un temps de demi-vie de plus de 380 heures pour des températures comprises entre 40 et 60°C, de 42 heures à 70°C et d'une heure à 80°C. Son pH optimal est de 5,0 mais elle conserve une forte activité pour une large gamme de pH compris entre 4,0 et 10,0. Son Km pour l'acétoacétyl-CoA est de 0,11 mM tandis que celui pour le  $\beta$ -hydroxybutyryl-CoA est de 0,29 mM.

En 2011, Lehmann and Lütke-Eversloh construisent un mutant inactivé pour le gène codant pour la  $\beta$ -hydroxybutyryl-CoA déshydrogénase (*hbd*). L'enzyme Hbd étant l'enzyme suivant la thiolase dans le métabolisme central et la première enzyme spécifique de la voie des  $\text{C}_4$ , son inactivation induit un arrêt complet de la production de butanol et de butyrate. La souche s'avère alors être extrêmement performante pour produire de l'éthanol avec des concentrations allant jusqu'à 33  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  et un rendement de 0,38  $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ .

La crotonase de *C. acetobutylicum* (L-3-hydroxyacétyl-CoA hydro-lyase, EC 4.2.1.17) catalyse la déshydratation du  $\beta$ -hydroxybutyryl-CoA en crotonyl-CoA. Cette enzyme a une masse moléculaire de 158 kDa et semble être constituée de quatre sous-unités d'une masse

moléculaire de 40 kDa. Spécifique des enoyl-CoA, elle ne semble réagir qu'avec le crotonyl-CoA et l'hexanoyl-CoA. Son  $K_m$  pour le crotonyl-CoA est de 30  $\mu\text{M}$  et celui pour l'hexanoyl-CoA de 130  $\mu\text{M}$ . Une inhibition par le crotonyl-CoA a été observée et pourrait être l'indication d'une régulation de l'enzyme par son produit (Waterson et al., 1972). L'activité crotonase augmente progressivement pendant la phase de croissance de la bactérie et atteint un pic après l'arrêt de la croissance cellulaire. Une activité maximum de 135  $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$  de protéine dans le sens de l'hydratation du crotonyl-CoA a été mesurée sur des extraits cellulaires dessalés (Hartmanis and Gatenbeck, 1984). L'expression du gène *crt* à partir d'un plasmide chez *E. coli* amène à la mesure d'une activité spécifique crotonase de 187,5  $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$  (Boynton et al., 1996)

La butyryl-CoA déshydrogénase (butyryl-CoA :  $\text{NAD}^+$  oxydoréductase, EC 1.3.99.2) de *C. acetobutylicum* (Bcd) n'a pas encore été purifiée à ce jour, mais sa présence a été montrée chez un certain nombre d'organismes du genre *Clostridium* comme *C. butylicum* et *C. kluyveri*. Il a été récemment montré que chez *C. kluyveri*, la butyryl-CoA déshydrogénase forme un complexe cytoplasmique avec une flavoprotéine transporteuse d'électrons (EtfA/EtfB) et catalyse simultanément la réduction de la ferrédoxine et celle du crotonyl-CoA en butyryl-CoA par le NADH (Li et al., 2008) (voir partie V.2). Des mesures d'activité butyryl-CoA déshydrogénase chez *C. acetobutylicum* ont été effectuées par HARTMANIS et GATENBECK, mais ceux-ci ne reportent qu'une très faible activité avec du Meldolabla et aucune activité avec les donneurs d'électrons physiologiques que sont le NADH et le NADPH (Hartmanis and Gatenbeck, 1984). De même, BOYTON et al, qui ont cloné et exprimé l'opéron *bcs* chez *E. coli* et *C. acetobutylicum*, ne mesurent aucune activité butyryl-CoA déshydrogénase. Les raisons expliquant ces résultats résident probablement dans le fait que Bcd formerait, comme chez *C. kluyveri*, un complexe avec EtfA et EtfB et que la présence de ferrédoxine serait nécessaire pour que la réaction ait lieu.

L'étude du niveau d'activité de la thiolase, de la  $\beta$ -hydroxybutyryl-CoA déshydrogénase et de la crotonase indique une expression coordonnée de ces trois enzymes qui présentent une activité croissante pendant la phase acidogène et atteignant un maximum en début de phase solvantogène. De plus, les gènes codant pour ces trois enzymes, constituant l'opéron *bcs*, semblent former une unité transcriptionnelle où un seul site d'initiation de la transcription a été identifié en amont du gène *crt* tandis que les deux

autres gènes de l'opéron n'en possèdent pas (Boynton et al., 1996). Toutes ces observations suggèrent un mécanisme de régulation commun, coordonnant les enzymes de la voie de synthèse du butyryl-CoA. En 2012 Wietzke and Bahl mettent en évidence la présence d'une protéine nommée Rex, encodée par le gène *cac2713*, qui régule l'expression des gènes impliqués dans le production du butyryl-CoA et des alcools. L'ORF CAC2713 est situé sur le chromosome en amont du gène *crt* (premier de l'opéron *bcs*). La protéine Rex est capable de reconnaître une séquence de 18 bp (TTGTTxxxTTxTTAACAA chez *C. acetobutylicum*) situé en amont de certain promoteur et de s'y fixer, ce qui induit une répression de la transcription des gènes associés. La fixation de Rex sur son site de reconnaissance dépend directement du niveau de pouvoir réducteur présent dans la cellule. Lorsque le ratio NADH/NAD<sup>+</sup> est bas, Rex est fixé sur l'ADN et réprime la transcription. En revanche, lorsque le ratio NADH/NAD<sup>+</sup> est élevé, Rex se dissocie de l'ADN et se lie au NADH ce qui permet alors à la transcription d'avoir lieu. Ce comportement s'explique par le fait que Rex a une bien plus grande affinité pour le NADH que pour le NAD<sup>+</sup>. Des sites de fixation de Rex ont été identifiés en amont de l'opéron *bcs*, du gène *thl* et du gène *adhE2*. Les auteurs construisent alors une souche mutante de *C. acetobutylicum* (*rex::int(95)*) inactivé pour le gène *cac2713*. Cette souche présente un profil produit altéré par rapport à la souche sauvage avec une production accrue d'éthanol et de butanol et une production fortement diminuée d'acétone et d'H<sub>2</sub>. En accord avec la fonction attribué à Rex, les niveaux d'activité Crt, Thl et Adh augmentent d'un facteur 3 par rapport à la souche sauvage. Un mécanisme similaire de régulation de l'opéron *bcs* par Rex a été identifié chez *C. tetanomorphum* GT6 (Panitz et al., 2014).

### II.2.2.3. Les voies de production des acides organiques

#### II.2.2.3.1. La voie de l'acétate

La production d'acétate chez *C. acetobutylicum* à partir de l'acétyl-CoA est réalisée grâce à l'action de deux enzymes, la phosphotransacétylase (gène *pta*) et l'acétate kinase (gène *ack*), catalysant respectivement la conversion de l'acétyl-CoA en acétyl-phosphate et celle de l'acétyl-phosphate en acétate et ATP (figure 7).

La phosphotransacétylase (acétyl-CoA : ortophosphate acétyltransférase, EC 2.3.1.8) catalyse la réaction réversible suivante :



Cette enzyme, initialement découverte chez *C. kluyveri*, présente un pH optimal de 7,4 et semble peu influencée par la température dans une gamme allant de 22°C à 40°C (Stadtman, 1955). Tout comme celle de *C. kluyveri*, la phosphotransacétylase de *C. acetobutylicum* (Pta) est activée par la présence d'ion potassium et ammonium et inactivée par la présence d'ion sodium (Hartmanis and Gatenbeck, 1984).

L'acétate kinase (ATP : acétate phosphotransférase, EC 2.7.2.1) catalyse la formation de l'acétate à partir d'acétyl-phosphate avec production concomitante d'ATP.



L'acétate kinase de *C. acetobutylicum* a été purifiée et ses propriétés ont été déterminées (Winzer et al., 1997). Cette enzyme montre une masse moléculaire sur gel de protéine en conditions dénaturantes de 43 kDa, ce qui est en accord avec la masse moléculaire de 44,3 kDa calculée à partir du gène *ack*. Néanmoins, sa masse moléculaire sur gel natif est de 89 kDa ce qui suggère une forme dimérique de l'enzyme native. Elle possède une forte spécificité pour l'acétate et ne présente au contraire aucune affinité pour le butyrate, le formate ou le propionate. Les constantes michaelienne de l'acétate kinase pour l'acétyl-phosphate et l'ADP sont respectivement de 0,71 mM et 0,58 mM.

La voie de production de l'acétate est un élément important de la phase acidogène de la fermentation car elle produit une partie de l'ATP nécessaire à la croissance cellulaire. Le niveau d'activité des deux enzymes de la voie de l'acétate atteint un maximum à la fin de

la phase acidogène, puis décroît de 50% à 90% pendant la phase solvantogène (Boynton et al., 1996), (Hartmanis and Gatenbeck, 1984). Cette observation est cohérente avec le fait que les gènes *pta* et *ack* sont adjacents sur le chromosome et partagent un unique site d'initiation de la transcription située en amont du gène *pta*. L'organisation polycistronique de ces deux gènes joue certainement un rôle dans la régulation de la voie de l'acétate (Boynton et al., 1996). Il a été suggéré que ces deux enzymes soient présentes chez tous les organismes anaérobies utilisant la phosphorylation au niveau du substrat pour la production d'ATP (Thauer et al., 1977).

En 1996 Green et al, utilise un plasmide non répliatif pour inactiver le gène Pta. L'inactivation du gène est alors confirmée par des mesures d'activité enzymatiques Pta et Ack. La souche mutante *PJC4PTA* montre une diminution par 7 de l'activité Pta et une diminution d'un facteur 3 de l'activité Ack (on peut supposer, étant donné que le gène *pta* est le premier de l'opéron *pta-ack*, que son interruption affecte l'expression du gène *ack*). Dans le même temps, cette souche voit ses activités Ptb et Buk augmentées respectivement d'un facteur 3 et d'un facteur 2 (voir partie II.4.1).

Kuit et al (2012) utilise la méthode ClosTron pour introduire un intron dans le gène *ack*. Après plusieurs tentatives infructueuses pour introduire l'intron en début de gène, ils réussissent finalement à obtenir un mutant avec une insertion de l'intron à la fin du gène *ack* (position 1027). Ils observent alors une diminution de 97% de l'activité Ack ainsi qu'une diminution de 29% de l'activité Pta. Néanmoins, la production d'acétate par ce mutant n'est que légèrement réduite (13%), malgré le fait qu'elle soit initiée bien plus tard durant la fermentation en comparaison avec la souche sauvage.

#### II.2.2.3.2. La voie du butyrate

La production de butyrate chez *C. acetobutylicum* est assurée par deux enzymes : la phosphotransbutyrylase (codée par le gène *ptb*) et la butyrate kinase (codée par le gène *buk*) qui catalysent respectivement la conversion du butyryl-CoA en butyryl-phosphate puis en butyrate (figure 7).

La phosphotransbutyrylase (butyryl-CoA : orthophosphate butyryl-transférase, EC 2.3.1.19) catalyse la réaction réversible suivante :

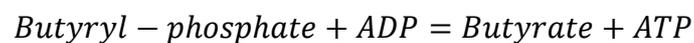


La présence d'une phosphotransbutyrylase a été montrée pour la première fois par GAVARD et al en 1957, qui l'ont partiellement purifiée, et ont mis en évidence ses différences avec la phosphotransacétylase (Pta). Elle fut plus tard purifiée et ses paramètres cinétiques déterminés (Wiesenborn et al., 1989). Sa masse moléculaire est de 264 kDa et elle est constituée de huit sous-unités ayant chacune une masse moléculaire de 31 kDa. L'enzyme semble avoir un mécanisme de type BI BI avec le butyryl-CoA et plusieurs sites de fixation du phosphate. Ces valeurs de Km pour le butyryl-CoA, le phosphate, le butyryl-phosphate et le CoASH sont respectivement de 0,11 ; 14 ; 0,26 et 0,077mM à 30°C et pH 7,0. Le butyryl-CoA et le butyryl-phosphate sont deux inhibiteurs importants de la réaction dans le sens de leur formation. L'ATP a également été montré comme étant un inhibiteur de l'enzyme à forte concentration. Elle possède une spécificité pour une large gamme de substrats acyl-CoA, mais son activité avec l'acétyl-CoA est faible en comparaison avec son activité avec le butyryl-CoA et, bien inférieure à l'activité Pta détectée dans des extraits bruts. Dans les deux sens de la réaction, l'enzyme montre une forte sensibilité vis-à-vis du pH, notamment dans une gamme allant de 5,5 à 7,0 (gamme du pH intracellulaire dans une fermentation classique (Gottwald and Gottschalk, 1985)). Dans le sens de la formation du butyryl-phosphate, toute activité est perdue pour des valeurs de pH inférieur à 6.0. Pendant une fermentation classique en mode discontinue de *C. acetobutylicum*, le pH extracellulaire décroît à cause de la production d'acide acétique et d'acide butyrique. Cette diminution de pH extracellulaire entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire en acide, ce qui a pour effet de faire chuter le pH intracellulaire jusqu'à 5.5. Il est vraisemblable que la perte complète d'activité de la phosphotransbutyrylase à des pH inférieurs à 6.0 soit un des éléments de régulation permettant le shift du flux de carbone vers la voie du butanol en fin de phase acidogène. D'un autre côté, dans le sens de production de butyryl-CoA, la sensibilité de la phosphotransbutyrylase au pH est moins importante et cette dernière

conserve une partie de son activité à pH 5,5. Cette observation pourrait suggérer un rôle de cette enzyme dans la reconsommation de l'acide butyrique pendant la phase solvantogène. Cette hypothèse est supportée par des expériences démontrant que l'expression des gènes *ptb* et *buk* dans une souche d'*E. coli*, déficiente des gènes *ato* (encodant la CoA-transférase d'*E. coli* responsable de la prise en charge du butyrate), permet de restaurer la capacité de la souche à utiliser le butyrate (Cary et al., 1988).

En 2012, Lehmann et al construisent un mutant inactivé du gène *ptb* (souche *ptb::int(87)*) et observent une perte presque totale de l'activité Ptb dans cette souche (0,013 U.mg<sup>-1</sup> contre 1.8 U.mg<sup>-1</sup> pour la souche sauvage) et une diminution de 77 % de l'activité Buk. En outre une élimination totale de la production de butyrate, la souche *ptb::int(87)* présente une production d'éthanol fortement augmenté.

La butyrate kinase (ATP : butyrate phosphotransférase, EC 2.7.2.7) catalyse la formation de butyrate à partir de butyryl-phosphate avec production concomitante d'ATP.



L'enzyme de *C. acetobutylicum* a un poids moléculaire de 85 kDa et est constituée de deux sous-unités identiques ayant une masse de 39 kDa. Sa spécificité est large et elle peut réagir avec différents acides carboxyliques comme le vinyl-acétate, le crotonate et le formate, ainsi qu'avec certains acides dicarboxyliques, comme le fumarate. Néanmoins, elle possède la plus forte affinité avec le butyrate avec un Km de 14 mM. Aucune perte de stabilité n'a été constatée dans une gamme de pH allant de 6,5 à 9,5 et le pH optimal de cette enzyme a été déterminé à 7,5 (Hartmanis, 1987). Une deuxième butyrate kinase (BkII) a également été trouvée chez *C. acetobutylicum* mais celle-ci présente un Km pour le butyrate de 0,62 M bien supérieur à celui de l'enzyme Buk, et semble très peu exprimée (Huang et al., 2000). La butyrate kinase joue un rôle important dans le métabolisme énergétique puisqu'elle constitue une voie supplémentaire de production d'ATP en plus de la glycolyse et de la production d'acétate. L'activité butyrate kinase atteint un maximum à la

fin de la phase acidogène au moment où la croissance bactérienne cesse. Une augmentation de 2,5 à 10 fois de l'activité butyrate kinase a été détectée de manière concomitante à la chute de l'activité phosphotransbutyrylase (dans le sens de la formation du butyryl-phosphate) et coïncide avec la phase de reconsommation de l'acide butyrique (Hartmanis and Gatenbeck, 1984).

Green et al (1996) inactive le gène Buk à l'aide d'un plasmide non répliquatif et observe alors une diminution d'un facteur 5 de l'activité Buk tandis que les activités Ack, Pta et Ptb augmentent respectivement d'un facteur 2, 3 et 4. La souche mutante produit alors 65 % de butyrate en moins et 33 % d'acétate en plus (voir partie II.4.1).

Les deux gènes *ptb* et *buk* codant pour les enzymes de la voie du butyrate forment un opéron constituant une unique unité de transcription sous la dépendance du promoteur *Ptb* (Cary et al., 1988).

#### II.2.2.4. Les voies de production des solvants

##### II.2.2.4.1. La voie de l'éthanol et du butanol

La production d'éthanol et de butanol, à partir respectivement d'acétyl-CoA et de butyryl-CoA, est réalisée par l'intermédiaire de l'action successive d'une aldéhyde déshydrogénase (aldéhyde : NAD(P)<sup>+</sup> oxydoréductase, EC 1.2.1.-) et d'une alcool déshydrogénase (alcool : oxydoréductase, EC 1.1.1.-) (figure 7).

Une aldéhyde déshydrogénase a été purifiée chez *C. acetobutylicum* B643 et présente une activité aussi bien avec l'acétyl-CoA qu'avec le butyryl-CoA, ce qui suggère son implication dans la production d'éthanol et de butanol (Palosaari and Rogers, 1988). Son poids moléculaire est de 115 kDa et elle est constituée de deux sous-unités identiques de 56 kDa. Le pH optimum de l'enzyme dans le sens direct de la réaction est de 7,0 et de 9,0 dans le sens inverse. Les valeurs de Km pour le NADH et le NADPH sont respectivement de 0,003 et 0,04 mM, ce qui indique que cette enzyme est majoritairement dépendante du NADH. Étonnamment, la vitesse de réaction de l'enzyme avec le butyryl-CoA est deux fois

supérieure avec le NADPH comme co-facteur qu'avec le NADH. Elle possède des Km pour l'acétyl-CoA et le butyryl-CoA relativement proches (0,055 et 0,045 mM respectivement) mais sa vitesse maximale de réaction est cinq fois supérieure avec le butyryl-CoA qu'avec l'acétyl-CoA. Cette propriété pourrait en partie expliquer le ratio butanol/éthanol de 6 :1 typiquement observé dans une fermentation de *C. acetobutylicum*.

Chez *C. acetobutylicum* ATCC824, une aldéhyde/alcool déshydrogénase codée par le gène *aad* a été identifiée en amont du gène *ctfA* (codant pour la sous-unité A de la CoA-transférase) (Nair et al., 1994) sur le méga-plasmide pSOL. Cette aldéhyde/alcool déshydrogénase a été clonée chez *E. coli* et consiste en une protéine de 873 acides aminés représentant une masse moléculaire calculée de 96,517 kDa. L'expression de cette protéine chez *E. coli*, cultivée en condition anaérobie, a permis de mettre en évidence des activités butyraldéhyde déshydrogénase et butanol déshydrogénase, spécifiques du NADH, mais aucune activité acétaldéhyde déshydrogénase ou éthanol déshydrogénase n'a été observée. Au contraire, la surexpression de cette enzyme à partir d'un plasmide chez *C. acetobutylicum*, cultivé en mode batch à pH 4,5, permet la détection d'activités acétaldéhyde et butyraldéhyde déshydrogénase ainsi que des activités éthanol et butanol déshydrogénase. Il a également été montré que cette souche de *C. acetobutylicum* possédant une expression plasmidique du gène *aad* produit plus d'éthanol qu'une souche portant un plasmide contrôle vide. En 1996, Green et Bennett ont montré que l'inactivation chromosomique du gène *aad* entraîne une diminution de 84% de la production de butanol et une augmentation de 33% de la production d'éthanol. De plus, l'expression à partir d'un plasmide répliatif du gène *aad* dans une souche de *C. acetobutylicum* M5 qui a perdu le mégaplasmide pSOL, restaure la production de butanol (Nair and Papoutsakis, 1994). Ces expériences confirment le rôle *in-vivo* de cette enzyme dans la production de butanol.

Une deuxième aldéhyde/alcool déshydrogénase appelée AdhE2 (codée par le gène *adhE2* et portée par pSOL) a été découverte chez *C. acetobutylicum* ATCC824 (Fontaine et al., 2002). Le gène *adhE2* possède 66,1% de similitude avec le gène *aad* et code pour une protéine de 858 acides aminés représentant une masse moléculaire calculée de 94,4 kDa. L'étude du niveau de transcription du gène *adhE2* à partir de cellules cultivées en chémostat opérant en condition d'acidogénèse (pH 6,5), de solvantogénèse (pH 4,4) ou d'alcoologénèse (pH 4,4 sur un mélange de glucose et de glycérol) indique que le gène *adhE2* est

spécifiquement exprimé dans des conditions d'alcoologenèse alors que le gène *aad* n'est exprimé qu'en condition de solvantogenèse. L'expression de cette enzyme uniquement dans des conditions de rapport NADH/NAD<sup>+</sup> élevé (culture sur un mélange glucose/glycérol ou ajout d'agent réducteur comme le méthylviologène) montre une régulation par le couple NADH/NAD<sup>+</sup>. Les travaux de Wietzke and Bahl (2012) suggèrent que cette régulation est principalement exercée par la protéine Rex. L'enzyme purifiée a de fortes activités : butyraldéhyde déshydrogénase et butanol déshydrogénase, avec le NADH et de très faibles activités avec le NADPH. L'expression plasmidique du gène *adhE2* dans une souche de *C. acetobutylicum* DG1 ayant perdu le méga-plasmide pSOL1 restaure la production de butanol, démontrant sa fonctionnalité *in-vivo*.

D'autres travaux ont également fait l'état d'activité butyraldéhyde déshydrogénase dépendante du NADPH chez *C. acetobutylicum*. Lors de cultures continues régulées à pH 4,5, Hüsemann and Papoutsakis (1989) détectent principalement une activité NADP<sup>+</sup>-butyraldéhyde déshydrogénase et proposent la présence de deux butyraldéhydes déshydrogénases, respectivement spécifiques du NADH et du NADPH.

Deux isoenzymes de butanol déshydrogénase dépendantes du NADH (Bdhl et BdhlI) ont été purifiées et caractérisées chez *C. acetobutylicum* (Welch et al., 1989). Elles possèdent une masse moléculaire de 82 kDa et sont constituées de deux sous-unités d'une masse de 42 kDa. Bdhl présente une activité avec le butyraldéhyde 2 fois plus élevée qu'avec l'acétaldéhyde tandis que BdhlI a une activité 46 fois plus élevée avec le butyraldéhyde qu'avec l'acétaldéhyde. Ces enzymes sont plus actives à des pH acides avec une activité maximale à pH 5,5 et perdent 50% de leurs activités dans un intervalle de  $\pm 0,7$  unité pH. Les gènes *bdhA* et *bdhB* codant pour Bdhl et BdhlI ont été clonés et séquencés (Walter et al., 1992)(Petersen et al., 1991). Les séquences en acides aminés de ces deux protéines présentent 73 % de similitude et leurs deux gènes sont organisés en tandem sur le chromosome. Néanmoins, ceux-ci ne forment pas un opéron et ils possèdent chacun un site d'initiation de la transcription situé à 37 pb de l'ATG pour *bdhA* et à 58 pb de l'ATG pour *bdhB* (Walter et al., 1992). L'analyse du niveau d'activité de ces deux enzymes dans des fermentations de *C. acetobutylicum* en mode discontinu, régulées à pH 5,0 montre un pic d'augmentation important 3h avant la formation de butanol. Le suivi du niveau d'ARNm de *bdhA* et *bdhB* révèle également une induction ou une dérégulation de ces gènes juste avant

que la production de butanol soit observée, ce qui indique une régulation de ces enzymes au niveau transcriptionnel (Walter et al., 1992).

Lors de la purification de Bdhl et de BdhII, Petersen et al., (1991) révèlent la présence d'une activité alcool déshydrogénase dépendante du NADPH et séparée des activités dépendantes du NADH de Bdhl et BdhII. Cette activité avec le NADPH est plus importante pour des pH supérieurs à 8,0, contrairement aux activités avec le NADH qui sont maximales pour des pH plus acides (Petersen et al., 1991)(Hüsemann and Papoutsakis, 1989). Des expériences réalisées en cultures continues et discontinues par Hüsemann et Papoutsakis (1989) mettent également en évidence la présence d'activités éthanol/butanol déshydrogénase avec le NADH et le NADPH. Ils en concluent la possible présence de deux enzymes différentes, l'une spécifique du NADH et l'autre du NADPH.

Ces observations pourraient être en accord avec des expériences réalisées chez *C. acetobutylicum* DSM 1732 qui montrent la présence de deux alcools déshydrogénases, séparables par ultracentrifugation, l'une dépendante du NADPH et l'autre du NADH (Dürre et al., 1987). L'alcool déshydrogénase dépendante du NADPH possède des activités butanol et éthanol déshydrogénase, même si sa vitesse de réaction est 2,4 fois supérieure avec le butyraldéhyde. Son pH optimum est compris entre 7,8 et 8,5 et elle est peu sensible à l'oxygène. L'alcool déshydrogénase spécifique de NADH est quant à elle, 1,7 fois plus active avec le butyraldéhyde qu'avec l'acétaldéhyde et possède un pH optimum entre 6,0 et 7,8. Ces résultats amènent les auteurs à en conclure que l'activité alcool déshydrogénase NADPH-dépendante serait impliquée dans la formation de butanol alors que l'activité NADH-dépendante serait plutôt impliquée dans la formation d'éthanol.

Bertram et al., (1990) ont réussi à isoler des mutants de *C. acetobutylicum* DSM 792 déficients de la voie de production du butanol mais toujours capables de synthétiser de l'éthanol. Ils ont montré que ces mutants ont perdu l'activité NADH-dépendante alcool déshydrogénase mais possèdent toujours une activité NADPH-dépendante alcool déshydrogénase. Ils suggèrent alors l'existence d'une butanol déshydrogénase NADH-dépendante et d'une éthanol déshydrogénase NADPH-dépendante dans cette souche.

Les différences de résultats obtenus chez *C. acetobutylicum* par différents groupes de chercheurs laissent encore planer un doute sur le nombre d'alcools déshydrogénases

présentes dans cet organisme, leurs spécificités vis-à-vis des co-facteurs ainsi que leurs rôles *in-vivo* dans la production de butanol et d'éthanol. Certains auteurs remarquent également que le choix de la méthode utilisée pour la préparation des extraits cellulaires (sonication par ultrason, presse de french...), le pH du dosage et la souche utilisée sont autant de paramètres qui influencent les activités mesurées (Dürre et al., 1987)(Petersen et al., 1991).

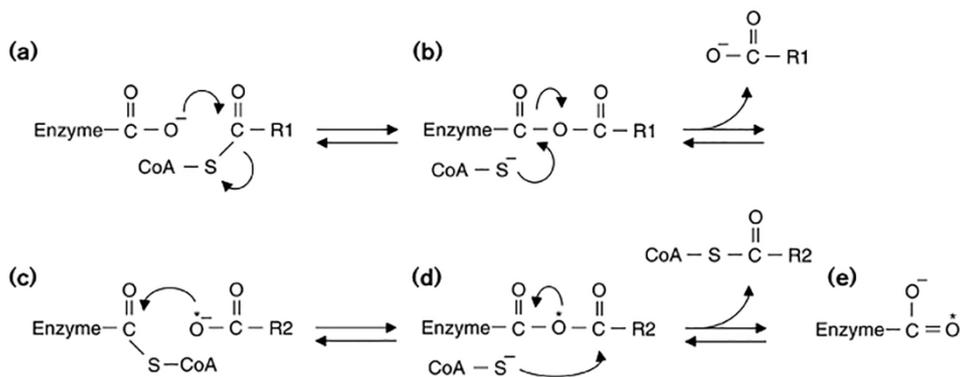
#### II.2.2.4.2. La voie de l'acétone

La production d'acétone chez *C. acetobutylicum* est réalisée à partir de l'acétoacétyl-CoA et requiert l'action d'une CoA-transférase et d'une acétoacétate décarboxylase, qui catalysent respectivement la formation d'acétoacétate à partir d'acétoacétyl-CoA et d'acétate et la formation d'acétone à partir d'acétoacétate (figure 7).

La CoA-transférase (acétoacétyl-CoA : acetate/butyrate : CoA-transferase [butyrate-acetoacetate CoA-transferase], EC 2.3.8.9) catalyse l'activation d'acide carboxylique vers son thioester CoA respectif au détriment du groupe CoA-thioester d'un autre acide carboxylique. L'enzyme de *C. acetobutylicum* ATTC824 a été purifiée et ses paramètres cinétiques déterminés (Wiesenborn et al., 1989). Elle est constituée de deux sous-unités distinctes appelées  $\alpha$  et  $\beta$  présentant une masse moléculaire respective de 23 kDa et 25 kDa. La masse moléculaire native de l'enzyme est de 93 kDa, ce qui suggère une organisation hétérotétramérique de la protéine, constituée de deux unités  $\alpha$  et de deux unités  $\beta$ . Elle est capable de prendre en charge plusieurs acides carboxyliques, mais son activité est la plus élevée avec l'acétate, le butyrate et le propionate et décroît ensuite fortement avec le valérate, le crotonate et l'isobutyrate. Le mécanisme réactionnel avec le butyrate et l'acétoacétyl-CoA est de type Ping-pong BI BI où les deux substrats sont des inhibiteurs compétitifs de la réaction. Au contraire, aucune inhibition n'est détectée quand l'acétate est utilisé comme substrat avec l'acétoacétyl-CoA. Lorsque l'acétate et le butyrate sont tous les deux présents dans le mélange réactionnel dans des proportions identiques, la vitesse de réaction avec le butyrate correspond à 27% de la vitesse de réaction avec l'acétate, ce qui place l'acétate comme le substrat principal *in-vivo* de cette enzyme. Les valeurs de Km pour l'acétate et le butyrate sont respectivement de 1200 mM et 660 mM et le Km pour l'acétoacétyl-CoA est de 21  $\mu$ M quand l'acétate est le substrat, et de 56  $\mu$ M quand le

butyrate est le substrat. La CoA-transférase est inhibée à des concentrations élevées en butanol et en acétone (> 200mM) mais également par l'acétoacétate, l'acétyl-CoA et le butyryl-CoA. Aucune inhibition n'a été observée avec l'ATP, l'ADP et le NAD(H). L'activité de l'enzyme reste élevée dans une gamme de pH allant de 7,0 à 5,5.

La structure tridimensionnelle de la CoA-transférase de *C. acetobutylicum* ATTC824 n'est pas connue mais des similarités avec d'autres CoA-transférases ont été faites. En 1997, Uwe et al ont résolu la structure 3D de la Glutaconate CoA-transférase d'*Acidaminococcus fermentans* et comparé cette enzyme avec un certain nombre d'autres CoA-transférases dont celle de *C. acetobutylicum* ATCC824. D'après cette étude, ces deux enzymes pourraient partager le même mécanisme réactionnel. Cette hypothèse est soutenue par le fait qu'un certain nombre de résidus importants sont conservés. Il s'agit notamment de la lysine 10 (sous-unité B) et de l'arginine 157 (sous-unité B) qui sont impliqués dans la liaison au CoA. Le glutamate 54 qui est l'acide aminé catalytique est également conservé. Globalement, le mécanisme réactionnel serait le suivant (figure 6) (Jacob et al., 1997) :



**Figure 6** : Mécanisme réactionnel au sein du site actif de la CoA-transférase

Le rôle de la CoA-transférase dans le métabolisme de *C. acetobutylicum* est essentiel puisqu'elle permet la reconsommation des acides acétique et butyrique, produits lors de la phase acidogène, pendant la phase solvantogène (Lehmann et al., 2012). Ce mécanisme de prise en charge des acides permet de détoxifier le milieu de culture en diminuant l'effet d'inhibition de ces acides sur la croissance cellulaire. Les valeurs de Km élevées pour l'acétate et le butyrate étant bien supérieures aux concentrations intracellulaires

physiologiques de ces deux composés (jusqu'à 300 mM pour l'acétate et 700 mM pour le butyrate (Wiesenborn et al., 1989b)), il est suggéré que l'activité *in-vivo* de l'enzyme est extrêmement sensible aux variations de leur concentration dans la cellule. Ce mécanisme pourrait servir à établir une réponse graduée et progressive à l'augmentation du niveau d'acide pendant la fermentation. Les gènes *ctfA* et *ctfB*, codant respectivement pour la sous-unité  $\alpha$  et  $\beta$  de la CoA-transférase ont été identifiés et clonés chez *E. coli* (Cary et al., 1990). L'organisation génétique de ces deux gènes, situés sur le mégaplasmide pSOL, indique qu'ils forment un opéron et que leur expression est coordonnée. Il a été montré plus tard, que les gènes *ctfA* et *ctfB* font partie d'un locus sur le mégaplasmide responsable de formation de solvants (*sol* locus) et forment avec le gène *aad* l'opéron *sol* (Cornillot et al., 1997).

L'acétoacétate décarboxylase (acétoacétate carboxy-lyase, EC 4.1.1.4) de *C. acetobutylicum* ATTC824 a été purifiée et son gène cloné chez *E. coli* (Petersen and Bennett, 1990). L'enzyme a une masse moléculaire de 340 kDa et est constituée de 12 sous-unités identiques d'une masse moléculaire de 28kDa. Dans le même temps, Gerischer et Dürre, (1990) ont purifié l'acétoacétate décarboxylase de *C. acetobutylicum* DSM 792 (ATTC824) et trouvent des résultats très similaires. Les deux équipes rapportent que le clonage du fragment codant pour l'acétoacétate décarboxylase dans un vecteur *E. coli* permet l'expression de l'enzyme, quel que soit le sens d'insertion du fragment et indépendamment du promoteur *lacZ*, ce qui suggère que tous les signaux nécessaires à la transcription et à la traduction sont présents. Le pH optimum de l'enzyme se situe à 5,0 et son Km pour l'acétoacétate est de 8 mM. L'activité de l'enzyme est induite par la présence d'acides linéaires de C<sub>1</sub> à C<sub>4</sub> mais aucune induction n'est observée pour des acides à plus de 5 carbones (Petersen and Bennett, 1990). D'un point de vue génétique, le gène *adc* codant pour l'acétoacétate décarboxylase se situe sur un opéron nonocystronique et possède un promoteur et un terminateur propre. Il se situe sur le mégaplasmide pSOL juste en aval du gène *ctfB* mais en dehors de l'opéron *sol* (*aad*, *ctfA* et *ctfB*). A fortiori, l'opéron *sol* et l'opéron *adc* sont orientés dans le sens contraire l'un par rapport à l'autre et partagent le même terminateur (Gerischer and Dürre, 1990).

Des expériences réalisées par Hartmanis et al. (1984) utilisant la résonance magnétique nucléaire du carbone (RMN C<sup>13</sup>) montrent que du butyrate ajouté dans le milieu de culture est converti en butanol sans accumulation d'intermédiaires métaboliques. La

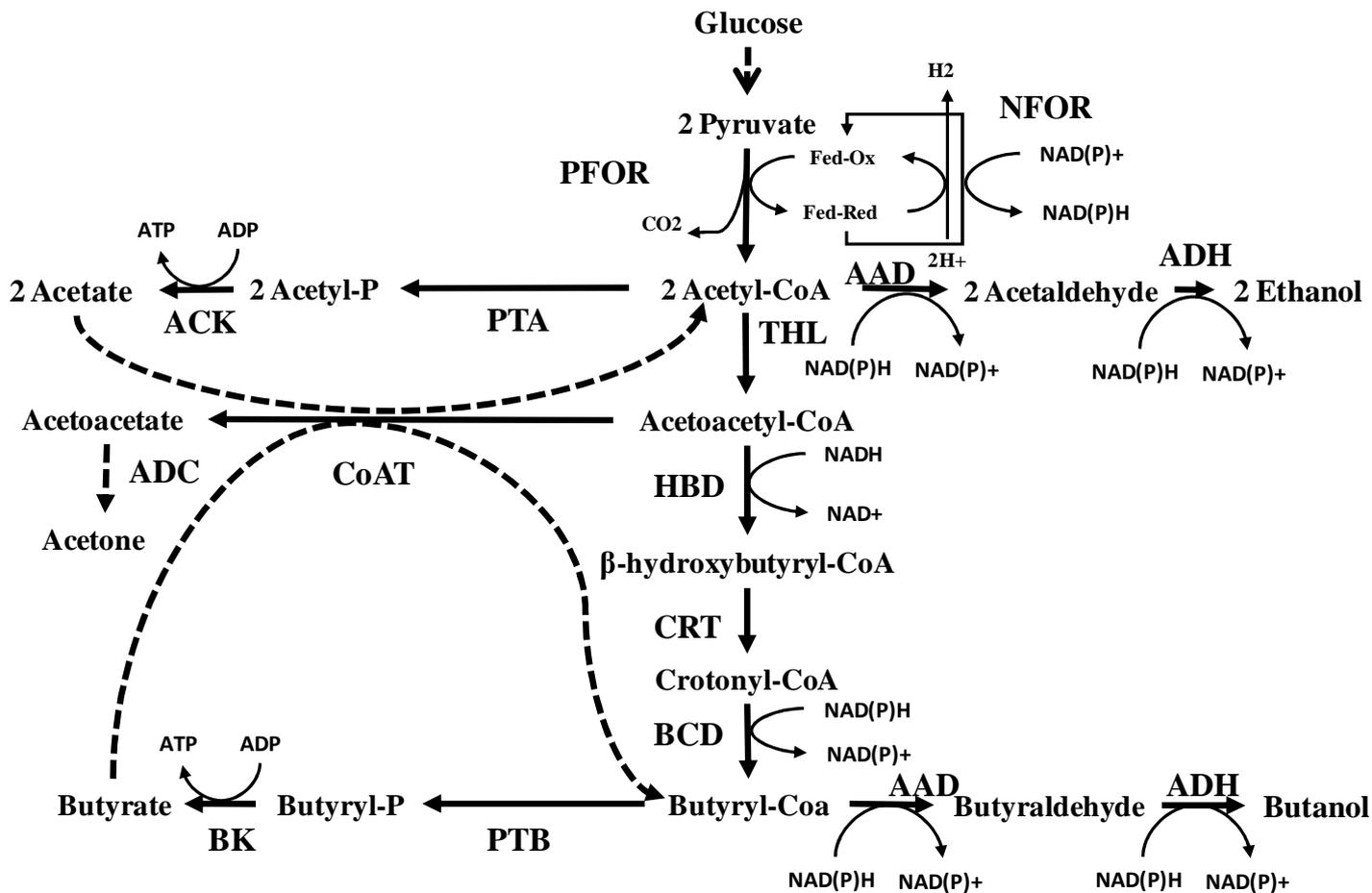
mesure des activités phosphotransacétylase, acétate kinase, phosphotransbutyrylase et butyrate kinase, subissant une diminution majeure pendant la phase de production des solvants, les auteurs en concluent que la reconsumation des acides acétique et butyrique ne peut être complètement attribuée à une activité réverse de ces enzymes. Ils proposent alors un rôle de la CoA-transférase dans la prise en charge de ces deux acides. Ces hypothèses sont supportées par le fait que la réaction catalysée par la CoA-transférase est énergétiquement plus intéressante pour la cellule que celles catalysées par l'acétate et la butyrate kinase qui sont consommatrices d'ATP. La réaction catalysée par la CoA-transférase présente néanmoins un  $\Delta G^{0'}$  allant de -7,1 à -9,6 kJ/mol, ce qui la rend peu favorable d'un point de vue thermodynamique. Cette dernière observation implique que la présence d'une réaction supplémentaire, permettant de déplacer l'équilibre vers la formation d'acétoacétate, est nécessaire au fonctionnement de cette voie métabolique et place l'acétoacétate décarboxylase au centre du mécanisme de reconsumation des acides. Dans des cultures continues de *C. acetobutylicum* DSM 1732, Andersch et al. (1983) montrent que les niveaux d'activités CoA-transférase et acétoacétate décarboxylase sont maximums en culture solvantogène régulée à pH 4,3 et faibles (mais non nuls) en culture acidogène régulée à pH 6,0. L'acétoacétate décarboxylase voit son activité multipliée par un facteur 40 entre les deux conditions alors que l'augmentation de l'activité CoA-transférase n'est que d'un facteur 10. Néanmoins, Wiesenborn et al.,(1989) remarquent que les extraits cellulaires préparés par Andersch et al. (1983) pour les mesures d'activités CoA-transférase ne contiennent ni ammonium sulfate ni glycérol qui sont deux agents indispensables à la stabilisation de cette enzyme. D'après leurs observations, toutes mesures d'activités CoA-transférase effectuées sur des extraits cellulaires non stabilisés ne sont pas significatives et sujettes à de fortes variations expérimentales. D'autres expériences effectuées plus tard en cultures continues semblent quant à elles, indiquer que la formation *in-vivo* d'acétone est directement corrélée au niveau d'activité CoA-transférase mesuré *in-vitro* (Hüsemann and Papoutsakis, 1989). Pour ces auteurs, cela suggère que l'induction de la CoA-transférase régule la formation d'acétone. De plus, ces auteurs ne détectent aucune activité CoA-transférase dans une culture continue régulée à pH 6,0 et ne produisant pas d'acétone.

#### II.2.2.5. Les voies de production du lactate et de l'acétoïne

La production de lactate chez *C. acetobutylicum* s'effectue à partir du pyruvate qui est réduit par l'action d'une lactate déshydrogénase. Le gène *ldh* codant pour une lactate déshydrogénase de *C. acetobutylicum* B643 a été cloné chez *E. coli* et permet de restaurer la production de lactate dans une souche mutée, dénuée de toute activité lactate déshydrogénase native (Contag et al., 1990). Il a été déterminé que cette enzyme possède une masse moléculaire de 159 kDa et catalyse de manière irréversible la réduction du pyruvate en lactate. De plus, elle présente une stricte dépendance pour le NADH et est activée par le fructose-1-6-biphosphate. Des résultats similaires ont également été trouvés chez *C. acetobutylicum* DSM 1731 par Freier and Gottschalk, (1987) qui caractérisent une lactate déshydrogénase spécifiquement activée par le fructose-1-6-biphosphate dépendante du NADH. Son pH optimal est de 5,8 et elle perd la quasi-totalité de son activité pour des pH inférieurs à 5,0.

Chez *C. acetobutylicum*, la production de lactate est généralement associée à des cultures régulées à un pH au dessus de 5,0 et/ou présentant une limitation nutritionnelle. Par exemple, la production de lactate est fortement augmentée dans des conditions de limitation en fer et peut s'expliquer par une diminution des activités pyruvate-ferrédoxine oxydoréductase et hydrogénase dans les cellules dues à la carence en ions fer, nécessaires à la formation des centres fer-souffre de ces enzymes. Dans ces conditions, on peut supposer que l'accumulation du NADH et du fructose-1-6-biphosphate causée par le blocage de la voie d'oxydation du pyruvate active la production de lactate.

La formation d'acétoïne, qui constitue un produit de fermentation minoritaire de *C. acetobutylicum* a été peu étudiée. L'acétoïne serait formé à partir de l'acétoacétate par une acétoacétate décarboxylase codée par le gène *aldh*. Cette voie est branchée au niveau du pyruvate et permet un bypass du métabolisme intermédiaire.



**Figure 7** : Schéma général du métabolisme du glucose par *C.acetobutylicum*. PFOR : Pyruvate ferrédoxine oxydoréductase ; NFOR : NAD(P) ferrédoxine oxydoréductase ; AAD : Aldéhyde-alcools déshydrogénase ; ADH : alcools déshydrogénase ; THL : Thiolase ; PTA : Phosphotransacétylase ; ACK : Acétate kinase ; CoAT : CoA transférase ; ADC : Acétoacétate décarboxylase ; HBD :  $\beta$ -hydroxybutyryl-CoA déshydrogénase ; CRT : Crotonase ; BCD : Butyryl-CoA déshydrogénase ; PTB : phosphotransbutyrylase ; BK : Butyrate kinase.

### II.2.3. Le flux métabolique d'électrons

La gestion du pouvoir réducteur et sa distribution dans la cellule est un élément clé de la régulation du métabolisme de *C. acetobutylicum*. Elle va permettre un flux des électrons en provenance du substrat vers des composés plus réduits.

#### II.2.3.1. Les enzymes impliquées dans le flux d'électrons

La ferrédoxine qui est une protéine commune à de nombreuses bactéries du genre *Clostridium* joue un rôle central dans ce flux électronique. Cette famille de protéines à fer-soufre possède un très bas potentiel d'oxydoréduction proche de celui de l'électrode d'hydrogène (entre -380 et -420 mV). Cette caractéristique vaut aux ferrédoxines d'être présentes dans un grand nombre de bactéries anaérobies et elles participent à de nombreuses réactions nécessitant un partenaire à faible potentiel d'oxydoréduction (Valentine et al., 1962) (LOVENBERG et al., 1963). La première ferrédoxine à avoir été caractérisée est celle de *C. pasterianum* par MORTENSON et al. en 1962. Ils découvrent alors que ce « chaînon manquant », permettant de faire le lien entre la pyruvate déshydrogénase et l'hydrogénase lors de la réaction phosphoroclastique est une petite protéine de 6 kDa, contenant 8 atomes de fer, 8 atomes de soufre, mais aucun hème et aucune flavine. Ils remarquent également que la ferrédoxine est une protéine très stable qui ne perd pas son activité même après une longue période de stockage à température ambiante et en présence d'oxygène. Sous sa forme réduite, la ferrédoxine a une couleur jaune et présente un pic d'absorption à 260 nm, tandis que sous sa forme oxydée, elle est brune et absorbe à 280 et 400 nm. Tout comme chez *C. pasterianum*, la ferrédoxine de *C. acetobutylicum* a pour rôle principal de capter les électrons issus de la transformation du pyruvate en acétyl-CoA par la pyruvate-ferrédoxine oxydoréductase (Pfor) et de les transmettre à l'hydrogénase. Elle intervient également en tant que substrat des NAD(P)H-ferrédoxine oxydoréductase permettant une régulation des concentrations (et du ratio) en NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup> intracellulaire. Cette régulation du rapport NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup> via la ferrédoxine va permettre à la bactérie d'adapter son métabolisme en fonction des conditions dans lesquelles elle se trouve. Le génome de *C. acetobutylicum* ATCC824 comporte 5 ORFs codant potentiellement pour des ferrédoxines, mais il a été montré que la ferrédoxine majoritairement présente

dans les cellules est encodée par le gène *cac0303* (Demuez et al., 2007). Cette protéine possède deux centres fer-soufre présentant un potentiel de -400 mV et elle est capable d'interagir *in-vitro* avec l'hydrogénase de *C. acetobutylicum* pour réaliser l'oxydation ou la production d'hydrogène selon les conditions expérimentales (Guerrini et al., 2007).

L'hydrogénase (hydrogène : ferrédoxine oxydoréductase, EC 1.12.7.1) est une enzyme clé du système de transport des électrons chez *C. acetobutylicum*. Cette enzyme est capable de catalyser aussi bien la réaction de production d'hydrogène à partir de protons et d'électrons que la réaction inverse de consommation du dihydrogène. Son rôle va être d'éliminer l'excès d'énergie réductrice dans la cellule sous forme d'hydrogène en réoxydant la ferrédoxine réduite. Chez *C. acetobutylicum*, au moins trois hydrogénases sont présentes : 2 hydrogénases à fer HydA et HydB codées par les gènes *hydA* et *hydB* et une hydrogénase à nickel-fer (Demuez et al., 2007). Gorwa et al (1996) ont cloné et caractérisé le gène *hydA*. D'une taille de 1,745 bp, il possède un terminateur de transcription rho-indépendant juste après le codon stop et un site d'initiation de la transcription 90 bp en amont du codon start. Ces éléments sont pour les auteurs, des indications que le gène *hydA* forme un opéron monocystronique. Le produit du gène *hydA* a par la suite été purifié et son activité mesurée (Girbal et al., 2005). Etonnamment, les niveaux d'activité de production d'hydrogène mesurés *in-vitro* se sont révélés 50 fois inférieurs à ceux mesurés pour l'hydrogénase de *C. pasterianum*, pourtant très similaire. Il a été alors proposé qu'une partie de l'activité puisse être perdue pendant la procédure de purification. Par la suite, l'optimisation des conditions de purification de la protéine a confirmé cette hypothèse et a permis d'augmenter d'un facteur 16 à 130 respectivement les activités de production et de consommation d'hydrogène mesurées *in-vitro* (Demuez et al., 2007). En outre de pouvoir utiliser la ferrédoxine comme donneur ou accepteur d'électrons, l'hydrogénase de *C. acetobutylicum* réagit également avec un certain nombre de transporteurs d'électrons tels que la flavodoxine, le méthylviologène ou le benzylviologène. Dans le sens de la production d'hydrogène, elle présente des valeurs de Km de 1,6 mM et 3,3 µM respectivement avec le méthylviologène et la ferrédoxine. Dans le sens de consommation de l'hydrogène, les valeurs de Km pour le méthylviologène et la ferrédoxine sont de 59 mM et 10 µM. La valeur de Vmax mesurée dans le sens de la consommation d'hydrogène avec le méthylviologène est de  $2,7 \cdot 10^6 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ , ce qui est 200 fois supérieur à celui mesuré avec

l'hydrogénase de *C. pasterianum* (Adams and Mortenson, 1984). Dans le sens de la production d'hydrogène, le Vmax de l'hydrogénase de *C. acetobutylicum* est similaire à celui de celle de *C. pasterianum*. Malgré le fait que le Km pour la ferrédoxine soit plus faible que celui pour le méthylviologène, les vitesses maximales de production d'hydrogène sont plus élevées avec le méthylviologène qu'avec la ferrédoxine.

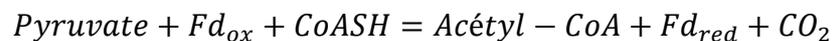
Le gène *hydB* codant pour la seconde hydrogénase à fer de *C. acetobutylicum* a également été cloné et purifié chez *E. coli* (King et al., 2006). L'enzyme présente peu de similarités, au niveau de sa séquence en acides aminés, avec l'hydrogénase de *C. pasterianum* et seulement 18% d'identité avec l'hydrogénase HydA de *C. acetobutylicum*. Néanmoins, la plupart des acides aminés, constituant les centres fer-soufre et le site actif, sont conservés. Son activité dans le sens de production d'hydrogène avec le méthylviologène est environ 10 fois inférieure à l'activité de l'hydrogénase HydA, ce qui laisse penser que la production d'hydrogène *in-vivo* chez *C. acetobutylicum* est majoritairement réalisée par HydA (King et al., 2006)(Demuez et al., 2007).

De nombreuses études ont montré qu'il existe un lien entre la baisse du niveau d'activité *in-vivo* de l'hydrogénase et l'induction de la solvantogénèse chez *C. acetobutylicum*. Gorwa et al (1996) ont démontré que la phase acidogène de culture est bien associée à des niveaux élevés d'hydrogénase tandis que la phase solvantogène est associée à des niveaux plus faibles de son activité. La redirection du flux métabolique de la production des acides vers la production des alcools peut être induite en diminuant artificiellement l'activité hydrogénase dans les cellules par :

- une augmentation de la pression partielle en hydrogène dans le milieu de culture (Kim et al., 1984)
- du monoxyde de carbone qui est un inhibiteur réversible de l'hydrogénase (Kim et al., 1984)(Datta and Zeikus, 1985)
- une limitation en fer (Peguin and Soucaille, 1995)(Junelles et al., 1988)
- des transporteurs artificiels d'électrons comme le méthylviologène ou le rouge neutre (Peguin and Soucaille, 1995).

Si la régulation de l'activité hydrogénase s'effectue en partie au niveau enzymatique, il a également été montré que le niveau d'ARNm *hydA* est plus faible dans des cultures continues maintenues en solvantogénèse que dans celles maintenues en acidogénèse (Gorwa et al., 1996), ce qui indique également une régulation au niveau transcriptionnel.

La pyruvate-ferrédoxine oxydoréductase (pyruvate : ferrédoxine oxydoréductase, EC 1.2.7.1) est une des enzymes productrices de ferrédoxine réduite. Lors de la conversion du pyruvate en acétyl-CoA, des électrons vont être transférés à la ferrédoxine oxydée pour donner de la ferrédoxine réduite. La réaction catalysée par la pyruvate-ferrédoxine oxydoréductase (Pfor) est la suivante :

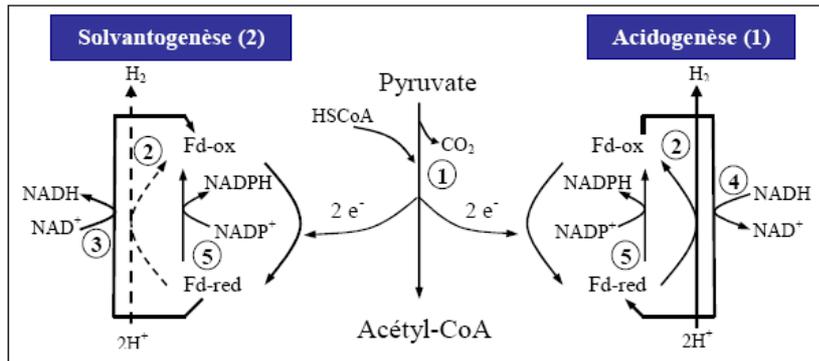


Purifiée chez *C. acetobutylicum* DSM 1731 et partiellement caractérisée (Meinecke et al., 1989), cette enzyme s'est révélée être extrêmement instable et particulièrement sensible à l'oxygène, ce qui a rendu sa caractérisation difficile. L'enzyme a une masse moléculaire de 123 kDa et possède 0,39 moles de thiamine-pyrophosphate (TTP), 4,13 moles de fer et 2,91 moles de soufre par mole de monomère. En plus du pyruvate, elle est capable d'oxyder le 2-ketobutyrate mais son activité avec ce substrat ne représente que 12,5 % de l'activité mesurée avec le pyruvate. Son Km pour le pyruvate est de 332 µM et celui pour le coenzyme A est de 3,7 µM. La ferrédoxine est l'accepteur d'électrons physiologique de la Pfor, mais des activités supérieures d'oxydation du pyruvate ont été obtenues avec le bleu de méthylène. Aucune activité Pfor n'est détectée avec le NAD(P)H comme accepteur d'électrons.

Des activités NADH et NADPH-ferrédoxine oxydoréductase ont également été détectées chez *C. acetobutylicum*. Ces enzymes permettent une interconversion du pouvoir réducteur sous forme de ferrédoxine réduite ou de NAD(P)H selon les besoins de la cellule et ainsi une fine régulation de la disponibilité de ces composés au cours de la fermentation.

### II.2.3.2. Le basculement du flux électronique

Lors du basculement du métabolisme de la phase acidogène vers la phase solvantogène, une modification du flux électronique s'opère. Ce basculement est rendu possible grâce à l'action de différentes enzymes : l'hydrogénase et les ferrédoxine-NAD(P)<sup>+</sup> réductases.



**Figure 8** : 1 : Pyruvate-ferrédoxine oxydoréductase ; 2 : Hydrogénase ; 3 : Ferrédoxine NAD<sup>+</sup> réductase ; 4 : NADH-ferrédoxine réductase ; 5 : Ferrédoxine NADP<sup>+</sup> réductase (Girbal et al., 1995).

Lors de la phase acidogène, une partie du NADH produit par la glycolyse est utilisé pour la formation de butyrate. Le reste est consommé par le biais de la réduction de la ferrédoxine grâce à une NADH-ferrédoxine réductase. La ferrédoxine oxydée est régénérée par l'hydrogénase qui va utiliser des protons comme accepteur d'électrons et produire de l'hydrogène. Lors de la phase solvantogène, la production de butanol et d'éthanol consomme plus de NADH que ne peut en fournir la glycolyse. Du NADH est alors produit par l'intermédiaire d'une ferrédoxine NAD<sup>+</sup> réductase qui va alors oxyder la ferrédoxine au détriment de la production d'hydrogène (figure 8).

### II.2.3.3. Rôle du flux d'électrons dans la régulation du métabolisme

Les voies de synthèse de l'acide butyrique et des alcools sont consommatrices de NAD(P)H alors que les voies de production d'acide acétique et d'acétone ne consomment pas de nucléotides réduits. En contrôlant la disponibilité du pouvoir réducteur dans la cellule, il semble donc possible de moduler le métabolisme et favoriser la production de

certaines composés. Lors d'une culture de *C. acetobutylicum* régulée à pH 6,5 et alimentée avec un mélange glucose-glycérol, un changement inhabituel du métabolisme de la bactérie s'opère. En effet, dans ces conditions, la production d'éthanol et de butanol est fortement stimulée alors que les productions d'acétate, de butyrate et d'hydrogène diminuent de manière conséquente. Le glycérol étant un substrat plus réduit que le glucose, pour la même quantité de carbone, deux fois plus de NADH est produit par le métabolisme. Cet excès d'équivalent réducteur, produit lors de la conversion du glycérol en pyruvate, va devoir être pris en charge par une des voies d'oxydation du NADH. Il serait alors possible d'imaginer que le NADH soit oxydé par l'intermédiaire de la NADH-ferrédoxine oxydoréductase, ce qui aurait pour effet d'augmenter la production d'hydrogène, qui servirait alors d'accepteur final des électrons. Étonnamment, il a été montré que dans ces conditions, une partie de la ferrédoxine réduite produite par la Pfor sert à la formation de NADH par le biais de la NAD<sup>+</sup>-ferrédoxine oxydoréductase (Vasconcelos et al., 1994). Étant donné que d'une part le métabolisme du glycérol produit plus de NADH, et que d'autre part une partie de la ferrédoxine réduite sert à la production de NADH supplémentaire, seules les voies de production des alcools peuvent être utilisées par la cellule pour effectuer la régénération du NAD<sup>+</sup>. Les voies de l'acétate et de l'acétone étant neutres du point de vue rédox, elles s'en trouvent largement défavorisées par rapport aux voies consommatrices de nucléotides réduits. Il est également important de souligner que la souche sauvage de *C. acetobutylicum* ATCC 824 est incapable de croître sur glycérol uniquement car l'excès de NADH produit dans ces conditions est trop important pour être absorbé par le métabolisme (Girbal et al., 1995), (Vasconcelos et al., 1994). Au contraire, lorsque la voie de production du 1-3 propanediol (de *C. butyricum*) est introduite chez *C. acetobutylicum*, la croissance sur glycérol comme source unique de carbone est possible et permise grâce à la régénération du NAD<sup>+</sup> par la voie du 1-3 propanediol (González-Pajuelo et al., 2005).

De même, un balayage de la culture au monoxyde de carbone, puissant inhibiteur de l'hydrogénase, augmente considérablement le niveau de NADH disponible. Dans de telles conditions, la production d'éthanol et de butanol est largement favorisée puisqu'elle permet d'absorber l'excès de pouvoir réducteur dévié de la production d'hydrogène (Papoutsakis et al., 1989).

Harris et Papoutsakis (1999) ont également montré qu'un mutant de *C. acetobutylicum* inactivé pour la butyrate kinase produit une plus grande quantité d'éthanol et de butanol (87 mM d'éthanol et 225 mM de butanol) que la souche sauvage (16 mM d'éthanol et 158 mM de butanol). De plus, ils observent également une production précoce de butanol lors de la fermentation dès la phase acidogène. Ce comportement peut être expliqué par le fait qu'une inactivation de la production de butyrate augmente la quantité de NAD(P)H disponible dans la cellule. La production d'alcool est alors un moyen pour la bactérie de réoxyder cet excès de pouvoir réducteur.

D'autre part, Lehmann et Eversloh (2011) ont montré qu'un mutant de *C. acetobutylicum* chez lequel le gène codant pour la  $\beta$ -hydroxybutyryl-CoA déshydrogénase (Hbd) est inactivé produit une très grande quantité d'éthanol (347mM). Ici, la production de butyrate et de butanol est bloquée, libérant alors une grande quantité de NAD(P)H, contraignant la cellule à produire de l'éthanol pour réoxyder l'excès de nucléotide réduit.

#### II.2.4. Les différentes phases fermentaires

##### II.2.4.1. Un métabolisme biphasique

La croissance de *C. acetobutylicum* en culture discontinue à pH non régulé se décompose en deux phases.

La première est la phase acidogène qui correspond à une croissance rapide liée à la production d'acide acétique, d'acide butyrique et d'hydrogène. La production d'acides organiques qui permet la formation d'ATP va entraîner une diminution du pH du milieu de culture.

La baisse du pH ainsi que l'accumulation d'acides organiques (acide butyrique notamment) vont être à l'origine d'une inhibition de la croissance. La détoxification du milieu de culture va alors s'effectuer au cours de la deuxième phase : la phase solvantogène, durant laquelle les solvants sont formés (butanol, éthanol et acétone) et les acides organiques partiellement consommés. Durant cette phase, la croissance est quasi nulle et le pH du milieu de culture remonte légèrement.

Un troisième état physiologique dans lequel peut se trouver une culture de *C. acetobutylicum* est appelé alcoologénèse et est accompagné d'une production d'éthanol et de butanol sans production d'acétone. L'alcoologénèse est associée à des cultures présentant un ratio NAD(P)H/NAD(P) élevé et peut être induite par l'ajout d'une source carbonée plus réduite (glycérol (Vasconcelos et al., 1994)), une limitation en fer (Junelles et al., 1988) ou par l'inactivation de l'activité hydrogénase (ajout de méthylviologène 1 mM par exemple (Peguín and Soucaille, 1995)).

#### II.2.4.2. Paramètres influençant la solvantogénèse

Il est généralement admis, que des cultures à pH élevé produisent majoritairement des acides et que des cultures à pH bas produisent des solvants. A une valeur de pH proche de la neutralité, les seuls produits de fermentation sont l'acétate, le butyrate, le CO<sub>2</sub> et l'hydrogène. Au contraire, quand le pH descend en dessous de 5,0, la production d'acétone, d'éthanol et de butanol est observée (Bahl et al., 1982). Néanmoins, même si la baisse du pH du milieu de culture semble être corrélée avec l'induction de la solvantogénèse, ce critère n'est pas suffisant pour déterminer si une culture se trouve en phase acidogène ou solvantogène. Le pH auquel intervient la solvantogénèse dépend de la souche considérée et des conditions de culture. De plus, l'induction de la solvantogénèse à des pH compris entre 5,0 et 7,0 peut être observée après addition d'acide acétique ou butyrique (Martin et al., 1983)(Holt et al., 1984). La diminution du taux de croissance et de la production d'hydrogène en fin de phase acidogène sont autant de paramètres pouvant jouer un rôle dans le « switch » vers la solvantogénèse.

Les acides organiques tels que l'acide acétique et l'acide butyrique semblent jouer un rôle important dans l'induction de la solvantogénèse, même si la nature de leur action reste très discutée. La production d'acides pendant la phase acidogène participe à l'équilibre ionique du milieu de culture et les formes non ionisées des acides diffusent passivement à travers la membrane (Kell et al., 1981). De plus, lorsque le pH extracellulaire diminue de 6,0 à 4,5, le pH intracellulaire lui diminue de manière moins importante, ce qui a pour effet d'augmenter le gradient de pH transmembranaire ( $\Delta$ pH) (Huang et al., 1985)(Gottwald and Gottschalk, 1985). L'augmentation du  $\Delta$ pH implique une forte augmentation de la

concentration intracellulaire en acide acétique et butyrique, bien supérieure à la concentration extracellulaire. En effet, à pH 4,5 les concentrations intracellulaires en acide acétique et butyrique sont respectivement 13 et 7 fois plus importantes que les concentrations extracellulaires, tandis que seulement 2,2 fois plus importantes à pH 6,5 (Huang et al., 1986) . L'entrée d'acides sous forme neutre dans la cellule s'accompagne d'une entrée de protons et d'une baisse du pH intracellulaire pouvant mener à la destruction du gradient de pH transmembranaire et l'arrêt des fonctions métaboliques qui lui sont associées (Ballongue et al., 1987). Cette entrée d'acide non ionisé dans la cellule dépend à la fois du pH extracellulaire et du pH intracellulaire selon une relation du type (Jarzębski et al., 1992) :

$$[AA]_i = [AA]_e \frac{10^{(pH_i - pK_a)}}{1 + 10^{(pH_e - pK_a)}}$$

[AA]<sub>i</sub> : concentration en acide intracellulaire ; [AA]<sub>e</sub> : concentration en acide extracellulaire

Quand les cellules fermentent les sucres, leurs capacités à maintenir un pH intracellulaire proche de la neutralité est soumise au stress engendré par les produits de fermentation. Pendant la phase acidogène, la baisse du pH extracellulaire et l'augmentation de la concentration extracellulaire en acide entraîne une forte hausse de la concentration intracellulaire en acide acétique et butyrique. Ceci tend à faire diminuer le pH intracellulaire. Une hypothèse serait que pour contrer cet effet, délétère pour la cellule, la production de solvants est déclenchée et permet de faire baisser la concentration intracellulaire en acides en les réassimilant par le biais de la production de solvants. Huang et al (1986) ont montré que la concentration intracellulaire en acide acétique et butyrique est maximale à pH 5.5 et 6 respectivement, juste avant que la solvantogénèse soit induite.

Le mode de culture semble également influencer sur l'impact des acides organiques sur la solvantogénèse. En culture discontinue, régulée entre pH 4,0 et 5,0 ; Papoutsakis et al. (1988,1989a) rapporte une concentration seuil en acide butyrique non dissocié de 6 à 13

mM pour l'induction de la solvantogénèse. Par contre en culture continue, la concentration en acide butyrique non dissocié ne semble pas être à l'origine de la solvantogénèse.

Zhao et al (2005) étudient les niveaux intracellulaires en butyryl-P et acétyl-P dans différentes souches de *C. acetobutylicum* (WT, mutant *buk* et mutant *M5*) et détectent une corrélation entre un pic de butyryl-P et l'initiation de la solvantogénèse. Le mutant *buk* qui accumule la plus grande quantité de butyryl-P présente une production de solvant bien plus précoce et soutenue que les autres souches. Pour toutes les souches, l'initiation de la formation du butanol correspond à un pic en butyryl-P entre 60 et 70 pmol.g<sup>-1</sup> et plus la concentration en butyryl-P est élevée plus la production de butanol est importante. La concentration intracellulaire en butyryl-P dans la souche *M5*, qui ne produit pas d'alcools, ne dépasse pas 50 pmol.g<sup>-1</sup>. Le mutant *pta* qui présente des niveaux très faibles d'acétyl-P ne semble pas avoir de défaut d'initiation de la solvantogénèse, indiquant que le butyryl-P est le principal régulateur.

En 2010, Alsaker et al utilisent des puces à ADN pour étudier le niveau d'expression des gènes de *C. acetobutylicum* en réponse à différents stress (acétate, butyrate, solvants ...). Ils montrent que la présence d'acétate dans le milieu induit une surexpression des gènes impliqués dans la solvantogénèse (notamment l'opéron *sol*) et suggère que ce métabolite participe très certainement au « switch » métabolique d'une phase à l'autre.

### II.3. Outils d'ingénierie génétique chez *C. acetobutylicum*

#### II.3.1. Transformation de *C. acetobutylicum* avec des vecteurs d'expression

La possibilité de pouvoir transformer *C. acetobutylicum* avec des vecteurs permettant l'expression de protéines ou de voies métaboliques, homologues ou hétérologues, la délétion ou l'intégration de gènes, est le point de départ indispensable à toutes stratégies d'ingénierie métabolique de cet organisme. *C. acetobutylicum* étant un microorganisme anaérobie stricte, il est judicieux d'utiliser des vecteurs navettes entre cet organisme et un second organisme bien caractérisé et connu tel qu'*E. coli*. En 1992, Mermelstein *et al* décrivent une procédure de transformation de *C. acetobutylicum* par électroporation en utilisant un vecteur navette *B. subtilis/C. acetobutylicum*, possédant une

origine de réplication provenant de *B.subtilis* et fonctionnelle chez *C. acetobutylicum*. Cependant, ils mettent en évidence l'impossibilité de transformer *C. acetobutylicum* avec un vecteur navette *E. coli/C. acetobutylicum*. Le même constat est réalisé par Lee et al., (1992) qui ne réussissent pas à obtenir de transformant de *C. acetobutylicum* ATTC 824 avec ce type de vecteur alors qu'ils y parviennent chez *C. beijerinckii* NCIMB 8052. Il est alors démontré que *C. acetobutylicum* possède une endonucléase CAC824 I qui reconnaît les séquences du type 5'-GCNGC-3' qui sont très fréquentes chez *E. coli* (Mermelstein et al., 1992). Ces motifs étant peu présents chez *B. subtilis*, cela explique pourquoi les vecteurs dérivés de cet organisme sont plus facilement transférables chez *C. acetobutylicum*. Peu de temps après, une technique permettant la transformation de *C. acetobutylicum* de manière efficace avec des vecteurs navettes *E. coli/C. acetobutylicum* a été développée (Mermelstein and Papoutsakis, 1993). Cette méthode consiste à transférer le vecteur *E. coli/C. acetobutylicum*, avant son introduction chez *C. acetobutylicum*, dans une souche d'*E. coli* exprimant la méthyltransférase  $\phi 3T$ I, provenant du phage de *B.subtilis*  $\phi 3T$ , permettant la méthylation des sites 5'-GCNGC-3' et le protégeant ainsi de l'action de l'endonucléase CAC824 I. Cette procédure qui a fait ses preuves est encore largement utilisée à ce jour. Plus récemment, des souches modifiées de *C. acetobutylicum* ATTC 824 (Soucaille et al., 2006) et *C. acetobutylicum* DSM 1731 (Dong et al., 2010) respectivement délétées et inactivées pour le gène *cac1502* (codant pour l'endonucléase CAC824I) ont été obtenues. Ces souches mutantes présentent alors l'avantage de pouvoir être transformées efficacement par des vecteurs *E. coli/C. acetobutylicum* non préalablement méthylés, ce qui simplifie considérablement la procédure et ouvre la porte à l'utilisation d'une plus large gamme de vecteurs.

### II.3.2. Inactivation, insertion et mutation de gènes chez *C. acetobutylicum*

Les premières tentatives réussies d'inactivation de gènes chez *C. acetobutylicum* ont été effectuées à l'aide de plasmides non-réplicatifs, introduits dans le chromosome par recombinaison homologue. Cette procédure, décrite par Green et al, a permis l'inactivation des gènes *buk* (Green et al., 1996), *pta* (Green et al., 1996) et *aad* (Green and Bennett, 1996). Ces plasmides non-réplicatifs, contiennent un fragment d'ADN chromosomique

correspondant au gène à inactiver et un marqueur génétique permettant d'effectuer la sélection des transformants. L'utilisation d'un plasmide non-réplicatif pose néanmoins des problèmes et rend la procédure laborieuse dans la mesure où, d'une part les nombreuses DNAses et endonucléases présentes dégradent rapidement le plasmide et d'autre part la fréquence de recombinaison est relativement basse (0,8 mutant par  $\mu\text{g}$  d'ADN). De plus, les mutants obtenus avec cette méthode conservent le marqueur de résistance antibiotique, ce qui limite grandement les stratégies d'inactivation successives de gènes. Finalement, les mutants issus d'évènements de simple crossing-over se révèlent très instables en absence de la pression de sélection antibiotique.

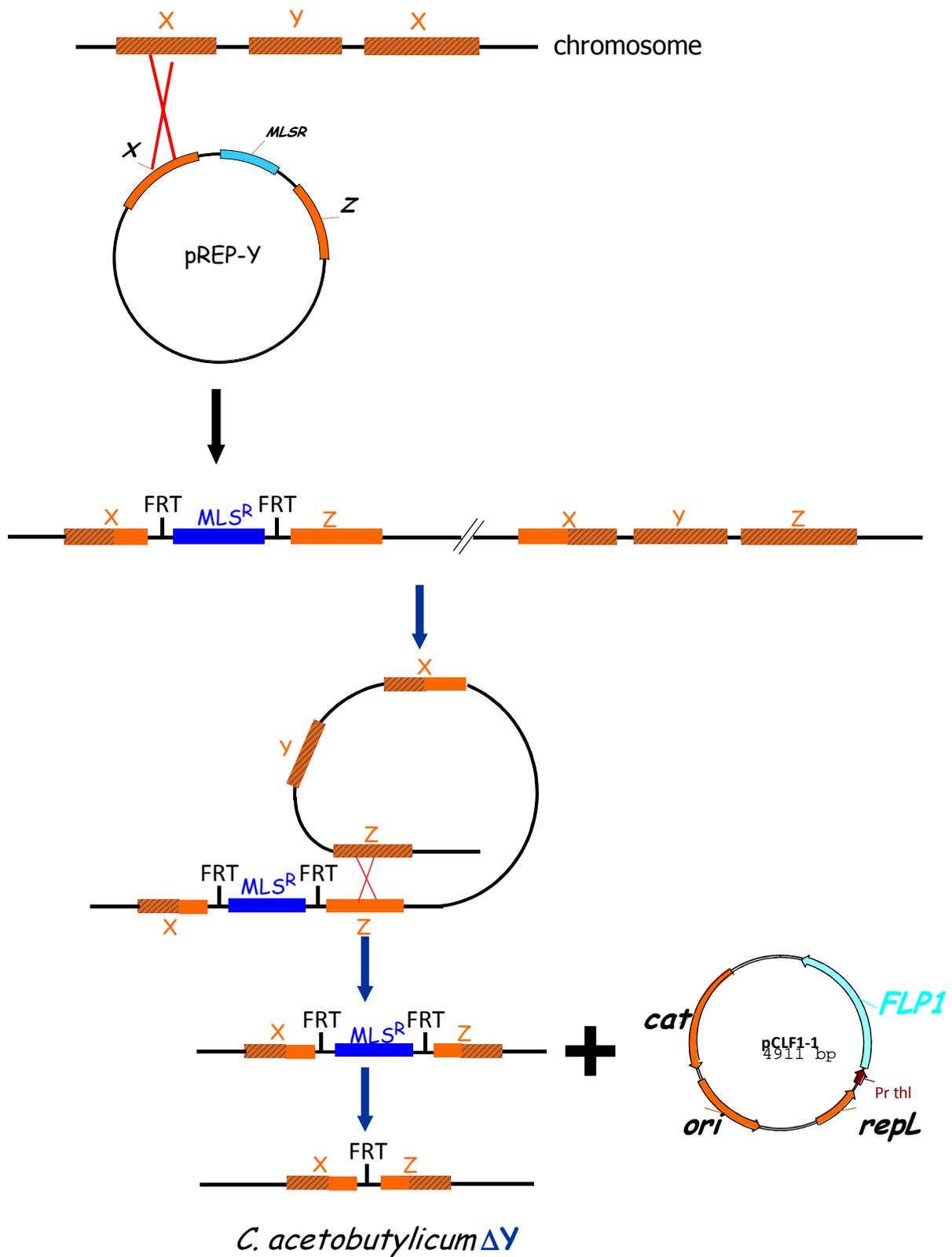
Plus tard, d'autres méthodes permettant de contourner les difficultés présentées ci-dessus ont été mises au point. La méthode ClosTron utilisant un système basé sur les introns mobiles du groupe II permet l'inactivation de gènes chez *C. acetobutylicum* de manière stable, efficace et rapide (Heap et al., 2007). Ces introns du groupe II utilisent un mécanisme de mobilité appelé retrohoming et s'insèrent dans l'ADN par une réaction d'épissage inverse. Etant donné que l'intron reconnaît sa séquence d'insertion dans l'ADN majoritairement par complémentarité de base, la redirection de ce type d'introns vers le gène d'intérêt à inactiver est facilement obtenue en modifiant l'intron au niveau de son site de fixation (Karberg et al., 2001). En 2010, Heap et al améliorent encore la technique en permettant la construction de souche comportant plusieurs insertions grâce à un système (FRT/Flp recombinase) permettant l'excision et la réutilisation du marqueur de résistance.

Finalement, deux méthodes ont été rapportées à ce jour, permettant la délétion, l'insertion ou la mutation de gènes sur le chromosome de *C. acetobutylicum* de manière stable et sans intégration définitive de marqueurs de résistance antibiotique (Soucaille et al., 2006)(Al-Hinai et al., 2012). Ces méthodes utilisent des vecteurs réplicatifs comportant la séquence à intégrer dans le génome et un marqueur de résistance antibiotique entouré de séquences homologues à celles présentes en amont et en aval de la région du chromosome ciblée. Le vecteur réplicatif possède en plus un deuxième marqueur de sélection. L'intégration de la cassette d'intérêt dans le génome s'effectue par recombinaison homologue et nécessite un évènement de double « crossing-over » pour garantir la stabilité de la souche. Ceci est assuré par l'utilisation du deuxième marqueur de sélection présent sur le plasmide qui permet une pression positive en faveur de l'intégration par double

« crossing-over ». Soucaille et al décrivent l'utilisation du gène *upp*, conférant une sensibilité au 5-fluoro-uracile, comme marqueur de sélection positive. Utilisé en combinaison avec une souche de *C. acetobutylicum*  $\Delta upp$ , la présence du gène *upp* sur le plasmide permet l'élimination du vecteur d'intégration sur milieu 5-fluoro-uracile, alors que dans le même temps la pression de sélection antibiotique permet d'assurer la présence de la cassette d'intérêt. Cette double sélection permet efficacement de sélectionner les doubles « crossing-over » dans la mesure où un événement de simple « crossing-over » impliquerait la présence du gène *upp* dans le génome, rendant alors la croissance sur 5-fluoro-uracile impossible. Enfin, le gène de résistance antibiotique intégré dans le chromosome étant entouré de deux sites de reconnaissance de la Flp recombinase de *S.cerevisiae* (sites FRT), celui-ci peut être facilement excisé du chromosome en exprimant dans la souche cette recombinase. Cette stratégie permet d'effectuer des délétions/intégrations de gènes successifs sans être limité par le nombre de marqueurs de sélection disponible (figure 9).

### II.3.3. Répression de gènes chez *C. acetobutylicum*

Des techniques de répression de gènes ont également vu le jour et sont basées sur l'utilisation d'ARN anti-sens s'hybridant avec l'ARNm correspondant au gène à réprimer. De telles approches sont particulièrement intéressantes pour étudier et modifier des gènes dont l'inactivation ou la suppression pure et simple serait létale pour la cellule. L'impact de la répression des gènes de la voie de l'acétone a notamment été testé en utilisant cette stratégie par Tummala et al (2003).



**Figure 9** : Méthode de délétion de gène chez *C. acetobutylicum* par double crossing-over (Soucaille et al., 2006).

#### II.4. Ingénierie métabolique de *C. acetobutylicum*

Les principes majeurs de toute stratégie d'ingénierie métabolique rationnelle pour le développement de souche de production sont : l'augmentation du flux métabolique vers le produit d'intérêt, la réduction de la production de produit secondaire et l'harmonisation des flux dans la voie par l'élimination des goulots d'étranglement. La difficulté de la mise en œuvre d'une telle approche dépend très largement de la complexité de l'organisme cible et des connaissances existantes sur sa physiologie. De ce point de vue, l'ingénierie de *C. acetobutylicum* représente un challenge de part son métabolisme branché et le peu de connaissances actuelles sur ses mécanismes de régulation.

##### II.4.1. Ingénierie des voies de production des acides organiques

Les voies de production d'acide acétique et butyrique de *C. acetobutylicum* sont des cibles de choix lorsque l'on veut augmenter le flux de carbone vers la production de solvant tout en diminuant la formation de produit secondaire. En 1996 Green et al , utilise un plasmide non répliatif pour inactiver les voies de l'acétate et du butyrate par intégration de fragments d'ADN dans les gènes *pta* et *buk* respectivement. La souche PJC4PTA (inactivation du gène *pta*) produit 22% moins d'acétate que la souche sauvage de *C. acetobutylicum* mais produit 32% de butyrate en plus. Quant à elle, la quantité de solvant produite par la souche PJC4PTA est similaire à celle produite par la souche sauvage. Au contraire, la souche PJC4BK (inactivation du gène *buk*) produit 65% de butyrate en moins et 33% d'acétate en plus. Le butyrate produit n'est pas réassimilé et la production d'acétone diminue de 50 % tandis que la production de butanol augmente de 10%. Malgré l'inactivation des gènes *pta* et *buk*, ces deux souches mutantes sont toujours capables de produire, dans des quantités réduites, de l'acétate et du butyrate. Mise à part l'existence éventuelle d'autres enzymes capables de catalyser les mêmes réactions, c'est surtout la stabilité des souches obtenues par cette méthode qui est à remettre en cause. Ces expériences montrent néanmoins, que *C. acetobutylicum* est en mesure de compenser l'affaiblissement d'une de ses voies de production d'acide organique par une augmentation du flux dans une autre voie de production d'acide. Ce fait est certainement à mettre en relation avec la perte en ATP générée par la diminution du flux au travers de l'une ou de l'autre voie de production des

acides organiques. Plus tard, la souche PJC4BK fut caractérisée plus en détails (Harris et al., 2000) et des fermentations menées à pH 5,0 ont montré une capacité particulièrement élevée de cette souche à produire des solvants. Dans les conditions de ces expériences, la souche produit 16,7 g.l<sup>-1</sup> de butanol, 4,4 g.l<sup>-1</sup> d'acétone et 2,6 g.l<sup>-1</sup> d'éthanol, dépassant ainsi la limite de toxicité du butanol qui était alors fixé à 13 g.l<sup>-1</sup>. Les auteurs poussent encore plus loin la production de solvant en surexprimant le gène *adhE1* à partir d'un plasmide répliquatif, ce qui a pour effet d'augmenter la production d'éthanol à 4,5 g.l<sup>-1</sup>. Le flux de production de butyrate dans cette souche est diminué d'environ 75% tandis que le flux de production d'acétate augmente de 100% pendant la phase exponentielle de croissance. Cette observation, qui est en accord avec les mesures d'activité enzymatique effectuées par Green et al., renforce l'idée d'une compensation par la production d'acétate du manque en ATP causé par la forte diminution de la production de butyrate. Cette étude met également en lumière un certain nombre d'éléments qui remettent en cause la manière dont est envisagée la fermentation ABE à cette époque. En effet, la souche PJC4BK présente un schéma de fermentation qui diffère significativement du modèle biphasique communément observé. La production de solvant, et plus particulièrement de butanol, commence très tôt pendant la phase exponentielle rendant la limite entre phase acidogène et phase solvantogène floue. La très faible production de butyrate remet également en question le rôle alors attribué à la concentration intracellulaire en acide butyrique non dissocié comme initiateur principale de la solvantogénèse.

Plus récemment, plusieurs mutants de la voie de l'acétate ont été construits par intégration d'introns dans les gènes *ack* et *pta* à l'aide de la méthode ClosTron. Lehmann et al construisent en 2012 un mutant de la voie de l'acétate en introduisant un intron dans le gène *pta*. Etonnement, ils n'observent pas de différence significative par rapport à la souche sauvage et la production d'acétate ne semble pas affectée. Dans le même temps, Cooksley et al (2012) réalisent une souche mutante pour le gène *ack* en introduisant un intron au milieu du gène (position 349). Ils observent une baisse significative de la production d'acétate (pic d'acétate observé à 0,3 g.l<sup>-1</sup>) sans augmentation notable de la production de butyrate. La production d'éthanol par ce mutant augmente de près de 300 % tandis que la production de butanol augmente de 23 % seulement. Ils réalisent également une expérience de complémentation où le gène *ack* est réintroduit à partir d'un plasmide et observent alors

une restauration de la production d'acétate et un profil de fermentation similaire à celui de la souche sauvage, ce qui confirme le rôle du gène *ack* dans le phénotype observé.

En utilisant la même stratégie, Cooksley et al (2012) produisent également un mutant déficient de la voie de production du butyrate en introduisant un intron dans le gène *ptb*. Après de nombreuses tentatives infructueuses pour obtenir ce mutant, un clone présentant l'insertion de l'intron dans le gène *ptb* a été isolé. Contrairement à ce qui avait été observé par Green et al (1996) et Harris et al (2000), la souche ne produit ni butyrate, ni acétone et très peu de butanol. Au contraire, les productions d'acétate et de lactate sont fortement augmentées pendant la phase acidogène et de grandes quantités d'éthanol sont produites pendant la phase solvantogène. Des expériences de complémentations visant à restaurer la production de butyrate en réintroduisant le gène sauvage *ptb* dans la souche ont été menées sans réussir à rétablir un phénotype sauvage. Ces résultats étonnants les ont poussés à effectuer un reséquençage du génome de ce mutant, qui a mis en évidence une mutation dans le gène *thl* conduisant à la production d'une protéine tronquée. La perte de la thiolase qui est la première enzyme de la voie des C<sub>3</sub>/C<sub>4</sub> est en accord avec le phénotype de ce mutant.

La majeure partie des stratégies d'ingénierie métabolique visant les voies de production des acides de *C. acetobutylicum* ont pour but de diminuer leur production en faveur de celle des solvants. Néanmoins, Jang et al (2013) construisent une souche mutante capable de produire presque exclusivement des acides et en particulier du butyrate. Dans un premier temps, ils inactivent les gènes *pta* et *ctfB* et obtiennent alors une souche produisant, en batch maintenu à pH 6.0, 26,6 g.l<sup>-1</sup> de butyrate et 3,6 g.l<sup>-1</sup> de solvant. L'inactivation additionnelle dans cette souche du gène *adhE1* supprime presque totalement la production de solvant et la souche produit 30,8 g.l<sup>-1</sup> de butyrate, 4,6 g.l<sup>-1</sup> d'acétate et seulement 0,8 g.l<sup>-1</sup> d'éthanol.

L'ensemble des études présentées ici mettent en évidence la difficulté que représente la suppression de la production des acides organiques chez *C. acetobutylicum*. La plupart des mutants construits ne présentent pas ou peu de diminution de la production de l'acide visé et cette diminution est le plus souvent compensée par l'augmentation de la production d'un autre acide. Le choix du gène ciblé semble avoir une grande importance

quant à la réussite de la stratégie comme le montrent les travaux de Lehmann et al (2012) et de Cooksley et al (2012) où l'inactivation du gène *pta* affecte peu la production d'acétate tandis que l'inactivation du gène *ack* a un impact plus prononcé. La quête vers une souche de *C. acetobutylicum* capable de réaliser une fermentation homobutanolique nécessitera, de manière certaine, la création d'une souche ne produisant pas d'acide organique. Même si la fermentation homobutanolique (sans production d'hydrogène) est, d'un point de vue équilibre redox, possible chez *C. acetobutylicum*, aucune étude n'a rapporté l'existence d'un double mutant déficient à la fois de la voie de l'acétate et du butyrate. Il est probable qu'un tel mutant ne soit pas viable en l'état à cause d'une capacité trop faible à produire de l'ATP.

#### II.4.2. Ingénierie de la voie de production de l'acétone.

La production d'acétone par *C. acetobutylicum* est largement considérée comme indésirable et de nombreux efforts ont été faits pour tenter de la réduire. En plus de diminuer le rendement de production de butanol, l'acétone produit lors de la fermentation doit impérativement être séparé des autres solvants car ses propriétés corrosives le rendent impropre à être utilisé pour un certain nombre d'applications (en tant que biocarburant par exemple). Le premier exemple de stratégie d'ingénierie métabolique visant à réduire la production d'acétone a été rapporté par Tummala et al (2003) qui utilisent des ARN antisens pour réduire le niveau de traduction des gènes *adc* et *ctfAB*. Ils montrent alors que la répression de la traduction du gène *adc* seule n'impacte pas la production d'acétone malgré une forte diminution de la quantité de protéine Adc produite. L'enzyme Adc étant cependant nécessaire à la production d'acétone, ils en concluent que l'activité résiduelle dans la souche mutante est suffisante pour soutenir la production et que cette enzyme n'est probablement pas limitante pour la voie de l'acétone. Au contraire, la répression de la traduction des gènes *ctfA* et *ctfB* cause une réduction drastique de la production d'acétone qui diminue d'un facteur 8 par rapport à la souche sauvage. Bien que la sélectivité envers le butanol soit augmentée (ratio butanol/acétone plus élevé) la production de butanol est également affectée et diminue de près de 70%. Le fait que les gènes *ctfAB* et *adhe1* soient organisés en opéron et résident sur le même ARNm explique probablement pourquoi la production de butanol est diminuée par la présence de l'ARNas. Ces expériences mettent

néanmoins en évidence le rôle prépondérant de la CoA transférase dans la production d'acétone. Cependant, Lehmann *et al* (2012) et Cooksley *et al* (2012) montrent que l'inactivation des gènes *adc* ou *ctfAB* par les méthodes TargeTron et ClosTron cause des phénotypes similaires, avec une abolition presque totale de la production d'acétone. Les deux souches produisent de l'acétate mais sont dans l'incapacité de le reconommer. Comme l'avait constaté avant eux Tummala *et al* (2003), ces mutants présentent un ratio ABE qui augmente en faveur du butanol, mais produisent significativement moins de solvants que la souche sauvage. La raison pour laquelle la production de butanol diminue pour la souche inactivée pour les gènes *ctfAB* est possiblement la même qu'énoncée précédemment, à savoir que la présence de l'intron gêne la bonne traduction d'*adhE1* qui se trouve en aval sur l'ARNm. Néanmoins, la baisse de la production de butanol par la souche inactivée pour le gène *adc* ne peut pas s'expliquer de la même manière étant donné que le gène *adc* se situe en dehors de l'opéron SOL. Jang *et al* (2012) proposent l'existence d'une voie de production du butanol passant par la CoA transférase via la production d'acétyl-CoA et de butyryl-CoA consécutif de l'utilisation respective de l'acétate et du butyrate par l'enzyme. La souche mutante inactivée pour le gène *adc* possède toujours une enzyme CtfAB active mais présente un défaut de reconsoption des acides, ce qui pourrait expliquer la baisse de la production de butanol. D'un point de vue thermodynamique, la réaction catalysée par la CoA transférase est peu favorable, avec une énergie libre de Gibbs entre -7,1 à -9,6 kJ.mol<sup>-1</sup>, et nécessite la présence d'une réaction motrice tirant le flux en déplaçant l'équilibre en faveur de la production d'acétoacétate. Ces résultats suggèrent que lorsque ce moteur disparaît, la CoA transférase se trouve dans l'incapacité de fonctionner. Le fait que très peu d'acétoacétate ne soit détecté dans le milieu lors de la fermentation de la souche mutante, corrobore cette hypothèse.

Des études visant à augmenter la production d'acétone par *C. acetobutylicum* ont également vu le jour. En 1993, Mermelstein *et al* construisent un opéron synthétique formé des gènes *ctfA*, *ctfB* et *adc* et l'exprime chez *C. acetobutylicum* ATTC824. La souche produit alors respectivement 95%, 37% et 90% plus d'acétone, de butanol et d'éthanol. Le rendement en solvant relatif au glucose consommé augmente de 50% et la quantité résiduelle d'acide diminue d'un facteur 22. Le fait que la production de butanol et d'éthanol soient également augmentées (même si le ratio butanol/acétone diminue) par la

surexpression des gènes de la voie de l'acétone souligne la corrélation qui existe entre ces voies et la complexité du métabolisme de *C. acetobutylicum*.

#### II.4.3. Ingénierie des voies de production du butanol et de l'éthanol.

De nombreuses études ont également été menées pour essayer d'améliorer la production de butanol (et d'éthanol) en augmentant le flux dans cette voie. La production des alcools chez *C. acetobutylicum* est réalisée par l'action d'une aldéhyde déshydrogénase qui convertit le butyryl-Coa (dans le cas du butanol) et l'acetyl-CoA (dans le cas de l'éthanol) en butyraldéhyde et acétaldéhyde. Ces aldéhydes sont ensuite convertis en l'alcool correspondant grâce à une alcool déshydrogénase. Il est communément admis que l'enzyme AdhE1 est la principale responsable de la production des alcools et qu'elle possède à la fois une activité aldéhyde déshydrogénase et une activité alcool déshydrogénase. Le fait qu'AdhE1 soit capable de réagir aussi bien avec l'acétyl-CoA qu'avec le butyryl-CoA rend difficile d'envisager une production de butanol sans production d'éthanol. Il existe néanmoins d'autres aldéhyde et alcool déshydrogénases capables d'effectuer la synthèse de butanol et d'éthanol (AdhE2, Bdh1, Bdh2), mais peu d'information sont disponibles quant à leurs rôles exacts ainsi que leur régulation.

De récentes études faites par Cooksley et al (2012) confirment le rôle prépondérant d'AdhE1 pour la production des alcools dans des conditions de culture standards de *C. acetobutylicum* (hors condition d'alcoologénèse). En effet, ils montrent que l'inactivation du gène *adhE1* éradique presque totalement la production d'éthanol et de butanol, causant une très forte augmentation de la production des acides acétiques et butyriques. Au contraire, l'inactivation des gènes *bdhA*, *bdhB* et *adhE2* ne produit aucun effet notable sur le profil de fermentation observé. Ils inactivent également le gène *cap0059*, codant pour une alcool déshydrogénase putative porté par pSOL, mais observe un phénotype contraire à celui attendu, à savoir une augmentation de la production de solvants ainsi que de la capacité de la souche à réassimiler les acides.

En 2009, Sillers et al utilisent une souche chez laquelle le gène codant pour la CoA transférase est inactivé afin de surexprimer AdhE1 et ainsi augmenter la production de

butanol. Le gène *adhE1* est alors exprimé à partir du promoteur *pPtb* qui présente l'avantage d'être fortement actif dès le début de la phase acidogène, au contraire du promoteur naturel d'*adhE1* qui lui n'est actif qu'en phase solvantogène. Cette stratégie leur permet d'obtenir une souche produisant une plus grande quantité de solvants et de manière plus précoce. L'impact le plus fort est observé au niveau de la production d'éthanol qui est multipliée par 15 et atteint  $14 \text{ g.l}^{-1}$ , dépassant alors la concentration en butanol qui est de  $13 \text{ g.l}^{-1}$ . Cette modification du ratio ABE en faveur de l'éthanol est d'autant plus surprenante qu'*AdhE1* est connue pour avoir une affinité plus grande pour le butyryl-CoA que pour l'acétyl-CoA. En analysant les flux dans les différentes voies, les auteurs arrivent à la conclusion que la quantité de butyryl-CoA est limitante et qu'une accumulation d'acétyl-CoA explique ce comportement. La formation de butyrate est très faible pour cette souche, ce qui indique que la forte surexpression d'*AdhE1* dès le début de phase acidogène permet une redirection du butyryl-CoA vers le butanol plutôt que vers le butyrate. Cette baisse de la production de butyrate se traduit par une augmentation de la production d'acétate comme cela est observé pour des souches inactivées du gène *buk*.

Des méthodes moins rationnelles d'ingénierie métabolique ont également été employées afin d'augmenter la production de butanol. Par exemple, Jang et al (2013) réalisent de la mutagenèse aléatoire sur la souche PJC4KB (inactivation du gène *buk*) et sélectionnent des mutants avec un milieu contenant du fluoroacétate (composé toxique pour la cellule lorsqu'il est utilisé par la CoA transférase). Ils isolent alors une souche mutante capable de produire  $32.5 \text{ g.l}^{-1}$  de mélange ABE ( $17.6 \text{ g.l}^{-1}$  de butanol,  $10.5 \text{ g.l}^{-1}$  d'éthanol et  $4.4 \text{ g.l}^{-1}$  d'acétone) à partir de  $82.5 \text{ g.l}^{-1}$  de glucose. Encore une fois, il est à noter que l'éthanol est le principal produit affecté dont la production augmente significativement. Il est probable que la toxicité du butanol soit un facteur limitant et explique pourquoi la plupart des stratégies visant à augmenter la production d'alcool impactent principalement la formation d'éthanol.

#### II.4.4. Ingénierie du métabolisme central

Différentes stratégies d'ingénierie métabolique ont été utilisées pour réorienter le métabolisme central de *C. acetobutylicum*.

#### II.4.4.1. Partie haute

La partie haute de cette voie centrale permet la conversion de la source de carbone (glucose, xylose etc...) en pyruvate, qui est le nœud principal à partir duquel sont articulées les différentes branches du métabolisme. La grande majorité des travaux réalisés sur cette partie du métabolisme vise à renforcer ces différentes réactions afin d'améliorer les capacités d'utilisation du substrat et ainsi augmenter production et productivité. De plus la production d'ATP et de cofacteur réduit durant la glycolyse jouent un rôle déterminant dans l'équilibre du métabolisme.

Jang et al (2013) surexpriment les gènes codant pour la 6-phosphofructokinase (*pfkA*) et la pyruvate kinase (*pykA*) en partant du principe qu'une augmentation du flux au travers de ces deux enzymes pourrait avoir un impact positif sur la disponibilité en ATP et en NADH, qui sont deux éléments nécessaires à la formation de solvants. De plus la conversion du fructose-6P en fructose-1,6-biphosphate, réalisée par la Pfk, est considérée comme étant l'étape limitante de la glycolyse. Ils montrent que la surexpression des enzymes Pfk et Pyk induit une augmentation de la production d'éthanol et de butanol. L'effet le plus prononcé est observé lorsque les deux enzymes sont surexprimées simultanément avec une augmentation de la production d'éthanol de 85.5% et une augmentation de la production de butanol de 29.4%. En suivant les concentrations intracellulaires de NADH et d'ATP au cours de la fermentation, ils mettent en évidence que la souche mutante surexprimant les gènes *pfkA* et *pykA* maintient une production d'ATP et de NADH supérieure à la souche sauvage durant la phase solvantogène. L'augmentation de la quantité de NADH disponible défavorisant les voies métaboliques neutres au point de vue redox, la production d'acétone est diminuée légèrement et le ratio ABE augmente en faveur de l'éthanol et du butanol. Les productions d'acide acétique et butyrique sont aussi impactées et diminuent respectivement de 15% et 22% pendant la phase acidogène, tandis que la reconsommation de ces acides durant la phase solvantogène est augmentée.

D'autres études portant sur la partie haute du métabolisme central ont également été menées afin d'augmenter la capacité de la souche à consommer le xylose. Ce sucre abondamment présent dans l'hémicellulose présente un fort intérêt économique, mais son utilisation par *C. acetobutylicum* n'est pas optimale. La présence d'autres sucres dans le

milieu de culture (et notamment du glucose) inhibe fortement son utilisation comme source de carbone, ce qui représente une barrière à la mise en place d'un procédé de production de solvants à partir d'hydrolysats de biomasse. Les stratégies d'ingénierie métabolique entreprises, ces dernières années, sur le métabolisme du xylose ont permises de lever la répression catabolique par le glucose (Ren et al., 2010; Xiao et al., 2011), d'augmenter le flux dans la voie de manière à améliorer l'utilisation de ce substrat (Gu et al., 2009; Xiao et al., 2011) et de mettre en évidence une deuxième voie de métabolisation de ce substrat (Liu et al., 2012) (voir partie II.2.1.2).

#### II.4.4.2. Partie basse

La partie basse du métabolisme central de *C. acetobutylicum* est constituée de 5 réactions successives et permet la conversion du pyruvate en butyryl-CoA. Cette voie est essentielle à la production des solvants et plus particulièrement du butanol.

La thiolase qui est la deuxième enzyme de cette voie, joue un rôle important dans la répartition du carbone vers les composés en C<sub>2</sub> et/ou les composés en C<sub>3</sub>/C<sub>4</sub> et constitue une cible de choix pour effectuer une réorientation du métabolisme. En 2011, Sillers et al tentent d'augmenter la production de butanol en surexprimant la thiolase dans une souche chez laquelle le gène codant pour la CoA transférase est inactivé. Ils n'observent pas de différence avec la souche parentale et concluent qu'un mécanisme de régulation plus complexe doit intervenir sur cette enzyme. Plus récemment, une stratégie de mutagenèse dirigée a été appliquée au gène de la thiolase afin d'isoler des variants présentant un degré d'inhibition par le coenzyme A moins important (Mann and Lütke-Eversloh, 2013). En effet, le flux métabolique passant par la thiolase est régulé par le ratio substrat/produit et l'enzyme est très sensible vis-à-vis du CoA-SH qui cause une forte inhibition à des concentrations de l'ordre du micromolaire. Cette stratégie a permise aux auteurs d'identifier trois mutations (R133G, H156N et G222V) augmentant significativement l'activité de l'enzyme en présence de CoA-SH. De plus l'expression de cette thiolase optimisée chez *C. acetobutylicum* a pour effet de retarder la production d'éthanol et d'acétone tout en augmentant la production de butanol de 18 %. Ces travaux indiquent que la thiolase est probablement régulée plutôt au niveau enzymatique qu'au niveau génétique. Ceci implique que l'augmentation de la

quantité de transcrits *thl* n'est pas nécessairement synonyme d'une augmentation du flux dans la voie centrale, comme cela a été observé par Sillers et al (2009). De plus d'un point de vue thermodynamique, la réaction thiolytique de cleavage de l'acétoacétyl-CoA est favorisée et la réaction de condensation telle qu'elle est observée dans le sens physiologique n'est possible que grâce à l'existence de réactions consommant l'acétoacétyl-CoA de manière efficace. L'activité de condensation de l'acétyl-CoA est donc finement régulée par les pools d'acétyl-CoA et d'acétoacétyl-CoA ainsi que par la quantité de CoA libre. En 2012, Cooksley et al tentent de construire une souche mutante de *C. acetobutylicum* inactivée pour le gène de la thiolase à l'aide de la méthode Clostron. Malgré de nombreuses tentatives, ils se voient dans l'incapacité d'obtenir un tel mutant. Néanmoins, ils obtiennent en inactivant le gène *ptb* une souche mutante incapable de produire des composées en C<sub>3</sub>/C<sub>4</sub>. Ils séquencent alors le génome de cette souche et observent la délétion d'une base dans le gène *thl* responsable de la production d'une thiolase tronquée de 207 acides aminés (sur 392). D'autres mutations non décrites par les auteurs ont également été relevées et expliqueraient potentiellement pourquoi ils leur avaient été impossible d'obtenir une souche seulement inactivée pour le gène *thl*. Ce double mutant *thl/ptb* ne produit que de l'acétate, du lactate et de l'éthanol ce qui est en parfait accord avec le rôle connu de la thiolase dans la voie des C<sub>3</sub>/C<sub>4</sub> et met en évidence l'absence d'autres enzymes capables d'assumer ce rôle.

Un phénotype semblable à celui décrit précédemment a été observé par Lehmann and Lütke-Eversloh (2011) après construction d'un mutant inactivé pour le gène codant pour la  $\beta$ -hydroxybutyryl-CoA déshydrogénase (Hbd). Contrairement au double mutant *ptb/thl* de Cooksley et al (2012), la souche est toujours capable de reconsommer l'acide acétique pour la production d'acétone, même si celle-ci semble réduite par rapport à la souche sauvage. L'activité alcool déshydrogénase NADH dépendante mesurée dans cette souche est fortement augmentée ce qui est en accord avec la nécessité de la souche à éliminer l'excès de NADH, venant de la glycolyse, par la production d'éthanol. Les auteurs mesurent également une activité thiolase significativement réduite et bien qu'aucune explication évidente n'explique ce phénomène, cela est en accord avec une production d'acétone diminuée.

La possibilité d'augmenter la production de butanol en renforçant l'ensemble de la voie basse du métabolisme de *C. acetobutylicum* a également été étudiée. Hou et al (2013)

surexpriment les gènes *thl*, *hbd*, *crt*, *ctfAB*, *adhe1* et *bcd* dans une souche inactivée pour le gène *adc*. Ils montrent alors que la souche mutante ainsi obtenue produit, en culture discontinue régulée à pH 5,0, près de 3 fois plus d'alcools (éthanol 14 g.l<sup>-1</sup> et butanol 13 g.l<sup>-1</sup>) que la souche sauvage tandis que la production d'acétone est quasiment éliminée.

## II.5. Production d'isopropanol par voie fermentaire

### II.5.1. Généralités sur l'isopropanol

L'isopropanol, ou alcool isopropylique est le nom commun pour le propan-2-ol, composé chimique sans couleur et inflammable, dont la formule chimique est CH<sub>3</sub>CH(OH)-CH<sub>3</sub> (figure 10). C'est l'un des deux isomères du propanol (l'autre étant le propan-1-ol). Il est aussi connu sous son nom abrégé IPA (acronyme de l'anglais IsoPropylic Alcohol).

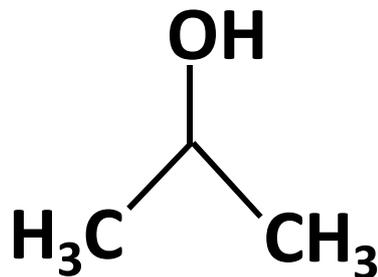


Figure 10 : la molécule d'isopropanol

Il est classiquement obtenu par la réduction de l'acétone (figure 11).

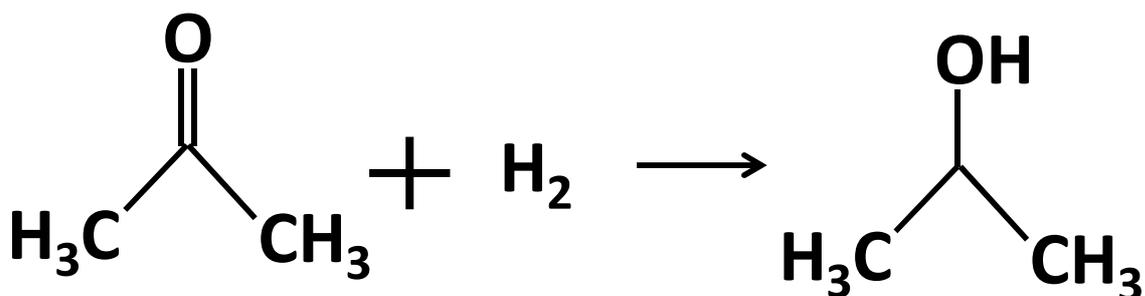
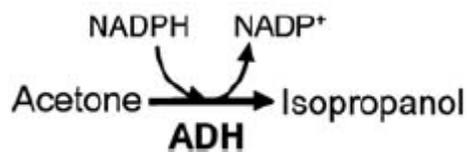


Figure 11 : Formation de l'isopropanol à partir d'acétone

### II.5.2. Production d'isopropanol par *C. beijerinckii* NRRL B593

Certains microorganismes sont naturellement capables de produire de l'isopropanol. C'est notamment le cas pour certaines souches de *C. beijerinckii* chez qui la conversion de l'acétone en isopropanol a été observée (George et al., 1983)(Chen and Hiu, 1986).

Contrairement à *C. acetobutylicum* qui s'arrête à la production d'acétone, certaines souches de *C. beijerinckii* possède une alcool déshydrogénase secondaire (*Sadh*) supplémentaire leur permettant de réduire l'acétone en isopropanol (figure 12).



**Figure 12** : Réduction de l'acétone en isopropanol par l'alcool déshydrogénase secondaire de *C. beijerinckii*.

Cette enzyme codée par le gène *sadh* est principalement NADPH dépendante et présente des activités envers l'acétone et le butyraldéhyde. Son activité spécifique est d'environ  $62,5 \text{ U.mg}^{-1}$  avec l'acétone et de  $31,7 \text{ U.mg}^{-1}$  avec le butyraldéhyde. Le  $K_m$  de l'enzyme pour l'acétone est de  $0,98 \text{ mM}$  tandis que son  $K_m$  pour l'isopropanol est de  $9,8 \text{ mM}$ . L'enzyme native a un poids moléculaire de  $100 \text{ kDa}$  et comme la grande majorité des alcools déshydrogénases bactérienne, elle est suspectée de posséder une structure homo-tétramérique (Korkhin et al., 1998). Néanmoins, la masse moléculaire de ses sous-unités a été estimée à  $40 \text{ kDa}$ , ce qui laisse planer un doute sur sa conformation *in-vivo* (Ismail et al., 1993). La protéine reste stable jusqu'à une température de  $70 \text{ °C}$  et possède un pic d'activité pour un pH compris entre  $7.0$  et  $7.5$  (Ismail et al., 1993). La structure tridimensionnelle de cette alcool déshydrogénase secondaire a été déterminée par cristallographie (Korkhin et al., 1998). Cette étude a révélé que chacun de ses monomères comporte deux domaines principaux, l'un étant le domaine de liaison au co-facteur et l'autre étant le domaine catalytique. Ces deux domaines sont séparés par un atome de zinc qui se lie au site actif. La spécificité de cette alcool déshydrogénase pour le NADPH est apportée par les résidus Gly198, Ser199, Arg200 et Tyr218 qui forment la liaison avec le co-facteur.

La production maximale d'isopropanol jusque là observée par *C. beijerinckii* NRRL B593 était d'environ 8 mM à partir d'un milieu contenant 111 mM de glucose (George et al., 1983)(Chen and Hiu, 1986). Récemment, Survase et al (2011) ont étudié la production d'un mélange butanol/isopropanol par *C. beijerinckii* DSM 6423 aussi bien en culture discontinue qu'en culture continue en milieu riche (TYG). Leurs résultats montrent une production d'isopropanol à un titre final de 2,16 g.l<sup>-1</sup> et de butanol à un titre final de 3,7 g.l<sup>-1</sup>. Ceci représente un rendement en isopropanol à partir de glucose de 0,08 g.g<sup>-1</sup> et un rendement en solvant à partir de glucose de 0,24 g.g<sup>-1</sup>. En culture continue et à faible taux de dilution (0,05 h<sup>-1</sup>), ils observent une augmentation de la production de solvant avec un titre en isopropanol de 3,4 g.l<sup>-1</sup> et un titre en butanol de 4,48 g.l<sup>-1</sup> ce qui représente un rendement en solvant à partir de glucose de 0,35 g.g<sup>-1</sup>. Néanmoins, la souche s'avère dans l'incapacité de consommer plus de 23,16 g.l<sup>-1</sup> de glucose.

### II.5.3. Ingénierie métabolique d'*E. coli* pour la production d'isopropanol

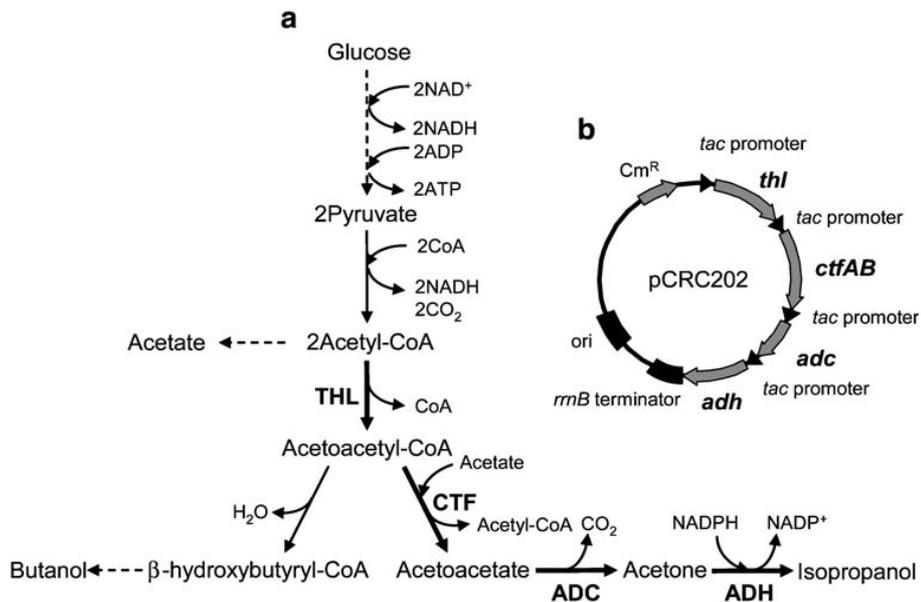
Un certain nombre d'études se sont penchées sur la possibilité de produire de l'isopropanol par ingénierie métabolique en utilisant comme hôte *E. coli*, un des organismes procaryotes le mieux étudié et dont la manipulation génétique est aisée.

Ces stratégies d'ingénierie du métabolisme d'*E. coli* reposent sur l'utilisation des gènes codant pour la voie de l'acétone de *C. acetobutylicum* (*thl*, *ctfA*, *ctfB*, *adc*) et du gène codant pour l'alcool déshydrogenase secondaire de *C. beijerinckii* (*sadh*) (figure 13).

En utilisant ce type de stratégie, Hanai et al., (2007) parviennent à une production d'isopropanol de 81.6 mM (4.7 g.l<sup>-1</sup>) chez *E. coli* K12-MG1655. En utilisant une souche d'*E. coli* JM109, Jojima et al (2008) rapportent une production maximale d'isopropanol à partir de glucose de 220 mM (13 g.l<sup>-1</sup>) correspondant à un rendement en isopropanol de 51%. Néanmoins, ils observent une concentration résiduelle en acétone élevée de 4.6 g.l<sup>-1</sup> suggérant une limitation au niveau de l'activité de l'alcool déshydrogénase secondaire *Sadh*.

En exploitant une stratégie d'amélioration du procédé utilisant un mode de culture du type discontinu alimentée en glucose, combiné avec un soutirage continu de l'isopropanol du milieu de culture par gas stripping, Inokuma et al (2010) sont parvenus à augmenter la

concentration finale en isopropanol. Une telle stratégie permet, selon leurs résultats, d'atteindre un rendement en isopropanol de 65% et de produire 2378 mM (143 g.l<sup>-1</sup>) d'isopropanol après 240 heures de fermentation.



**Figure 13** : Stratégie d'ingénierie métabolique d'*E.coli* pour la production d'isopropanol. THL : Thiolase; CTF : CoA transférase; ADC : Acétoacétate décarboxylase; ADH : Alcool déshydrogénase secondaire (Jojima et al., 2008).

Très récemment, Soma et al (2012) rapportent une production de 69 mM (4,41 g.l<sup>-1</sup>) d'isopropanol à partir d'un milieu contenant 5% de cellobiose en utilisant une souche modifiée contenant l'opéron isopropanol décrit précédemment ainsi qu'une protéine de *Thermobifida fusca* permettant la dégradation du cellobiose.

#### II.5.4. Ingénierie métabolique de *C. acetobutylicum* pour la production d'isopropanol

De manière concomitante aux travaux réalisés dans le cadre de ce doctorat et présentés dans ce manuscrit, plusieurs stratégies d'ingénierie de *C. acetobutylicum* ayant pour objectif la production d'isopropanol ont vu le jour.

Lee et al en 2012 introduisent l'alcool déshydrogénase secondaire de *C. beijerinckii* NRRL B593 (Sadh), sous la dépendance du promoteur *adc*, dans une souche sauvage de *C. acetobutylicum* et obtiennent ainsi une production de 3,1 g.l<sup>-1</sup> d'isopropanol à partir de 40 g.l<sup>-1</sup> de glucose. Afin d'augmenter le flux de carbone vers la production d'isopropanol, ils surexpriment les gènes de la voie de l'acétone (*ctfA*, *ctfB* et *adc*), également sous la dépendance du promoteur *adc*, ce qui leur permet d'obtenir une concentration finale en isopropanol de 5,1 g.l<sup>-1</sup>. L'expression des gènes de la voie de l'acétone et du gène *sadh* simultanément dans la souche PJC4BK de *C. acetobutylicum*, inactivée pour le gène de la butyrate kinase, permet une augmentation de la production de solvant, avec des concentrations finales en isopropanol/éthanol/butanol respectivement de 4,4 g.l<sup>-1</sup>, 1,9 g.l<sup>-1</sup> et 14,1 g.l<sup>-1</sup>. Ceci représente une production totale d'alcools de 20,4 g.l<sup>-1</sup> et un rendement alcools/glucose de 0,3 g.g<sup>-1</sup>. Finalement, ils obtiennent une production de 35,6 g.l<sup>-1</sup> de solvants après 45 heures de cultures en combinant une culture en mode fed-batch avec un soutirage des produits de fermentation par gas-stripping.

Peu de temps après, Collas et al (2012) co-expriment les gènes de la voie de l'acétone de *C. acetobutylicum* et le gène *sadh* de *C. beijerinckii* dans une souche sauvage de *C. acetobutylicum* et rapportent une production totale de solvants de 24,4 g.l<sup>-1</sup> dont 8,8 g.l<sup>-1</sup> d'isopropanol à partir de 60 g.l<sup>-1</sup> de glucose. Néanmoins, les performances supérieures de cette souche peuvent, au moins en partie, être expliquées par l'ajout d'acétate dans le milieu de culture qui va être directement consommé par la voie de l'acétone pour la production d'isopropanol. Ces auteurs remarquent également que l'expression du gène *sadh* permet une conversion de l'acétoïne produit naturellement (en faible quantité) en 2,3-butanediol.

Enfin, Dai et al (2012) introduisent l'alcool déshydrogénase secondaire de *C. beijerinckii* dans un mutant de *C. acetobutylicum* présentant une résistance au butanol accrue et

obtiennent une production totale de solvants de 23,88 g.l<sup>-1</sup> comprenant 7,6 g.l<sup>-1</sup> d'isopropanol, 15 g.l<sup>-1</sup> de butanol et 1,28 g.l<sup>-1</sup> d'éthanol.

## II.6. La bifurcation d'électrons comme mode de conservation de l'énergie

### II.6.1. Historique

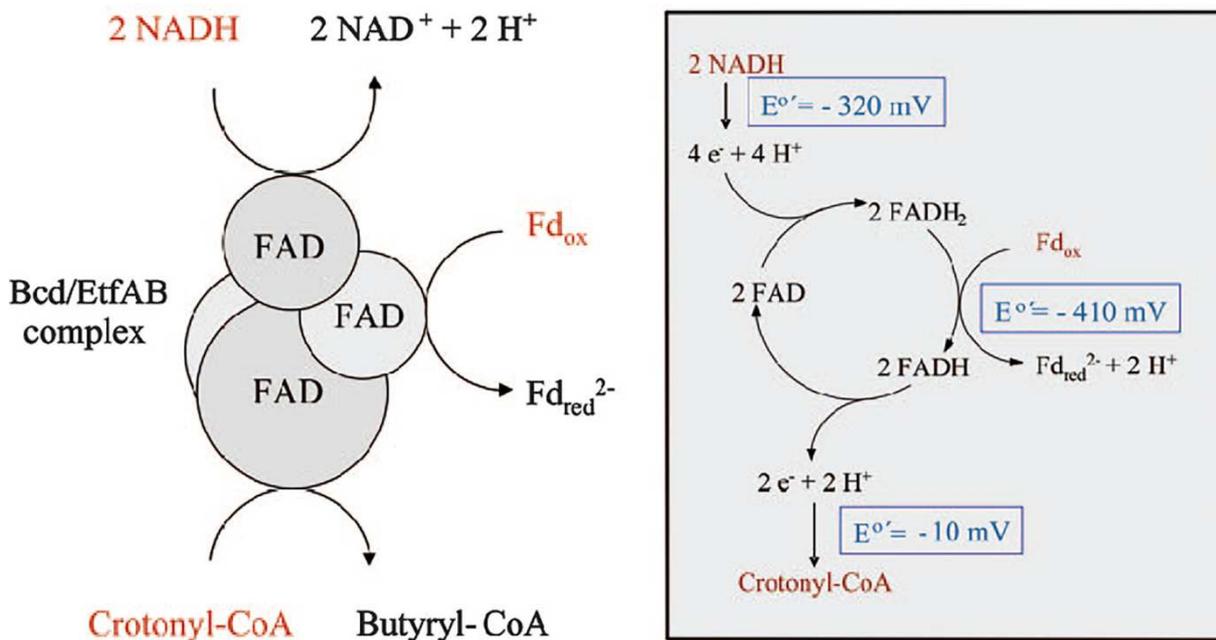
En biologie, l'existence de deux modes principaux de conservation de l'énergie est communément admise. Le premier de ces mécanismes est la phosphorylation au niveau du substrat (SLP), souvent constituée d'une réaction de déshydrogénation suivie d'une réaction de phosphorylation, permettant un stockage de l'énergie libérée sous forme d'ATP. Le deuxième mécanisme est la phosphorylation par transfert d'électrons (ETP) et implique généralement l'établissement d'un gradient de pH et de potentiel électrique à travers une membrane. Généré par le transfert de protons lors d'une réaction d'oxydoréduction, ce gradient permet la mise en place d'une force protomotrice utilisée pour la synthèse d'ATP (Thauer et al., 1977). Plus récemment, l'idée de l'existence d'un troisième mode de conservation de l'énergie appelé « bifurcation d'électrons » a vu le jour (Herrmann et al., 2008). La connaissance de réactions utilisant le principe de bifurcation d'électrons remonte pourtant aux années 80 où Crofts et al (1983) ont montré son implication dans la grande efficacité du complexe III mitochondrial (Crofts et al., 1983). Néanmoins, la découverte récente de la présence de ce mode de conservation de l'énergie dans des systèmes complètement différents de la mitochondrie, amène une partie de la communauté scientifique à émettre l'hypothèse que ce mécanisme est beaucoup plus répandu et essentiel qu'ils ne se l'étaient imaginé auparavant. Certains auteurs vont jusqu'à avancer l'idée que la bifurcation d'électrons serait le premier mode de conservation de l'énergie à avoir vu le jour et aurait permis l'établissement des premières voies métaboliques à l'origine de la vie (Nitschke and Russell, 2012)(Herrmann et al., 2008).

### II.6.2. Principe et exemples

Chez les bactéries méthanogènes, les archéobactéries anaérobies et chez les clostridies, un certain nombre de transferts d'électrons cruciaux s'effectuent en dépit d'une différence

de potentiel d'oxydoréduction, entre les partenaires concernés, défavorables. Dans les métabolismes énergétiques utilisant la ferrédoxine, chaque réaction produisant de la ferrédoxine réduite doit être contrebalancée par une réaction permettant la réoxydation de la ferrédoxine et vice-versa. Ces deux types de réaction doivent être impérativement stoechiométriquement équilibrées pour permettre la survie de la cellule.

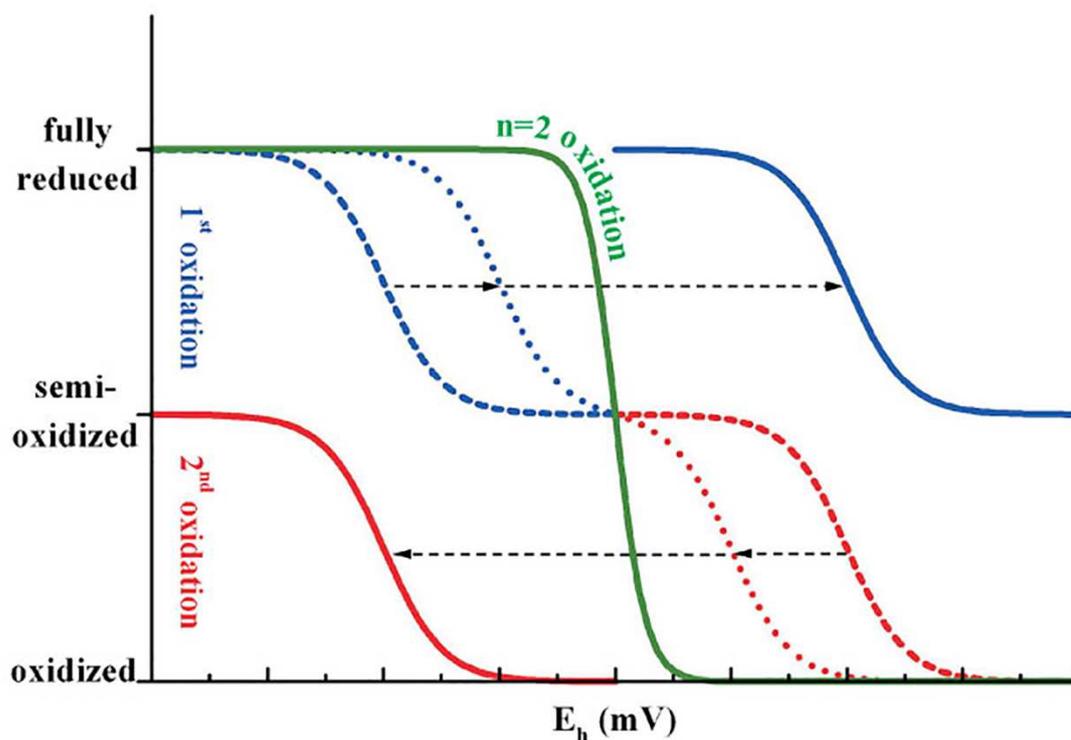
A cet égard, le métabolisme de *C. kluyveri* a longtemps représenté une énigme dans la mesure où aucune réaction permettant la régénération de la ferrédoxine réduite n'était connue. Puis, Thauer et al., (1969) observèrent chez cet organisme une réduction de la ferrédoxine par le NADH en présence d'acétyl-CoA. Ils en conclurent l'existence d'une NADH : ferrédoxine oxydoréductase sous le contrôle allostérique de l'acétyl-CoA. Beaucoup plus récemment, Li et al (2008) élucidèrent le mécanisme de la réduction de la ferrédoxine par le NADH en montrant que celui-ci n'est pas sous le contrôle de l'acétyl-CoA, mais dépend du crotonyl-CoA (un produit de la réduction de l'acétyl-CoA). Cette réaction est en fait catalysée par le complexe cytoplasmique butyryl-CoA déshydrogénase/Etf qui couple la réduction de la ferrédoxine par le NADH avec la réduction du crotonyl-CoA en butyryl-CoA. La bifurcation d'électrons au sein de ce complexe permet de coupler la réaction exergonique de réduction du crotonyl-CoA par le NADH avec la réaction endergonique de réduction de la ferrédoxine par le NADH. La présence de FAD dans chaque sous-unité de ce complexe suggère un mécanisme similaire à celui observé dans les mitochondries dans la mesure où les flavines sont des transporteurs d'électrons proches des quinones. Les flavines « libres » en solutions possèdent des potentiels respectivement de -170 mV et -238 mV pour le 1<sup>er</sup> et le 2<sup>ème</sup> électron. Néanmoins, il est connu que la protéine, à laquelle les nucléotides flavine (FAD et FMN) sont associés, change de manière significative les potentiels d'oxydoréduction de ceux-ci. Ainsi, au sein de la flavodoxine de *A. fermentans*, le FMN présente un premier potentiel d'oxydoréduction (FMNH) à -60 mV et un second (FMNH<sub>2</sub>) à -430 mV. Li et al (2008) proposent alors que le FAD du complexe butyryl-CoA déshydrogénase subisse une première étape d'oxydation durant laquelle la ferrédoxine est réduite et du FAD semi-oxydé stable produit. La seconde oxydation a ensuite lieu avec le crotonyl-CoA pour donner du butyryl-CoA et du FAD oxydé.



**Figure 14** : Mécanisme proposée de la réduction de la ferrédoxine et du crotonyl-CoA par le NADH au sein du complexe Bcd/EtfAB de *C.kluyveri* (Li et al., 2008).

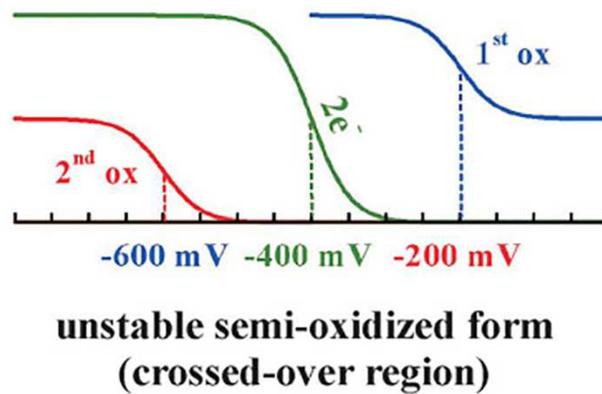
Kaster et al (2011) proposent également un mécanisme de bifurcation d'électrons basé sur le principe que la flavoprotéine pourrait posséder trois potentiels d'oxydoréduction différents :  $E'^0 \text{ FP/FPH}_2$ ,  $E'^0 \text{ FP/FPH}$  et  $E'^0 \text{ FPH/FPH}_2$ .  $E'^0 \text{ FP/FPH}$  étant plus positif que  $E'^0 \text{ FPH/FPH}_2$  et  $E'^0 \text{ FPH/FPH}_2$  plus négatif que  $E'^0 \text{ FP/FPH}_2$ .

Nitschke and Russell (2012), proposent une explication thermodynamique au mécanisme de bifurcation d'électrons qui a lieu dans certaines flavoprotéines radicalement opposée à ceux proposés précédemment. La bifurcation d'électrons est possible, selon eux, car les flavines présentent, dans certaines situations, un chevauchement des transitions rédox de l'état réduit vers l'état semi-oxydé et de l'état semi-oxydé vers l'état oxydé.



**Figure 15** : Courbes théoriques de titration de composées rédox à deux électrons. La partie bleue de la courbe de Nernst représente le passage de l'état réduit à l'état semi-oxydé. La partie rouge de la courbe représente le passage de l'état semi-oxydé à l'état oxydé. La courbe de Nernst verte représente le passage de l'état réduit à l'état oxydé sans passage par un état semi-oxydé (Nitschke et Russell, 2012).

On pourrait croire que l'oxydation complète de la flavine réduite se déroule en deux étapes durant lesquelles une forme semi-oxydée est générée, lors d'un premier transfert d'électrons à bas potentiel (courbe pointillée bleu figure 15), puis l'état oxydé est atteint lors d'un deuxième transfert d'électrons à plus haut potentiel (courbe pointillée rouge figure 15). Ce n'est cependant pas ce qui est observé pour des quinones en solution aqueuse qui perdent leurs électrons de manière simultanée (courbe verte figure 15). Dans certaines protéines, l'environnement électrostatique autour de la flavine peut modifier le potentiel d'oxydoréduction de cette dernière, de sorte que le potentiel de la première oxydation est plus élevé que le potentiel de la seconde oxydation (figure 16).



**Figure 16:** Transition rédox au sein d'une flavoprotéine hypothétique (Nitschke et Russell, 2012).

Dans ce cas de figure, la flavine va se retrouver après la première étape d'oxydation dans un état semi-oxydé instable, dans la mesure où son potentiel est bien supérieur au potentiel de la seconde oxydation. La courbe de Nernst correspondant à l'oxydation complète de la flavine réduite (transfert de deux électrons) dans ces conditions va suivre le chemin où les deux électrons sont donnés simultanément et le potentiel de cette réaction va se situer à mi-chemin entre les potentiels des deux étapes d'oxydoréduction prises séparément (courbe verte, figure 16).

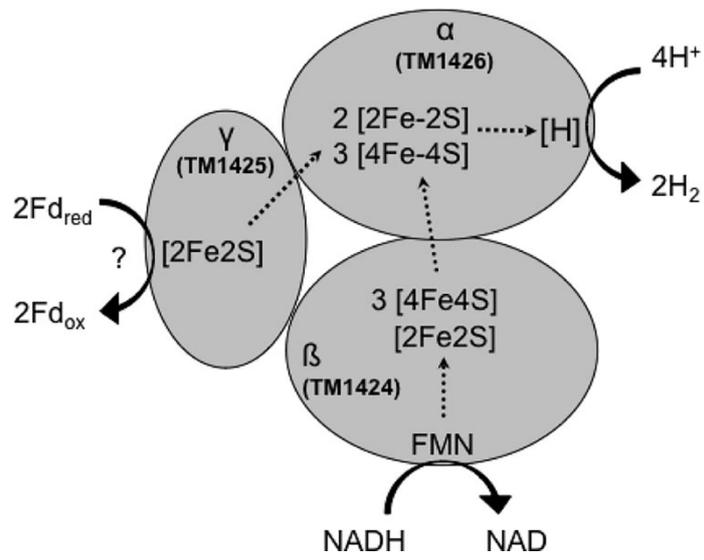
Dans le cas du complexe butyryl-CoA déshydrogénase de *C.kluveri*, cela implique que le NADH va être assez réducteur pour transmettre ses électrons au FAD du complexe pour le mettre sous sa forme réduite (FADH<sub>2</sub>). Si la ferrédoxine et le crotonyl-CoA sont tous les deux suffisamment proches de la flavine réduite, la première réaction d'oxydation, qui a lieu vers -200 mV (et qui par conséquent ne peut pas réduire la ferrédoxine), va se faire avec le crotonyl-CoA qui joue ici le rôle d'accepteur à haut potentiel. Cette première réaction va laisser la flavine dans un état semi-oxydé instable dont le potentiel est alors assez bas pour réduire la ferrédoxine.

Une autre enzyme utilisant le mécanisme de bifurcation d'électrons a été découverte récemment. Cette enzyme d'*Acetobacterium woodii* couple la réaction exergonique de réduction du NAD<sup>+</sup> par le dihydrogène avec la réaction endergonique de réduction de la ferrédoxine par le dihydrogène (Schuchmann and Müller, 2012). Cette hypothèse est

supportée par le fait qu'en l'absence de ferrédoxine, le  $\text{NAD}^+$  n'est pas réduit par le dihydrogène et vice-versa. Le  $\text{NAD}^+$  et la ferrédoxine sont réduits par l'hydrogénase d'*A. woodii* et la réduction de l'un est strictement dépendante de la présence de l'autre avec un ratio 1 :1 déterminé expérimentalement. De plus cette réaction n'a lieu qu'en présence de FMN. Cette hydrogénase se présente sous la forme d'un tétramère composé des sous-unités A, B, C et D. La sous-unité HydA contient 5 centres fer-soufre en plus du site catalytique, où a lieu l'oxydation du dihydrogène, et possède le H-cluster couramment présent dans les hydrogénases à fer. La sous-unité HydB possède un site de fixation du FMN et pourrait être le lieu de la réduction du  $\text{NAD}^+$ . La sous-unité unité HydC possède un cluster [2Fe2S] et la sous-unité HydD ne possède pas de site de fixation de cofacteur et pourrait servir à la bonne conformation du complexe multimérique.

Chez *Thermotoga maritima*, une enzyme trimérique a également été mise en évidence et semble catalyser la réaction inverse de celle catalysée par l'hydrogénase d'*A. woodii* (Schut et Adams, 2009). Cette hydrogénase couple la réaction exergonique d'oxydation de la ferrédoxine avec la réaction endergonique d'oxydation du NADH pour la production de dihydrogène. L'enzyme de *T. maritima* est similaire en de nombreux points à celle d'*A. woodii*. Sa sous-unité  $\alpha$  est également constituée du H-cluster présent dans le site catalytique et possède 5 centres fer-soufre. La sous-unité  $\beta$  possède les sites de fixation de la flavine et du NAD et est supposée être impliquée dans l'oxydation du NADH. La sous-unité  $\gamma$  contient un centre [2Fe2S] et pourrait être le lieu d'oxydation de la ferrédoxine. Les auteurs ont également mis en évidence que la présence simultanée de NADH, de ferrédoxine et de FMN est indispensable pour que la réaction se produise. L'utilisation de la ferrédoxine et du NADH s'effectue selon un ratio 1 :1 .

L'existence d'une enzyme capable d'utiliser du NADH pour la production de dihydrogène, bien que cette réaction soit thermodynamiquement défavorable dans des conditions physiologiques, ouvre un certain nombre de perspectives pour la fermentation anaérobie, offrant un mécanisme supplémentaire de régulation de la balance redox par les cellules.



**Figure 17** : Structure et mécanisme hypothétique de transfert d'électrons au sein de l'hydrogénase de *T.maritima* (Schut et Adams ,2009).



**Matériel**

**&**

**Méthodes**



### III. Matériel et méthodes

#### III.1. Souches et plasmides utilisés

Les souches et plasmides utilisés et développés dans cette étude sont répertoriés dans le tableau suivant :

**Tableau 1** : Liste des souches et plasmides utilisés dans cette étude.

<b>Souches/Plasmides</b>	<b>Caractéristiques<sup>a</sup></b>	<b>Références</b>
<b><i>C. acetobutylicum</i></b> <i>ATCC 824 ΔCAC15 (824 Δcac15)</i>	Souche ATCC 824 portant la délétion du gène <i>cac1502</i> codant pour l'endonucléase de type II Cac824I	Soucaille <i>et al.</i> 2006
<i>ATCC824 ΔCAC15Δbuk::MLS<sup>r</sup>ptbΔ499-906 (824 Δbuk)</i>	Souche 824 <i>Δcac15</i> portant le remplacement du gène codant pour la butyrate kinase par la cassette <i>MLS<sup>r</sup></i> . Délétion de 408 nucléotides à l'extrémité 3' du gène codant pour la phosphotransbutyrylase	Soucaille <i>et al.</i> 2007
<i>ATCC824 ΔCAC15Δbuk::FRT ptbΔ499-906 hydA::int (60s) (824 Δbuk hydA::int)</i>	Souche 824 <i>Δbuk</i> portant l'insertion d'un intron de groupe II à la position 60./61. pb du gène codant pour l'hydrogénase	Résultats non publiés
<i>ATCC824 ΔCAC15Δbuk::FRT ptbΔ499-906 ΔpSOL1thI<sup>-</sup> hydA<sup>-</sup> (824 ΔbukΔpSOL)</i>	Souche 824 <i>Δbuk</i> curée du mégaplasmide <i>pSOL1</i> , <i>thI<sup>-</sup></i> , <i>hydA<sup>-</sup></i>	Résultats non publiés

**E. coli**

TOP10

*F* *mcrA*  $\Delta$ (*mrr*-*hsdRMS*-*mcrBC*)  $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74* *recA1*  
*araD139*  $\Delta$ (*ara-leu*) 7697 *galU* *galK* *rpsL* (*Str<sup>R</sup>*) *endA1* *nupG*  $\lambda$ -

Invitrogen

**Plasmides***pSOS95-VL*

*MLS<sup>r</sup>*; *AP<sup>r</sup>*; *repL*; *ctfA*; *ctfB*; *adc*. Opéron synthétique de la voie de l'acétone sous la dépendance du promoteur *pThl* et du terminateur *adc*

GenBank accession no.  
AY187686

*pSOS95-upp-flp S2*

Dérivé du *pSOS95-VL*. *MLS<sup>r</sup>*; *AP<sup>r</sup>*; *repL*; *upp*; *flp1*

Résultats non publiés

*pSOS94*

*MLS<sup>r</sup>*; *AP<sup>r</sup>*; *repL*; *ctfA*; *ctfB*; *adc*. Opéron synthétique de la voie de l'acétone sous la dépendance du promoteur *pPtB* et du terminateur *adc*

Résultats non publiés

*pSOS952*

Dérivé du vecteur *pSOS95-VL* avec insertion du gène *sadh* entre les gènes *ctfB* et *adc*

Cette étude

*pSOS942*

Dérivé du vecteur *pSOS952* avec remplacement du promoteur *pThl* par le promoteur *pPtB*

Cette étude

*pSOS95-thl*

Dérivé du vecteur *pSOS95-VL* portant le gène *thl* en amont du gène *ctfA*

Résultats non publiés

*pSOS952-thl*

Dérivé du vecteur *pSOS95-thl* portant le gène *sadh* entre les gènes *ctfB* et *adc*

Cette étude

*pSOS942-thl-RBS-OPT*

Dérivé du vecteur *pSOS952-thl* avec remplacement du promoteur *pThl* par le promoteur *pPtB*. Optimisation du RBS pour l'expression du gène *thl* chez *C. acetobutylicum*

Cette étude

<i>pCLF1</i>	<i>Cm<sup>r</sup> ; repL ; flp1</i>	Soucaille <i>et al.</i> 2006
<i>pCLF952</i>	Dérivé du vecteur <i>pCLF1</i> portant les gènes <i>ctfA</i> ; <i>ctfB</i> ; <i>sadh</i> ; <i>adc</i> . Opéron synthétique de la voie de l'isopropanol sous la dépendance du promoteur <i>pThl</i> et du terminateur <i>adc</i> .	Cette étude
<i>pCLF942</i>	Dérivé du vecteur <i>pCLF1</i> portant les gènes <i>ctfA</i> ; <i>ctfB</i> ; <i>sadh</i> ; <i>adc</i> . Opéron synthétique de la voie de l'isopropanol sous la dépendance du promoteur <i>pPtb</i> et du terminateur <i>adc</i> .	Cette étude
<i>pCLF952-thl</i>	Dérivé du vecteur <i>pCLF952</i> portant le gène <i>thl</i> en amont du gène <i>ctfA</i>	Cette étude
<i>pCLF942-thl-RBS-OPT</i>	Dérivé du vecteur <i>pCLF952-thl</i> avec remplacement du promoteur <i>pThl</i> par le promoteur <i>pPtb</i> . Optimisation du RBS pour l'expression du gène <i>thl</i> chez <i>C. acetobutylicum</i>	Cette étude
<i>pCLF952-thl-atoAD</i>	Dérivé du vecteur <i>pCLF952-thl</i> portant les gènes <i>atoA</i> et <i>atoD</i> de <i>E. coli</i> à la place des gènes <i>ctfA</i> et <i>ctfB</i> de <i>C. acetobutylicum</i>	Cette étude
<i>pCLF952-thl-atoAD-OPT</i>	Dérivé du vecteur <i>pCLF952-thl</i> portant les gènes <i>atoA</i> et <i>atoD</i> optimisé pour <i>C. acetobutylicum</i> à la place des gènes <i>ctfA</i> et <i>ctfB</i> de <i>C. acetobutylicum</i>	Cette étude
<i>pTLH1</i>	<i>AP<sup>r</sup> ; Tc<sup>r</sup> ; repL</i>	Harris <i>et al.</i> 2000
<i>pPHHydA-C-long-linker-Tag</i>	<i>AP<sup>r</sup> ; MLS<sup>r</sup> ; repL ; hydA</i> . Expression sous le contrôle du promoteur <i>pHydA</i>	Girbal <i>et al.</i> 2005
<i>pPHHydA-C-long-linker-Tag-catP-upp</i>	Dérivé du vecteur <i>pPHHydA-C-long-linker-Tag</i> . <i>AP<sup>r</sup> ; Cm<sup>r</sup> ; repL ; hydA ; upp</i>	Gauquelin. Résultats non publiés

<i>pTLS_HydA-C-long-linker-Tag</i>	Dérivé du vecteur <i>pPHHydA-C-long-linker-Tag</i> . <i>AP<sup>r</sup></i> ; <i>TC<sup>r</sup></i> ; <i>repL</i> ; <i>hydA</i>	Cette étude
<i>pSOS_NADH_hydB593</i>	Dérivé du vecteur <i>pSOS95-VL</i> . <i>MLS<sup>r</sup></i> ; <i>AP<sup>r</sup></i> ; <i>repL</i> ; <i>Cbei593_4110-4112</i> . Expression de l'hydrogénase NADH dépendante de <i>C. beijerinckii</i> NRLL B593 sous la dépendance du promoteur <i>pThl</i>	Cette étude
<i>pSOS_NADH_hyd8052-upp</i>	Dérivé du vecteur <i>pSOS95-upp-flp S2</i> . <i>MLS<sup>r</sup></i> ; <i>AP<sup>r</sup></i> ; <i>repL</i> ; <i>upp</i> ; <i>Cbei8052_4110-4112</i> . Expression de l'hydrogénase NADH dépendante de <i>C. beijerinckii</i> NCIMB 8052 sous la dépendance du promoteur <i>pThl</i>	Cette étude
<i>pTLS_NADH_hydB593</i>	Dérivé du vecteur <i>pSOS_NADH_hydB593</i> . <i>AP<sup>r</sup></i> ; <i>TC<sup>r</sup></i> ; <i>repL</i> ; <i>Cbei593_4110-4112</i>	Cette étude
<i>pTLS_NADH_hyd8052</i>	Dérivé du vecteur <i>pSOS_NADH_hyd8052</i> . <i>AP<sup>r</sup></i> ; <i>TC<sup>r</sup></i> ; <i>repL</i> ; <i>Cbei8052_4110-4112</i>	Cette étude
<i>pTLS_NADH_hydTm</i>	Dérivé du vecteur <i>pTLH1</i> . <i>AP<sup>r</sup></i> ; <i>Tc<sup>r</sup></i> ; <i>repL</i> ; <i>Tm_1424-1426</i> . Expression de l'hydrogénase NADH dépendante de <i>T. maritima</i> sous la dépendance du promoteur <i>pThl</i>	Cette étude
<i>pCLF_NADH_hydTm</i>	Dérivé du vecteur <i>pCLF1</i> . <i>Cm<sup>r</sup></i> ; <i>repL</i> ; <i>Tm_1424-1426</i> . Expression de l'hydrogénase NADH dépendante de <i>T. maritima</i> sous la dépendance du promoteur <i>pThl</i>	Cette étude
<i>pSOS_NADH_hydAw</i>	Dérivé du vecteur <i>pSOS95-VL</i> . <i>MLS<sup>r</sup></i> ; <i>AP<sup>r</sup></i> ; <i>repL</i> ; <i>hydABCDE</i> . Expression de l'hydrogénase NADH dépendante d' <i>A. woodi</i> sous la dépendance du promoteur <i>pThl</i>	Cette étude

*pCLF\_NADH\_hydAw*

Dérivé du vecteur *pCLF1*. *Cm<sup>r</sup>* ; *repL* ; *hydABCDE*. Expression de l'hydrogénase NADH dépendante d'A. *woodi* sous la dépendance du promoteur *pThl*

Cette étude

---

## III.2. Milieux de culture et conditions de croissance

### III.2.1. *E. coli*

#### III.2.1.1. Culture en milieu liquide

Les cultures d'*E. coli* sont réalisées dans la grande majorité des cas en condition d'aérobie en milieu Lysogeny-Broth (LB) à 37°C, supplémenté si nécessaire avec l'antibiotique adéquat.

**Composition du milieu LB en g.l<sup>-1</sup>(BERTANI, 1951) :**

Tryptone	10
Extrait de Levure	5
NaCl	10

Le milieu SOC est également utilisé pour la culture des souches lors de la phase d'expression phénotypique suivant une procédure de transformation (par choc thermique ou par électroporation).

**Composition du milieu SOC en g.l<sup>-1</sup>(Inoue et al., 1990) :**

Tryptone	20
Extrait de Levure	5
NaCl	0,58
KCl	0,19
MgCl <sub>2</sub>	0,95
Glucose	3,66

Dans certains cas, comme par exemple lors de l'expression de protéines sensibles à l'oxygène, des cultures sont réalisées en condition d'anaérobie en milieu MAC à 37°C.

### Composition du milieu MAC en g.l<sup>-1</sup> :

Tryptone	10
Extrait de Levure	5
Glycérol	20
HEPES	23
NTA	0,2
FeSO <sub>4</sub>	0,05
NaCl	2
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5

Le pH est alors ajusté à une valeur de 7,3 à l'aide d'ammoniac 28%. Le milieu est ensuite réparti dans des fioles qui sont serties avant d'être autoclavées. Dans ces conditions, le peu d'oxygène présent dans la fiole est très rapidement consommé par *E. coli* pendant les premières minutes de croissance puis la culture se poursuit en condition anaérobie.

#### III.2.1.2. Culture en milieu solide

Toutes les cultures d'*E. coli* sur milieu solide ont été effectuées sur milieu LB supplémenté avec 15 g.l<sup>-1</sup> d'agar.

#### III.2.1.3. Antibiotiques utilisés

Lors de la culture de souches possédant un ou plusieurs marqueurs de résistance antibiotique, qu'il soit génomique ou plasmidique, le milieu de culture (solide ou liquide) est supplémenté avec le(s) antibiotique(s) correspondant.

### Concentration finale dans le milieu des antibiotiques utilisés en µg.ml<sup>-1</sup> :

Ampicilline/Carbénicilline	100
Chloramphénicol	20 <sup>(1)</sup> ou 30 <sup>(2)</sup>
Kanamycine	50

(1): Concentration utilisée pour l'isolement de clone après transformation

(2) Concentration utilisée pour les cultures en routine

### III.2.2. C. acetobutylicum

#### III.2.2.1. Culture en milieu liquide

*C. acetobutylicum* est une bactérie anaérobie strict ce qui suppose que le maintien de conditions anaérobies drastique est indispensable à sa croissance.

##### III.2.2.1.1. Culture en fiole

Les cultures de *C. acetobutylicum* en mode batch sans régulation du pH sont réalisées dans des bouteilles serties dont le milieu a été préalablement dégazé à chaud à l'azote (pendant 20 à 30 min). La présence d'oxygène dans le milieu est contrôlée visuellement grâce à l'ajout de résazurine dont la couleur change selon le potentiel d'oxydoréduction. Les bouteilles sont alors autoclavées 20 min à 120°C, puis de la cystéine (0,5 g.l<sup>-1</sup>) est ajoutée en condition anaérobie afin de réduire le milieu et de faire baisser le potentiel redox. Les inocula sont préparés par ensemencement (à 10 % v/v) avec une solution stock de spores (pour les souches sporulantes) ou avec une solution stock glycérol 20% v/v (pour les souches non sporulantes). Pour les inoculations faites à partir d'un stock de spores, un choc thermique à 80°C pendant 15 min est effectué afin d'éliminer les formes végétatives et de synchroniser la germination des spores. Les cultures sont ensuite incubées à 37°C sans agitation.

Un milieu synthétique (MS) est utilisé en routine pour les cultures de *C. acetobutylicum* en fiole (préparation des inocula, sporulation des souches etc....).

#### **Composition du milieu MS en g.l<sup>-1</sup> (Vasconcelos et al., 1994)**

Glucose	60
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,22
KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,55
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,55
Acide Acétique	2,2
FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,011
Acide para-aminobenzoïque	0,008
Biotine	0,00004

Dans certains cas particuliers où la source de carbone utilisée est différente du glucose, le milieu MS est préparé sans glucose et la source de carbone ajoutée en condition anaérobie avant l'inoculation.

Pour les cultures nécessitant une croissance plus rapide et une meilleure production de biomasse (production de protéine recombinante, analyse des capacités de production de solvants) un milieu CGM riche est utilisé.

**Composition du milieu CGM en g.l<sup>-1</sup> :**

Extrait de levure	6,25
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,5
KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,95
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,95
MnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,013
FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,013
NaCl	1,25
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,5
Asparagine	2,5

Dans le cas du milieu CGM, la source de carbone est préparée, dégazée et stérilisée à part. Cela permet d'éviter les réactions de Maillard pouvant intervenir entre les sucres et l'extrait de levure lors de la stérilisation. La source de carbone est alors ajoutée en condition anaérobie quelques minutes avant l'inoculation.

Le milieu 2YTG est utilisé pour la culture des souches lors de la phase d'expression phénotypique suivant une procédure de transformation par électroporation.

**Composition du milieu 2YTG en g.l<sup>-1</sup> :**

Extrait de levure	6,25
Tryptone	16
NaCl	4
Glucose	5

Le pH du milieu est ajusté à une valeur de 5,2 à l'acide chlorhydrique

### III.2.2.1.2. Culture en bioréacteur de type batch

Les cultures en fermenteurs sont réalisées dans des bioréacteurs de type Biostat B (Sartorius, Aubagne, France) de 2 litres en utilisant un volume de travail de 1,5 litres. Ce type d'installation permet le contrôle fin des différents paramètres de la culture à l'aide de sondes mesurant la température, le pH et le potentiel redox. Les cultures sont effectuées à 35°C avec une agitation de 300 rpm. Le pH est maintenu au dessus de la valeur fixée par ajout automatique d'ammoniac 14% v/v. Après autoclave, le milieu est dégazé pendant 30 min à l'azote puis maintenu légèrement en surpression afin d'éviter toute entrée d'oxygène. La sortie gaz du réacteur est protégée vis-à-vis de l'oxygène par un flacon contenant du pyrogallol. Une fiole de garde est placée entre celui-ci et la sortie du réacteur. Les prélèvements pour le suivi de la DO et des produits de fermentation sont réalisés à l'aide d'un système dédié permettant la prise d'échantillon sans risques de contamination du fermenteur. Ce système de prélèvement ne permettant néanmoins pas de maintenir des conditions d'anaérobiose, les prélèvements pour la réalisation d'activité enzymatique sont faits à la seringue stérile et l'échantillon récolté est directement injecté dans une bouteille dégazée et sertie. Les fermentations dans ce type de réacteur sont réalisées en milieu CGM identique à celui utilisé pour les cultures en fioles à l'exception de l'absence de résazurine et de cystéine.

Le bilan carboné est calculé en équivalent C-mole à partir de la formule suivante :

$$CM_{Glucose\ consommé} - CM_{Acétate} - CM_{Ethanol} - CM_{Butyrate} - CM_{Acétone} - CM_{Isopropanol} \\ - CM_{Butanol} - CM_{CO_2} - CM_{Biomasse}$$

$$\text{où } M_{CO_2} = M_{Pyruvate} + M_{Acétone} + M_{Isopropanol}$$

$$\text{et } M_{Pyruvate} = M_{Acétate} + M_{Ethanol} + 2M_{Acétone} + 2M_{Isopropanol} + 2M_{Butyrate} + \\ 2M_{Butanol}$$

La formule élémentaire massique de la biomasse utilisée est  $CH_{1,75}O_{0,5}N_{0,25}$

### III.2.2.1.3. Culture en bioréacteur de type chémostat

Les cultures sont réalisées dans un bioréacteur de 500 ml contenant 300 ml de milieu à 37°C et sous agitation constante. Le pH est contrôlé à l'aide d'une sonde et maintenu au

dessus de 6,5 par ajout automatique d'ammoniac 10% v/v et les conditions d'anaérobiose sont vérifiées à l'aide d'une sonde redox. Les cultures sont effectuées en milieu MS limité en phosphate dont la composition diffère légèrement de celle utilisée pour les cultures en fiole.

**Composition du milieu MS utilisé pour les cultures de type chémostat en g.l<sup>-1</sup> :**

KCL	0,65
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,2
NH <sub>4</sub> Cl	1,5
FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,028
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,1
Acide para-aminobenzoïque	0,008
Biotine	0,00004

Le milieu est autoclavé puis dégazé à chaud à l'azote pendant 45 min. Dans le cas où le glucose et/ou le xylose sont utilisés comme source de carbone, le pH du milieu dans le bidon d'alimentation est ajusté à 2 de manière à réduire le risque de contamination. La source de carbone est ajoutée en condition anaérobie dans le bidon d'alimentation après autoclave. Le bidon d'alimentation de contenance 10 litres est maintenu sous pression d'azote légère tout au long de l'expérience et son contenu est agité en permanence à l'aide d'un agitateur magnétique. Le fermenteur est inoculé à partir d'une culture active en milieu MS à 10% v/v et placé en mode batch jusqu'à atteindre la phase exponentielle de croissance. Le mode continu est alors initié par alimentation du milieu grâce à une pompe péristaltique à un débit de 4 à 15 ml.h<sup>-1</sup>. Le volume est maintenu constant dans le réacteur par un prélèvement haut contrôlé par une sonde de niveau. La sortie gaz du réacteur est protégée vis-à-vis de l'oxygène par un flacon contenant du pyrogallol. Une fiole de garde est placée entre celui-ci et la sortie du réacteur. Les prélèvements sont effectués à travers un septum prévu à cet effet à l'aide de seringues stériles.

#### III.2.2.2. Cultures en milieu solide

Les cultures sur milieu solide réalisées, après une procédure de transformation de *C. acetobutylicum* et dans le but d'obtenir des clones isolés, sont faites avec du milieu riche RCA (Reinforced Clostridium Agar). Le milieu RCA est obtenu à partir d'une préparation

commerciale RCM (Reinforced Clostridium Media) diluée à 33g.l<sup>-1</sup> à laquelle est ajouté de l'agar pour une concentration finale de 15 g.l<sup>-1</sup> et dont le pH est ajusté à 5,8. Le milieu RCA est à base de glucose.

Lorsque la situation nécessite l'utilisation d'un milieu riche comportant une source de carbone différente du glucose, un milieu CGM supplémenté en agar (15 g.l<sup>-1</sup>) et en substrat est utilisé.

Lorsqu'un milieu synthétique est préféré, les cultures sont réalisées sur boîte MS supplémentée en agar (15 g.l<sup>-1</sup>).

### III.2.2.3. Antibiotiques utilisés

Lors de la culture de souches possédant un ou plusieurs marqueurs de résistance antibiotique, qu'il soit génomique ou plasmidique, le milieu de culture (solide ou liquide) est supplémenté avec le(s) antibiotique(s) correspondant.

#### **Concentration finale dans le milieu des antibiotiques utilisés en µg.ml<sup>-1</sup> :**

Erythromycine/Clarythromycine	40
Thiamphénicol	10 <sup>(1)</sup> à 25 <sup>(2)</sup>
Tétracycline	10

(1): Concentration utilisée pour l'isolement de clone après transformation

(2) Concentration utilisée pour les cultures en routine

### III.2.3. Conditions de stockage des souches

Les souches d'*E. coli* sont stockées dans une solution de glycérol 20% v/v dans des tubes cryogéniques à -80°C.

Les souches de *C. acetobutylicum* sporulantes sont stockées sous forme de spores à -20 °C en milieu MS liquide. Les spores sont obtenues après 5 à 7 jours de cultures en milieu MS liquide à 37 °C. La présence de spores est vérifiée par observation en microscopie optique à contraste de phases.

Les souches de *C. acetobutylicum* non sporulantes sont conservées dans une solution de glycérol 20% (v/v) dans des fioles 5 ml serties et anaérobies à -80 °C.

### III.3. Techniques de génie génétique

#### III.3.1. Isolement et manipulation des acides nucléiques

##### III.3.1.1. Préparation d'ADN plasmidique d'*E. coli*

Les mini-préparations d'ADN plasmidique d'*E. coli* sont réalisées à partir d'1 à 2 ml de culture sur la nuit en milieu LB supplémenté en antibiotique(s) (si nécessaire) à l'aide de mini-colonnes du kit GenElute Plasmid Miniprep (Sigma). Cette procédure de purification sur colonne permet l'obtention d'une préparation d'ADN pure pouvant être manipulée (digestion, ligation,...) ou directement introduite chez *E. coli*.

Les midi-préparations d'ADN plasmidique d'*E. coli* sont réalisées à partir de 100 ml de culture sur la nuit en milieu LB supplémenté en antibiotique(s) (si nécessaire) à l'aide de colonnes du kit GenElute Plasmid Midiprep (Sigma). Cette procédure de purification est utilisée quand des quantités d'ADN importantes sont nécessaires, notamment pour la transformation de *C. acetobutylicum*.

##### III.3.1.2. Préparation d'ADN génomique de *C. acetobutylicum*

Les préparations d'ADN génomique de *C. acetobutylicum* sont réalisées sur 2 ml de culture, en milieu MS ou CGM supplémenté en antibiotique (si nécessaire), récoltée à DO proche de 1, à l'aide de mini-colonnes du kit GenElute Bacterial Genomic DNA (Sigma) en suivant les recommandations du fournisseur pour les bactéries de type Gram positif.

##### III.3.1.3. Transformation d'*E. coli*

Toutes les procédures de transformation d'*E. coli* sont réalisées à l'aide de cellules chimio-compétentes One Shot® TOP10 (Life Technologies). Entre 1 et 7 µl de produit de

ligation ou de préparation d'ADN plasmidique sont généralement utilisés pour transformer 50 µl de cellules

Transformation par choc thermique :

- Ajouter l'ADN au 50 µl de cellules compétentes
- Incuber 30 minutes dans la glace
- Faire un choc thermique à 42 °C pendant 30 secondes sans agitation
- Incuber 2 minutes dans la glace
- Ajouter 250 µl de SOC
- Incuber 1 heure à 37 °C avec une agitation de 300 rpm
- Etaler les cellules sur le milieu de sélection

III.3.1.4. Transformation de *C. acetobutylicum*

*C. acetobutylicum* possède un système de restriction Cac824I imposant une méthylation spécifique de l'ADN avant de pouvoir l'utiliser pour transformer cet organisme. Néanmoins, toutes les souches utilisées dans cette étude possèdent une délétion du gène *cac1502* codant pour l'endonucléase de type II Cac824I (Soucaille et al., 2006), permettant l'utilisation d'ADN non préalablement méthylé dans toutes les procédures de transformation. Le protocole de transformation par électroporation est dérivé de la procédure initialement décrite par Mermelstein et al. (1992).

Tampons : Tampon d'électroporation composé de 10 ml de saccharose 270 mM et de 150 µl de tampon phosphate de sodium (pH 7,4) à 200 mM.

Protocole :

A partir d'une pré-culture en milieu CGM (30 ml), sur la nuit :

- Inoculer, à 10% (v/v), 50 ml de milieu CGM (la  $DO_{620}$  doit avoisiner 0,2)
- Cultiver la souche à 37 °C jusqu'à une  $DO_{620}$  comprise entre 0,7 et 1
- Refroidir la culture dans la glace

Dans l'enceinte anaérobie :

- Centrifuger les cellules, 10 minutes à 3000xg
- Laver le culot dans 8 ml de tampon d'électroporation glacé
- Centrifuger les cellules, 10 minutes à 3000xg
- Resuspendre le culot dans 500 µl de tampon d'électroporation glacé
- Mettre en contact la suspension de cellules et la préparation plasmidique (20 à 100 µg de préparation d'ADN plasmidique concentrée et dessalée) dans la cuvette d'électroporation placée dans la glace.
- Le mélange est immédiatement soumis à une décharge électrique avec les paramètres du Gene Zapper suivants :  
$$\text{Voltage} = 1800 \text{ V}; C = 50 \mu\text{F}; R = 600 \text{ ohms}$$
- Transférer les cellules dans 10 ml de milieu 2YTG et incubé à 37°C pendant 4 heures
- Centrifuger 15 minutes à 3000xg
- Reprendre le culot dans 250 µl de surnageant
- Etaler les cellules sur milieu de sélection (boîtes RCA pH 5,8 + antibiotique)
- Incuber 48 h à 37 °C

#### III.3.1.5. Techniques de clonage

Les techniques de clonage et de digestion d'ADN sont réalisées selon les procédures standards (Sambrook, 2001) et en respectant les indications données par les fournisseurs (New England Biolabs, Life Technologies, Sigma).

La séparation et l'analyse des tailles de fragments d'ADN sont réalisées par électrophorèse sur gel d'agarose (de 0,8 à 2% d'agarose selon la taille des fragments, dans un tampon TAE 0,5X). Les fragments d'ADN sont purifiés à partir de gels d'agarose avec les kits de purification sur gel GenElute™ Gel Extraction (Sigma). Du tampon de charge (1X final) est ajouté aux échantillons avant dépôt. Le marqueur de taille 1 kb (New England Biolabs) est couramment employé. L'ADN est visualisé aux ultraviolets ( $\lambda = 254$  ou  $312 \text{ nm}$ ) après coloration du gel dans une solution de bromure d'éthidium (BET) à environ  $0,5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

### III.3.1.6. Amplification de fragments d'ADN

L'amplification de fragments d'ADN est réalisée grâce à la technique de l'amplification en chaîne par polymérase (PCR). La réaction se fait *in-vitro* en mettant en contact de l'ADN (10 à 100 ng pour de l'ADN génomique et 1 à 10 ng pour de l'ADN plasmidique) des amorces, des dNTPs, une polymérase et son tampon d'activité. La réaction est effectuée dans un volume allant de 25 à 50 µl. En fonction des différents besoin, entre 18 et 30 cycles de PCR sont nécessaires pour obtenir le niveau d'amplification souhaité. Chaque cycle de PCR est constitué d'une étape de dénaturation de l'ADN (entre 95 et 98 °C), d'une étape d'hybridation des amorces sur l'ADN cible (température dépendante de l'ADN et des amorces, typiquement entre 50 et 65 °C) et d'une étape d'élongation pendant laquelle la synthèse de l'ADN a lieu (température dépendante de l'enzyme utilisée).

#### **Crimson Taq DNA Polymerase (New England Biolabs) :**

La Crimson Taq DNA Polymerase est une enzyme robuste utilisée en routine pour l'amplification d'ADN dans le but de contrôler la présence d'un gène sur un plasmide ou sur de l'ADN génomique. Ne possédant pas d'activité de correction des erreurs, cette enzyme introduit environ une mutation toutes les 3500 bases amplifiées et n'est donc pas utilisée pour des applications nécessitant une haute fidélité.

#### **Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs):**

La Phusion DNA Polymerase est une enzyme extrêmement fidèle qui introduit une mutation toutes les 175000 bases amplifiées environ (50 fois moins que la Taq). Cette enzyme est utilisée pour l'amplification d'ADN pour des applications nécessitant une conservation stricte de la séquence d'origine (clonage par exemple).

Exemple de mélange réactionnel :

Reagents	Volume (µL)	Conc/Unit
Tampon 5X	10	1X
dNTP 2,5mM	4	200 µM
Amorce N°1 10 µM	2,5	0,5 µM
Amorce N°2 10 µM	2,5	0,5 µM
Phusion DNA Polymerase	0,25	0,5 U
Eau	29,75	-
ADN	1	-
Volume Final	50	

La réaction est réalisée dans un MJ Mini<sup>Tm</sup> Gradient Thermal cycler (Biorad) :

Etapas PCR	Température	Temps
Dénaturation initiale	98°C	30sec
Dénaturation	98°C	20 sec
Hybridation	50 à 65°C	30 sec
Elongation	72°C	30 sec par kpb
Elongation finale	72°C	2 min

X18

### III.3.1.7. Table des oligonucléotides

**Tableau 2** : Liste des oligonucléotides utilisés dans cette étude.

Nom	Séquence 3'-5'	Utilisation
<b>Clonage du gène <i>sadh</i> de <i>C.beijerinckii</i></b>		
<b>adhEcoRV+RBS s</b>	TAAATGATATCTTTAAGGAGGAACATATTTTATGAAAGGTTTTG CAATGCT	Amplification du gène <i>sadh</i> de <i>C. beijerinckii</i> NRRL B593. Ajout d'une site EcoRV en amont du RBS (direct)
<b>adhEcoRV+RBS as</b>	TTAAAAATTGATATCTTATAATACTACTGCTTTAATTAAGTCT TTTG	Amplification du gène <i>sadh</i> de <i>C. beijerinckii</i> NRRL B593. Ajout d'une site EcoRV en aval du codon stop (reverse)
<b>Clonage des hydrogénases NADH dépendantes de <i>C. beijerinckii</i></b>		
<b>NADH_hyd_BamH1_SfoI F</b>	TTAAATTGGATCCTAATAGGAGGGTGGATGATCATGGTAAATC	Amplification des gène <i>Cbei_4110-4112</i> . Ajout d'un site BamHI en amont du RBS (direct)
<b>NADH_hyd_BamH1_SfoI R</b>	TATGGCGCCTTAATGTTCACTTTTATCATAATGAACATGTAGTAA TTC	Amplification des gène <i>Cbei_4110-4112</i> . Ajout d'un site SfoI en aval du codon stop (reverse)
<b>Clonage de l'hydrogénase NADH dépendante de <i>T. maritima</i></b>		
<b>NADH_hydTm_BamHI F</b>	TAAATACGTTCAACTGTTAGGAGGTGTTGGCGTTGG	Amplification des gènes <i>Tm_1424-1426</i> . Ajout d'un site BamHI en amont du RBS (direct)
<b>NADH_hydTm_SfoI R</b>	TAAATGGCGCCGGTGTATCATTTTCAGCCATTTTTCGAAAGC	Amplification des gènes <i>Tm_1424-1426</i> . Ajout d'un site SfoI en aval du codon stop (reverse)
<b>NADH_hydTm_SmaI F</b>	TTAAATCCCGGGACGTTCAACTGTTAGGAGGTGTTGGCGTT GG	Amplification des gènes <i>Tm_1424-1426</i> . Ajout d'un site SmaI en amont du RBS (direct)
<b>Clonage de l'hydrogénase NADH dépendante d'<i>A. woodii</i></b>		
<b>HYDABCD A woodii F</b>	TTAAATTGGATCCAAAAGCGTAAAGGTTGCACGATTTAATTA	Amplification des gènes <i>HydADCE</i> . Ajout d'un site BamHI en amont du RBS (direct)

<b>HYDABCD A woodii R</b>	TTAAATTGGCGCCCCATTGTTGGGCCTCTTTTTGTTTA	Amplification des gènes <i>HydABCDE</i> . Ajout d'un site Shol en aval du codon stop (reverse)
<b>Clonage des gènes <i>atoAD</i> de <i>E. coli</i></b>		
<b>SADH-ato-FW</b>	AAAGAATTCTTGATATCTTTAAGGAGGAACA	Amplification des vecteurs type <i>pSOS95-thl</i> ou <i>pCLF95-thl</i> . Utilisé pour le remplacement des gènes <i>ctfAB</i> par recombinaison homologue. Hybridation à l'extrémité 5' du gène <i>sadh</i> (direct)
<b>P95-ato-rev</b>	CATTTTAATCCCTCCTTTTAAATTCTGGATCTTCTAGC	Amplification des vecteurs type <i>pSOS95-thl</i> ou <i>pCLF95-thl</i> . Utilisé pour le remplacement des gènes <i>ctfAB</i> par recombinaison homologue. Hybridation à l'extrémité 3' du gène <i>thl</i> (reverse)
<b>ato_F</b>	ATTTAAAAGGAGGGATTAAAATGAAAACAAAATTGATGACAT TACAAGACGCC	Aplification des gènes <i>atoAD</i> . Ajout d'une région d'homologie en 5' pour recombinaison homologue dans un vecteur du type <i>pSOS95-thl</i> ou <i>pCLF95-thl</i> (direct)
<b>atoAD_RV</b>	ATATCAAGAATTCTTTTCATAAATCACCCCGTTGCGTATT	Aplification des gènes <i>atoAD</i> . Ajout d'une région d'homologie en 3' pour recombinaison homologue dans un vecteur du type <i>pSOS95-thl</i> ou <i>pCLF95-thl</i> (reverse)
<b>Clonage des gènes <i>atoAD_OPT</i></b>		
<b>atoAD_OPT_REC_F</b>	CTAGAAAAGTGCTAGCTCGAGACACAAGGC	Amplification des gènes <i>atoAD_OPT</i> (direct)
<b>atoAD_OPT_REC_R</b>	TATCAAGAATTCTTTGCGGCCGCTCATAAA	Amplification des gènes <i>atoAD_OPT</i> (reverse)
<b>Construction du vecteur <i>pCLF942-thl-RBS-OPT</i></b>		
<b>pPTB_RBS_THL_OPT_F</b>	TTTTTTAAGGCATTAGTGCATTTAAGCGTCAGAGCATGGC	Amplification du promoteur <i>pPtb</i> avec ajout d'un RBS optimisé pour l'expression du gène <i>thl</i> à l'extrémité 5'. Ajout d'une région d'homologie avec le fragment <i>pCLF952-DeltaRBS-thl</i> (direct)

<b>pPTB_RBS_THL_OPT_R</b>	TACAACCTTCTTTCATTTATCTACCTCTTCTCTTGCTTGGGTCTT AGCGTTTAAACAATTATCTATGTTAAATGATTAACG	Amplification du promoteur <i>pPtb</i> avec ajout d'un RBS optimisé pour l'expression du gène <i>thl</i> à l'extrémité 5'. Ajout d'une région d'homologie avec le fragment <i>pCLF952-DeltaRBS-thl (reverse)</i>
<b>pCLF952-DeltaRBS-thl-F</b>	ATCGCATTTCATAGATTGACCTCCAATAA	Amplification du vecteur <i>pCLF952-thl</i> et dérivé avec délétion du promoteur et du RBS. Ajout d'une région d'homologie avec le fragment <i>pPTB_RBS_THL_OPT (direct)</i>
<b>pCLF952-DeltaRBS-thl-R</b>	ATGAAAGAAGTTGTAATAGCTAGTGCAGTA	Amplification du vecteur <i>pCLF952-thl</i> et dérivé avec délétion du promoteur et du RBS. Ajout d'une région d'homologie avec le fragment <i>pPTB_RBS_THL_OPT (reverse)</i>

---

#### Oligonucléotides de contrôle

<b>adh_verif s</b>	ATGGAGCAACAGATATTCTAAATTA	Vérification du sens d'insertion du gène <i>sadh</i> . Hybridation au milieu du gène <i>sadh (direct)</i>
<b>adh_verif as</b>	CTACTAAAGTATCTGAATCCACAAA	Vérification du sens d'insertion du gène <i>sadh</i> . Hybridation au milieu du gène <i>adc (reverse)</i>
<b>NADH_hyd 01R</b>	CTATGAGAAAATTGGGTTTTGAAAA	Vérification et séquençage des gènes <i>Cbei_4110-4112</i> de <i>C. beijerinckii (reverse)</i>
<b>NADH_hyd 02F</b>	CCGCAACAATTTCCCCATAACATT	Vérification et séquençage des gènes <i>Cbei_4110-4112</i> de <i>C. beijerinckii (direct)</i>
<b>NADH_hyd 02R</b>	AGGAGAAATGCAGAGGCTGTTCAAA	Vérification et séquençage des gènes <i>Cbei_4110-4112</i> de <i>C. beijerinckii (reverse)</i>
<b>NADH_hyd 03F</b>	TATCAATCTCATATGAAATTAGTGA	Vérification et séquençage des gènes <i>Cbei_4110-4112</i> de <i>C. beijerinckii (direct)</i>
<b>NADH_hyd 03R</b>	CACGGTGTTATTGAGGGGATGATTA	Vérification et séquençage des gènes <i>Cbei_4110-4112</i> de <i>C. beijerinckii (reverse)</i>

<b>NADH_hyd 04F</b>	TGGATTTCTCCATCATGCTTCTA	Vérification et séquençage des gènes <i>Cbei_4110-4112</i> de <i>C. beijerinckii</i> (direct)
<b>NADH_hydTm_01R</b>	TTTACCCAGAGACCAGACT	Vérification et séquençage des gènes <i>Tm_1424-1426</i> de <i>T. maritima</i> (reverse)
<b>NADH_hydTm_02F</b>	ATTCTCTTCGACCTCGAGGTGAAG	Vérification et séquençage des gènes <i>Tm_1424-1426</i> de <i>T. maritima</i> (direct)
<b>NADH_hydTm_03R</b>	AAAAGCGGTTGTACAACGCTTTCA	Vérification et séquençage des gènes <i>Tm_1424-1426</i> de <i>T. maritima</i> (reverse)
<b>NADH_hydTm_04F</b>	AACACGTCAGGGACGAATCCGCTCC	Vérification et séquençage des gènes <i>Tm_1424-1426</i> de <i>T. maritima</i> (direct)
<b>NADH_hydAW_1F</b>	TTAATGAAATCGGGCATGTCGGATGTGT	Vérification et séquençage des gènes <i>HydABCDE</i> de <i>A. woodii</i> (direct)
<b>NADH_hydAW_2R</b>	ACCTTCGAAAGGAATATCAGATACCCCTAA	Vérification et séquençage des gènes <i>HydABCDE</i> de <i>A. woodii</i> (reverse)
<b>NADH_hydAW_3F</b>	AACAAAGACGAATTGCCTTAGCAAAGTGTG	Vérification et séquençage des gènes <i>HydABCDE</i> de <i>A. woodii</i> (direct)
<b>NADH_hydAW_4R</b>	CGGCCACGTAAACCAGATGCTTTAACTCG	Vérification et séquençage des gènes <i>HydABCDE</i> de <i>A. woodii</i> (reverse)
<b>NADH_hydAW_5F</b>	ATTTTGCAGGAAACACAAGTATGGC	Vérification et séquençage des gènes <i>HydABCDE</i> de <i>A. woodii</i> (direct)
<b>pSOS-Prom</b>	TAAGTTGTTAGAGAAAACGTATAAATTAGGG	Hybridation sur le promoteur <i>pThl</i> (direct)
<b>pSOSProm univ</b>	CTTTTGGTCGTAGAGCACACGG	Hybridation en amont du promoteur <i>pThl</i> sur les vecteur de type <i>pSOS</i> (direct)

<b>pSOS-Term</b>	CGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGG	Hybridation en aval du terminateur <i>adc</i> sur les vecteurs de type <i>pSOS</i> (reverse)
<b>pCLF_term2</b>	ATATCCAACCTTAACGGTCAT	Hybridation sur l'extrémité 5' du gène <i>catP</i> les vecteurs de type <i>pCLF</i> (direct)
<b>Tetra D</b>	ATAATCGATGACAGTGGAGTATATCGACCAGCAGACCAAAGC AACGCAGG	Hybridation sur l'extrémité 3' du gène Tet <sup>R</sup> (direct)
<b>Tetra R</b>	ATACTGCAGAGTTTATAATAACTATCTCC	Hybridation sur l'extrémité 5' du gène Tet <sup>R</sup> (reverse)
<b>NTHLSFOAS</b>	ATTGGCGCCCTAGCACTTTTCTAGCAATATTGCTGTT	Vérification et séquençage du gène <i>thl</i> . Hybridation sur l'extrémité 5' du gène <i>thl</i> (reverse)
<b>ctfA debut R</b>	GTTGGAGTGCCACAGTTTAA	Vérification et séquençage du gène <i>thl</i> . Hybridation sur l'extrémité 3' du gène <i>ctfA</i> (reverse)
<b>Repl F</b>	GAAAGAAAGATATGGAACAGTCTATAAAGGC	Vérification et séquençage du gène <i>thl</i> . Hybridation sur l'extrémité 3' du gène <i>repl</i> (direct)
<b>Buk1</b>	TAGTAAAAGGGAGTGTACGACCAGTG	Vérification du locus <i>buk</i> sur le chromosome de <i>C. acetobutylicum</i> . Hybridation sur l'extrémité 5' du gène <i>ptb</i> (direct)
<b>Buk4</b>	TCTAAATTCTGCAATATATGCCCCCCC	Vérification du locus <i>buk</i> sur le chromosome de <i>C. acetobutylicum</i> . Hybridation sur l'extrémité 3' du gène <i>cac_3073</i> (reverse)
<b>pSTIhydAP100</b>	TCCTGCAGTTTACTTAAATGTAACCGATTTGTGCTTC	Vérification du gène <i>hydA</i> . Hybridation sur le promoteur pHydA (direct)
<b>HydaMilieu D</b>	CAAAATGGGATATGGAAAAGATGTAACAGG	Vérification du gène <i>hydA</i> . Hybridation au milieu du gène <i>hydA</i> (direct)

<b>HydaMilieu R</b>	GCTATTCCTGAAATTGAAGGATAGTAAG	Vérification du gène <i>hydA</i> . Hybridation au milieu du gène <i>hydA</i> (reverse)
<b>hydA_intron_F</b>	TAAATGGCAATGAAGTGCATACAGATAAAG	Vérification de la présence de l'intron sur le gène <i>hydA</i> (direct)
<b>hydA_intron_R</b>	CATGTTGAGTCATCAAGACAAACATCATCA	Vérification de la présence de l'intron sur le gène <i>hydA</i> (reverse)

---

### III.3.1.8. Synthèse d'oligonucléotides

Les oligonucléotides sont synthétisés par la société Eurogentec<sup>™</sup> (Belgique)

### III.3.1.9. Analyse informatique des séquences

Les logiciels suivants ont été utilisés pour la construction des plasmides, la gestion de la banque des séquences, les alignements multiples et l'optimisation de RBS : VectorNTI (Life Technologies), pDRAW32 (<http://www.acaclone.com>), RBS Calculator (Salis Lab).

### III.3.1.10. Construction des vecteurs d'expressions

#### III.3.1.10.1. Vecteur *pCLF952/pCLF942*

Le gène *sadh* (numéro d'accèsion AF157307) a été amplifié à partir de l'ADN génomique de *C. beijerinckii* NRLLB593 (DSMZ) à l'aide des primers adhEcoRV+RBS s et adhEcoRV+RBS as. Ces oligonucléotides permettent l'amplification de la région RBS naturelle avec l'ensemble du gène *sadh* et placent des sites de restrictions EcoRV à chaque extrémité du fragment amplifié. Le fragment ainsi amplifié a ensuite été sous-cloné dans un vecteur Zero-blunt TOPO (Invitrogen) afin d'obtenir le vecteur *TOPO-sadh*. Le fragment contenant le gène *sadh* a alors été purifié sur gel d'agarose après digestion du vecteur *TOPO-sadh* par EcoRV. Le vecteur *pSOS95-VL* (6,9 kb) a également été digéré par EcoRV, traité à l'Antartic phosphatase (New England Biolabs) et ligué au fragment contenant *sadh* préalablement digéré par EcoRV. Le vecteur *pSOS952* (8 kb) a ainsi été obtenu. Le vecteur *pSOS942* a été construit en remplaçant le promoteur *pThl* sur le vecteur *pSOS952* par le promoteur *pPtb*, à l'aide d'une double digestion Clal-BamHI. Les vecteur *pSOS952* et *pSOS942* ont ensuite été digéré par Sall, et le fragment contenant l'opéron synthétique isopropanol a été purifié, pour chaque vecteur, sur gel d'agarose. Le vecteur *pCLF1* a alors été digéré par Sall, traité à l'Antartic phosphatase et ligué avec les opérons isopropanol préalablement digéré par Sall. Les vecteur *pCLF952* et *pCLF942* ont ainsi été obtenu (figure 18).

ADN génomique *C.beijerinckii*

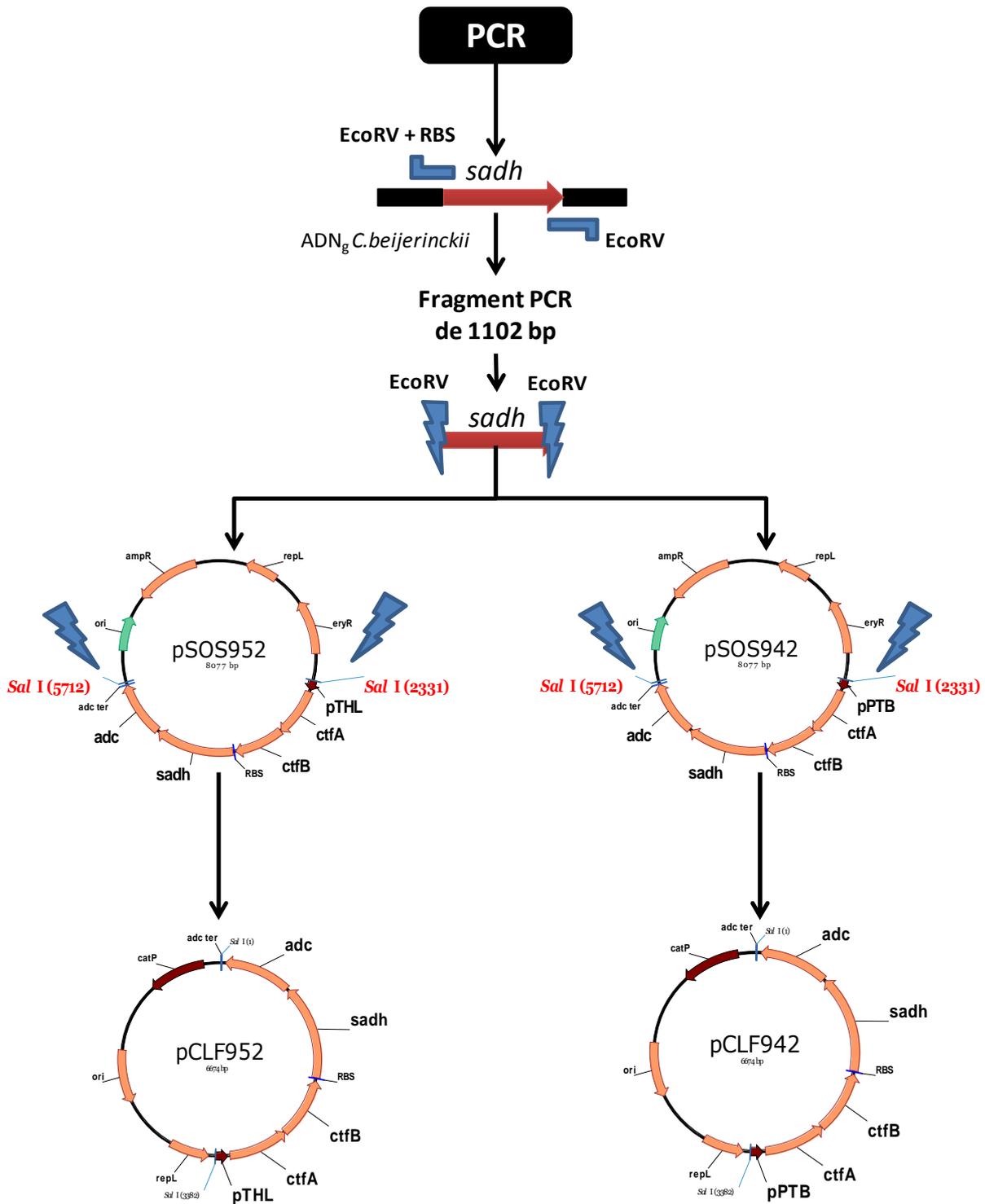
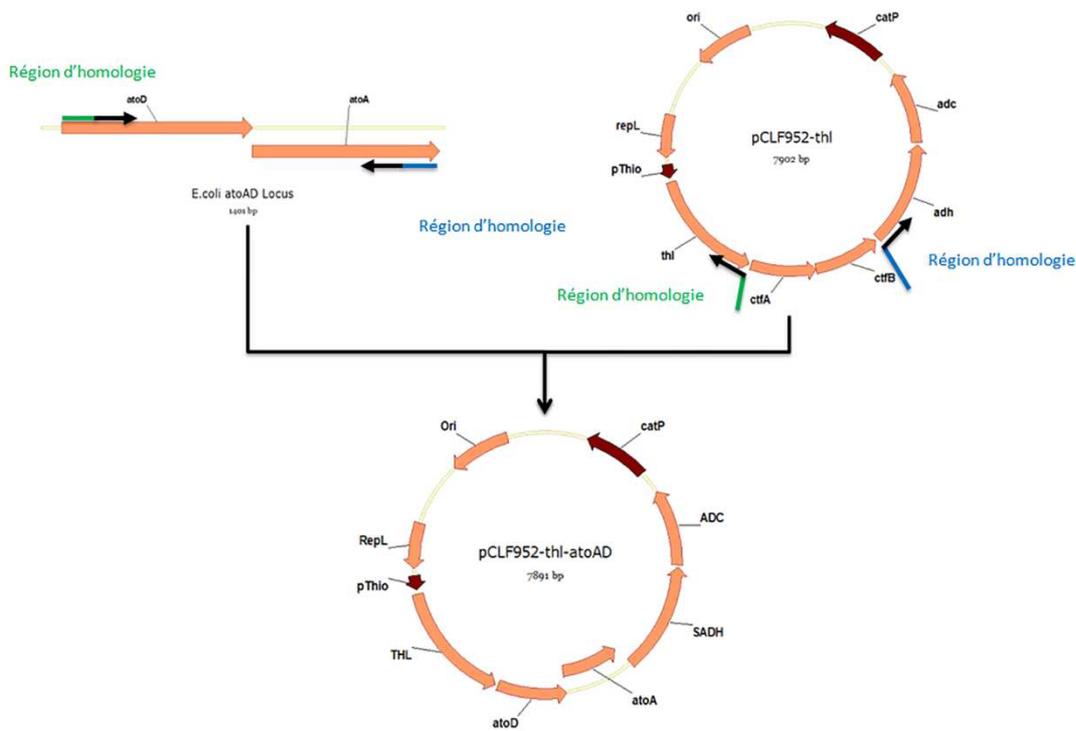


Figure 18 : Stratégie de clonage de l'opéron isopropanol dans les vecteur pCLF942 et pCLF952.

### III.3.1.10.2. Vecteur *pCLF952-thl-atoAD* et *pCLF952-thl-atoAD-OPT*

Le vecteur *pCLF952-thl-atoAD* a été construit en remplaçant les gènes *ctfAB* par les gènes *atoAD* sur le vecteur *pCLF952-thl*. Ce remplacement a été effectué par recombinaison homologue, à l'aide du kit GeneArt® Seamless Cloning and Assembly Kit (Invitrogen), afin de retirer uniquement la région codant pour les gènes *ctfAB* du vecteur *pCLF952* pour y mettre à la place les gènes *atoAD*. Seule la séquence codant précisément pour les deux ORFs, allant du codon start au codon stop de *atoA*, a été insérée et le RBS initialement présent sur le vecteur, en amont de *ctfA*, a été conservé. Les primers *ato\_F* et *atoAD\_RV* ont été utilisés pour amplifier les gènes *atoAD* sur le génome d'*E. coli* et ajouter les régions d'homologies nécessaire à la recombinaison (Figure 19).



**Figure 19** : Stratégie de clonage des gènes *atoAD* dans le vecteur *pCLF952-thl-atoAD*.

Le vecteur *pCLF952-thl-atoAD-OPT* a été construit en utilisant la même stratégie que pour la construction du vecteur *pCLF952-thl-atoAD* en utilisant les primers

atoAD\_OPT\_REC\_F et atoAD\_OPT\_REC\_R pour amplifier les gènes synthétiques *atoAD-OPT* à partir de vecteur fournis par la société Life Technologies.

### III.4. Techniques analytiques

#### III.4.1. Détermination de la densité optique

La densité cellulaire des cultures est estimée par mesure de la densité optique à 600<sub>nm</sub> (pour les cultures d'*E. coli*) ou à 620<sub>nm</sub> (pour les cultures de *C. acetobutylicum*), à l'aide d'un spectrophotomètre (Biochrom Libra), dans des cuves de 1 cm de trajet optique. Des dilutions sont effectuées si nécessaire pour que la mesure soit dans la gamme de linéarité de l'appareil (0,05-0,6 UDO).

Les suivis cinétiques faits lors des dosages d'activité sont réalisés à l'aide d'un spectrophotomètre Hewlett Packard 8452A permettant une lecture simultanée des longueurs d'ondes allant de l'UV au visible. Les mesures sont réalisées dans des cuves en quartz de 1 cm de trajet optique.

#### III.4.2. Dosage des substrats et produits de fermentation

Les surnageants de culture prélevés lors des cultures en fioles ou en fermenteurs sont filtrés sur 0,2 µm et analysés par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Le système HPLC utilisé (Agilent 1200 series) est équipé d'un passeur automatique (Agilent 1200 series), d'une précolonne (Microguard Biorad) et d'une colonne de type H<sup>+</sup> (HPX-87H, 300 nm x 7,8 mm) qui permet une séparation par échange d'ions et exclusion de taille. L'analyse des échantillons est réalisée à 14 °C, avec un débit d'éluant (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 mM) de 0,5 ml.h<sup>-1</sup>. La détection des produits est assurée grâce à un spectrophotomètre UV (Agilent 1200 series G1362A) à 210 nm et par un réfractomètre (Agilent 1200 series G1314B). Les concentrations des différents composés dans les échantillons analysés sont déterminées à l'aide d'une courbe de calibration établie à partir de solutions étalons.

### III.5. Mesure des activités enzymatiques

Des conditions d'anaérobioses strictes sont observées tout au long de la procédure de préparation des extraits cellulaires et des dosages d'activités enzymatiques (sauf indication contraire). Toutes les procédures sont effectuées sous une enceinte dédiée où les conditions d'anaérobioses sont assurées par une atmosphère constituée d'azote ultra-pure. Un catalyseur de palladium transforme l'oxygène résiduel en hydrogène et en eau, qui est alors absorbé par du silicagel. La concentration en oxygène dans l'enceinte est contrôlée à l'aide d'une sonde dont la précision est de l'ordre du ppm. Les expérimentations sont typiquement réalisées sous une atmosphère contenant moins de 20 ppm d'oxygène.

Toutes les solutions (tampons) sont préparées dans de l'eau ultra-pure et sont portées à ébullition et dégazées à chaud sous flux d'azote. Les réactifs sont pesés puis dissouts à l'intérieur de la hotte anaérobie en utilisant des tampons anaérobies.

Sauf indication contraire, les activités enzymatiques sont effectuées dans le sens physiologique avec des extraits acellulaires concentré 100 fois. Les activités spécifiques sont déterminées dans une gamme où la linéarité avec la concentration en protéine a été établie.

La réduction ou l'oxydation des nucléotides pyridiniques est mesurée à 340 nm ( $\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), la disparition de la forme énolate de l'acétoacétyl-Coa est mesurée à 303 nm ( $\epsilon = 14 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) ou à 310 nm ( $\epsilon = 8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) et la réduction du méthylviologène à 560 nm ( $\epsilon = 7,71 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). Une unité d'activité enzymatique est définie comme étant la quantité d'enzyme qui catalyse la conversion de 1  $\mu\text{mole}$  de substrat par minute (sauf indication contraire). Les réactions devant être réalisées sous atmosphère d'hydrogène sont effectuées dans des cuves en quartz munies d'un bouchon en butyl afin de maintenir une pression de 1 atm en hydrogène pendant le cours de l'expérience.

#### III.5.1. Préparation des extraits cellulaires

Un volume de 100 à 200 ml de culture est récolté en anaérobiose à partir du fermenteur ou bien de culture en bouteille sertie. Les cultures en fermenteur sont récoltées à une  $\text{DO}_{620\text{nm}}$  proche de 4, tandis que les cultures en bouteille sont récoltées à une  $\text{DO}_{620\text{nm}}$  proche de 2. Le milieu est centrifugé 15 min à 8500 xg et le culot est lavé par 20 à 40 ml de

tampon Tris-Hcl 100mM, DTT 2mM, pH 7,5, glycérol 10% (v/v). Après une nouvelle centrifugation de 15 min à 8500 xg, le culot est repris dans 1 à 2 ml (concentration 100X) de tampon Tris-Hcl 100mM, DTT 2mM, pH 7,5, glycérol 10% (v/v). Les extraits cellulaires ainsi préparés sont conservés à -80 °C dans des fioles serties sous atmosphère d'azote ou bien utilisés directement.

La suspension cellulaire est ensuite désintégrée par sonication à l'aide d'un appareil à ultrasons (Bioblock, muni d'une micro-sonde) par 4 cycles de 30 secondes de traitement entrecoupés de 2 minutes de refroidissement dans une glace à -15 °C, obtenue par l'ajout de chlorure de sodium. Les débris cellulaire sont ensuite éliminés par centrifugation à 13 000 xg pendant 2 minutes.

Pour la mesure de certaines activités (CoA transférase), une procédure de dialyse de l'extrait cellulaire dans un tampon spécifique est nécessaire afin de stabiliser l'enzyme et permettre l'obtention de mesures fiables. Dans ce cas, les cellules sont lavées et conservées avec un tampon Tris-Hcl 100mM, pH 7,5, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5M, glycérol 20% (v/v). Après sonication, l'extrait acellulaire est dialysé sur la nuit à 4 °C contre 2l de tampon Tris-Hcl 100 mM, pH 7,5, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5M, glycérol 20% (v/v) (dégazé) à l'aide d'un boudin SPECTRA/POR Float-A-Lyzer (SpectrumLabs) possédant un seuil de coupure de 8-10 kDa.

### III.5.2. Dosage des protéines

La concentration totale en protéine dans les extraits acellulaires est déterminée par la méthode de Bradford (Bradford, 1976). L'extrait acellulaire est dilué de manière à ce que la concentration en protéine mesurée se trouve dans la zone de linéarité de la méthode (entre 1 mg.l<sup>-1</sup> et 8 mg.l<sup>-1</sup>). L'extrait dilué (800 µl) est mélangé à du réactif concentré de Bradford (Biorad) (200 µL) composé d'acide phosphorique et de méthanol. Après 15 minutes d'incubation, l'absorbance à 595 nm est mesurée. Les dosages sont effectués en double et une moyenne des deux mesures est calculée. La courbe étalon est réalisée à l'aide d'une solution d'albumine bovine (BSA à des concentration allant de 1 mg.l<sup>-1</sup> à 10 mg.l<sup>-1</sup>).

### III.5.3. Activité Thiolase

L'activité spécifique de la thiolase est mesurée dans le sens de la réaction de thiolyse (sens non physiologique) selon le protocole décrit par Inui et al (2008).

- Tampon Tris-Hcl 100 mM pH 8,0 (sans DTT)
- CoASH 0,2 mM
- Acétoacétyl-CoA 60  $\mu$ M
- MgCl<sub>2</sub> 10 mM
- DTT 1 mM
- Extrait à doser variable

La réaction est réalisée à 30 °C et est déclenchée par l'ajout de l'extrait brut. La disparition de l'acétoacétyl-CoA est suivie à 303 nm ( $\epsilon = 14 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ). La pente correspondant à l'hydrolyse naturelle de l'acétoacétyl-CoA (sans extrait) est également déterminée et est retranchée de l'activité mesurée.

### III.5.4. Activité CoA transférase

L'activité CoA transférase est mesurée par suivi de la disparition de la forme énolate de l'acétoacétyl-CoA à 310 nm ( $\epsilon = 8 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ) selon le protocole décrit par (Wiesenborn et al., 1989). Il est impératif que l'extrait soit dialysé pour pouvoir mesurer cette activité. En effet, l'acétoacétyl-CoA étant également un substrat pour la thiolase, la moindre trace de CoASH va permettre à la réaction de thiolyse (très forte activité chez *C. acetobutylicum*) d'avoir lieu et fausser la mesure de l'activité CoA transférase. Il est également indispensable que l'extrait soit conservé dans un tampon contenant 0,5 M de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et 20% (v/v) de glycérol afin d'éviter une déstabilisation de l'enzyme et une perte totale de l'activité.

- Tampon Tris-Hcl 100 mM pH 7,5
- Acétate de potassium 0,15 M
- MgCl<sub>2</sub> 20 mM
- Glycérol 5% (v/v)
- Acétoacétyl-CoA 100  $\mu$ M
- Extrait à doser variable

Pour chaque test, un blanc substrat, dans lequel l'acétate de potassium est omis, est réalisé en parallèle de manière à : 1) s'assurer qu'aucune réaction de thiolysse n'a lieu et que l'activité mesurée est bien dépendante de la présence d'acétate, 2) mesurer l'hydrolyse spontanée de l'acétoacétyl-CoA afin de pouvoir la soustraire à la valeur d'activité mesurée dans l'extrait.

### III.5.5. Activité acétoacétate décarboxylase

Contrairement aux autres activités qui sont mesurées par suivi de la densité optique, l'activité acétoacétate décarboxylase est déterminée par le dosage HPLC de la formation d'acétone au cours du temps (sens physiologique). Le milieu réactionnel (1 ml) contient :

- Tampon acétate de potassium 200 mM pH 5,0
- Acétoacétate de lithium 200 mM
- Extrait à doser variable

La réaction est initiée par ajout de l'extrait et incubée à 30°C pendant 20 min. Un prélèvement de 100 µL est effectué toutes les 5 min et directement injecté dans un vial HPLC pour analyse. Une réaction témoin sans ajout d'extrait est réalisée afin de déterminer le bruit de fond du dosage. La réaction est arrêtée dans le vial HPLC par ajout de 10 µL de soude 2 N. La concentration en acétone dans chaque prélèvement est déterminée en mmol.l<sup>-1</sup> à l'aide d'une gamme étalon spécifiquement préparée pour chaque série de dosage.

#### Préparation de la gamme étalon :

- Tampon acétate de potassium 200 mM pH 5,0
- Acétone 0,5 à 10 mM
- Soude 2N 10 µL

Ici, une unité est définie comme étant la quantité d'enzyme qui catalyse la production de 1 µmole d'acétone par minute.

### III.5.6. Activité alcool déshydrogénase secondaire

L'activité spécifique alcool déshydrogénase secondaire est mesurée dans le sens de la formation de l'alcool selon le protocole décrit par (Hiu et al., 1987).

- Tampon Tris-Hcl 50 mM pH 7,5
- NAD(P)H 0,2 mM
- Acétone 6,7 mM
- DTT 1 mM
- Extrait à doser variable

La réaction est réalisée à 25 °C et est déclenchée par l'ajout d'acétone. L'oxydation du NAD(P)H est suivie à 340 nm ( $\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). La pente correspondant à l'hydrolyse naturelle NAD(P)H (sans extrait) est également déterminée et est retranchée de l'activité mesurée.

### III.5.7. Activités hydrogénases

#### III.5.7.1. Activité de consommation de l'hydrogène

##### III.5.7.1.1. Hydrogénase de *C. acetobutylicum*

Le protocole de mesure de l'activité de consommation de l'hydrogène par suivi de la réduction du méthylviologène est adapté de la publication de Vasconcelos et al (1994). La réaction est réalisée dans une cuve en quartz de 1 ml et le milieu réactionnel est soumis à un bullage à l'hydrogène. Un bouchon en butyl ferme la cuve et permet de maintenir une pression en hydrogène de 1 atm.

- Tampon phosphate de potassium 100 mM pH 7,2
- DTT 20 mM
- Méthylviologène 20 mM
- Hydrogène 1 atm
- Extrait à doser variable

La réaction est réalisée à 37 °C et est initiée par l'ajout du méthylviologène. La réduction du méthylviologène est suivie à 560nm ( $\epsilon = 7,7 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ). La réduction de deux molécules de méthylviologène est couplée à la consommation d'une molécule d'H<sub>2</sub>.

#### III.5.7.1.2. Hydrogénase de *T. maritima*

Le protocole de mesure de l'activité de consommation de l'hydrogène par suivi de la réduction du méthylviologène est adapté de la publication de Schut and Adams (2009). Le protocole est similaire à celui utilisé pour la mesure de l'activité de l'hydrogénase de *C. acetobutylicum* à l'exception de l'ajout de NAD et de FMN dans le mélange réactionnel. Les concentrations de certains réactifs sont également modifiées.

- Tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,5
- DTT 20 mM
- Méthylviologène 10 mM
- FMN 100  $\mu\text{M}$
- NAD 1 mM
- Hydrogène 1 atm
- Extrait à doser variable

La réaction est réalisée à 37 °C ou à 80 °C et est initiée par l'ajout du méthylviologène. La réduction du méthylviologène est suivie à 560nm ( $\epsilon = 7,7 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ). La réduction de deux molécules de méthylviologène est couplée à la consommation d'une molécule d'H<sub>2</sub>.

#### III.5.7.1.3. Hydrogénase d'*A. woodii*

Le protocole de mesure de l'activité de consommation de l'hydrogène par suivi de la réduction du méthylviologène est adapté de la publication de Schuchmann and Müller (2012). Le protocole est similaire à celui utilisé pour la mesure de l'activité de l'hydrogénase de *T. maritima* à l'exception du remplacement du tampon phosphate de potassium par un tampon EPPS à pH 8,0.

- Tampon EPPS 50 mM pH 8,0
- DTT 20 mM
- Méthylviologène 10 mM
- FMN 100  $\mu$ M
- NAD 1 mM
- Hydrogène 1 atm
- Extrait à doser variable

La réaction est réalisée à 37 °C et est initiée par l'ajout du méthylviologène. La réduction du méthylviologène est suivie à 560 nm ( $\epsilon = 7,7 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). La réduction de deux molécules de méthylviologène est couplée à la consommation d'une molécule d' $\text{H}_2$ .

### III.5.7.2. Activité de production de l'hydrogène

Les dosages enzymatiques de production d'hydrogène sont effectués à 37 °C sous agitation. Le mélange réactionnel est préparé à l'intérieur de l'enceinte anaérobie. La réaction s'effectue dans un volume de phase liquide de 2 ml à l'intérieur d'un vial serti de 10 ml préalablement dégazé à l'argon.

#### Composition du mélange réactionnel :

- Tris-Hcl 50 mM pH 8,0
- Dithionite de sodium 50 mM
- Méthylviologène 1 mM
- Extrait à doser variable

La réaction est déclenchée par ajout de l'extrait brut. Une fois la réaction initiée, le vial (serti) est immédiatement sorti de l'enceinte anaérobie et 200  $\mu$ l de phase gazeuse sont prélevés à la seringue de précision et analysés par chromatographie en phase gazeuse (CPG). La réaction est ensuite mise à incuber au bain marie à 37 °C. Un prélèvement de 200  $\mu$ l de phase gazeuse est ensuite effectué toutes les 8 minutes et analysé par CPG. La réaction est suivie pendant 40 minutes. La séparation des gaz est réalisée avec un appareil de chromatographie en phase gazeuse de type GIRA CPG C12 à l'aide d'un tamis moléculaire (5 Å, 3 mètres de long).

Paramètre CPG :

- Température du four                    35 °C
- Température du détecteur            35 °C
- Température de l'injecteur           50 °C

Le gaz porteur est de l'argon à une pression de 0,6 bar. L'hydrogène produit est quantifié selon l'aire du pic obtenu et à partir d'une gamme étalon préalablement faite par injections successives de différents volumes d'hydrogène 100%.



**Ingénierie métabolique de**  
***C. acetobutylicum* pour la**  
**production d'un mélange IBE**  
**à partir d'hexoses et de**  
**pentoses**



#### IV. Ingénierie métabolique de *C. acetobutylicum* pour la production d'un mélange IBE à partir d'hexoses et de pentoses

##### IV.1. Introduction

L'objectif de ces travaux est de réaliser l'ingénierie du métabolisme de *C. acetobutylicum* pour la conversion de l'acétone en isopropanol couplée à une surexpression de la voie de l'acétone afin, d'une part, d'augmenter le rendement massique en solvants et, d'autre part, de produire un mélange IBE (Isopropanol-Butanol-Ethanol) directement utilisable comme biocarburant (dans la mesure où l'isopropanol est un « booster » de l'indice d'octane (Rassadin et al., 2006)).

##### IV.2. Construction des vecteurs et des souches d'expression

L'enzyme qui a été choisie pour effectuer la conversion de l'acétone en isopropanol est l'alcool déshydrogénase secondaire (Sadh) de *C. beijerinckii* NRLL B593 (codé par le gène *sadh*, GenBank: AF157307.2). Le choix de cette enzyme a été guidé par différentes études montrant quelle possède, en comparaison aux autres alcools déshydrogénases caractérisées chez des clostridies, une des plus fortes activités envers l'acétone (Chen, 1995; Hiu et al., 1987; Ismaïel et al., 1993). De plus, le fort lien de parenté qui lie *C. beijerinckii* et *C. acetobutylicum* et les nombreuses similitudes dans leurs métabolismes, devraient assurer une expression hétérologue optimale de cette enzyme chez *C. acetobutylicum*.

Néanmoins, la production d'un mélange IBE directement utilisable comme biocarburant est soumise à deux problématiques majeures, à savoir le rendement de production de solvants et la pureté du mélange obtenu en sortie du réacteur. Chez *C. acetobutylicum*, ces deux paramètres peuvent être maximisés en rétrécissant le spectre des produits formés et en redirigeant le flux de carbone vers les produits recherchés. Les acides organiques produits lors de la fermentation ABE sont les principaux composés impactant le rendement en solvants totaux. Même si ces acides sont partiellement reconstitués, leur présence en quantité non négligeable en fin de fermentation diminue la production de solvants et impose la mise en place de procédures de séparation des produits. Deux options sont alors envisageables pour répondre à ce problème : (i) diminuer (voire supprimer) la production

d'acides et/ou (ii) augmenter leur reconsommation. L'acétate étant un précurseur métabolique indispensable dans la voie de production de l'acétone de *C. acetobutylicum*, la suppression de sa production n'est pas envisageable. Au contraire, la capacité de la souche à le prendre en charge de manière optimale pour la production d'acétone/isopropanol va directement impacter le rendement IBE. Mermelstein et al (1993) ont montré que la surexpression des gènes *ctfA*, *ctfB* et *adc* permet une augmentation significative du flux de carbone vers la voie de l'acétone. Le rendement de production des solvants est alors maximisé et la quantité d'acides résiduels diminuée. L'acétone étant le substrat de l'enzyme Sadh, cette stratégie devrait s'avérer avantageuse pour accroître la production d'isopropanol par *C. acetobutylicum* (figure 20).

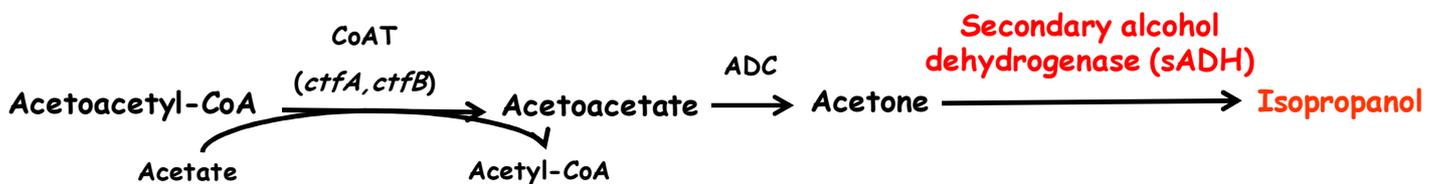


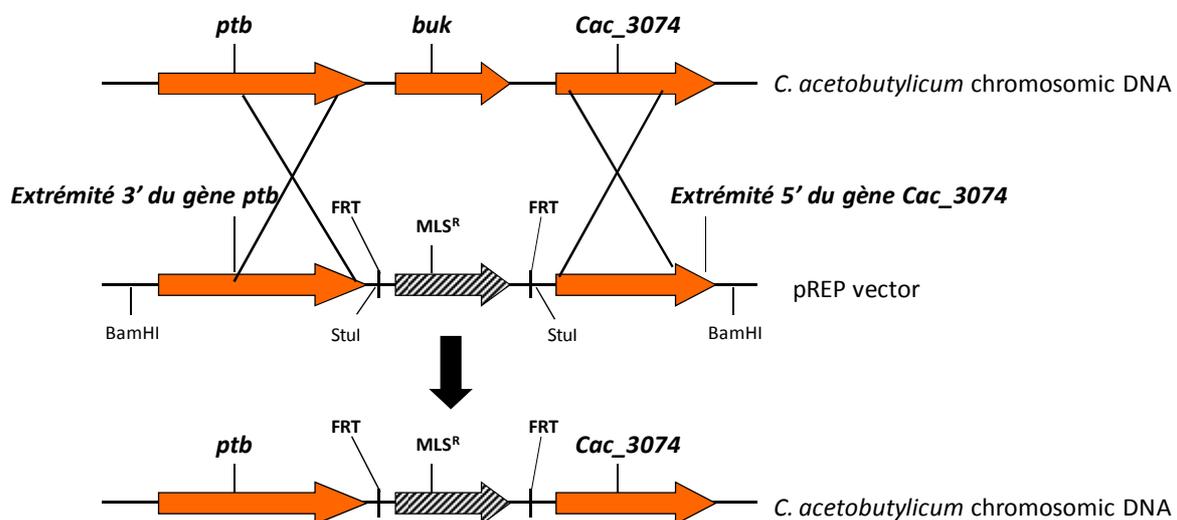
Figure 20 : Voie de l'isopropanol chez *C. acetobutylicum* après introduction de l'enzyme SADH.

Deux vecteurs d'expression *pCLF942* et *pCLF952*, co-exprimant un opéron synthétique composé des gènes *ctfAB* codant pour la CoA transférase, *adc* codant pour l'acétoacétate décarboxylase et *sadh* codant pour l'alcool déshydrogénase secondaire, ont alors été construits. Cet opéron synthétique de la voie de l'isopropanol a été placé sous la dépendance du promoteur de la thiolase (*pThl*), dans le cas du vecteur *pCLF952*, et sous la dépendance du promoteur de la phosphotransbutyrylase (*pPtb*), dans le cas du vecteur *pCLF942*. Ces deux constructions ont pour but de tester l'influence du promoteur sur la production d'isopropanol, dans la mesure où Girbal et al (2003) ont montré, en utilisant *gusA* comme gène rapporteur, que le promoteur de la phosphotransbutyrylase (*pPtb*) est deux à trois fois plus fort celui de la thiolase (*pThl*).

Quant à lui, le butyrate ne participe pas à la voie de l'acétone/isopropanol et sa production dévie une partie du carbone et des équivalents réducteurs au détriment de la production des solvants. Harris et al (2000) montrent que l'inactivation de la voie du

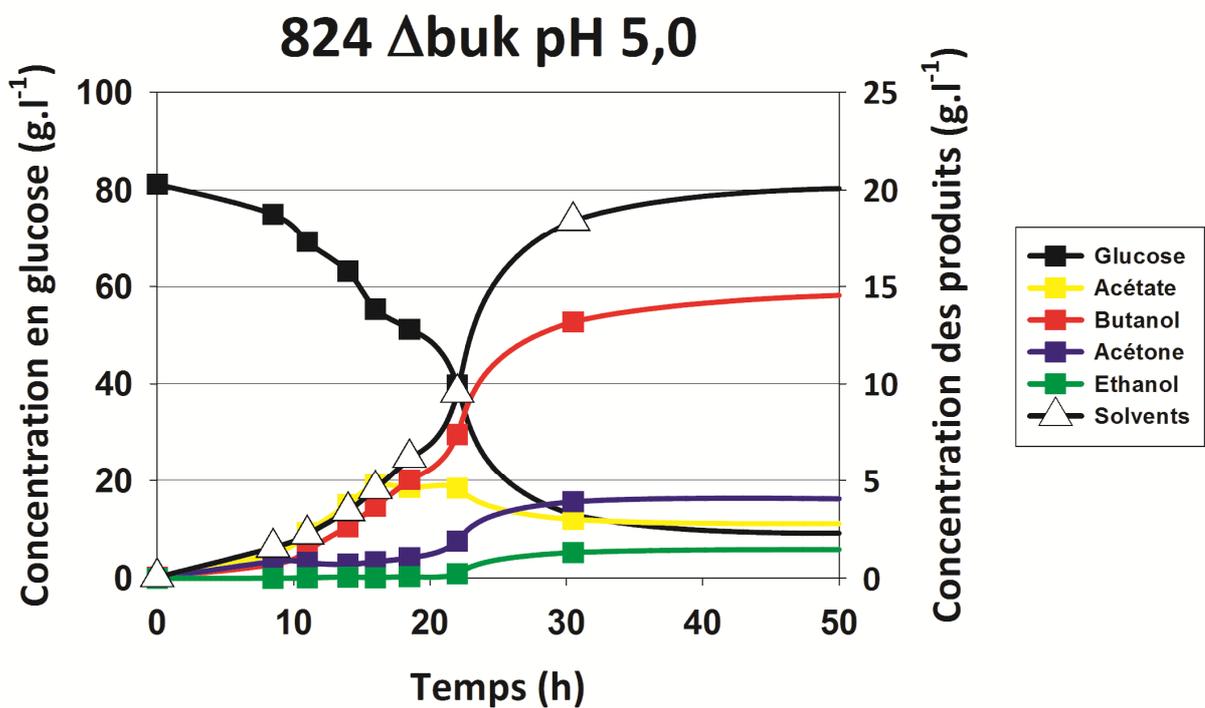
butyrate augmente la production de solvants et notamment celle du butanol. En effet, la souche produit, dès la phase acidogène, du butanol afin de régénérer le NAD(P)H excédentaire résultant de l'inactivation de la voie du butyrate. En contrepartie de la forte diminution de la production de butyrate, la production d'acétate augmente de 100%. Ce dernier point est potentiellement à l'avantage de la production IBE car l'acétate ainsi produit va pouvoir venir alimenter la voie de l'isopropanol, à condition que cette dernière soit en mesure d'absorber un tel flux.

Une souche de *C. acetobutylicum*, précédemment construite dans l'équipe (Soucaille et al., 2006), portant le remplacement du gène codant pour la butyrate kinase (*buk*) par la cassette  $MLS^r$  (souche 824  $\Delta buk$ ) a donc été également évaluée dans le cadre d'une production IBE. Cette souche obtenue à l'aide d'une technique de recombinaison par double crossing-over possède l'intérêt d'être stable vis-à-vis de la production de butyrate contrairement à celle développée par Green et al (souche PJ4BK ; 1996) pouvant présenter un retour au génotype sauvage, par excision de fragment d'ADN inséré dans le gène *buk* (figure 21).



**Figure 21** : Délétion du gène *buk* du génome de *C. acetobutylicum* par double crossing-over (Soucaille et al.,2006).

En plus de la délétion du gène *buk*, la souche *824 Δbuk* présente une délétion de 408 nucléotides à l'extrémité 3' du gène codant pour la phosphotransbutyrylase (*ptb*). En accord avec les observations de Harris et al (2000), la souche *824 Δbuk* produit les solvants de manière plus précoce et en plus grande quantité que la souche sauvage. Lorsqu'elle est cultivée en milieu CGM glucose à un pH fixé autour de 5, la production de solvants commence dès la phase acidogène avec  $3,5 \text{ g.l}^{-1}$  (figure 22) produits en moins de 15 heures de fermentation et le titre final de plus de  $20 \text{ g.l}^{-1}$  (figure 22) est parmi les plus élevés rapporté chez *C. acetobutylicum*.



**Figure 22:** Profil de fermentation de la souche *824 Δbuk* d'une culture régulée à pH 5,0 en milieu CGM glucose.

Les trois produits majoritaires formés étant le butanol, l'acétone et l'éthanol, cette souche constitue un bon candidat pour la production d'un mélange IBE à haut rendement.

IV.3. Expression des vecteurs *pCLF942* et *pCLF952* dans les souches *824 Δcac15* et *824 Δbuk* de *C. acetobutylicum*

Les deux plasmides construits précédemment ont été introduits dans les souches de *C. acetobutylicum* ATCC824 *Δcac1502* (*824 Δcac15*) et *Δcac1502 Δbuk ptbΔ499-906* (*824 Δbuk*) (tableau 1). La délétion totale et partielle, respectivement de la butyrate kinase et de la phosphotransbutyrylase dans la souche *824 Δbuk* (Soucaille et al., 2006), réduit considérablement la production de butyrate en faveur des solvants (Harris et al., 2000). Les quatre souches recombinantes obtenues, ainsi que les deux souches parentales ont alors été cultivées en milieu CGM, sans aucune régulation pH, en utilisant du glucose (50 g.l<sup>-1</sup>) comme unique source de carbone. Les résultats de production de ces différentes cultures sont présentés dans le tableau 3.

**Tableau 3** : Comparaison des résultats de fermentations obtenus à pH non régulé avec les souches parentales et recombinantes de *C. acetobutylicum*.

Souches	Rendement par rapport au glucose (g.g <sup>-1</sup> )				
	Glucose consommé (g.l <sup>-1</sup> )	Isopropanol (g.l <sup>-1</sup> )	Solvants (g.l <sup>-1</sup> )	Isopropanol	Solvants
<i>824 Δcac15</i>	31.43 ± 2.74	0.00	10.1 ± 1.10	0.00	0.31 ± 0.01
<i>824 Δbuk</i>	11.45 ± 0.60	0.00	3.49 ± 0.14	0.00	0.31 ± 0.00
<i>824 Δcac15 pCLF942</i>	27.64 ± 0.34	2.05 ± 0.05	7.96 ± 0.40	0.074 ± 0.00	0.29 ± 0.01
<i>824 Δcac15 pCLF952</i>	21.00 ± 0.66	1.59 ± 0.03	6.59 ± 0.26	0.076 ± 0.00	0.31 ± 0.01
<i>824 Δbuk pCLF942</i>	16.04 ± 0.57	1.21 ± 0.09	5.46 ± 0.32	0.075 ± 0.00	0.34 ± 0.01
<i>824 Δbuk pCLF952</i>	26.40 ± 0.24	2.00 ± 0.04	8.95 ± 0.30	0.076 ± 0.00	0.34 ± 0.01

Tous les résultats sont des moyennes ± écarts type calculés à partir de triplicat

N'exprimant pas l'alcool déshydrogénase secondaire Sadh, les deux souches parentales *824 Δcac15* et *824 Δbuk* sont incapables de produire de l'isopropanol. Bien que les rendements massiques de production de solvants soient identiques pour ces deux souches, la souche *824 Δbuk* consomme significativement moins de glucose que la souche *824 Δcac15*. La souche *824 Δbuk* produit, pour compenser la perte de la voie du butyrate, une quantité d'acétate plus importante que la souche *824 Δcac15* et dont une grande partie n'est pas reconsumée. Ceci entraîne, en culture fiole à pH non régulée, une diminution du pH du milieu à des valeurs inhibitrices (inférieures à pH 4,0) pour la croissance. Cette hypothèse est confirmée par le fait que l'ajout de carbonate de calcium (jouant le rôle de

tampon pH) au milieu de culture permet d'augmenter considérablement la quantité de glucose consommé par cette souche ainsi que la production de solvants (tableau 4).

**Tableau 4** : Comparaison des résultats de fermentations obtenus à pH non régulé de la souche *824 Δbuk* avec ou sans ajout de carbonate de calcium.

Souches	Rendement par rapport au glucose (g.g <sup>-1</sup> )		
	Glucose consommé (g.l <sup>-1</sup> )	Solvants (g.l <sup>-1</sup> )	Solvants
<i>824 Δbuk</i>	11.5	3.5	0.31
<i>824 Δbuk + CaCO3</i>	27.3	9.0	0.33

Les quatre souches recombinantes exprimant la voie de l'isopropanol à partir des plasmides *pCLF942* et *pCLF952* produisent, quant à elles, de l'isopropanol à des concentrations variant de 1,2 g.l<sup>-1</sup> à 2,2 g.l<sup>-1</sup>, validant ainsi la fonctionnalité de l'enzyme Sadh chez *C. acetobutylicum*. Les consommations plus importantes de glucose des souches *824 Δbuk pCLF942/952* par rapport à la souche parentale sont en relation directe avec leur capacité accrue à reconsommer l'acide acétique via l'expression de la voie de l'isopropanol. Ces résultats semblent indiquer que la surexpression des gènes *ctfAB* et *adc* permet effectivement d'augmenter le flux dans la voie de l'acétone. Bien que les rendements en isopropanol à partir de glucose soient similaires entre les souches *824 Δbuk pCLF942/952* et *824 Δcac15 pCLF942/952* (0,075 g.g<sup>-1</sup>), le rendement en solvants totaux est plus élevé pour les souches *824 Δbuk pCLF942/952* (0,34 g.g<sup>-1</sup> contre 0,31 g.g<sup>-1</sup>). Ces résultats sont en accords avec ceux de Harris et al (2000), qui observent une plus forte production de solvants dans une souche PJ4BK inactivée pour la butyrate kinase.

#### IV.4. Fermentations régulées à pH 5,0 des souches 824 $\Delta$ buk, 824 $\Delta$ buk pCLF942 et 824 $\Delta$ buk pCLF952

##### IV.4.1. Cinétique de fermentations

De manière à évaluer les capacités de production d'un mélange IBE des différentes souches 824  $\Delta$ buk pCLF942 et 824  $\Delta$ buk pCLF952, des fermentations régulées à pH 5,0, en milieu CGM avec 80 g.l<sup>-1</sup> de glucose, ont été conduites. Ce pH de 5,0 a été déterminé précédemment comme étant optimal pour la production de solvants par *C. acetobutylicum* (Harris et al., 2000). Un suivi des cinétiques de fermentation a été effectué et comparé avec les résultats obtenus avec la souche parentale 824  $\Delta$ buk. Les résultats de ces expériences, présentés dans le tableau 5, montrent que les souches exprimant les plasmides pCLF942 et pCLF952 produisent respectivement 4,22 g.l<sup>-1</sup> et 4,75g.l<sup>-1</sup> d'isopropanol. La souche parentale, ne produisant pas d'isopropanol, accumule 2,82 g.l<sup>-1</sup> d'acétate et 3,91 g.l<sup>-1</sup> d'acétone. Les souches recombinantes 824  $\Delta$ buk pCLF942 et 824  $\Delta$ buk pCLF952 montrent une meilleure capacité à prendre en charge l'acétate, avec des concentrations résiduelles de 1,79 g.l<sup>-1</sup> et 1,88 g.l<sup>-1</sup> respectivement. Néanmoins, la concentration finale en acétate n'étant pas nulle, une optimisation des paramètres de fermentation et/ou de la voie est possible afin de maximiser la production d'isopropanol. La concentration finale en acétone dans le milieu de fermentation est faible (environ 0,3 g.l<sup>-1</sup>) pour ces deux souches, ce qui laisse penser que l'activité Sadh n'est pas limitante.

**Tableau 5** : Concentration finale en métabolites lors de cultures régulée à pH 5,0 des souches *C. acetobutylicum* 824  $\Delta$ buk pCLF942, *C. acetobutylicum* 824 $\Delta$ buk pCLF952 et de la souche parentale *C. acetobutylicum* 824  $\Delta$ buk.

**A. Fermentations des souches recombinantes et de la souche contrôle de *C. acetobutylicum* à pH 5,0**

Souches	Glucose consommé et concentration des produits (g.l <sup>-1</sup> )								Rendement en solvant totaux (g.g <sup>-1</sup> )	Bilan carbone* (%)	
	<i>C. acetobutylicum</i>	Glucose consommé	Acétate	Butyrate	Acétone	Ethanol	Isopropanol	Butanol			Acétoïne
824 $\Delta$ buk		71.87 ± 0.19	2.82 ± 0.17	1.14 ± 0.1	3.91 ± 0.21	1.54 ± 0.06	0 ± 0.00	14.74 ± 0.06	1.88 ± 0.06	0.28	96
824 $\Delta$ buk pCLF942		61.1 ± 0.18	1.79 ± 0.21	1.3 ± 0.08	0.33 ± 0.01	0.46 ± 0.06	4.22 ± 0.15	13.8 ± 0.06	0.19 ± 0.01	0.31	97
824 $\Delta$ buk pCLF952		63.47 ± 0.18	1.88 ± 0.24	1.03 ± 0.12	0.36 ± 0.00	1.01 ± 0.01	4.75 ± 0.16	14.63 ± 0.16	0.12 ± 0.01	0.33	101

**B. Analyse stœchiométrique de la fermentation de *C. acetobutylicum* à pH 5,0**

Souches	Rendement par rapport au glucose (mol.mol <sup>-1</sup> )							NAD(P)H produit à partir	
	<i>C. acetobutylicum</i>	Acétate	Butyrate	Acétone	Ethanol	Isopropanol	Butanol	de ferrédoxine**	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> **
824 $\Delta$ buk		0.118	0.032	0.169	0.084	0	0.498	0.52	0.577
824 $\Delta$ buk pCLF942		0.088	0.044	0.017	0.029	0.207	0.549	0.79	0.485
824 $\Delta$ buk pCLF952		0.089	0.033	0.018	0.062	0.224	0.560	0.83	0.480

Tous les résultats sont des moyennes, ± écarts types à partir de triplicatas

\* Le bilan carbone est calculé à partir de la production de la biomasse et des métabolites mise en rapport avec la consommation de glucose.

\*\* H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> et NAD(P)H produit à partir de ferrédoxine sont calculés sur la base des équations stœchiométriques du métabolisme central de *C. acetobutylicum*. Le NAD(P)H produit à partir de ferrédoxine représente la différence entre le NAD(P)H consommé et le NAD(P)H formé durant la glycolyse et est calculé à l'aide de l'équation suivante :  $M_{\text{NAD(P)H from Fd}} = M_{\text{Ethanol}} + 2M_{\text{Butanol}} - M_{\text{Acétate}} - 2M_{\text{Acétone}} - M_{\text{Isopropanol}} - 2M_{\text{Acétoïne}}$ .  
M: moles.l<sup>-1</sup>.

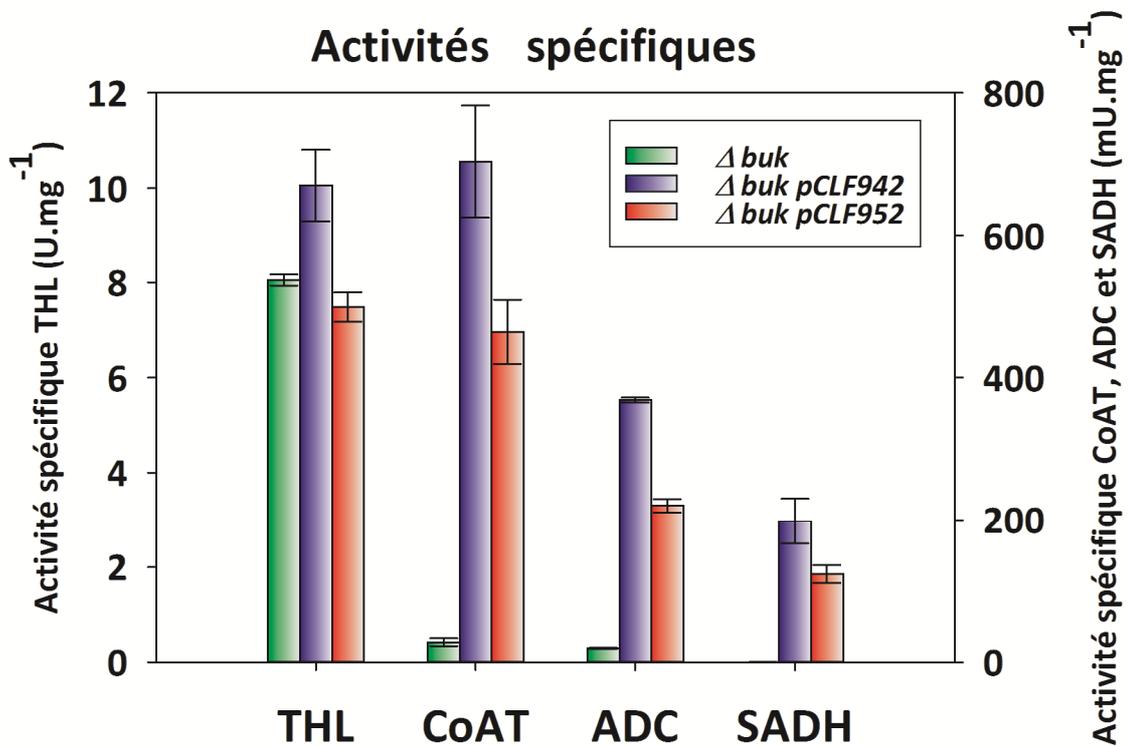
La distribution du flux d'électrons a été étudiée et comparée pour les trois souches, à partir des équations stœchiométriques composant le métabolisme central de *C. acetobutylicum*. Les quantités d'H<sub>2</sub>, de CO<sub>2</sub> et de NAD(P)H produits à partir de ferrédoxine ont été déterminées (tableau 5B). Ces données permettent de mettre en évidence que les souches exprimant le gène *sadh* utilisent une plus grande partie de la ferrédoxine réduite pour la production de NAD(P)H au détriment de la production d'H<sub>2</sub>. Ce changement du flux d'électrons, fournit à la voie de l'isopropanol la quantité de nucléotides réduits nécessaire à la réduction de l'acétone en isopropanol. Ces résultats suggèrent que la quantité de NAD(P)H produits par la glycolyse n'est pas suffisante, dans ce cas, pour soutenir la production des alcools, ce qui nécessite alors l'action de la ferrédoxine-NAD(P) réductase pour la production de NAD(P)H additionnels.

La souche *824 Δbuk pCLF952*, surexprimant l'opéron isopropanol sous la dépendance du promoteur *thl*, produit plus d'isopropanol, d'éthanol et de butanol que la souche surexprimant l'opéron isopropanol sous la dépendance du promoteur *ptb*. Le promoteur de la phosphotransbutyrylase étant plus fort que le promoteur de la thiolase (Girbal et al., 2003), il était attendu que celui-ci permettrait une meilleure expression des gènes de la voie de l'isopropanol, accompagnée d'une production d'alcools plus importante. Afin de déterminer l'origine de cette différence, les niveaux d'activités des enzymes de la voie de l'isopropanol ont été mesurés *in-vitro* et comparés pour ces trois différentes souches.

#### IV.4.2. Activités enzymatiques

Les activités spécifiques *in-vitro* de la thiolase, la CoA transférase, l'acétoacétate décarboxylase et l'alcool déshydrogénase secondaire ont donc été mesurées à partir d'extraits cellulaires récoltés pendant la phase exponentielle de croissance (figure 23). Le gène de la thiolase n'étant pas porté par les plasmides *pCLF942/952*, son niveau d'expression est attendu identique entre les trois souches. Effectivement, l'activité spécifique de la thiolase s'avère élevée et similaire (aux erreurs expérimentales près) pour les trois cultures. Comme attendu, les niveaux d'activité de la CoA transférase et de l'acétoacétate décarboxylase sont très faibles pour la souche *824 Δbuk* et correspondent au

fait que ces deux enzymes ne sont exprimées qu'en fin de phase acidogène (Hüsemann et Papoutsakis, 1989).



**Figure 23** : Activités spécifiques mesurées à partir d'extraits cellulaires collectés en phase exponentielle pour les souches *824Δ buk pCLF942*, *824 Δbuk pCLF952* et *824 Δbuk*.

Aucune activité Sadh n'est détectée dans cette souche ce qui est en accord avec l'absence d'enzyme capable de réduire l'acétone en isopropanol chez *C. acetobutylicum*. L'expression de *ctfAB* et *adc* à partir des plasmides *pCLF942* (*pPtb*) et *pCLF952* (*pThl*) multiplie l'activité spécifique de la CoA transférase d'un facteur 19 et 11 respectivement et celle de l'acétoacétate décarboxylase d'un facteur 25 et 17 respectivement. L'activité Sadh mesurée est cohérente avec les activités spécifiques rapportées pour cette enzyme (Ismail et al., 1993) et est 1,6 fois plus élevée pour la souche *824 Δbuk pCLF942* comparé à la souche *824 Δbuk pCLF952*. Ces résultats, en accord avec les forces relatives des promoteurs *pThl* et *pPtb* (Girbal et al., 2003), ne permettent cependant pas d'expliquer pourquoi la production d'isopropanol est plus importante pour la souche *824 Δbuk pCLF952*. Si les niveaux d'activités des enzymes de la voie de l'isopropanol ne sont pas à l'origine de ces différences,

il doit exister un mécanisme de régulation, pour l'instant non déterminé, impactant la production de solvants.

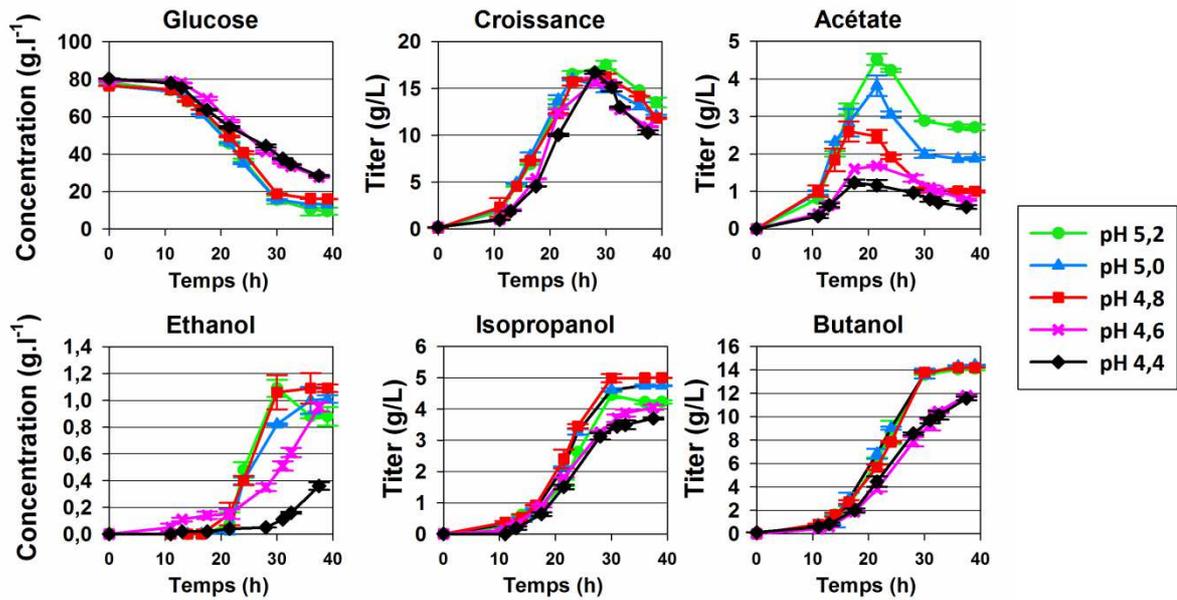
#### IV.5. Optimisation du pH de fermentation de la souche 824 *Δbuk pCLF952* pour la production d'un mélange IBE à haut titre et rendement

Afin d'évaluer l'impact du pH de la culture sur les capacités de production d'un mélange IBE par la souche 824 *Δbuk pCLF952*, des fermentations ont été effectuées en milieu CGM glucose (80 g.l<sup>-1</sup>) aux pHs suivants : 5,2 ; 5,0 ; 4,8 ; 4,6 et 4,4. Les concentrations en glucose et en métabolites extracellulaires ont été suivies et mesurés tout au long de la fermentation. Les concentrations finales en isopropanol et en solvants sont présentés dans le tableau 6.

**Tableau 6** : Concentrations finales en solvants lors de fermentations de la souche 824 *Δbuk pCLF952*, réglée à 5 différents pH

Concentrations finales (g.l <sup>-1</sup> )				
	Isopropanol	Ethanol	Butanol	Solvants
<b>pH 5.2</b>	4.23 ± 0.05	0.88 ± 0.06	14.1 ± 0.14	19.53 ± 0.25
<b>pH 5.0</b>	4.75 ± 0.01	1.01 ± 0.03	14.4 ± 0.06	20.52 ± 0.1
<b>pH 4.8</b>	5.00 ± 0.06	1.09 ± 0.03	14.2 ± 0.01	20.68 ± 0.1
<b>pH 4.6</b>	3.40 ± 0.07	0.95 ± 0.04	11.8 ± 0.09	17.57 ± 0.2
<b>pH 4.4</b>	2.90 ± 0.03	0.36 ± 0.03	11.5 ± 0.15	16.06 ± 0.21

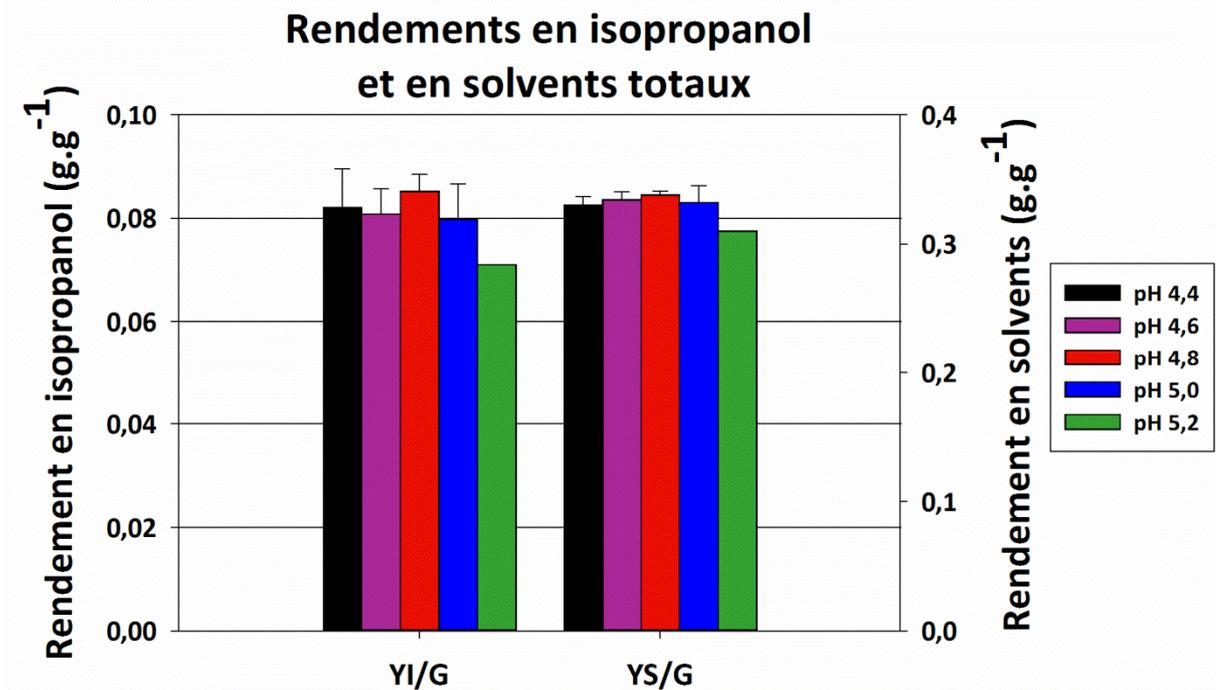
Comme l'indique les résultats, la production de solvants augmente lorsque le pH de la culture diminue de 5,2 à 4,8 avec un maximum atteint à pH 4,8 puis diminue à nouveau quand le pH descend en dessous de cette valeur. La quantité de glucose consommé diminue légèrement avec le pH tandis que les cinétiques de croissance sont identiques dans les cinq conditions (figure 24).



**Figure 24** : Evolution de la concentration en glucose, acétate, éthanol, isopropanol et butanol, ainsi que celle de la densité optique, lors de fermentation de la souche *824 Δbuk pCLF952* réalisées à 5 pHs différents.

Les rendements massiques en isopropanol et en solvants totaux à partir de glucose sont similaires pour les fermentations réalisées à un pH compris entre 4,4 et 5,0, avec un maximum à pH 4,8, puis diminuent pour des pH supérieurs à 5,0 (figure 25). L'ensemble des résultats obtenus indiquent que le pH 4,8 est la valeur optimale pour la production d'IBE ; la souche *824 Δbuk pCLF952* atteint une production en solvants de 21 g.l<sup>-1</sup> avec un rendement de 0,34 g.g<sup>-1</sup> de glucose et une productivité de 0,8 g.l<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. L'ensemble de ces résultats place cette souche de *C. acetobutylicum* comme l'une des plus performantes pour la production de solvants disponible à ce jour. De plus, la concentration des coproduits de fermentation indésirables (acétate, butyrate et acétoïne) est ici inférieure à 2 g.l<sup>-1</sup>.

Lee et al (2012) ont récemment développé une approche très similaire en exprimant les gènes *ctfA*, *ctfB*, *adc* et *sadh*, sous la dépendance du promoteur *adc*, dans une souche de *C. acetobutylicum* PJ4BK (inactivée pour la butyrate kinase) et ont montré, pour des fermentations réalisées en milieu CGM glucose 80 g.l<sup>-1</sup> à pH 5,0, une concentration finale en IBE (20,4 g.l<sup>-1</sup>), un rendement par rapport au glucose (0,30 g.g<sup>-1</sup>) et une productivité (0,6 g.l<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) légèrement inférieurs à ceux obtenus ici.



**Figure 25** : Rendements en isopropanol et en solvants mesurés lors de fermentations de la souche 824  $\Delta buk$  *pCLF952* réalisées à 5 pHs différents.

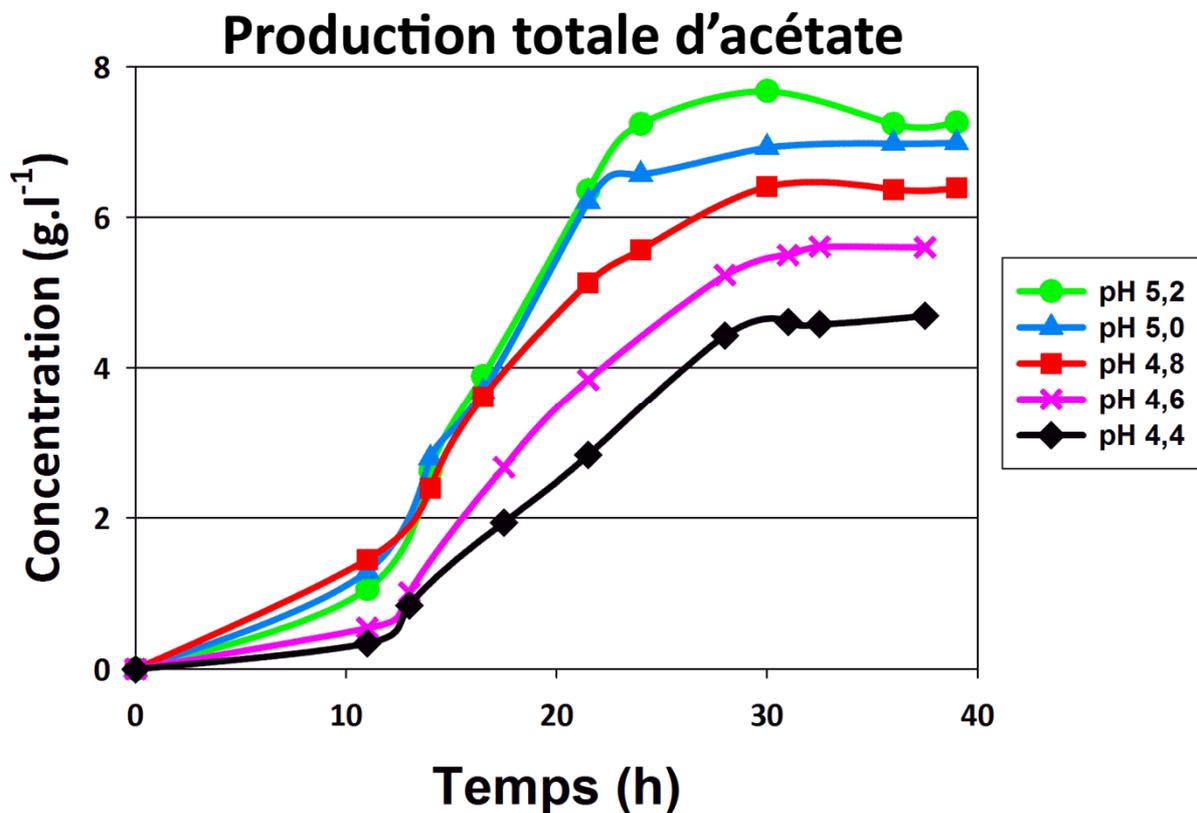
#### IV.6. Impact du pH de fermentation sur la consommation d'acétate et la production d'isopropanol

D'après ces résultats, la production d'isopropanol semble être sensible au changement du pH du milieu de fermentation. Ce constat est à mettre en relation avec les niveaux de production et de reconsommation d'acétate à ces mêmes pHs. En effet, il est clair d'après la figure 24 que plus le pH de la culture est bas, plus la concentration en acétate mesurée dans le milieu est basse et ce, tout au long de la culture. Cette observation est en accord avec une plus forte expression des gènes *pta* et *ack* à des pHs élevés (Boynton et al., 1996; Hartmanis and Gatenbeck, 1984). L'augmentation de la concentration en acétate extracellulaire concomitante à l'augmentation du pH de culture peut résulter : (i) d'une plus forte production d'acétate, (ii) d'une moins bonne reconsommation d'acétate, ou (iii) d'une combinaison de ces deux paramètres. L'acétate étant un intermédiaire de la voie de l'isopropanol, l'hypothèse (i) impliquerait, pour une même capacité de reconsommation de l'acétate, une plus grande production d'isopropanol à pH élevé. Or nous avons

précédemment vu que la production maximale est observée à pH 4,8 et non à pH 5,2. A l'inverse, l'hypothèse (ii) supposerait, à production d'acétate égale, une plus forte production d'isopropanol à pH bas, soit un maximum à pH 4,4. Encore une fois, ceci n'est pas ce qui est observé expérimentalement. Il semble donc que le niveau de production d'isopropanol soit une combinaison de la capacité de la souche à produire de l'acétate, à un pH donné, et de sa capacité à le reconsommer, à ce même pH. En se basant sur la stœchiométrie des réactions qui composent la voie de l'isopropanol, il est possible de calculer la production totale d'acétate au long de la fermentation. En effet, une mole d'acétate étant convertie en une mole d'acétone, elle-même convertie en une mole d'isopropanol, la production totale d'acétate (en mol.l<sup>-1</sup>) suit la relation suivante :

$$[\text{Acétate}]_{\text{Totale}} = [\text{Acétate}]_{\text{mesurée}} + [\text{Acétone}]_{\text{mesurée}} + [\text{Isopropanol}]_{\text{mesurée}}$$

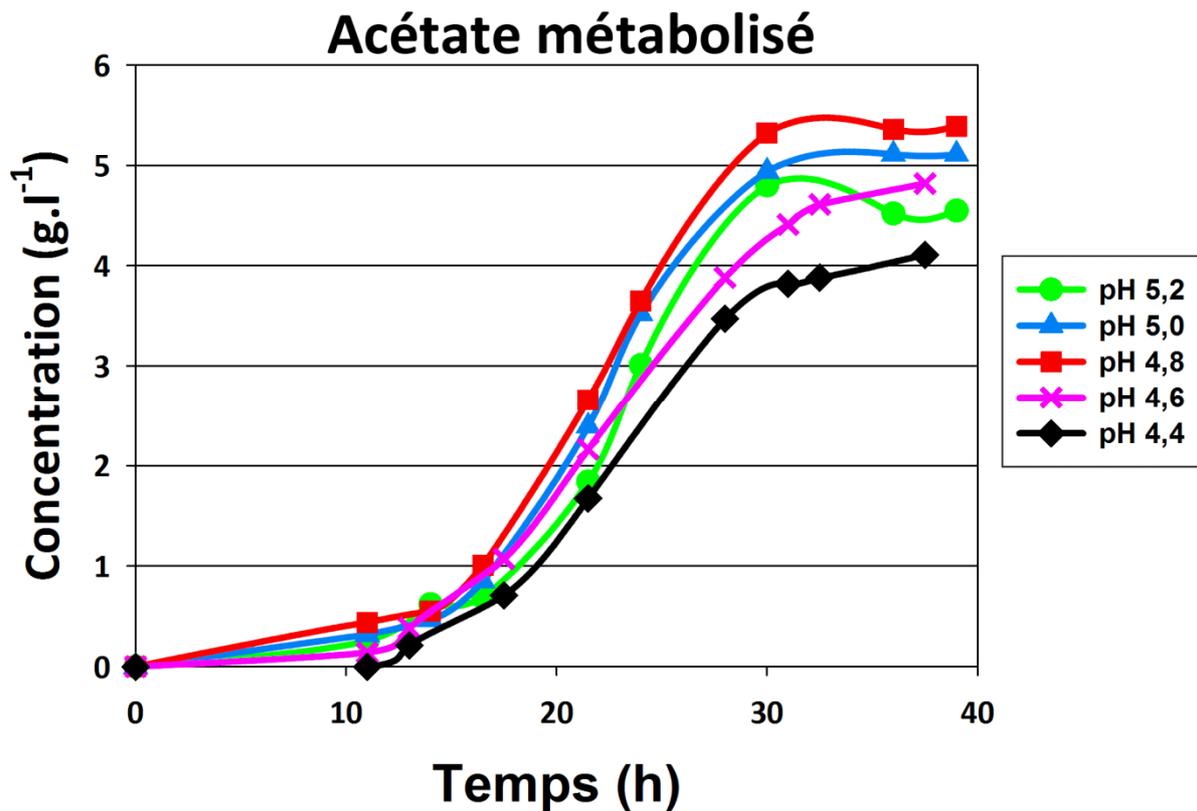
Les profils de production totale d'acide acétique pour les 5 pHs sont ainsi déterminés (figure 26).



**Figure 26 :** Production totale d'acétate lors de fermentations de la souche 824 *Δbuk pCLF952* réalisées à 5 pHs différents.

Comme attendu, la production globale d'acétate augmente lorsque le pH de la culture augmente. On peut ainsi déterminer la quantité d'acétate métabolisée au cours de la fermentation pour les différentes valeurs de pH, grâce à la relation suivante (figure 27):

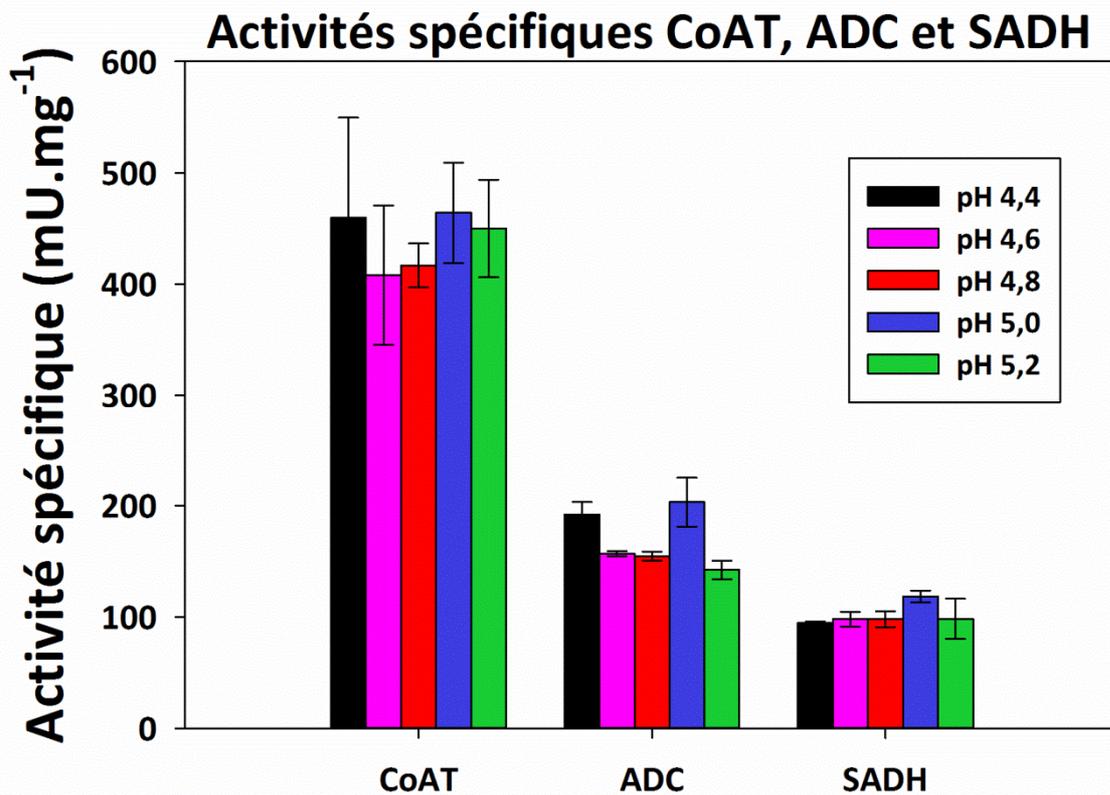
$$[\text{Acétate}]_{\text{métabolisée}} = [\text{Acétate}]_{\text{Totale}} - [\text{Acétate}]_{\text{mesurée}}$$



**Figure 27** : Quantité d'acétate métabolisée lors de fermentations de la souche 824  $\Delta buk$  pCLF952 réalisées à 5 pHs différents.

La quantité d'acétate reconsumé par la souche pour la production de solvants, n'augmente pas de manière linéaire avec la baisse du pH de culture, comme le suggérait l'hypothèse (ii). Au contraire, elle est maximale à pH 4,8 puis par ordre décroissant à pH 5,0; 4,6; 5,2 et 4,4. Il semble alors qu'un paramètre supplémentaire entre en jeu et fasse le lien entre la production d'acétate, le pH de la culture et la capacité de la souche à métaboliser cet acétate préalablement produit.

La CoA transférase, l'acétoacétate décarboxylase et l'alcool déshydrogénase secondaire étant toutes les trois impliquées dans la voie de l'isopropanol, des variations de leurs activités en fonction du pH pourraient expliquer ces différences. Afin de tester cette hypothèse, les activités CoAT, Adc et Sadh ont été mesurées *in-vitro* pour chaque fermentation à partir d'extraits cellulaires récoltés en milieu de phase exponentielle de croissance.



**Figure 28** : Activités spécifiques mesurées à partir d'extraits cellulaires collectés en phase exponentielle pour la souche *824Δ buk pCLF952* cultivée à différents pH.

Les résultats obtenus, présentés dans la figure 28, montrent que les niveaux des activités enzymatiques spécifiques sont très similaires, pour les trois enzymes, aux 5 pHs considérés et les variations observées, principalement imputables aux erreurs expérimentales, ne permettent en aucun cas de conclure à un effet du pH sur l'expression des gènes de l'opéron isopropanol ou sur la stabilité des enzymes.

Wiesenborn et al (1989) ont purifié la CoA transférase de *C. acetobutylicum* et déterminé ses paramètres cinétiques. Ils montrent ainsi que le  $K_M$  de la CoA transférase pour l'acétate est très élevé (1200 mM) et bien supérieur à la concentration intracellulaire en acétate qui ne dépasse pas les 300 mM. Ils suggèrent alors que cette enzyme doit être extrêmement sensible, *in-vivo*, aux variations de la concentration en acétate intracellulaire. Afin d'étudier cette possibilité, les flux *in-vivo* et *in-vitro* à travers la CoAT ainsi que la concentration en acétate intracellulaire ont été calculés pour chacune des fermentations, en considérant le point de la culture où la concentration en acétate extracellulaire est la plus élevée (entre 18 heures et 22 heures de culture, voir figure 24). La concentration en acétate intracellulaire a été estimée à l'aide du modèle proposé par Jarzębski et al (1992) et en se basant sur les valeurs de pH intracellulaire rapportées par Gottwald and Gottschalk (1985) et Huang et al(1985). Le flux *in-vivo* passant par la CoA transférase (en  $\text{mmol.g}^{-1}_{\text{biomasse}}.\text{h}^{-1}$ ) a été déterminé à partir des vitesses de production d'acétone et d'isopropanol, à l'instant considéré, divisées par la concentration en biomasse à ce même instant. En parallèle, le flux *in-vitro* a été calculé à l'aide de la cinétique Michaelienne de cette enzyme ( $v = \frac{V_M[S]}{K_M+[S]}$ , Wiesenborn et al., 1989) et de la concentration en acétate intracellulaire préalablement déterminée (figure 29).

Cette analyse permet de mettre en évidence à la fois la forte influence du pH sur la concentration en acétate intracellulaire et aussi la corrélation entre la concentration en acétate intracellulaire et les flux *in-vivo* et *in-vitro* à travers la CoAT. Lorsque le pH de la culture diminue, le pH intracellulaire baisse également mais dans une proportion beaucoup moins importante. Ceci a pour effet d'engendrer une augmentation du  $\Delta\text{pH}$  à travers la membrane et provoque un afflux d'acétate dans la cellule. Cette entrée d'acétate dans la cellule est d'autant plus importante que la concentration d'acétate dans le milieu de culture est élevée. Le flux à travers la CoAT est donc influencé par deux variables qui évoluent de manière opposée en fonction du pH : un  $\Delta\text{pH}$  qui augmente lorsque le pH diminue et une production d'acétate qui augmente lorsque le pH augmente. Il semblerait alors que la combinaison la plus favorable de ces deux paramètres soit expérimentalement obtenue pour un pH du milieu régulé à une valeur de 4,8.

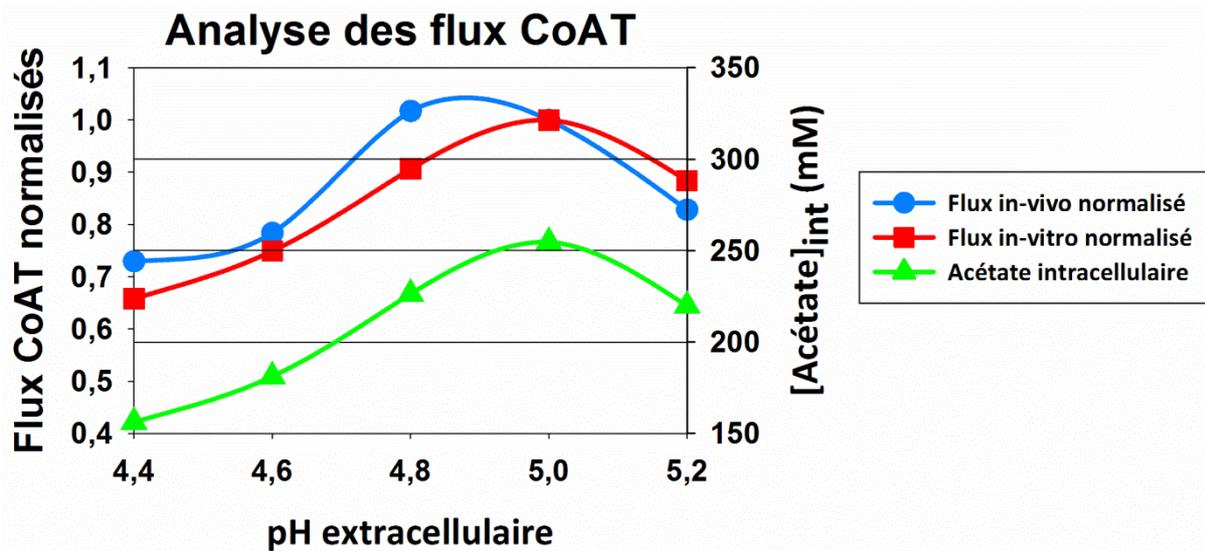


Figure 29 : Evolution en fonction du pH de culture de la concentration en acétate intracellulaire et des *flux in-vivo* et *in-vitro* à travers la CoA transférase

#### IV.7. Utilisation de la CoA transférase d'*E. coli* pour la production d'isopropanol chez *C. acetobutylicum*

Comme le montrent les résultats présentés dans le paragraphe précédent, il est fort probable que la réaction catalysée par la CoA transférase soit le goulot d'étranglement de la voie de l'isopropanol. Si l'efficacité catalytique de l'enzyme à proprement parler n'est pas à remettre en cause, c'est précisément sa capacité à fixer l'acétate qui constitue l'étape limitante. Améliorer l'affinité de la CoA transférase pour l'acétate devrait permettre (i) d'augmenter le pH de la fermentation (et donc la production d'acétate) tout en maintenant une production d'isopropanol optimale et (ii) d'atteindre des concentrations finale en acétate proche de 0.

Il serait possible d'envisager une stratégie d'ingénierie enzymatique afin d'améliorer l'affinité pour l'acétate de la CoA transférase de *C. acetobutylicum*, néanmoins le manque d'information disponible sur la structure de cette enzyme limite la possibilité d'utiliser une approche de type rationnelle. D'un autre côté, la nature même de l'enzyme et de la réaction qu'elle catalyse n'est pas compatible avec la mise en place d'un protocole de criblage à haut débit qu'exige une stratégie de mutagenèse aléatoire.

Il reste cependant la possibilité de remplacer la CoA transférase de *C. acetobutylicum* par une enzyme similaire possédant les caractéristiques recherchées. Parmi les organismes

possédant ce type d'enzyme, *E. coli* possède une CoA transférase encodée par les gènes *atoA* et *atoD* et qui est capable de catalyser la formation d'acétoacétate à partir d'acétoacétyl-CoA et d'acétate. La CoA transférase d'*E. coli* a été purifiée par Sramek and Frerman (1975) et ses caractéristiques ont été déterminées (Sramek and Frerman, 1977). Comme celle de *C. acetobutylicum*, la CoA transférase d'*E. coli* (AtoAD) est une enzyme hétérotétramérique d'un poids moléculaire de 97 kDa (93 kDa pour CtfAB) constitué de deux unités  $\alpha$  (AtoD) de 26 kDa (25 kDa pour CtfA) et de deux unités  $\beta$  (AtoA) de 23 kDa (23 kDa pour CtfB). D'un point de vue de leur structure primaire, les deux enzymes partagent près de 50% d'identité (figure 30).

ctfA-atoD.apr

		Section 1				
		(1) 1	10	20	30	49
atoD	(1)	MKT	RLMTLQDATG	FFRDGMTIMVGGFMGI	GTPSRLVEALLES	GVRDLT
ctfA ATCC 824	(1)	MNSKI	IRFENLRS	FFKDGMTIMIGGF	LNCGTPTKLID	FLVNLNIKNLTI
Consensus	(1)	M SKII	FFKDGMTIMIGGF	L	GTPSKLID LL	IK LTI
		Section 2				
		(50) 50	60	70	80	98
atoD	(50)	IANDTAFVDTGIG	PLIVNGRVRKVIASH	IGTNPETGRRMISG	EMDVV	LV
ctfA ATCC 824	(50)	ISNDTCYPNTGIG	KLISNNQVKKLIASH	IGSNPDTGKKL	FNNE	LEVELS
Consensus	(50)	IANDT F	TGIG LI N	VKLIASHIGSNPDTGKKL	ELDV	L
		Section 3				
		(99) 99	110	120	130	147
atoD	(99)	PQGTLE	QIRCGGAGLGGFL	TPGVGTVV	EEGKQTLTLDGKT	WLLERPL
ctfA ATCC 824	(99)	PQGTLE	VERIRAGGSGLGGV	LTKTGLGLTLE	EKGKKKIS	INGTEYLLELPL
Consensus	(99)	PQGTLE	IR GGAGLGG LT	TGLGLTLE	GK ISI G	WLLERPL
		Section 4				
		(148) 148	160	170	180	196
atoD	(148)	RADIALIRAHRC	DTLGNLTYQLSARNFNP	LIALAADITL	VEPDEL	VETG
ctfA ATCC 824	(148)	TADV	ALIKGSIVDEAGNTFY	KGTTEKNFNPM	MAMAAKTV	IVEAENLV
Consensus	(148)	ADLALIKA	D GN Y S	KNFNP IALAA	IVE D	LV
		Section 5				
		(197) 197	210	220		
atoD	(197)	ELQPDHIVTPGAV	IDHII	IVSQESK		
ctfA ATCC 824	(197)	KLEK	KAMTPGV	LINYIV	KEPA--	
Consensus	(197)	L D	MTPG LI	HII		

ctfB-atoA.apr

		Section 1				
	(1)	1	10	20	30	49
atoA	(1)	-----MDAKQR	IARRVAQEL	RDGDI	VNLGIGLPTMV	ANYLPEGIHITLQ
ctfB ATCC 824	(1)	MINDKNLAK	EIAKRVAREL	KNGQL	VNLGVGLPTMV	ADYIPEKNFKITFQ
Consensus	(1)	AK	IAKRVA	ELK G	IVNLGIGLPTMVA	YIP IT Q
		Section 2				
	(50)	50	60	70	80	98
atoA	(45)	SENGFLGLG	P---VTTAHPD	LVNAGG	QPCGVLP	GAAMFDSAMS
ctfB ATCC 824	(50)	SENGIVGMG	ASPKINEADK	DVVNAGG	DYTTVLP	DGTFFDSSV
Consensus	(50)	SENG LGLG	I A	DLVNAGG	VLP A	FDSAMS
FALIRG						
		Section 3				
	(99)	99	110	120	130	147
atoA	(91)	GHIDAC	VLGG	LQVDEE	ANLANWV	VPGKMW
ctfB ATCC 824	(99)	GHVDVT	VLGAL	LQVDEK	GNIANWV	VPGKML
Consensus	(99)	GHID	VLGAL	LQVDE	ANIANWV	VPGKML
GMGGAMD						
LVTSR						
KVVIAM						
		Section 4				
	(148)	148	160	170	180	196
atoA	(140)	EHC	AKDGS	AKILRR	CTMPLTA	QHAVHML
ctfB ATCC 824	(148)	RHTNK	-GQPK	LKCK	CTLPLTAKS	QANLIV
Consensus	(148)	H K G	KILK	CKTLP	LTA	LIV
TELA						
VFRF						
IDGK						
MWLT						
TEIAD						
		Section 5				
	(197)	197	210	224		
atoA	(189)	GCD	LATV	RAKTE	ARFEVA	ADLNTQRGDL
ctfB ATCC 824	(196)	NTT	IDEI	RSLEA	ADLLIS	NEIRPMAV--
Consensus	(197)	I	IRA	T A	IA	DL

**Figure 30** : Alignement des séquences protéiques de la CoA transférase de *C. acetobutylicum* et de la CoA transférase d'*E. coli*.

Toutefois, la caractérisation de l'enzyme d'*E. coli* purifiée a montré qu'elle possède un Km pour l'acétate de 53,1 mM, suggérant une plus forte affinité pour ce substrat par rapport à l'enzyme de *C. acetobutylicum* (Km 22,5 fois plus élevé). Dans notre cas, cette différence notable s'avère particulièrement intéressante puisque cela signifie qu'AtoAD est potentiellement capable de maintenir un flux catalytique optimal à des concentrations en acétate intracellulaire beaucoup plus basses que CtfAB. Le remplacement de CtfAB par AtoAD au sein de la voie de l'isopropanol se présente donc comme une solution possible pour optimiser le flux de carbone vers la production d'isopropanol.

#### IV.7.1. Utilisation des gènes *atoAD* natif d'*E. coli*

##### IV.7.1.1. Construction du vecteur d'expression

Des travaux précédemment réalisés par Gu et al (2009) tendent à montrer que l'expression hétérologue de gènes issus d'*E. coli* chez *C. acetobutylicum* est envisageable, même si le pourcentage GC diffère significativement entre ces deux organismes. En effet, les auteurs ont montré que l'expression du gène *talA* d'*E. coli* chez *C. acetobutylicum* permet une augmentation significative du niveau d'activité transaldolase et de la consommation du xylose.

Une stratégie de clonage a donc été mise au point afin de remplacer les gènes *ctfAB* par les gènes *atoAD* d'*E. coli* sur le vecteur *pCLF952*. De plus, le gène *thl* codant pour la thiolase de *C. acetobutylicum* a été ajouté en amont du gène *atoD*. Même si rien n'indique que l'activité thiolase soit limitante, sa surexpression pourrait permettre de tirer un peu plus le flux de carbone vers la production des alcools en C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> (isopropanol et butanol) et ainsi augmenter leurs concentrations finales.

##### IV.7.1.2. Expression du vecteur *pCLF952-thl-atoAD* chez *E. coli*

Le vecteur d'expression *pCLF952-thl-atoAD* ainsi construit, a dans un premier temps été introduit chez *E. coli* afin de déterminer la fonctionnalité de l'ensemble de la voie. En effet, même si *E. coli* possède sur son génome des gènes codant pour une thiolase (*atoB*) et pour une CoA transférase (*atoAD*), ceux-ci ne sont pas exprimés en condition standard de culture (milieu LB glucose aérobie). Ainsi, une production d'isopropanol à partir de glucose par *E. coli* ne sera observée qu'à l'unique condition que l'ensemble des gènes portés par le plasmide soient fonctionnels et correctement exprimés.

Des cultures comparées des souches d'*E. coli* *TOP10 pCLF952-thl* (exprimant *ctfAB*) et *TOP10 pCLF952-thl-atoAD* ont donc été effectuées en condition aérobie en milieu LB contenant 20 g.l<sup>-1</sup> de glucose (tableau 7).

**Tableau 7** : Cultures des souches *E. coli* *TOP10 pCLF952-thl* et *TOP10 pCLF952-thl-atoAD* en milieu LB glucose.

Souches	Glucose consommé et concentration des produits (g.g <sup>-1</sup> )					Rendement en solvants totaux (g.g <sup>-1</sup> )
	Glucose consommé	Acétate	Acétone	Isopropanol	Solvants	
<i>TOP10 pCLF952-thl</i>	21,78	0,41	0,82	3,12	3,94	0,18
<i>TOP10 pCLF952-thl-atoAD</i>	20,60	0,00	0,80	3,27	4,07	0,20

Les résultats de ces cultures indiquent que le nouvel opéron synthétique de la voie de l'isopropanol exprimant les gènes *atoAD* permet une bonne production d'isopropanol chez *E. coli*. La capacité de la souche *TOP10 pCLF952-thl-atoAD* à produire des solvants est même légèrement supérieure à celle de la souche *TOP10 pCLF952-thl* avec un rendement en solvant totaux de 0,20 g.g<sup>-1</sup> contre 0,18 g.g<sup>-1</sup>. Les productions d'isopropanol sont toutefois équivalentes entre les deux souches avec une concentration finale d'environ 3,3 g.l<sup>-1</sup>. La différence de rendement constatée vient d'une meilleure reconsommation de l'acétate produit par la souche utilisant l'enzyme AtoAD (concentration final nulle) par rapport à la souche utilisant l'enzyme CtfAB (concentration finale de 0,4 g.l<sup>-1</sup>). Cette observation, en parfaite adéquation avec les propriétés cinétiques connues de ces deux enzymes, renforce l'idée qu'AtoAD est capable de maintenir une activité enzymatique optimale à des concentrations en acétate plus faibles que CTFAB. Il est à noter cependant que la présence de plusieurs transporteurs actifs de l'acétate chez *E. coli* (une acétate perméase et un transporteur succinate-acétate) (Sá-Pessoa et al., 2013) peut permettre une augmentation de la concentration en acétate intracellulaire et un meilleur fonctionnement des CoA transférases. La présence de tels systèmes de transport de l'acétate chez *C. acetobutylicum* n'a, à ce jour, pas été décrit.

#### IV.7.1.3. Expression du vecteur *pCLF952-thl-atoAD* chez *C. acetobutylicum*

Le vecteur *pCLF952-thl-atoAD* a donc été introduit, dans un deuxième temps, dans la souche 824  $\Delta buk$  de *C. acetobutylicum* afin d'évaluer l'impact de l'expression des gènes *atoAD* sur la production d'un mélange IBE. Des cultures de la souche mutante ainsi obtenue ont été réalisées à pH non régulé, en fiole, dans le milieu MS. Le milieu MS, contenant initialement environ 2,2 g.l<sup>-1</sup> d'acétate, permet de valider la capacité de reconsommation de

l'acétate de la souche, notamment en début de culture où le pH est élevé (> 5,5) (Tableau 8). L'efficacité avec laquelle la souche va utiliser cet acétate exogène et le convertir en isopropanol est directement corrélée avec l'activité CoA transférase présente.

Les résultats montrent que l'expression de l'opéron isopropanol contenant les gènes *atoAD* natifs d'*E. coli* chez *C. acetobutylicum*, à partir du vecteur *pCLF952-thl-atoAD*, ne conduit pas à une production d'isopropanol aussi importante que lorsque l'opéron porte les gènes *ctfAB*.

**Tableau 8 :** Cultures des souches *824 Δbuk pCLF952* et *824 Δbuk pCLF952-thl-atoAD* en milieu CGM glucose.

Souches	Glucose consommé et concentration des produits (g.l <sup>-1</sup> )								Rendement par rapport au glucose (g.g <sup>-1</sup> )	
	Glucose consommé	Acétate	Lactate	Acétone	Isopropanol	Ethanol	Butanol	Solvant	Isopropanol	Solvant
<i>824Δbuk pCLF952</i>	26,80	0,47	2,97	0,15	3,38	0,83	5,80	10,16	0,08	0,33
<i>824Δbuk pCLF952-thl-atoAD</i>	41,37	2,09	1,00	0,53	1,96	1,70	8,60	12,79	0,02	0,28

En effet, très peu de l'acétate présent dans le milieu MS est consommé par la souche (0,1 g.l<sup>-1</sup>) et il en résulte une production d'isopropanol fortement diminuée (1,96 g.l<sup>-1</sup>). Au contraire, la souche portant les gènes *ctfAB* sur le vecteur *pCLF952* utilise presque l'intégralité de l'acétate présent dans le milieu (2,15 g.l<sup>-1</sup>) et produit près de 3,4 g.l<sup>-1</sup> d'isopropanol. Le rendement de production d'isopropanol est de 0,02 g.g<sup>-1</sup> pour la souche *824Δbuk pCLF952-thl-atoAD* contre 0,08 g.g<sup>-1</sup> pour la souche *824Δbuk pCLF952* et le rendement en solvants totaux diminue en conséquence. Il est à noter que la souche *824Δbuk pCLF952-thl-atoAD* possède toujours une copie chromosomique des gènes *ctfAB* et que leurs expressions lors de la phase acidogène est peut être seule responsable de la production d'isopropanol observée.

Afin de savoir si les gènes *atoAD* sont correctement exprimés et traduits chez *C. acetobutylicum*, des mesures d'activité enzymatique CoA transférase ont été réalisées à partir d'extraits cellulaires de la souche *824Δbuk pCLF952-thl-atoAD* récoltés en début de phase acidogène (avant que les gènes *ctfAB* chromosomiques ne soient exprimés). Ces

résultats sont ensuite comparés à ceux obtenus dans les mêmes conditions avec les souches *824Δbuk* et *824Δbuk pCLF952* (figure 31).

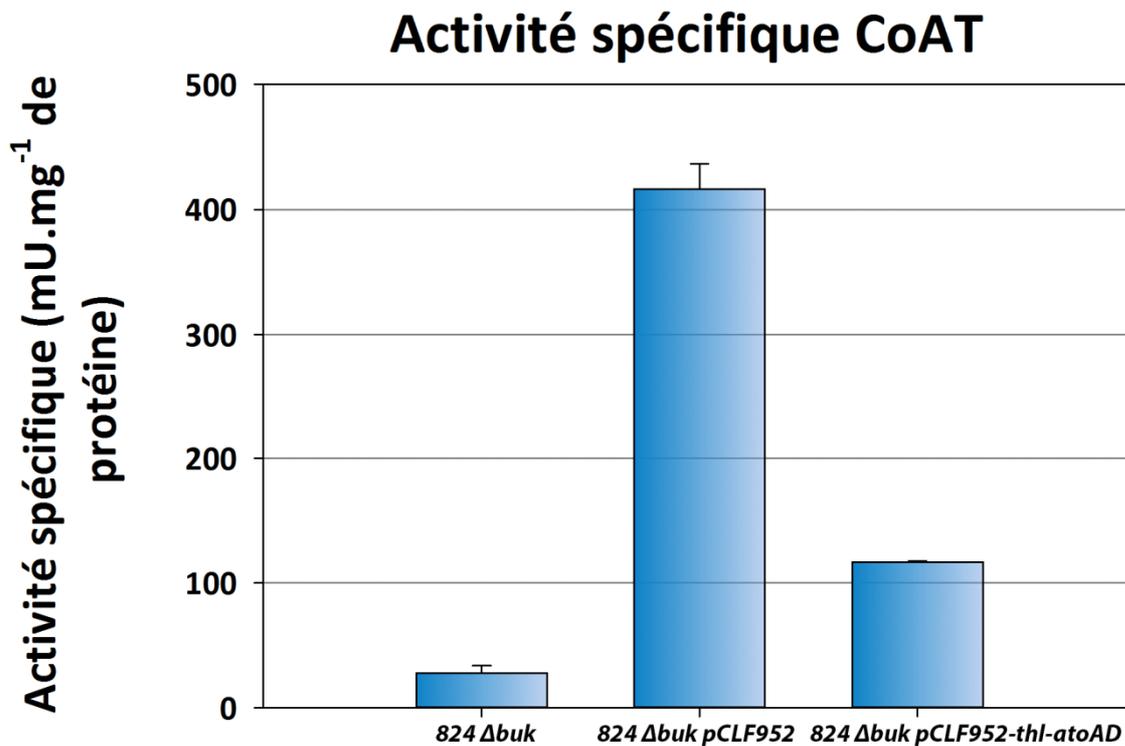


Figure 31 : Activités spécifiques CoA transférase mesurées dans les souches *824Δbuk*, *824Δbuk pCLF952* et *824Δbuk pCLF952-thl-atoAD*.

Comme l'indique les résultats, l'activité CoA transférase mesurée pour la souche *824Δbuk pCLF952-thl-atoAD* est presque 4 fois plus faible que celle mesurée dans la souche *824Δbuk pCLF952*. Néanmoins, cette activité est significativement plus élevée (116 mU.mg<sup>-1</sup>) que celle mesurée dans la souche *824Δbuk* (25 mU.mg<sup>-1</sup>). L'enzyme AtoAD native d'*E. coli* apparaît donc fonctionnelle chez *C. acetobutylicum* et augmente le niveau d'activité CoA transférase détectable par rapport à la souche sans plasmide. L'activité n'est néanmoins pas suffisante pour égaler celle obtenue en exprimant les gènes *ctfAB*. L'expression des gènes *atoAD* d'*E. coli* ne semble pas être optimale chez *C. acetobutylicum* et nécessite d'être améliorée afin d'envisager leur utilisation pour la production d'isopropanol.

#### IV.7.2. Design de gènes *atoAD* dont la séquence est optimisés pour une expression optimale chez *C. acetobutylicum*

##### IV.7.2.1. Design des gènes *atoAD* synthétiques

Aux vues des résultats de production d'isopropanol et des mesures d'activité enzymatique AtoAD effectuées chez *C. acetobutylicum*, il semble que l'expression des gènes *atoD* et *atoA* de *E. coli* chez *C. acetobutylicum* ne soit pas optimale. L'utilisation de gènes *atoD* et *atoA* synthétiques dont la séquence est optimisés pour une expression chez *C. acetobutylicum* se présente donc comme une solution potentielle à ce problème.

Les gènes *atoD* et *atoA* d'*E. coli* ont un pourcentage GC de 54%, ce qui est relativement élevé pour une expression chez *C. acetobutylicum* dont le % GC moyen est de 33%. Cette grande différence de pourcentage GC suggère qu'un grand nombre de codons constituant la séquence de ces deux gènes soient des codons rares chez *C. acetobutylicum*. La première étape de cette optimisation de gène est donc de diminuer le %GC d'*atoD* et d'*atoA*, tout en évitant une optimisation trop « efficace » qui pourrait faire disparaître les éventuelles pauses traductionnelles nécessaire à la bonne conformation co-traductionnelle de l'enzyme (Oh et al., 2011; Plotkin and Kudla, 2011; Sørensen et al., 1989). Les deux enzymes AtoAD et CtfAB possèdent la même fonction et partagent près de 50% d'identité. Il est donc probable que leurs structures soient très similaires, tout comme leur mécanisme de repliement. Les gènes *ctfAB* ont donc été utilisés comme modèle pour déterminer les positions nécessitant des codons rares ou non.

Lors de la première étape d'optimisation des gènes *atoD* et *atoA*, pour chaque acide aminé identique entre AtoAD et CtfAB, le codon utilisé dans *ctfAB* a été utilisé pour *atoAD* à la position correspondante (voir annexes 1).

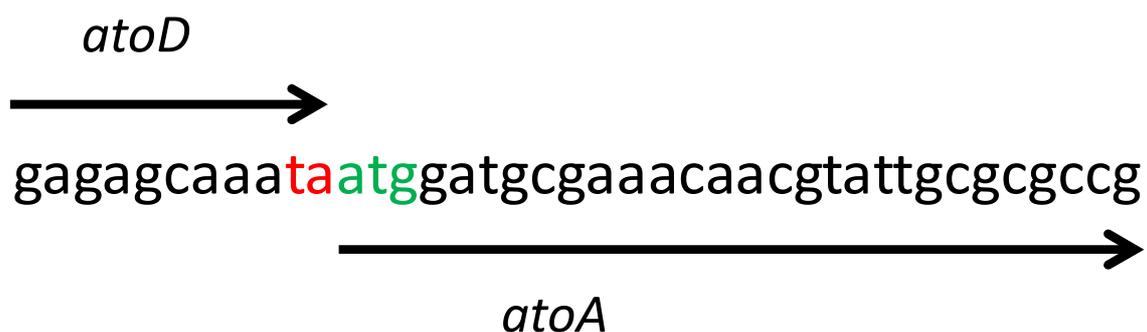
Cette première étape permet de faire diminuer le %GC de *atoD* à 42% et celui de *atoA* à 47%. Ces pourcentages en GC restent néanmoins encore trop élevés pour espérer une expression optimale chez *C. acetobutylicum*.

La seconde étape d'optimisation a consisté, pour chaque position correspondante entre *ctfAB* et *atoAD* (mais non identique), à regarder la fréquence du codon utilisé dans *ctfAB* et à choisir un codon correspondant à une fréquence similaire pour *atoAD*, afin de

respecter la dynamique de traduction du gène (tables de fréquence d'usage des codons obtenues sur <http://www.kazusa.or.jp>). Ainsi, deux nouvelles séquences pour *atoD* et *atoA* ont été obtenues.

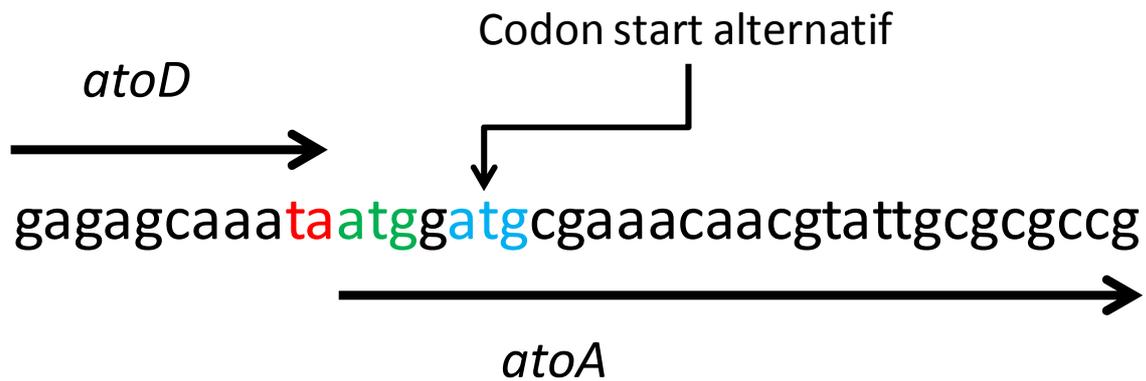
A ce stade, le pourcentage GC d'*atoD* est de 38% et celui d'*atoA* est de 41%. Cela représente une baisse du pourcentage GC de 16% pour *atoD* et de 13% pour *atoA*.

L'efficacité des RBS est également un élément important à prendre en compte pour la bonne traduction des deux sous-unités AtoD et AtoA. S'il est facile de mettre le RBS de notre choix devant le gène *atoD*, qui est le premier de l'opéron, il est plus difficile de contrôler le RBS devant *atoA*. En effet, il n'y a pas de région inter-génique entre *atoD* et *atoA* (figure 32).



**Figure 32** : Région intergénique entre *atoD* et *atoA*. Codon stop *atoD* en rouge et codon start *atoA* en vert.

Le RBS devant *atoA* dépend donc uniquement de la séquence codant pour les derniers acides aminés d'*atoD*. Afin d'évaluer la force du RBS (natif) d'*atoA* chez *C. acetobutylicum*, le logiciel RBS calculator (Espah Borujeni et al., 2014; Salis et al., 2009) a été utilisé et une valeur de 1733 UA (Unité arbitraire) a été déterminée. Ce RBS s'avère alors peu performant par rapport à celui de *ctfB* dont la vitesse d'initiation de la traduction a été déterminé à une valeur de 125591 UA. De plus, la probabilité d'initiation du deuxième codon start possible dans la séquence d'*atoA*, qui entrainerait un décalage du cadre de lecture, est plus élevée avec 4004 UA (Figure 33).

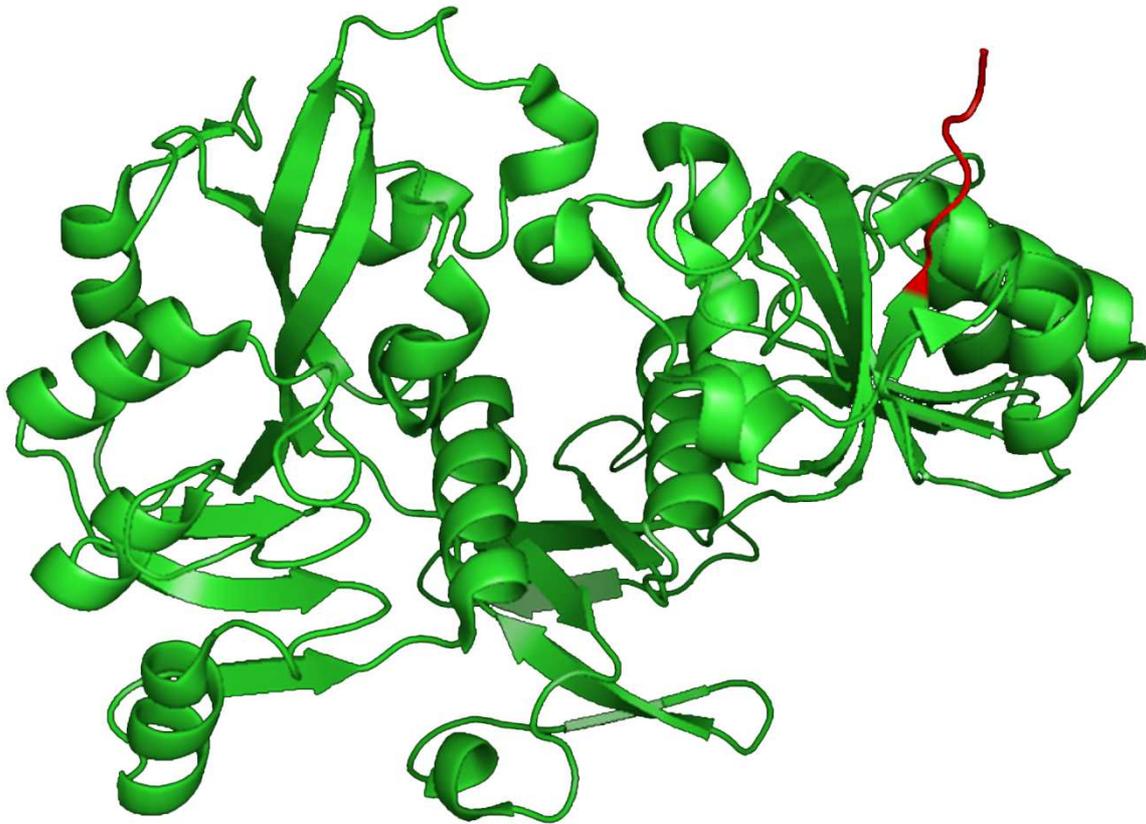


**Figure 33** : Région intergénique entre *atoD* et *atoA*. Codon stop *atoD* en rouge, codon start *atoA* en vert et codon start alternatif en bleue.

La présence d'une séquence RBS, permettant une bonne traduction d'*atoA* chez *C. acetobutylicum* est donc indispensable à la formation d'un complexe AtoAD fonctionnel. Deux solutions sont alors envisageables : soit la région inter-génique entre *atoD* et *atoA* est allongée et un RBS optimisé propre à *atoA* est ajouté, soit la fin du gène *atoD* est modifiée.

Les cinq derniers acides aminés d'AtoD ont donc été modifiés et remplacés par ceux de CtfA de manière à avoir le même RBS pour *atoA* que pour *ctfB*. La structure 3D d'*atoD* étant connue (Korolev et al., 2002), il est possible d'évaluer l'importance que ces 5 derniers acides aminés ont pour la structure de la protéine. Cette structure a été visualisée à l'aide du logiciel Pymol et est présenté dans la figure 34.

On peut voir (en rouge), que ces 5 acides aminés sont dans une zone non structurée et à l'extérieur de la protéine. Il est peu probable qu'ils possèdent une fonction structurale ou qu'ils soient impliqués dans l'action catalytique de l'enzyme. Si on remplace ces acides aminés par ceux présents à la même position dans CtfA (en utilisant les mêmes codons que *ctfA*), on obtient une séquence RBS plus performante pour *atoA* dont la force est estimée à 47084 UA (soit une augmentation d'un facteur 27 par rapport au RBS initialement présent).



**Figure 34 :** Structure 3D de la sous unité alpha de la CoA transférase d'*E.coli*. Les 5 derniers acides aminés de l'extrémité C terminal sont représentés en rouge.

Finalement, les vitesses d'initiation de la traduction ont été calculées et comparées pour *ctfA* et *ctfB* grâce au logiciel RBS calculator. Il apparait que la vitesse d'initiation de la traduction est 1.8 fois plus importante pour *ctfA* que pour *ctfB*. Dans l'hypothèse que ce paramètre pourrait avoir une importance pour une bonne formation du complexe enzymatique, un RBS pour *atoD* ayant une vitesse d'initiation de la traduction proche de 1.8 fois plus grande que celle d'*atoA* a été dessiné (97920 UA pour *atoD* et 47084 UA pour *atoA*). L'ensemble de la stratégie présentée ci-dessus a conduit au design de deux gènes synthétiques, avec leur séquence RBS, optimisés pour une expression optimale chez *C. acetobutylicum* (voir annexes 2).

#### IV.7.2.2. Construction du vecteur d'expression

Les gènes synthétiques *atoAD* optimisés pour *C. acetobutylicum* ont été introduits, par recombinaison homologue, à la place des gènes *ctfAB* sur le vecteur *pCLF952-thl* en utilisant la même stratégie que celle mise en œuvre pour la construction du vecteur *pCLF952-thl-atoAD*. Le vecteur *pCLF952-thl-atoAD-OPT* a ainsi été obtenu.

#### IV.7.2.3. Expression du vecteur *pCLF952-thl-atoAD-OPT* chez *C. acetobutylicum*

##### IV.7.2.3.1. Culture à pH non régulé

Le vecteur *pCLF952-thl-atoAD-OPT* a donc été introduit dans la souche *824Δbuk*. Comme précédemment, des cultures de la souche mutante *824Δbuk pCLF952-thl-atoAD-OPT* ont été effectuées en milieu MS, à pH non régulé, et les résultats ont été comparés à ceux obtenus avec la souche *824Δbuk pCLF952* (tableau 9).

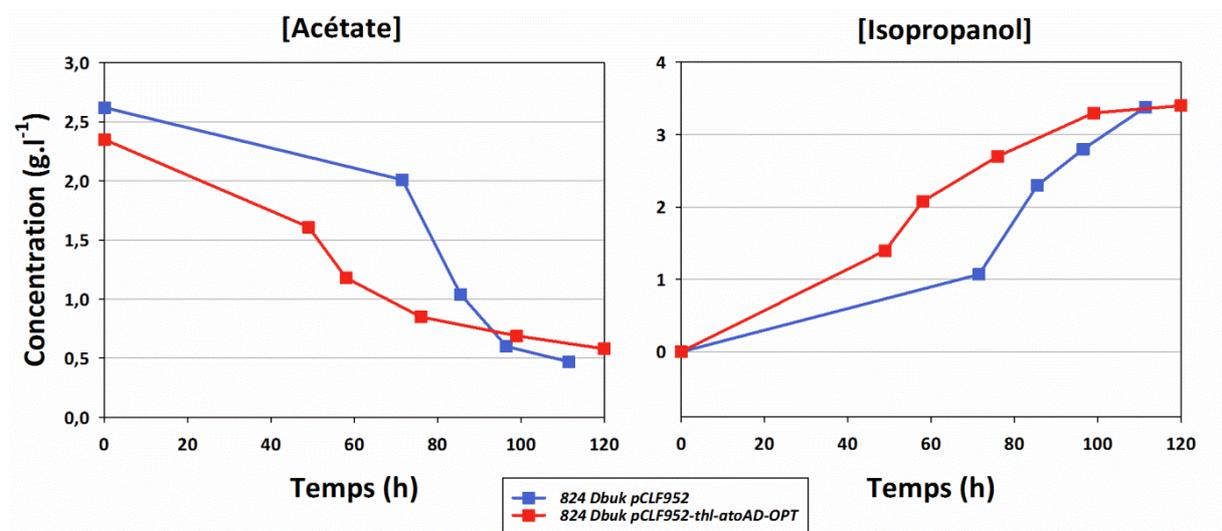
**Tableau 9** : Cultures des souches *824 Δbuk pCLF952* et *824 Δbuk pCLF952-thl-atoAD-OPT* en milieu CGM glucose.

Souches	Glucose consommé et concentration des produits (g/L)								Rendement par rapport au glucose (g.g <sup>-1</sup> )	
	Glucose consommé	Acétate	Lactate	Acétone	Isopropanol	Ethanol	Butanol	Solvant	Isopropanol	Solvant
<i>Δbuk pCLF952</i>	26,80	0,47	2,97	0,15	3,38	0,83	5,80	10,16	0,08	0,33
<i>Δbuk pCLF952-thl-atoAD-OPT</i>	36,53	0,58	5,97	0,19	3,40	2,06	7,43	13,08	0,06	0,33

Contrairement à ce qui a été observé avec les gènes natifs *atoAD*, l'expression des gènes *atoAD* optimisés permet une production d'isopropanol équivalente (3,4 g.l<sup>-1</sup>) à celle obtenue avec les gènes *ctfAB* (3,38 g.l<sup>-1</sup>). En effet, les souches *824Δbuk pCLF952* et *824Δbuk pCLF952-thl-atoAD-OPT* produisent toutes les deux environ 3,4 g.l<sup>-1</sup> d'isopropanol et les rendements de production IBE sont identiques (0,33 g.g<sup>-1</sup>). La concentration résiduelle en acétate est relativement faible pour les deux souches avec environ 0,5 g.l<sup>-1</sup> (figure 35).

Une analyse plus fine de la cinétique de production des produits de fermentation et de reconsommation de l'acétate au cours du temps suggère que la souche exprimant *atoAD*-

*OPT* reconvertit l'acétate produit pour la production d'isopropanol de manière plus précoce. Après 70 heures de cultures, les concentrations d'acétate et d'isopropanol sont respectivement de 2 et 1 g.l<sup>-1</sup> pour la souche *824Δbuk pCLF952* contre 0,85 et 2,7 g.l<sup>-1</sup> pour la souche *824Δbuk pCLF952-thl-atoAD-OPT* (figure 35). Ces résultats semblent indiquer que la stratégie d'optimisation des gènes *atoAD*, pour une expression optimale chez *C. acetobutylicum*, a effectivement amélioré la quantité d'enzyme AtoAD fonctionnelle produite par la souche *824Δbuk* par rapport à l'expression des gènes *atoAD* natifs.



**Figure 35** : Profils de production d'acétate et d'isopropanol par les souches *824 Δbuk pCLF952* et *824Δbuk pCLF952-thl-atoAD-OPT* en milieu CGM glucose.

Le rendement de production d'isopropanol par la souche *824Δbuk pCLF952-thl-atoAD-OPT* est néanmoins légèrement inférieur à celui de la souche *824Δbuk pCLF952*. Cette différence est liée à une consommation de glucose accrue, principalement corrélée à une plus forte production de lactate. Lors de culture fiole en milieu MS, la production de lactate est majoritairement observée pendant la première phase de la culture, lorsque le pH du milieu est élevé. Le fait que la souche *824Δbuk pCLF952-thl-atoAD-OPT* reconsomme plus rapidement l'acide acétique implique que le pH du milieu baisse moins rapidement, ce qui pourrait alors expliquer une production supérieure de lactate.

#### IV.7.2.3.2. Culture à pH régulé

Les résultats préliminaires obtenus à partir des cultures réalisées en fiole montrant que la voie de l'isopropanol, exprimant les gènes *atoAD-OPT*, est fonctionnelle, des fermentations à pH régulé ont été effectuées afin de déterminer les capacités de production IBE de la souche *824Δbuk pCLF952-thl-atoAD-OPT*. Les fermentations ont été réalisées, dans les mêmes conditions que précédemment (partie IV.4 et IV.5), en milieu CGM comportant 80 g.l<sup>-1</sup> de glucose. Compte tenu des résultats obtenus précédemment, deux valeurs de régulation du pH ont été retenues : i) à pH 4,8, car il s'agit du pH précédemment déterminé comme optimal pour la production IBE et ii) à pH 5,2 car à ce pH la production d'acétate est maximale, ce qui devrait alimenter en substrat la voie de l'isopropanol. Les résultats obtenus aux cours de ces expériences sont présentés dans le tableau 10.

**Tableau 10** : Concentration finale en métabolites lors de cultures régulée à pH 5,2 et 4,8 de la souche *824 Δbuk pCLF952-thl-atoAD-OPT*.

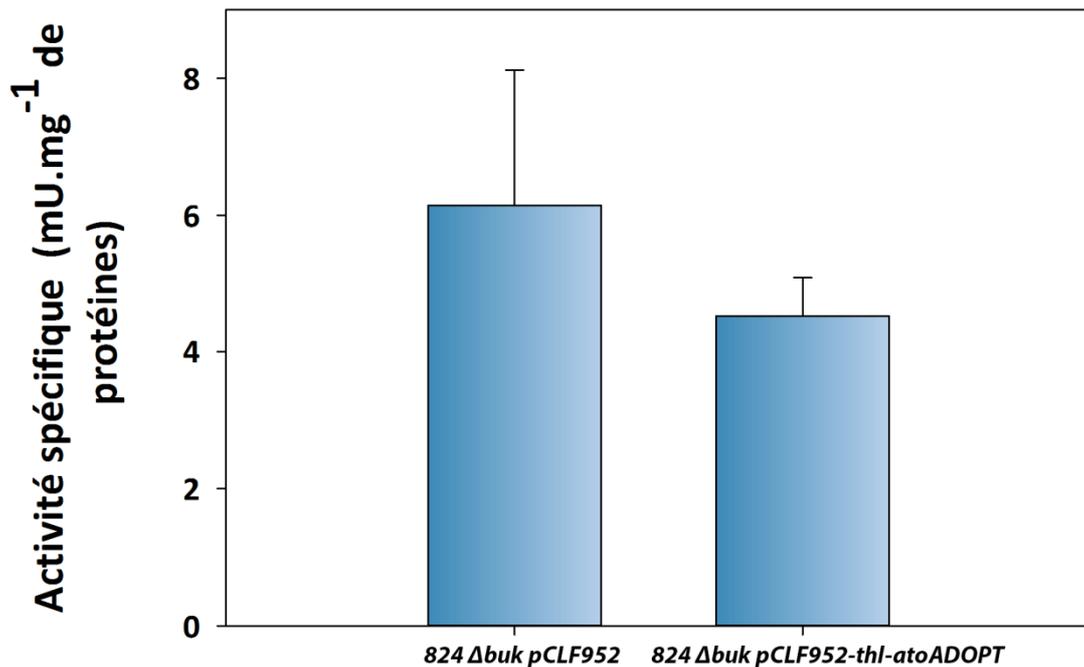
<i>824Δbuk pCLF952-thl-atoAD-OPT</i>	Glucose consommé et concentration des produits (g/L)							Rendement par rapport au glucose (g.g <sup>-1</sup> )	
	Glucose consommé	Acétate	Acétone	Isopropanol	Ethanol	Butanol	Solvant	Isopropanol	Solvant
<b>pH 5,2</b>	78,98	8,62	0,52	1,77	6,29	11,72	20,30	0,02	0,26
<b>pH 4,8</b>	80,93	5,04	0,82	2,26	14,05	9,84	26,97	0,03	0,33

Contre toute attente, les résultats obtenus lors des fermentations à pH régulé de la souche *824Δbuk pCLF952-thl-atoAD-OPT* diffèrent significativement de ce qui avait été observé précédemment lors des cultures en fioles. En effet, la souche montre une capacité très réduite à reconsommer l'acétate avec des titres finaux de 8,62 et 5,04 g.l<sup>-1</sup>, respectivement à pH 5,2 et 4,8. Il en résulte une production d'isopropanol fortement diminuée avec seulement 1,77 g.l<sup>-1</sup> à pH 5,2 et 2,26 g.l<sup>-1</sup> à pH 4,8. Les rendements en isopropanol sont en conséquence très inférieurs à ceux observés lors des fermentations de la souche *824Δbuk pCLF952*. L'acétate et l'isopropanol ne sont néanmoins pas les deux seuls produits à avoir un profil inhabituel. En effet, la production d'éthanol est très largement augmentée avec 14 g.l<sup>-1</sup> produit à pH 4,8 contre seulement 1 g.l<sup>-1</sup> pour la souche *824Δbuk*

*pCLF952* au même pH. La production de butanol est également affectée (entre 9,8 et 11,7 g.l<sup>-1</sup>) et diminue de près d'un tiers par rapport à la souche de référence (14,2 g.l<sup>-1</sup>).

L'ensemble de ces résultats suggèrent un blocage partiel de la voie des composés en C3-C4 qui pourrait intervenir au niveau de la thiolase comme décrit par Cooksley et al (2012). L'hypothèse de l'apparition de mutations ayant pour effet de diminuer l'activité thiolase est cependant peu probable du fait de la présence de deux copies indépendantes du gène *thl* dans la souche (une sur le chromosome et une sur le plasmide). De plus, des PCRs effectuées sur des cellules récoltées en fin de fermentation ont permis de mettre en évidence la présence du plasmide et le séquençage du gène *thl* porté par ce dernier n'a révélé aucune mutation. Néanmoins, cette modification phénotypique de la souche ne semble pas être réversible et des cultures en fioles successives réalisées à partir de cellules issues des fermenteurs montrent le même profil produit altéré, sans récupération du phénotype initial. L'hypothèse de mutations affectant un ou plusieurs mécanismes de régulation de l'activité thiolase n'est donc pas à exclure. Afin d'obtenir un aperçu du niveau d'activité thiolase présent dans la souche, des mesures d'activité spécifique ont été effectuées sur des cellules récoltées en début de fermentation (phase acidogène). Les résultats ont été comparés à des mesures d'activité réalisées en parallèle sur un extrait cellulaire de la souche *824Δbuk pCLF952* récoltée lors d'une fermentation à pH 4,8 (figure 36).

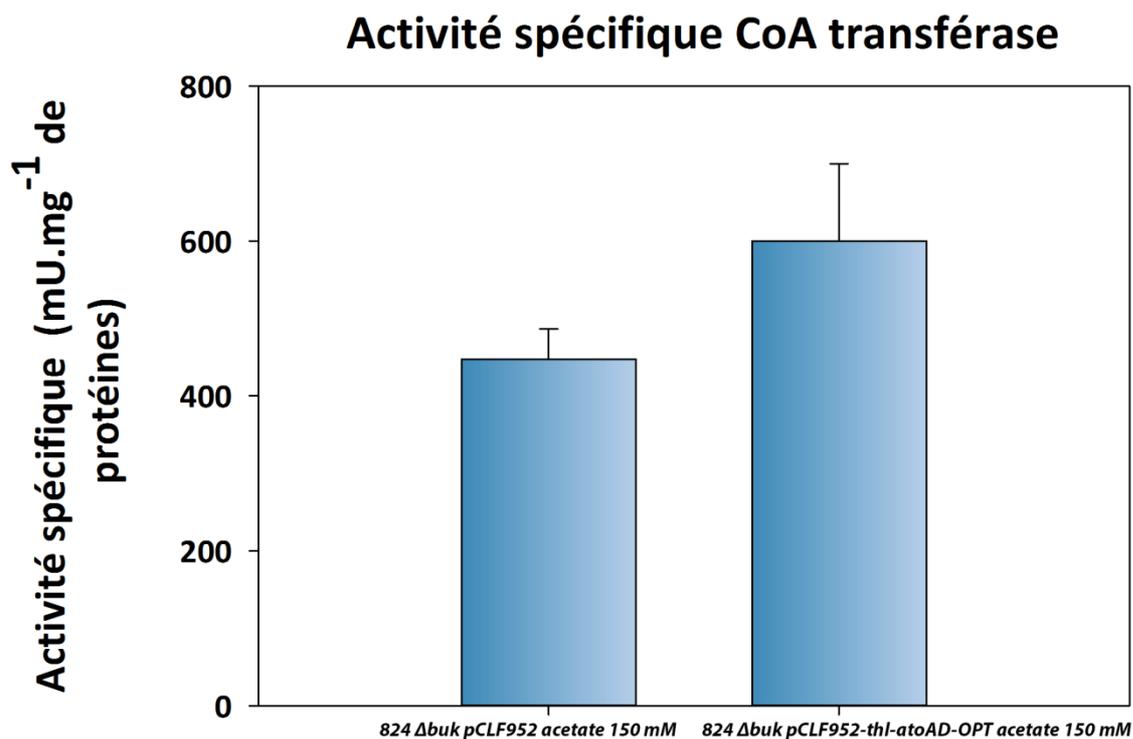
## Activité spécifique thiolase



**Figure 36** : Activité spécifique thiolase mesurée à partir d'extrait totaux des souches *824Δbuk pCLF952* et *824Δbuk pCLF952-thl-atoAD-OPT*.

L'activité thiolase mesurée dans la souche *824Δbuk pCLF952-thl-atoAD-OPT* (4,62 U.mg<sup>-1</sup>) est légèrement plus faible que celle présente dans la souche *824Δbuk pCLF952* (6,25 U.mg<sup>-1</sup>), mais la différence étant plus petite que l'écart type sur la mesure, celle-ci ne peut pas être considérée comme pleinement significative. De plus l'activité spécifique thiolase de 4,62 U.mg<sup>-1</sup> mesurée dans la souche *824Δbuk pCLF952-thl-atoAD-OPT* reste élevée et peut difficilement expliquer les résultats de fermentation obtenus.

L'analyse du profil des produits de fermentations ne permet pas non plus de déterminer si la CoA transférase d'*E. coli* est une enzyme performante pour la production d'isopropanol. Des mesures d'activités spécifiques CoA transférase ont donc été effectuées, à partir de cellules récoltées lors des fermentations à pH régulé, afin de déterminer si celle-ci est limitante pour la production d'isopropanol (figure 37).

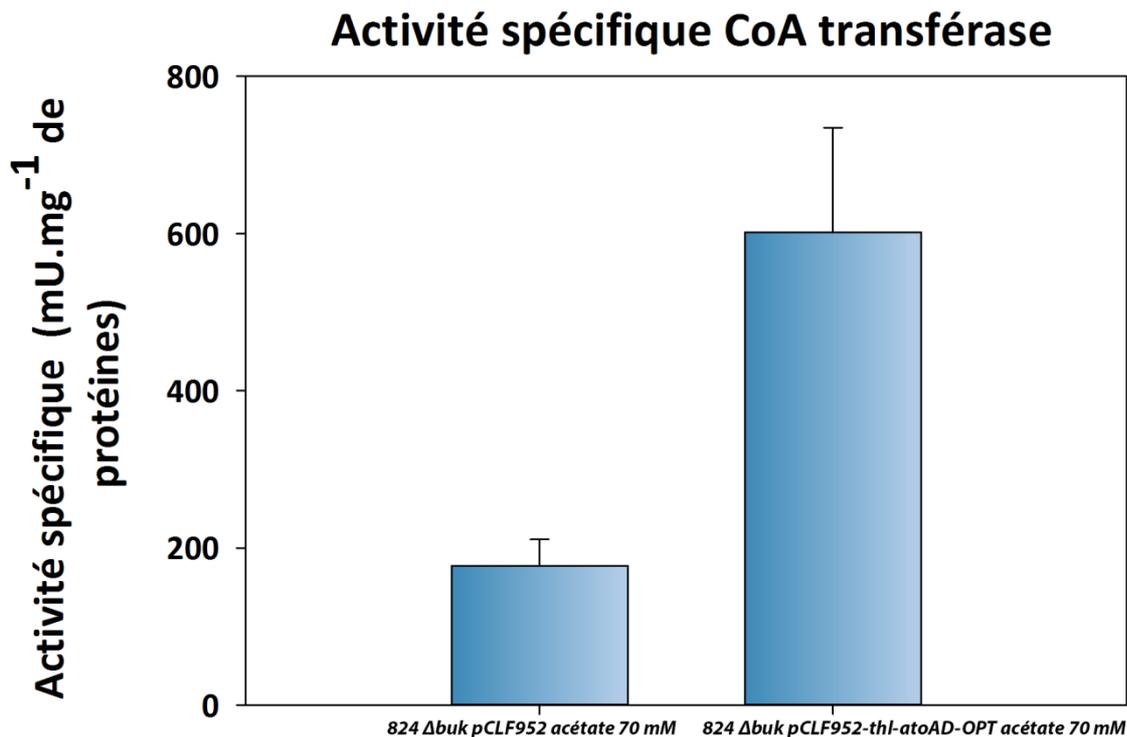


**Figure 37** : Activité spécifique CoA transférase avec 150 mM d'acétate dans le milieu réactionnel mesurée à partir d'extrait totaux des souches *824Δbuk pCLF952* et *824Δbuk pCLF952-thl-atoAD-OPT*.

L'activité CoA transférase mesurée dans la souche *824Δbuk pCLF952-thl-atoAD-OPT* augmente de 35 % par rapport à celle mesurée dans la souche *824Δbuk pCLF952*. Ces résultats montrent que le niveau d'activité CoA transférase n'est pas la cause de la baisse de production d'isopropanol observée lors des fermentations de la souche *824Δbuk pCLF952-thl-atoAD-OPT*. La souche *824Δbuk pCLF952-thl-atoAD-OPT* possède toujours une copie chromosomique des gènes *ctfAB*, et même si il a été montré que ces gènes ne sont pas exprimés en phase acidogène, rien ne permet d'affirmer que l'activité mesurée est directement liée à la présence des gènes *atoAD-OPT*.

Dans les conditions standards du protocole de mesure de l'activité CoA transférase, la concentration en acétate dans le mélange réactionnel est de 150 mM, ce qui représente une valeur près de dix fois inférieure au  $K_m$  pour l'acétate de l'enzyme CtfAB. Cela signifie que l'activité spécifique CtfAB mesurée n'est pas l'activité maximale de l'enzyme et que, dans cette gamme de concentration en substrat, elle suit une relation linéaire par rapport à la concentration en acétate. En d'autres termes, si l'on diminue par deux la concentration en acétate dans le mélange réactionnel, l'activité CtfAB mesurée devrait également être divisée

par deux. Au contraire, le  $K_m$  d'AtoAD pour l'acétate étant de 53,1 mM, l'activité mesurée ne devrait pas être modifiée tant que la concentration en acétate reste supérieure à cette valeur. Cette différence de caractéristiques entre CtfAB et AtoAD peut donc être utilisée pour déterminer laquelle de ces deux enzymes est responsable de l'activité CoA transférase détectée dans les extraits cellulaires. Des nouveaux dosages de l'activité ont donc été réalisés en baissant la concentration en acétate à 70 mM (figure 38).



**Figure 38** : Activité spécifique CoA transférase avec 70 mM d'acétate dans le milieu réactionnel mesurée à partir d'extrait totaux des souches *824Δbuk pCLF952* et *824Δbuk pCLF952-thl-atoAD-OPT*.

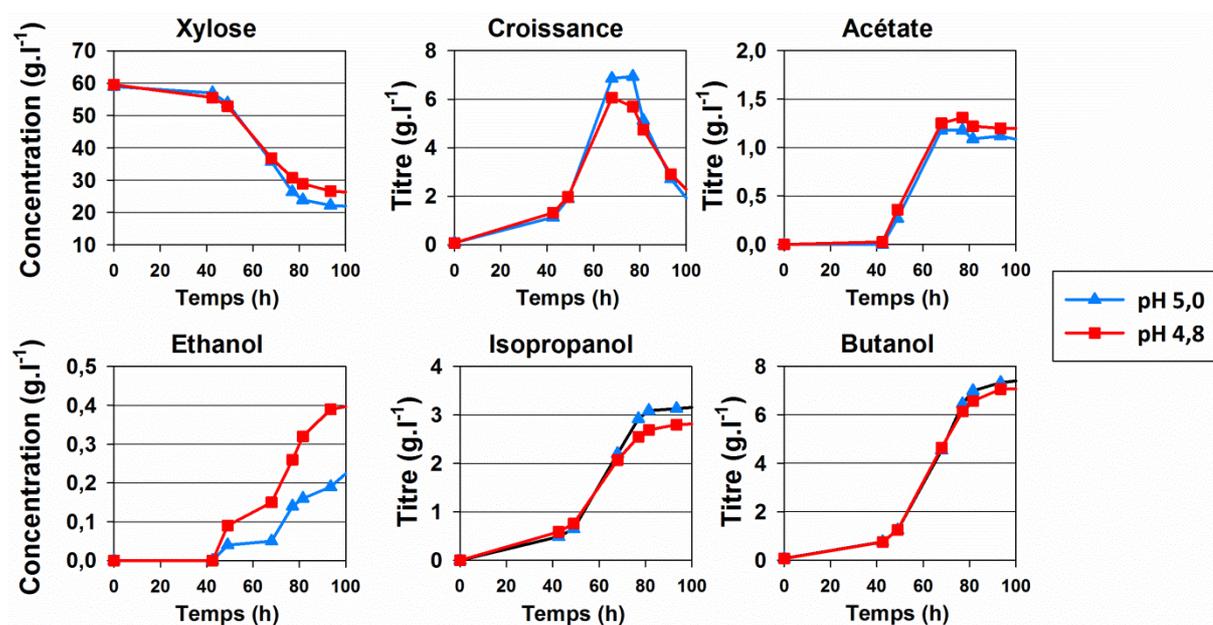
Comme attendu, lorsque la concentration en acétate est divisée par un facteur d'environ deux, l'activité CoA transférase mesurée dans la souche *824Δbuk pCLF952* est aussi divisée par deux. Cela s'explique naturellement par le fait que l'enzyme CtfAB, codée par le plasmide *pCLF952*, est la seule CoA transférase présente dans la souche. A contrario, l'activité CoA transférase, mesurée dans la souche *824Δbuk pCLF952-thl-atoAD-OPT*, n'est pas affectée par la diminution de la concentration en acétate. L'enzyme responsable de l'activité CoA transférase dans cette souche a donc un  $K_m$  pour l'acétate inférieur à 70 mM ce qui correspond aux caractéristiques d'AtoAD.

Ces résultats permettent donc de conclure que la stratégie d'optimisation des gènes *atoAD* a permis une bonne expression et une bonne traduction de l'enzyme AtoAD chez *C. acetobutylicum*. De plus l'enzyme est fonctionnelle dans cet organisme et les premiers tests suggèrent qu'elle possède les propriétés souhaitées. Malgré tout, la souche mutante exprimant AtoAD obtenue semble subir un processus « d'évolution » entraînant une forte diminution du flux de carbone dans la voie des composés en C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>. Même si rien n'indique que l'enzyme AtoAD soit toxique pour *C. acetobutylicum*, il n'est pas à exclure que sa présence dans la souche crée une pression de sélection en faveur de cette « évolution ». Afin de tenter de répondre à cette problématique, des investigations supplémentaires seraient nécessaires. L'expérience pourrait être réalisée sur un plus grand nombre de clones afin de tenter d'isoler un clone stable ne présentant pas de dysfonctionnements de la voie des C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>. Dans le cas où cela s'avèrerait infructueux, il serait également possible d'isoler certains de ces variants afin d'étudier les modifications entrant en jeu au point de vue génétique (reséquençage du génome) et au point de vue transcriptomique (extraction des ARNm).

#### IV.8. Production d'un mélange IBE par la souche *824Δbuk pCLF952* à partir de xylose

L'utilisation de source de carbone alternative au glucose pour la production de molécules d'intérêt pour la chimie et les biocarburants constitue un enjeu important au niveau industriel. L'utilisation du xylose est particulièrement intéressante dans la mesure où il s'agit du 2<sup>ème</sup> sucre le plus abondant sur terre. On le retrouve principalement sous la forme de polymères présents en grande quantité dans l'hémicellulose. Un métabolisme efficace des pentoses, et plus particulièrement du xylose, par *C. acetobutylicum* est donc une étape importante vers l'utilisation d'hémicellulose comme substrat pour la production de solvants.

Afin de déterminer la capacité de la souche *824Δbuk pCLF952* à produire un mélange IBE à haut rendement à partir de xylose, des cultures régulées à pH 4,8 et 5,0 ont été effectuées en milieu CGM (60 g.l<sup>-1</sup> de xylose) (figure 39).



**Figure 39** : Evolution de la concentration en xylose, acétate, éthanol, isopropanol et butanol, ainsi que celle de la densité optique, lors de fermentations de la souche 824  $\Delta$ buk pCLF952 réalisées à pH 5,0 et 4,8 sur milieu xylose.

Par rapport aux résultats qui avaient été obtenus sur glucose, le xylose soutient une production de solvants environ deux fois moins importante ( $11 \text{ g.l}^{-1}$  sur xylose contre  $21 \text{ g.l}^{-1}$  sur glucose). La consommation de sucres et la croissance sont également divisées par deux et l'augmentation de la durée de la fermentation fait chuter la productivité.

**Tableau 11** : Concentrations finales des produits de fermentations de la souche 824  $\Delta$ buk pCLF952, réglée à pH 5,0 et 4,8 ; sur milieu xylose.

Conditions de culture	xylose consumed and products titer ( $\text{g.l}^{-1}$ )								Rendement en solvant	
	xylose consommé	Acétate	Butyrate	Acétone	Ethanol	Isopropanol	Butanol	Acétoïne	Rendement isopropanol ( $\text{g.g}^{-1}$ )	totaux ( $\text{g.g}^{-1}$ )
xylose pH 5.0	37.17	1.07	1.04	0.14	0.24	3.17	7.43	0.72	0.085	0.30
xylose pH 4.8	33.32	1.20	0.66	0.10	0.40	2.82	7.07	0.59	0.085	0.31

A pH 5,0, où les meilleurs résultats ont été obtenus, la souche produit  $3,17 \text{ g.l}^{-1}$  d'isopropanol,  $7,43 \text{ g.l}^{-1}$  de butanol et  $0,24 \text{ g.l}^{-1}$  d'éthanol. Même si le rendement en

isopropanol est similaire sur xylose et sur glucose ( $0,085 \text{ g.g}^{-1}$ ), le rendement en solvants totaux est, quant à lui, plus faible ici ( $0,31 \text{ g.g}^{-1}$  contre  $0,34 \text{ g.g}^{-1}$ )(tableau 11).

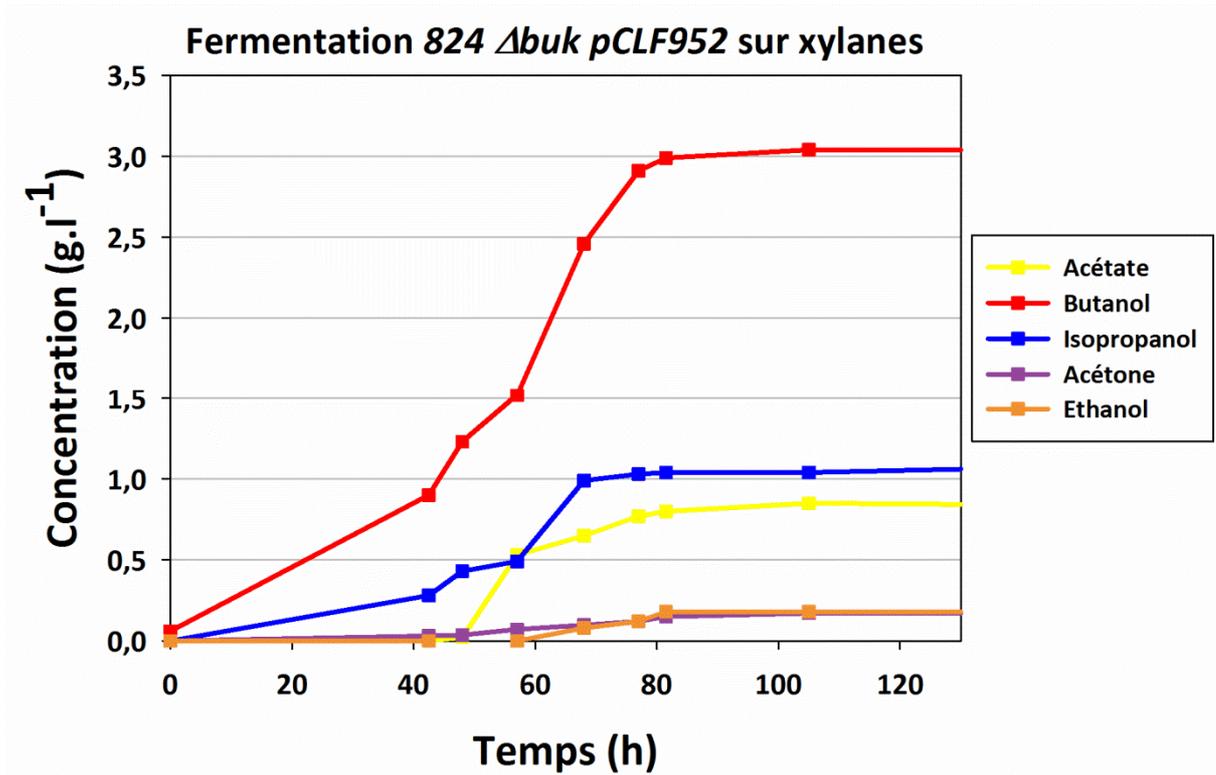
Ces résultats sont néanmoins cohérents avec les limitations présentes dans le métabolisme du xylose mises en évidence (Gu et al., 2009; Ren et al., 2010) , notamment au niveau de XylT, XylA-II et XylB (Gu et al., 2010)( voir partie II.2.1.2).

#### IV.9. Production d'un mélange IBE par la souche 824 $\Delta$ buk pCLF952 à partir de xylanes

Le xylane étant un des constituants principaux de l'hémicellulose, son utilisation effective pour la production de solvants par voie fermentaire est un enjeu important, en termes de coût et de disponibilité de la matière première. *C. acetobutylicum* possède différents gènes codant putativement pour des xylanases sur son génome (2 de la famille GH10 et 6 de la famille GH43), mais peu d'informations sont disponibles quant à sa capacité à métaboliser ce substrat (Lee et al., 1985).

Afin d'évaluer la production IBE sur xylanes, une fermentation en milieu CGM,  $50 \text{ g.l}^{-1}$  de xylane de bouleau, régulée à pH 5,0 a été effectuée (figure 40).

La souche produit  $1,1 \text{ g.l}^{-1}$  d'isopropanol,  $3 \text{ g.l}^{-1}$  de butanol et  $0,18 \text{ g.l}^{-1}$  d'éthanol en une  $100^{\text{aine}}$  d'heures, soit une production IBE totale de  $4,28 \text{ g.l}^{-1}$ . Le xylane n'étant pas un substrat soluble, la quantité résiduelle en fin de fermentation a été estimée par une méthode d'hydrolyse acide combinée à un dosage HPLC du xylose libéré. La quantité de xylane consommée a été déterminée à une valeur de  $15,7 \text{ g.l}^{-1}$ , soit un rendement isopropanol de  $0,066 \text{ g.g}^{-1}$  et un rendement en solvants de  $0,28 \text{ g.g}^{-1}$ .



**Figure 40** : Evolution de la concentration des produits de fermentation de la souche 824  $\Delta buk$  pCLF952 sur milieu xylane.

L'ensemble de ces résultats sont très encourageants et laissent présager le fort potentiel que possède cette souche pour ce type de fermentation sur hémicellulose. Beaucoup de microorganisme utilisé pour le développement de souches de production (*E. coli*, *S. cerevisiae*...) ne sont pas naturellement capable d'hydrolyser le xylane. Par exemple, la souche P260 de *C. acetobutylicum* est incapable d'utiliser du xylane comme source de carbone sans l'ajout dans le milieu d'un cocktail de xylanases. Dans la plupart des cas, un traitement préalable du xylane est nécessaire à la réalisation de la fermentation et ce traitement, en plus d'engendrer des coûts supplémentaires, apporte de nouvelles contraintes, comme la dilution du substrat ou l'introduction de molécule toxiques. Au contraire, la souche de *C. acetobutylicum* 824 $\Delta buk$  pCLF952 est directement capable d'utiliser du xylane, non prétraité, pour la production de solvants, ce qui représente un avantage économique non négligeable. Néanmoins, une optimisation des paramètres de fermentation, tel que la composition du milieu, le pH de la culture, le mode de culture (fed-batch ou chémostat avec recyclage des cellules) devrait être réalisée afin d'augmenter les

rendements ainsi que la productivité. De manière simultanée à la rédaction de ce manuscrit, Rajagopalan et al (2014) ont étudiés la production de butanol par *C. acetobutylicum* BOH3 à partir de xylanes de hêtre. Ils montrent que la souche est dans l'incapacité de fermenter plus de 10 g.l<sup>-1</sup> de xylane lors d'une culture en milieu RCM et produit 2,5 g.l<sup>-1</sup> de butanol. Bien que les performances de la souche *824Δbuk pCLF952* soient légèrement supérieures à celle rapportées par Rajagopalan et al., la souche semble subir le même type de limitation, avec seulement 32 % du substrat consommé. Rajagopalan et al., (2014) mettent en évidence que le niveau de xylanases excrétées dans le milieu est insuffisant pour permettre une utilisation complète du xylane. Ils optimisent alors la composition du milieu en ajoutant de la bagasse de sucre de canne, du sulfate d'ammonium et du chlorure de fer, ce qui a pour effet d'augmenter d'un facteur 1,6 l'activité xylanase présente dans le milieu. La souche consomme, dans ce nouveau milieu, près de 50 g.l<sup>-1</sup> de xylane et produit 14,8 g.l<sup>-1</sup> de butanol. Une optimisation similaire du milieu de fermentation serait sans aucun doute applicable à la souche *824Δbuk pCLF952* et pourrait permettre d'atteindre des productions IBE à partir de xylanes proches de celles obtenues à partir de xylose.

Des modifications supplémentaires au niveau génétique de la souche pour améliorer sa capacité à utiliser le xylane sont également envisageables. Par exemple, l'expression de xylanases spécialement conçues pour être localisées à la surface de la membrane cellulaire pourrait augmenter les capacités xylanolytique de la souche comparé à une souche sécrétant directement les enzymes dans le milieu extracellulaire, comme cela a été montré chez *S. cerevisiae* (Katahira et al., 2004; Kondo and Ueda, 2004).

**Ingénierie métabolique de  
*C. acetobutylicum* pour la  
production d'isopropanol  
comme unique produit de  
fermentation**



## V. Ingénierie métabolique de *C. acetobutylicum* pour la production d'isopropanol comme unique produit de fermentation

### V.1. Introduction

La redirection du métabolisme de *C. acetobutylicum* vers la production d'isopropanol comme unique produit de fermentation nécessite la suppression des voies métaboliques responsables de la formation du butyrate, de l'éthanol et du butanol.

La souche 824  $\Delta buk$  *pCLF952* développée dans l'approche précédente est déjà déléetée de la voie du butyrate et produit une quantité d'acide butyrique nettement diminuée couplée à une production de solvants accrue. De ce fait, elle constitue un point de départ intéressant pour atteindre l'objectif fixé. Le gène *aad*, localisé sur le méga plasmide *pSOL* est majoritairement impliqué dans la production d'éthanol et de butanol (Cooksley et al., 2012). Il a été démontré que la perte de *pSOL* entraîne l'incapacité de la bactérie à produire ces alcools (Cornillot et al., 1997). Ainsi, la destruction du méga plasmide semble être le moyen le plus direct pour éliminer la formation de ces deux produits.

Néanmoins, avant même d'envisager la suppression des voies de production du butanol et de l'éthanol, il est nécessaire de considérer l'ensemble des équations stœchiométriques constituant le métabolisme de *C. acetobutylicum*. Ces dernières sont présentées dans le tableau 12.

Chez *C. acetobutylicum*, l'équilibre rédox est normalement assuré par la production de butyrate et/ou de butanol et d'éthanol. Les différentes voies métaboliques se partagent le flux de carbone de manière à (i) consommer le NADH produit lors de la glycolyse et (ii) maximiser la production d'ATP. Par exemple, la souche 824  $\Delta buk$  *pCLF952* fermente le glucose selon une combinaison des réactions (8) et (13) du tableau 12. Les réactions (2) et (9) indiquent que pour produire 1 mole d'isopropanol par mole de glucose consommé, la souche doit impérativement être en mesure de produire 4 moles d' $H_2$ . En effet, selon la réaction (2), la conversion d'un glucose en isopropanol libère 2 ferrédoxines réduites et 2 NADH. La ferrédoxine est réoxydée par l'hydrogénase, produisant ainsi 2  $H_2$ , mais les 2 NADH doivent également être réoxydés afin de régénérer le  $NAD^+$ . La voie de production de l'isopropanol ne consommant pas de NADH, elle ne peut donc pas remplir ce rôle. Il est donc

nécessaire que la production de l'isopropanol soit couplée avec un système capable de réoxyder cet excès de NADH et de rétablir la continuité du flux électronique. Puisque nous considérons ici la création d'une souche homo-isopropanolique, la production d'un composé carboné réduit est à exclure, laissant la production d'H<sub>2</sub> comme seule alternative.

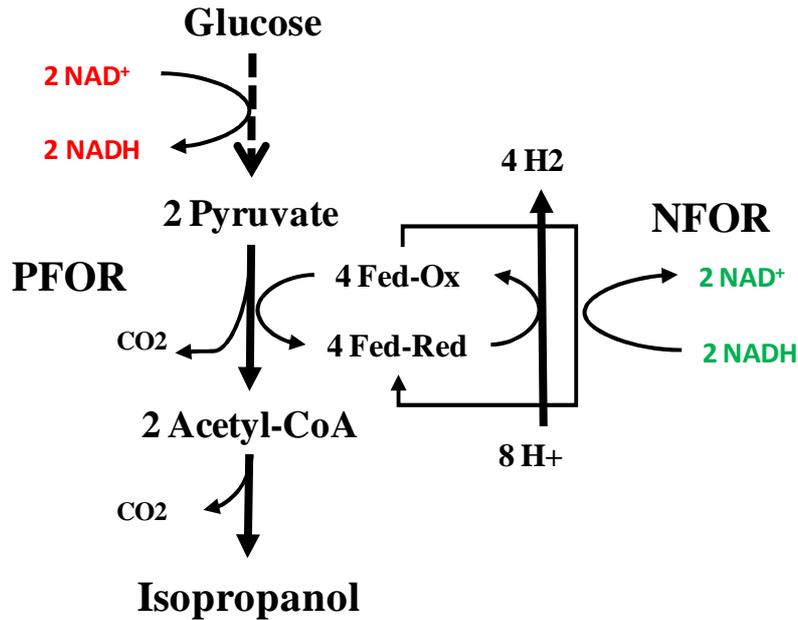
**Tableau 12** : Principales réactions constituant le métabolisme de *C. acetobutylicum*.

Réaction	Substrat	Produits	Rendement en ATP	Pouvoir redox libéré
1	1 Glucose	2 Acétate	4	2 NADH + 2Fd <sub>red</sub>
2	1 Glucose	1 Isopropanol	3	2 NADH + 2Fd <sub>red</sub> + 1 NADP <sup>+</sup>
3	1 Glucose	1 Butyrate	3	2Fd <sub>red</sub>
4	1 Glucose	1 Butanol	2	2 NAD <sup>+</sup> + 2Fd <sub>red</sub>
5	1 Glucose	2 Ethanol	2	2 NAD <sup>+</sup> + 2Fd <sub>red</sub>
6	1 Glucose	2 Lactate	2	-
7	1 Glucose	2 Ethanol + 2CO <sub>2</sub>	2	-
8	1 Glucose	2 Acétate + 2CO <sub>2</sub> + 4H <sub>2</sub>	4	-
9	1 Glucose	1 Isopropanol + 3CO <sub>2</sub> + 4H <sub>2</sub>	3	-
10	1 Glucose	1 Butyrate + 2CO <sub>2</sub> + 2H <sub>2</sub>	3	-
11	1 Glucose	1 Butanol + 2CO <sub>2</sub>	2	-
12	1 Glucose	1 Acétate + 1 Ethanol + 2CO <sub>2</sub> + 2H <sub>2</sub>	3	-
13	1 Glucose	0,3 Isopropanol + 0,6 Butanol 0,2 Ethanol + 2,3CO <sub>2</sub> + 1,2H <sub>2</sub>	2,3	-

La production d'hydrogène à partir de NADH est, métaboliquement parlant, possible grâce à deux enzymes (figure 41) :

i) la NADH-ferrédoxine oxydoréductase (NFOR), qui transfère dans un premier temps les électrons du NADH à la ferrédoxine,

ii) et de l'hydrogénase qui transfère à son tour les électrons de la ferrédoxine à l'hydrogène.



**Figure 41** : Voies métaboliques théorique de production d'isopropanol à partir de glucose.

Néanmoins, la production d'hydrogène à partir de NADH est défavorable, d'un point de vue thermodynamique, en raison des potentiels d'oxydoréduction de ces couples rédox. Etant donné que le potentiel standard d'oxydoréduction du couple NADH/NAD<sup>+</sup> est de -0,318 mV et que celui du couple H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub> est de -0,420 mv, la réaction n'est possible que dans des conditions de pressions partielles en hydrogène très faibles permettant de déplacer l'équilibre de la réaction vers la production d'H<sub>2</sub>. L'énergie libre de Gibbs de cette réaction peut s'écrire de la manière suivante :

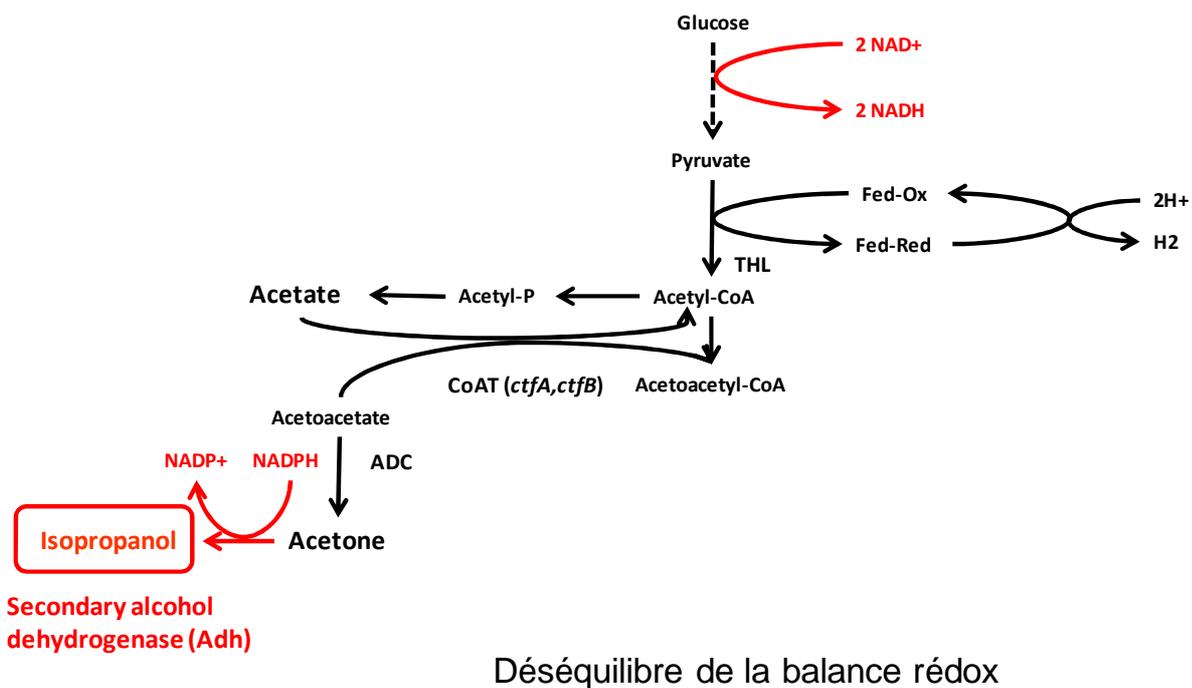
$$\Delta G = \Delta G_0 + RT \ln \frac{(pH_2)[NAD^+]}{[H^+][NADH]}$$

Avec :

$$\Delta G_0 = \Delta G'_0 + RT \ln 10^{-21}$$

Où  $\Delta G'_0$  est l'énergie libre standard de la réaction, R la constante universelle des gaz parfaits et T la température en Kelvin.

En considérant que le  $\Delta G'_0$  de la réaction est de  $18,14 \text{ kJ.mol}^{-1}$  et que le rapport  $\frac{[\text{NAD}^+]}{[\text{NADH}]}$  est de 0,5 (González-Pajuelo et al., 2005), la pression partielle maximale en  $\text{H}_2$  permettant à la réaction d'avoir lieu est de 0,018 atm. Le métabolisme de *C. acetobutylicum* produisant en moyenne autant d' $\text{H}_2$  que de  $\text{CO}_2$ , il est possible d'estimer que la pression partielle en  $\text{H}_2$  s'équilibre autour de 0,5 atm, ce qui est donc incompatible avec une production d' $\text{H}_2$  à partir de NADH. L'élimination simultanée des voies de production du butyrate, du butanol et de l'éthanol n'est donc pas directement envisageable et serait létale pour la bactérie car il s'agit, pour la cellule, des 3 mécanismes principaux de réoxydation des cofacteurs réduits issus de la glycolyse. Il se produirait alors un déséquilibre dans l'équilibre de la balance rédox et un blocage du flux d'électrons dû à l'accumulation du NADH (figure 42).



**Figure 42:** Déséquilibre de la balance rédox provoqué par la suppression simultanée des voies de l'éthanol et de butanol dans la souche 824 $\Delta$ buk.

L'ensemble de ces éléments souligne l'ampleur du challenge que représente la production d'isopropanol comme unique produit de fermentation chez *C. acetobutylicum*. Un équilibre parfait de la balance rédox doit impérativement être atteint pour que le système soit fonctionnel.

Afin de prendre en charge le pouvoir réducteur libéré durant la glycolyse pour la production d'isopropanol et ainsi d'équilibrer la balance rédox dans la cellule, trois grandes stratégies sont envisageables : (i) introduire un nouveau système métabolique rendant possible la production d'H<sub>2</sub> à partir de NADH, (ii) utiliser une voie alternative de métabolisation du substrat générant moins de pouvoir réducteur et (iii) modifier la voie de l'isopropanol de manière à ce que celle-ci consomme du pouvoir réducteur sous la forme de NADH.

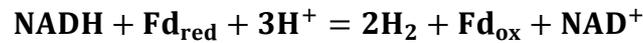
## V.2. Utilisation d'hydrogénases NADH dépendantes

### V.2.1. Introduction

Comme nous l'avons vu dans la partie IV.1, une des solutions possibles pour permettre la production d'isopropanol comme unique produit de fermentation à partir de glucose consiste à introduire un système capable d'utiliser le NADH pour la production d'H<sub>2</sub>. Ce système doit être en mesure de franchir la barrière thermodynamique qui rend cette réaction défavorable dans les conditions physiologiques de culture et être suffisamment efficace pour soutenir une forte production d'H<sub>2</sub>.

Récemment, une nouvelle classe d'hydrogénase, utilisant la bifurcation d'électrons comme mécanisme de conservation de l'énergie, a été découverte. Ces enzymes possèdent la particularité de pouvoir coupler une réaction exergonique et une réaction endergonique de manière à ce que l'énergie libérée par la première serve à la réalisation de la deuxième. En 2009 Schut and Adams isolent une hydrogénase de ce type chez *T. maritima* capable de coupler efficacement la réaction d'oxydation de la ferrédoxine par deux protons avec la réaction d'oxydation du NADH par deux protons, générant ainsi 4 molécules d'H<sub>2</sub>. Par la suite, des enzymes similaires ont également été caractérisées chez *A. woodii* et *M. thermoacetical* (Schuchmann and Müller, 2012; Wang et al., 2013)(voir partie II.6.2).

Afin de déterminer si une telle enzyme serait en mesure de permettre la production d'H<sub>2</sub> à partir de NADH chez *C. acetobutylicum*, la pression partielle maximum en H<sub>2</sub> permise par ce système a été calculée. La réaction enzymatique peut s'écrire :



L'énergie libre de Gibbs de cette réaction est décrite par la relation :

$$\Delta G = \Delta G_0 + RT \ln \frac{(\text{pH}_2)^2 [\text{Fd}_{\text{ox}}] [\text{NAD}^+]}{[\text{H}^+]^3 [\text{NADH}] [\text{Fd}_{\text{red}}]}$$

Soit :

$$\text{pH}_2 = \sqrt{\frac{[\text{H}^+]^3 [\text{NADH}] [\text{Fd}_{\text{red}}]}{[\text{Fd}_{\text{ox}}] [\text{NAD}^+]}} e^{\frac{-\Delta G_0}{RT}}$$

En prenant le rapport  $\frac{[\text{NAD}^+]}{[\text{NADH}]}$  égal à 0,5 (González-Pajuelo et al., 2005) et le rapport  $\frac{[\text{Fd}_{\text{ox}}]}{[\text{Fd}_{\text{red}}]}$  égal à 9,23 (Vasconcelos, résultats de thèse, 1991), on obtient une valeur de pH<sub>2</sub> max de 0,38 atm. Cela signifie que la réaction est thermodynamiquement favorable tant que la pression partielle en hydrogène reste inférieure à 0,38 atm, ce qui est nettement supérieur à la valeur de 0,018 atm, calculée en l'absence de ce système. Cette limite de 0,38 atm semble acceptable d'un point de vue physiologique d'autant plus qu'un mécanisme de soutirage des gaz produit lors de la fermentation pourrait facilement être mis en œuvre de manière à garder la pression partielle en H<sub>2</sub> en dessous de cette valeur.

L'expression hétérologue d'une hydrogénase NADH dépendante de ce type n'ayant jamais été rapportée, il est indispensable de disposer d'outils permettant de déterminer si cette dernière est active chez *C. acetobutylicum*, avant de pouvoir l'utiliser pour la production d'isopropanol. Dans cette partie sont présentées deux méthodes, l'une *in-vitro* et l'autre *in-vivo*, permettant de déterminer la fonctionnalité d'hydrogénases chez *C. acetobutylicum*, et leurs mises en œuvre avec trois hydrogénase NADH dépendantes d'origines différentes.

### V.2.2. Mise au point d'un outil de criblage *in-vitro* de l'activité hydrogénase

Ici, la détermination *in-vitro* de la fonctionnalité d'une hydrogénase est envisagée comme la mesure de son activité spécifique à partir d'extraits cellulaires d'une souche recombinante exprimant cette enzyme. Les mesures d'activité spécifique peuvent être réalisées à partir d'extraits totaux ou bien de fractions purifiées. Cependant, les hydrogénases NADH dépendantes sont de gros complexes multimériques composés de plusieurs sous-unités différentes et leur purification peut se révéler délicate. Au contraire, un dosage d'activité spécifique réalisable directement sur extraits totaux permettrait un criblage plus rapide de différentes enzymes sans avoir à optimiser les conditions de purification pour chacune d'entre elles.

Le principal obstacle à la mise en place d'un protocole de dosage d'une activité hydrogénase hétérologue sur extraits totaux chez *C. acetobutylicum* est la présence native d'une très forte activité hydrogénase endogène. Imputable à l'enzyme HydA de *C. acetobutylicum*, cette activité hydrogénase endogène va générer un important bruit de fond susceptible de masquer l'activité recherchée. Afin de contourner ce problème, l'utilisation d'une souche de *C. acetobutylicum* dénuée d'activité hydrogénase est envisageable, à condition que cette souche soit toujours en capacité d'exprimer et de maturer les hydrogénases.

#### V.2.2.1. Présentation de la souche 824 $\Delta buk\Delta pSOL$

Une souche mutante de *C. acetobutylicum* (824  $\Delta buk\Delta pSOL$ ) développée dans le cadre d'un autre projet au sein de l'équipe (brevet en cours de dépôt, projet ANR INJECOH 08B00E005) a été utilisée afin de mesurer *in-vitro* l'activité d'hydrogénases chez *C. acetobutylicum*. En plus de posséder le même génotype que la souche 824  $\Delta buk$ , la souche 824  $\Delta buk\Delta pSOL$  est curée du mégaplasme *pSOL* et possède un phénotype *hydA*<sup>-</sup> et *thI*<sup>-</sup>.

Lorsqu'elle est cultivée en chémostat dans un milieu MS contenant du glucose, cette souche produit très majoritairement du lactate (figure 43).

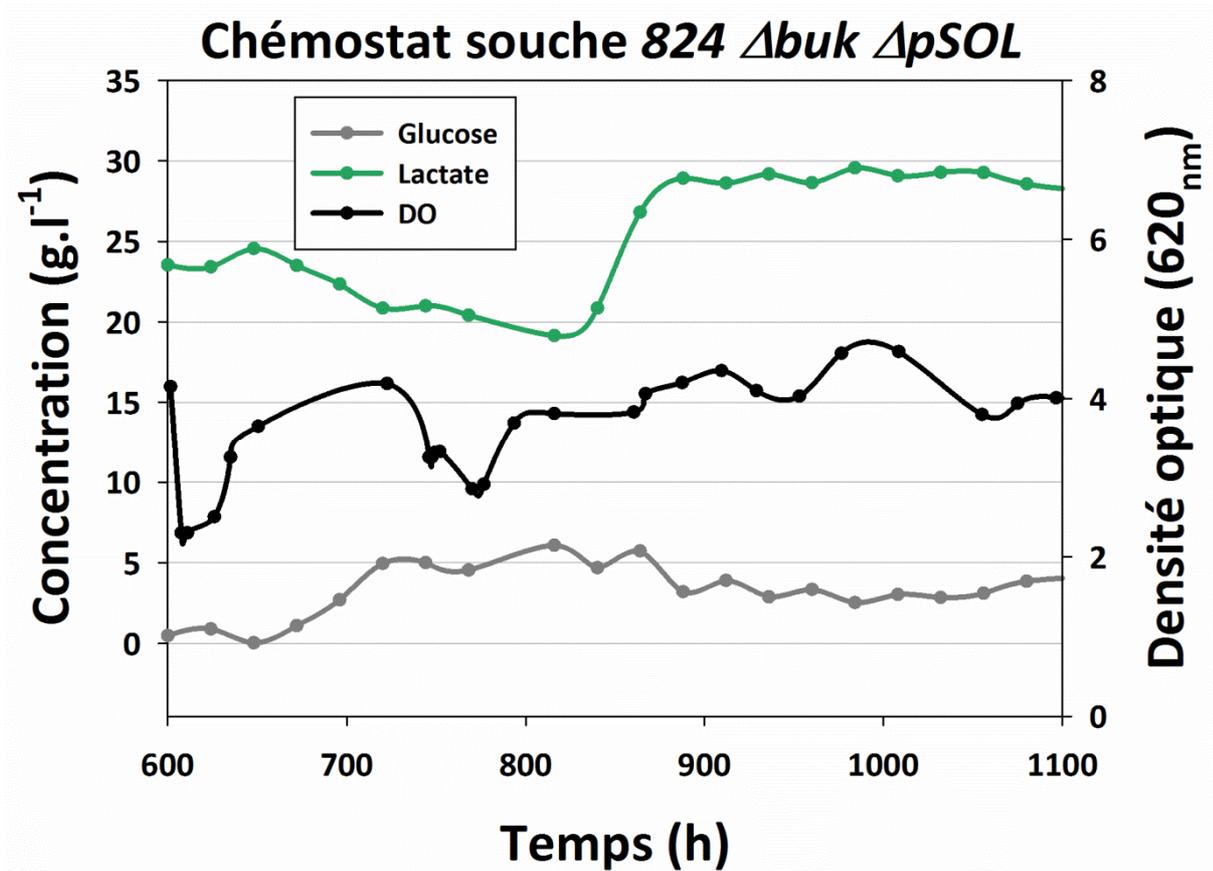
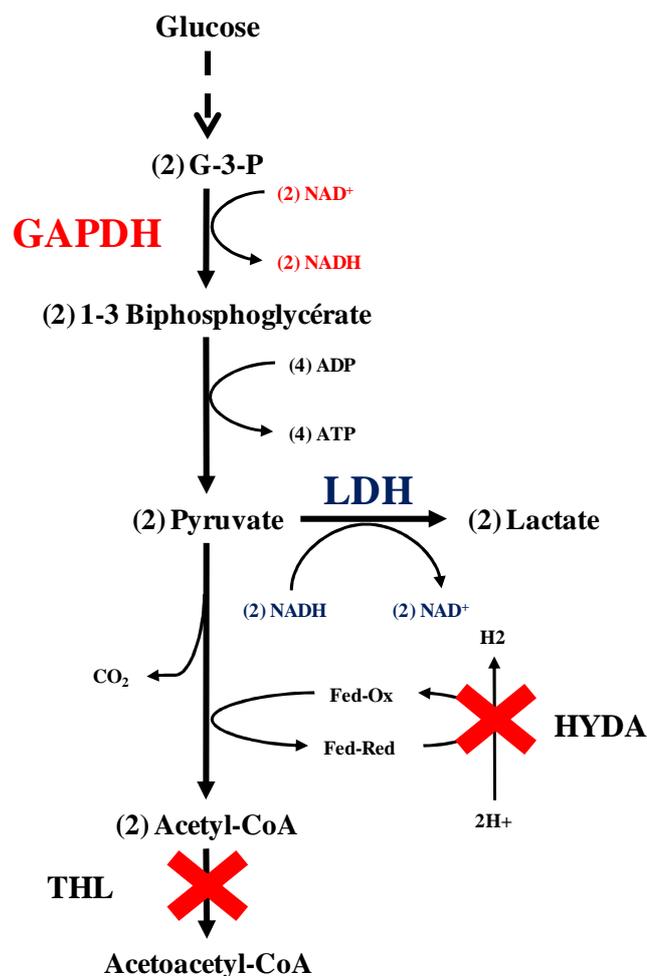


Figure 43 : Profils de fermentation de la souche 824  $\Delta buk \Delta pSOL$  en chémostat en milieu synthétique contenant 30 g.l<sup>-1</sup> de glucose.

Une fois l'état stationnaire atteinte, la production de lactate s'élève à  $29 \pm 0,34$  g.l<sup>-1</sup> pour  $29,5 \pm 0,3$  g.l<sup>-1</sup> de glucose consommé, ce qui représente un rendement de  $0,988 \pm 0,002$  g.g<sup>-1</sup>. A part une très faible production d'acétate de 0,08 g.l<sup>-1</sup>, aucun autre produit n'est formé par la souche. Un tel rendement de production de lactate s'explique par le fait que dans cette souche il s'agit de la seule voie disponible pour réoxyder le NADH produit lors de la glycolyse. Dans cette configuration, 2 NADH sont produits par la glycolyse et 2 NADH sont consommés lors de la production de 2 lactates. Cette contrainte métabolique posée par la nécessité de maintenir l'équilibre rédox rend le métabolisme très rigide et ne permet pas la production d'un autre produit (figure 44).



**Figure 44** : Schéma simplifié du métabolisme de la souche 824  $\Delta buk\Delta pSOL$  sur glucose

#### V.2.2.2. Mesure de l'activité hydrogénase présente dans la souche 824 $\Delta buk\Delta pSOL$

La souche de *C. acetobutylicum* 824  $\Delta buk\Delta pSOL$  possède un phénotype *hydA*<sup>-</sup> de par la délétion de la partie du gène *hydA* encodant le H cluster. Cette particularité unique fait de cette souche une plateforme idéale pour l'expression hétérologue d'hydrogénase.

Dans un premier temps, la souche 824  $\Delta buk\Delta pSOL$  a été analysée dans l'objectif de s'assurer que celle-ci est toujours capable de maturer correctement une hydrogénase bien étudiée dont la fonctionnalité n'est plus à prouver (l'enzyme sauvage de *C. acetobutylicum* HydA). Dans ce but, la souche a été transformée avec le plasmide *pPHyda-C-longLinker-Tag-catP-upp* exprimant le gène *hydA* de *C. acetobutylicum* sous la dépendance du promoteur pHYDA. Des mesures d'activité *in-vitro* de consommation et de production d'hydrogène ont

alors été réalisées sur des extraits totaux des souches *824 Δbuk*, *824 ΔbukΔpSOL* et *824 ΔbukΔpSOL pPHydA-C-longLinker-Tag-catP-upp* (tableau 13).

**Tableau 13** : Activités spécifiques de consommation et de production d'hydrogène mesurées sur des extraits totaux des souches *824 Δbuk*, *824 ΔbukΔpSOL* et *824 ΔbukΔpSOL pPHydA-C-longLinker-Tag-catP-upp*.

Souche	Activité spécifique (U.mg <sup>-1</sup> )	
	Consommation H <sub>2</sub>	Production H <sub>2</sub>
<i>824 Δbuk</i>	35,00 ± 4,4	Nd
<i>824 ΔbukΔpSOL</i>	0,00	0,00
<i>824 ΔbukΔpSOL pPHydA-C-longLinker-Tag-catP-upp</i>	10,56 ± 2,1	0,60 ± 0,07

Ces différents tests permettent de montrer que la souche *824 ΔbukΔpSOL* est toujours capable de maturer et de produire une hydrogénase fonctionnelle. La souche *824 ΔbukΔpSOL pPHydA-C-longLinker-Tag-catP-upp* présente une activité de consommation de l'hydrogène de 10,53 U.mg<sup>-1</sup> et une activité de production d'hydrogène de 0,6 U.mg<sup>-1</sup>. Le fait que l'activité soit néanmoins environ trois fois plus faible que dans une souche exprimant l'hydrogénase HydA à partir du chromosome seulement (souche *824 Δbuk*) est surprenant car on observe généralement une plus forte production de protéines à partir d'un plasmide multicopie qu'à partir du chromosome. On peut émettre l'hypothèse que le fait que la souche *ΔbukΔpSOL* produise toujours une forme tronquée de l'hydrogénase à partir du gène chromosomique, mobilise une partie des ressources nécessaires à la maturation de l'hydrogénase portée par le plasmide, réduisant ainsi la quantité d'enzymes actives produites.

Néanmoins, ces expériences confirment l'absence totale d'activité hydrogénase détectable dans la souche *824 ΔbukΔpSOL* et indiquent qu'elle possède toujours une machinerie de maturation fonctionnelle permettant la production d'hydrogénases actives. De ce fait, cette souche peut être utilisée pour mesurer l'activité d'hydrogénases hétérologues introduites à partir d'un plasmide par simple dosage sur extraits totaux, en s'affranchissant d'une étape de purification.

### V.2.2.3. Mesure de l'activité de la NADH hydrogénase de *T. maritima*

La première hydrogénase NADH dépendante a avoir été évaluée chez *C. acetobutylicum* à l'aide de cette méthode est l'enzyme de *T. maritima*, caractérisée par Schut and Adams, (2009). Cette enzyme étant originaire d'un organisme thermophile, il est très probable qu'elle perde une partie de son activité à 37 °C. En effet, il est connu que la structure des protéines thermostables est moins mobile à une température modérée de par la présence de résidus la stabilisant fortement pour lui permettre de résister à des températures élevées. Néanmoins cette enzyme est la seule à avoir été caractérisée et dont il a été montré que le sens physiologique de réaction est la production NADH dépendante d'H<sub>2</sub>.

Les trois gènes, organisés en opéron, codant pour l'hydrogénase de *T. maritima* (*Tm\_1424-Tm\_1426*) ont donc été amplifiés à partir de l'ADN<sub>g</sub> de *T. maritima* et introduits dans un vecteur navette *E. coli/C. acetobutylicum* sous la dépendance du promoteur *pThl*. Le plasmide *pCLF\_NADH\_hydTm* ainsi obtenu a été introduit dans la souche *824 ΔbukΔpSOL*. La souche mutante *824 ΔbukΔpSOL pCLF\_NADH\_hydTm* a ensuite été cultivée en milieu CGM-MES xylose et les cellules récoltées en fin de phase exponentielle. Des mesures de l'activité hydrogénase ont alors été effectuées sur des extraits totaux de cette souche et comparées avec les résultats obtenus avec des extraits totaux de la souche *824 ΔbukΔpSOL* (tableau 14).

Dans un premier temps, l'activité de consommation d'H<sub>2</sub> a été mesurée en présence de méthylviologène et de NAD<sup>+</sup>, par suivi de la réduction du méthylviologène à 560<sub>nm</sub>.

**Tableau 14** : Activité spécifiques de consommation d'hydrogène mesurées sur des extraits totaux des souches *824 ΔbukΔpSOL* et *824 ΔbukΔpSOL pCLF\_NADH\_hydTm*.

Souche	Activité spécifique (mU.mg <sup>-1</sup> ) Consommation H <sub>2</sub>	
	37°C	80°C
<i>824 ΔbukΔpSOL</i>	1,32 ± 0,09	27,18 ± 2,9
<i>824 ΔbukΔpSOL pCLF_NADH_hydTm</i>	228,87 ± 52	304,29 ± 46

La souche exprimant l'hydrogénase NADH dépendante de *T. maritima* présente une activité de consommation de l'hydrogène significativement plus importante que la souche contrôle sans plasmide. L'activité spécifique mesurée à 37 °C est de 230 mU.mg<sup>-1</sup>, ce qui est près de 45 fois inférieur à l'activité spécifique de l'enzyme HydA dans la souche 824 *ΔbukΔpSOL*. Cette faible activité était prévisible, étant donné qu'il est communément admis qu'une enzyme voit en moyenne son activité diminuer par 2 à chaque fois que la température baisse de 10 °C par rapport à la température optimale. Étonnamment, l'activité spécifique mesurée à la température optimale de l'enzyme (80 °C) n'est que très légèrement supérieure à celle mesurée à 37 °C. Il est possible que l'enzyme ne soit pas correctement repliée à 37 °C et que le passage à 80 °C, lors de la mesure d'activité, ne lui permette pas de retrouver sa conformation optimale. Tel qu'elle a été mesurée ici, l'activité de consommation de l'hydrogène n'apparaît pas être dépendante du NAD<sup>+</sup>, dans la mesure où l'ajout ou non de NAD<sup>+</sup> lors du test ne change pas l'activité de réduction du méthylviologène observée. Il est probable que le méthylviologène soit une molécule suffisamment petite pour aller interagir directement avec le H cluster de la NADH hydrogénase, contournant alors le mécanisme de bifurcation d'électrons.

L'activité spécifique dans le sens physiologique (production d'H<sub>2</sub>) a également été mesurée par CPG en présence de NADH, de méthylviologène et d'H<sub>2</sub>, aussi bien à 37 °C et à 80 °C, mais aucune production d'H<sub>2</sub> n'a pu être détectée.

#### V.2.2.4. Mesure de l'activité de la NADH hydrogénase d'*A. woodii*

L'activité de l'hydrogénase NAD dépendante d'*A. woodii* a également été évaluée chez *C. acetobutylicum* en utilisant la même procédure. Contrairement à l'enzyme de *T. maritima*, celle d'*A. woodii* est issue d'un organisme mésophile, ce qui fait d'elle un bon candidat pour une expression chez *C. acetobutylicum*. Cependant, seule l'activité de consommation d'H<sub>2</sub> a été caractérisée (sens physiologique de la réaction chez *A. woodii*) et aucune information n'est disponible quant à sa capacité à produire de l'hydrogène.

Les 4 gènes encodant les différentes sous-unités de l'enzyme (*hydABCD*) ont été clonés dans un vecteur navette *E. coli/C. acetobutylicum* sous la dépendance du promoteur

*pThl*. Le plasmide *pCLF\_NADH\_hydAw* ainsi obtenu a été introduit dans la souche *824 ΔbukΔpSOL*. La souche mutante *824 ΔbukΔpSOL pCLF\_NADH\_hydAw* a ensuite été cultivée en milieu CGM-MES xylose et les cellules récoltées en fin de phase exponentielle. Des mesures de l'activité hydrogénase ont alors été effectuées sur des extraits totaux de cette souche et comparées avec les résultats obtenus avec des extraits totaux de la souche *824 ΔbukΔpSOL* (tableau 15).

**Tableau 15** : Activité spécifiques de consommation d'hydrogène mesurées sur des extraits totaux des souches *824 ΔbukΔpSOL* et *824 ΔbukΔpSOL pCLF\_NADH\_hydAw*.

Souche	Activité spécifique (mU.mg <sup>-1</sup> )
	Consommation H <sub>2</sub>
<i>824 ΔbukΔpSOL</i>	0,00 ± 0,01
<i>824 ΔbukΔpSOL pCLF_NADH_hydAw</i>	277 ± 57

La souche exprimant l'hydrogénase d'*A. woodii* présente une activité de consommation d'hydrogène de 277 mU.mg<sup>-1</sup> avec le méthylviologène comme accepteur d'électrons. Schuchmann and Müller (2012) ont déterminé une activité spécifique de consommation d'H<sub>2</sub> de l'enzyme purifié de 760 U.mg<sup>-1</sup> ce qui indique qu'une très faible quantité de protéines actives est produite par *C. acetobutylicum*. Ceci pourrait être causé par un problème d'expression et de maturation de ce gros complexe tétramérique.

### V.2.3. Mise au point d'une méthode de criblage *in-vivo* de l'activité hydrogénase

La mesure *in-vitro* de l'activité spécifique d'hydrogénase permet de déterminer si l'enzyme est produite et fonctionnelle chez *C. acetobutylicum*. Cependant, cette mesure n'est pas suffisante pour déterminer avec certitude si l'enzyme est suffisamment active pour assurer la survie de la bactérie à elle seule. En effet, la suppression des voies

consommatrices de NADH (lactate, butanol et éthanol) ne pourra avoir lieu qu'une fois qu'une voie de production d'H<sub>2</sub> à partir de NADH fonctionnelle sera introduite.

A l'exception de la souche 824  $\Delta buk \Delta pSOL$ , le métabolisme de *C. acetobutylicum* dépend en grande partie de la présence de l'hydrogénase pour réguler le flux et la distribution des électrons. L'hydrogénase possède donc un rôle charnière dans le métabolisme et différentes études tendent à montrer que la suppression de cette enzyme n'est pas possible sans d'autres altérations du métabolisme (Cooksley et al., 2012). Ceci peut alors être utilisé pour le développement d'une souche dont la croissance est directement liée à la fonctionnalité d'une hydrogénase introduite à partir d'un plasmide.

#### V.2.3.1. Présentation de la souche 824 $\Delta buk hydA ::int$

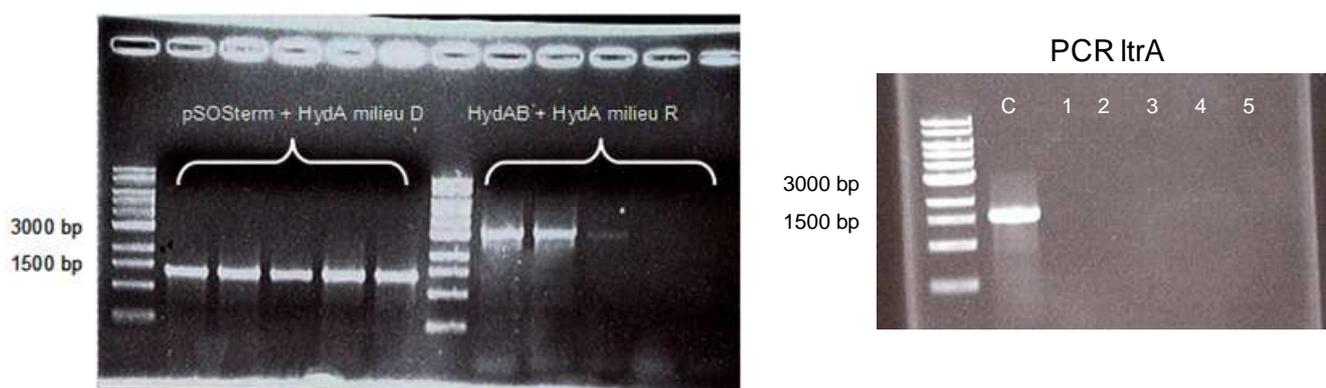
Une souche de *C. acetobutylicum* possédant un intron de type II dans le gène *hydA* a été construite dans l'équipe à l'aide de la méthode ClosTron (Heap et al., 2007) (résultats non publiés, projet Ecchymose). Le problème de l'essentialité du gène *hydA* a été contourné en introduisant l'intron sur le brin sens, ce qui permet, dans certaines conditions, la production d'une protéine fonctionnelle. En effet, le gène *ItrA*, initialement requis pour permettre l'insertion de l'élément mobile, est également en mesure d'effectuer un épissage post-transcriptionnel de l'intron si celui-ci est inséré sur le brin sens du gène ciblé. Le vecteur utilisé pour l'introduction initial de l'intron (*pCONS\_hydA ::int*) étant porteur du gène *ItrA*, la souche conserve alors la possibilité de produire une hydrogénase fonctionnelle tant qu'elle possède ce plasmide. Ce vecteur porte également le gène *upp* dont le produit est létal pour la bactérie lorsque celle-ci est cultivée en présence de 5-fluoro-uracile (5FU). Il a été démontré que la perte du plasmide *pCONS\_hydA ::int* par la souche est impossible, même en utilisant un milieu contenant du 5FU pour forcer l'élimination du vecteur (et par conséquent éliminer le gène *ItrA*) confirmant donc la nécessité d'une hydrogénase active pour assurer la viabilité de la bactérie.

Dans cette configuration, cette souche peut être utilisée comme plateforme pour sélectionner des hydrogénases capables de soutenir la croissance de *C. acetobutylicum* en complétant la perte de l'hydrogénase HydA chromosomique. La stratégie repose sur l'utilisation du 5FU pour forcer la perte du plasmide portant *ItrA*, une fois l'hydrogénase

hétérologue introduite dans la souche. La croissance ou non de la souche dans du milieu contenant du 5FU (signe de la perte du plasmide *pCONS\_hydA::int*) permet alors de déterminer la fonctionnalité ou non de l'enzyme testée.

#### V.2.3.2. Construction de la souche 824 $\Delta buk hydA ::int pTLS hydAWT$

Afin de démontrer la validité de la méthode, celle-ci a été mise en œuvre en exprimant dans un premier temps le gène *hydA* de *C. acetobutylicum* à partir d'un plasmide multicopie pour compléter l'inactivation du gène chromosomique. Le plasmide *pCONS\_hydA::int*, portant déjà les gènes de résistance à l'érythromycine (*eryR*) et au thiamphénicol (*catP*), le vecteur *pTLS\_HydA-C-long-linker-Tag* a alors été construit portant un marqueur de résistance à la tétracycline (*tetR*) et introduit dans la souche 824  $\Delta buk hydA ::int$ . La souche mutante ainsi obtenue (824  $\Delta buk hydA ::int pTLS_HydA-C-long-linker-Tag$ ) a été cultivée en milieu contenant de la tétracycline puis étalée sur boîte complétement avec de la tétracycline et du 5FU. Des clones résistants à la tétracycline et au 5FU et sensibles à l'érythromycine et au thiamphénicol ont ainsi été sélectionnés. L'analyse de leur génotype a révélé le remplacement effectif du vecteur *pCONS\_hydA::int* par le vecteur vecteur *pTLS\_HydA-C-long-linker-Tag* (figure 45).



**Figure 45 :** Contrôles PCR effectués sur la souche  $\Delta buk hydA ::intron pTLS_hydA$ . pSOSterm + hydA milieu D : PCR spécifique du vecteur *pTLS\_hydA-C-long-linker-Tag*, taille attendue de 1323 bp. HydAB+HydA milieu R : PCR spécifique du gène *hydA* chromosomique, taille attendue avec intron de 3102 bp, taille attendue sans intron de 2153 bp. ItrA : PCR spécifique du gène *ItrA* sur le plasmide *pCONS\_hydA::int*, c : contrôle positif, taille attendue de 1498 bp .

Ces résultats indiquent que la perte du plasmide *pCONS\_hydA::int*, entraînant une inactivation totale du gène chromosomique *hydA*, est effectivement possible à condition qu'une hydrogénase fonctionnelle soit exprimée à partir d'un plasmide dans la souche.

#### V.2.3.3. Expression de la NADH hydrogénase de *C. beijerinckii* NCIMB 8052

La souche 824  $\Delta$ *buk\_hydA::int* a finalement été utilisée pour évaluer la fonctionnalité *in-vivo* d'une hydrogénase NADH dépendante putative, identifiée sur le génome de *C. beijerinckii* NCIMB8052. En effet, l'analyse bioinformatique du génome de cette bactérie a révélé la présence d'un opéron composé de 3 gènes présentant des homologues avec l'hydrogénase de *T. maritima*. Les gènes *Cbei\_4110*, *Cbei\_4111* et *Cbei\_4112* codent pour trois protéines ayant respectivement 35, 50 et 41% d'identités avec les sous-unités  $\alpha$  (Tm\_1424),  $\beta$  (Tm\_1425) et  $\gamma$  (Tm\_1426) de l'hydrogénase NADH dépendante de *T. maritima* (figure 46).

Sous unité α :

	Section 1					
	(1)	10	20	30	40	55
Tm_1424	(1)	-MKIYVDGREV	IINDNERN	LEALKNV	GIEIPNLCYL	SEASTYGACRMCLVEIN-
Cbei_4110	(1)	MSKYMVIDGNR	IEFDKKNILL	LVRKAGIDLPT	LCYYTDL	SVYGACRMCLVDER
	Section 2					
	(56)	70	80	90	100	110
Tm_1424	(54)	GQITTSCTL	KPYEGMKV	TNTPETI	YEMRRNILEL	ILATHNRDCTTCDRNGSCKLQ
Cbei_4110	(56)	GSILTSCSTP	PKMMSIR	TNTPKIQKYR	KVILELLLATH	CRDCTICEKNGKCKLQ
	Section 3					
	(111)	120	130	140	150	165
Tm_1424	(109)	KYAEDFGIR	KIRPEAIK	-KEHV	RDESAPVVR	DTSKCILCGDCVRCBEIQGVGVI
Cbei_4110	(111)	KLASRFGLT	NIRPKSIEG	KDLDTSSKS	IIRDPNKCIL	CGDCVRCNEIQSVGAI
	Section 4					
	(166)	180	190	200	210	220
Tm_1424	(163)	EFAKRGFES	VVTAFDTP	LIETECV	LCGQCVAYCPT	GALSIRNDIDKIEAL
Cbei_4110	(166)	DFANRGSNM	VVSPAFGKS	LAETDCV	NCGQCATVCPT	GALIVKSDIKNWKAIYNH
	Section 5					
	(221)	230	240	250	260	275
Tm_1424	(218)	KI-VIGMI	IAPAVRAA	IQE	EPGIDEDV	MAEKLV
Cbei_4110	(221)	KQRVIAQ	VAPAVRVA	IG	EEPGIKP	GENVMGK
	Section 6					
	(276)	290	300	310	320	330
Tm_1424	(272)	YEEAHEP	YERLKKGS	-RLPQ	FTSCCPAWV	KHAEHTYPQYLQNLSSVKSPQQALGT
Cbei_4110	(276)	IEESKEFL	KKLESDN	KPFL	TSCCPAWVRY	VENKYTELTPYVSSCKSPMEMFGS
	Section 7					
	(331)	340	350	360	370	385
Tm_1424	(326)	VTKKIYAR	KLGVP	EKEIPL	VSFMP	PCTAKKFEA
Cbei_4110	(331)	VVKAYFKE	KDSEN	RETISVA	VMP	PCTAKKAEA
	Section 8					
	(386)	400	410	420	430	440
Tm_1424	(377)	QLIKMSRI	DINRVE	PQPFDR	PYGVSSQ	AGLGF
Cbei_4110	(386)	AMIK	EIGIQ	FDEIE	AASDIB	LSLYSGAGVIF
	Section 9					
	(441)	450	460	470	480	495
Tm_1424	(432)	DVKS----	PEDGIR	VAEVT	LKDGTS	SFKGAVI---YGLGKVKKFL
Cbei_4110	(441)	KDIE	FIGVRG	MKGV	RTCEIQ	KDESIRIGIV
	Section 10					
	(496)	510	520	530	540	550
Tm_1424	(479)	VMACNYG	CVGGG	QPPV	PNDSRI	EHRAKVL
Cbei_4110	(496)	VMAC	PGGCI	AAGQ	PPGLM	BEKNERAKGL
	Section 11					
	(551)	560	570	580	590	605
Tm_1424	(534)	LKDEHTR	HEILH	TTYR	PRRRY	PEKDVEILPVPNGEKRTVKVCLGT
Cbei_4110	(550)	LKNR--	TKEL	LHVH	YDK	SEH-----
	Section 12					
	(606)	620	630	640	650	660
Tm_1424	(589)	LKKLV	DYVK	END	MEGKIE	VLGTF
Cbei_4110	(568)	-----	-----	-----	-----	-----
	Section 13					
	(661)	<u>662</u>				
Tm_1424	(644)	NG				
Cbei_4110	(568)	--				

## Sous unité $\beta$ :

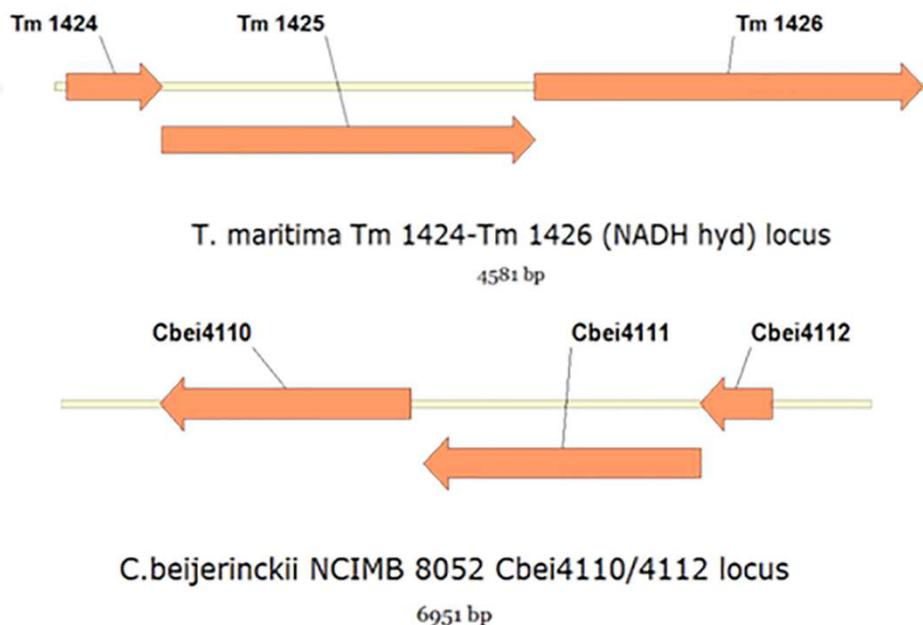
		Section 1																
	(1)	1	10	20	30	40	55											
Tm_1425	(1)	-MFKNAK	EFVQYAN	KLKTLREK	KLNGVS	IYVCVGTGCTAKGALKVYSA	FEELKK											
Cbei_4111	(1)	MRINTRE	ELNDISS	KYKAALVR	QRK--QILVCA	GTGCVAGGSLNIYRR	FKEILKE											
		Section 2																
	(56)	56	70	80	90	100	110											
Tm_1425	(55)	RNLLGQVTL	-BKIDDDKVT	LNRTGCCGR	CSSGPIVK	IMPYRFFYSNV	APEDVPEI											
Cbei_4111	(54)	KGLEVTLEL	KBEPHDNT	IGLKKSG	CHGFC	CEMGLIRIE	PEGWLYIKVSI	DDCEEI										
		Section 3																
	(111)	111	120	130	140	150	165											
Tm_1425	(109)	VDRTVLKGE	PIERLFLTD	PPLTGEKVP	RIEDTTLF	KNQDFYIMEAI	GESECD	SIED										
Cbei_4111	(109)	IEKSIIIGNE	EVVTVGL	LSYKD--	GDKLYSK	QEDIPFYKK	QTRVALN	NCGHINA	ESIEE									
		Section 4																
	(166)	166	180	190	200	210	220											
Tm_1425	(164)	YIARSGYES	LVKALTSMT	PBEIIE	ETVKASGLR	GRGGGFP	TGLKWF	FTRKAQ	GDI									
Cbei_4111	(162)	YLAEGGYS	ATTKALFDM	TSEBIIE	NEWSEAH	LRRGRGGG	FPTGKKW	QVLKQ	TESE									
		Section 5																
	(221)	221	230	240	250	260	275											
Tm_1425	(219)	KFVVCNGDE	GDGPGAFM	NRTLLER	DRDPHLV	LEGMI	IAGYAVGA	QKGYAYI	RAEY	PFA								
Cbei_4111	(217)	KYIVCNGDE	GDGPGAFM	DRSMME	GNPHGV	LEGMI	IAGIATK	AHNGYIY	VRAEY	PLA								
		Section 6																
	(276)	276	290	300	310	320	330											
Tm_1425	(274)	VKMFKKAIE	DARKLGLL	GENILGT	GFSDLE	VKEGAGAF	VCGEET	TALLAS	IEGKR									
Cbei_4111	(272)	VKRLRIAIE	QAMEKGLL	GDNILNS	GFDFHI	QINQGAGAF	VCGEGS	ALTAS	IEGNR									
		Section 7																
	(331)	331	340	350	360	370	385											
Tm_1425	(329)	GMPPPKPP	FPAQSGLW	GKPTLIN	NNVET	YANIPRI	ILRDGV	ENYRKR	GTEN	SPG	TKM							
Cbei_4111	(327)	GMPPRVKPP	RTVEQGLF	GKPTVL	NNVET	FCNVSP	ILNKGV	HWYKTM	GTEN	NYG	TKA							
		Section 8																
	(386)	386	400	410	420	430	440											
Tm_1425	(384)	PSVAGPLKA	TGTEIE	VEFGTTL	RDIIYNIC	GGFVVE	GE	EFKAVQ	IGG	PSGA	CLS--E							
Cbei_4111	(382)	FALTG	NVNTGL	IEVPM	GTTLRK	IIFDI	-GGV	KGE	EFKAVQ	IGG	PSGC	CLCLRE						
		Section 9																
	(441)	441	450	460	470	480	495											
Tm_1425	(437)	DFIDMPLDY	DTLKK	ADAMV	GSGGI	VVITKKT	CMVE	VARFF	LDFT	KRE	SCGK	CVPC						
Cbei_4111	(436)	NHLDLTLD	FDLSL	KVGA	MIGSGG	LVV	MNDKN	CMVE	MARFF	MNFT	QNE	SCGK	CIPC					
		Section 10																
	(496)	496	510	520	530	540	550											
Tm_1425	(492)	REGTMQAYN	ILEKFT	HGKATY	EDLKTLE	HLDSK	TIKTAS	LCGLG	KTAPN	PI	LSTL	K						
Cbei_4111	(491)	REGTRRM	LEILNDI	VEGK	GLDDID	TLEELA	ETIS	DTAL	CGLG	KS	AAPP	V	STLR					
		Section 11																
	(551)	551	560	570	580	590	605											
Tm_1425	(547)	LFRREYIA	HT-EGE	CPSGM	CTAFK	KYVIN	FDIC	KGCGL	CARS	CP	QNAIT	GER	GK					
Cbei_4111	(546)	YFRLE	YIEHV	VDDK	C	SGVCK	SLISYE	IDK	KCRG	C	SKC	ANG	CP	VE	AIT	G	IK	KP
		Section 12																
	(606)	606	620	631														
Tm_1425	(601)	YTIDQE	KCVK	CGLC	ASKC	PP	KAI	ELV										
Cbei_4111	(601)	YVIDKS	KCIK	CGNC	IEG	CV	F	KAI	RV									

### Sous unité $\delta$ :

	Section 1					
	(1) 1	10	20	30	40	55
Tm_1426	(1) ---MERHFEKVEEILKKGYYKRENLIKILLEIQEIYRYLPEDVINYVSTAMGIP					
Cbei_4112	(1) MIMVNQKEIKKLLDDILISNNYDKTQIITIMQEIQKEYRYLPEDALCYIAKEIKIS					
	Section 2					
	(56) 56	70	80	90	100	110
Tm_1426	(52) PAKIYGVATFYAQP SLKPKGKYTIMVCDGTACHMAGSPEVLKAIEEETGLTPGNV					
Cbei_4112	(56) EAKVYGVATFYENPSLEPKGKYVIRICDGTACHVRKSDPI LSEPKSELGLSEKKL					
	Section 3					
	(111) 111	120	130	140	150	165
Tm_1426	(107) T-EDLMFSLDQVGC LGACALAPVMVINGEVYGNLTADKVKELRKEKERESAN					
Cbei_4112	(111) TTDDMHFTVETVSC LGACGLAPVCTVNDVVYPSMTPEKARKLVKQLKEELSNEN-					
	Section 4					
Tm_1426	(166) <del>366</del>					
Cbei_4112	(165) -					

**Figure 46** : Comparaison des séquences en acides aminés des hydrogénases NADH dépendantes de *T. maritima* et de *C. beijerinckii* NCIMB8052.

Tout comme les gènes *Tm\_1424-Tm\_1426*, les ORFs *Cbei\_4110-Cbei\_4112* sont organisés en opéron au sein duquel les deux premiers gènes forment une fusion transcriptionnelle (figure 47).



**Figure 47** : Organisation génétiques des opérons *Tm\_1424-Tm\_1426* et *Cbei\_4110-Cbei\_4112* sur les génomes de *T. maritima* et *C. beijerinckii* NCIMB8052.

Si l'opéron *Cbei\_4110-Cbei\_4112* code effectivement pour une hydrogénase NADH dépendante, les probabilités que celui-ci soit correctement transcrit et traduit chez *C. acetobutylicum* sont élevées de par les fortes similitudes qui existent entre ces deux organismes (même pourcentage GC, usage de codon similaire, organismes proches d'un point de vue phylogénétique...).

Les gènes *Cbei\_4110-Cbei\_4112* ont donc été amplifiés à partir de l'ADN<sub>g</sub> de *C. beijerinckii* NCIMB8052 et introduits dans un vecteur d'expression pour *C. acetobutylicum* sous la dépendance du promoteur *pThl*. Le vecteur *pTLS\_NADH\_hyd8052* ainsi construit a été introduit dans la souche *824 Δbuk\_hydA::int*. Une fois la souche mutante *824 Δbuk\_hydA::int pTLS\_NADH\_hyd8052* obtenue, celle-ci a été cultivée en milieu contenant de la tétracycline puis étalée sur boîte supplémentée en tétracycline et en 5FU. Malgré de nombreuses tentatives, aucun clone résistant au 5FU et sensible à l'érythromycine et au thiamphénicol n'a été isolé. Ceci semble indiquer que l'hydrogénase NADH dépendante putative de *C. beijerinckii* n'est pas en mesure de compléter la perte de l'enzyme HydA et n'est pas (ou pas suffisamment) active pour assurer la croissance de la bactérie à elle seule.

#### V.2.4. Discussion

Les travaux présentés ici décrivent la mise au point de deux plateformes permettant l'évaluation, aussi bien *in-vivo* qu'*in-vitro*, de la fonctionnalité d'hydrogénase chez *C. acetobutylicum*. Ces outils ont été utilisés pour évaluer la fonctionnalité de différentes hydrogénases NADH dépendantes et représentent la première tentative, rapportée à ce jour, d'expression hétérologue de cette nouvelle classe d'enzymes utilisant la bifurcation d'électrons. Les résultats obtenus sont encourageants et laissent entrevoir la perspective d'utiliser un jour ce type d'enzyme pour la production d'hydrogène chez *C. acetobutylicum*. En effet, deux des hydrogénases testées présentent une activité *in-vitro* chez *C. acetobutylicum*. Néanmoins, des expérimentations complémentaires seront indiscutablement à conduire afin de s'assurer que cette activité est toujours détectée en présence de ferrédoxine (partenaire naturel de l'enzyme) comme accepteur/donneur d'électron, et que celle-ci est effectivement dépendante du NAD(H).

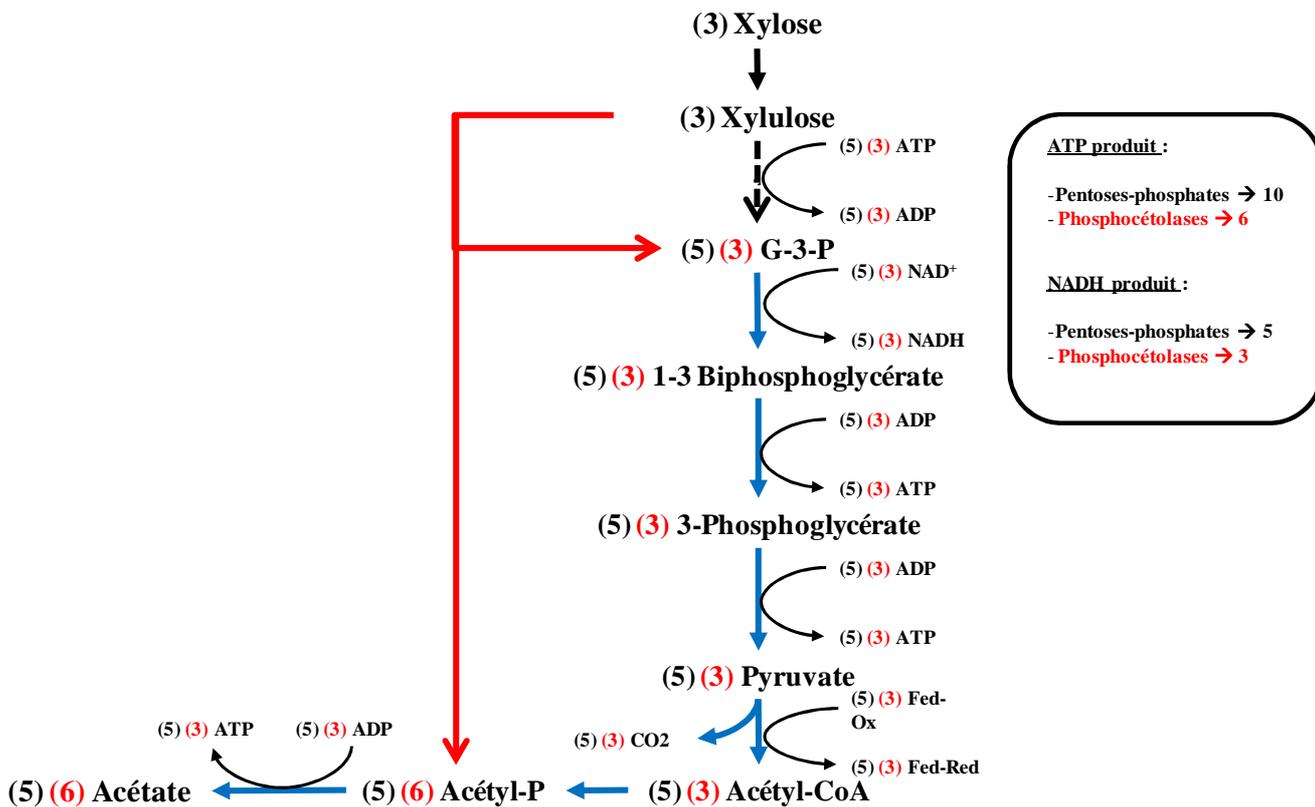
L'implémentation chez *C. acetobutylicum* d'une hydrogénase capable de coupler la consommation de NADH avec la production d'H<sub>2</sub> ouvre la voie pour la production de nombreux composés chez cet organisme dans la mesure où elles permettent de réguler la disponibilité en équivalents réduits en fonction des besoins propres à la production du produit considéré. Bien que le mécanisme de ces enzymes soit encore largement incompris, le nombre grandissant d'études récemment entreprises à leur sujet suggère que de nouvelles découvertes viendront prochainement faciliter leur utilisation dans des systèmes tels que ceux envisagés dans cette étude.

### V.3. Utilisation de la voie des phosphocétolases

Comme nous l'avons vu précédemment, une des solutions possibles pour répondre aux problèmes posés par la production d'isopropanol comme mono-produit est l'utilisation d'une voie métabolique de prise en charge de la source de carbone alternative, ne produisant pas ou peu d'équivalents réduits.

En 2012, Liu et al., mettent en évidence l'existence d'une voie catabolique d'utilisation du xylose chez *C. acetobutylicum* par le biais d'une phosphocétolase. Cette voie des phosphocétolases convertit le xylulose-5-P en acétyl-P et glycéraldéhyde-3-P. L'acétyl-P est alors converti en acétate, par l'action d'Ack, avec génération d'un ATP ou en acétyl-CoA par l'intermédiaire de Pta. Le glycéraldéhyde-3-P est quant à lui converti en pyruvate avec production d'un équivalent réduit (figure 48).

Même si la voie des phosphocétolases est, énergétiquement parlant, moins performante que la voie des pentoses-phosphates, elle présente l'intérêt de produire moins de NADH. En effet, seulement un NADH est généré par l'action de la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase dans la voie des phosphocétolases contre 1,7 dans la voie des pentoses-phosphates.

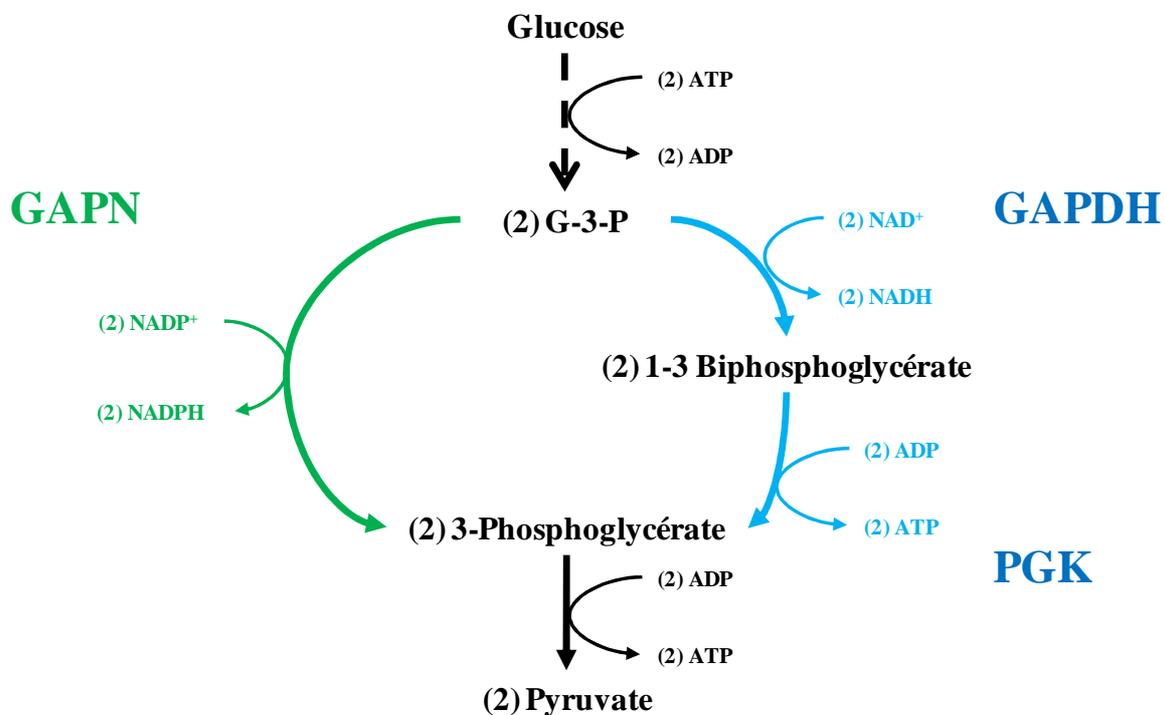


**Figure 48** : Représentation schématique de la voie des pentoses-phosphate (noir) et de la voie des phosphocétolases (rouge).

Néanmoins, ce NADH, produit par la voie des phosphocétolases, ne peut toujours pas être pris en charge par la voie de l'isopropanol et la balance rédox reste en déséquilibre. Au contraire, la voie de l'isopropanol nécessite un NADPH pour réaliser la réduction de l'acétone. Il serait alors théoriquement possible d'équilibrer la balance électronique en utilisant une voie des phosphocétolases, modifiée pour produire un NADPH par xylose consommé.

Certains organismes, comme *Streptococcus mutans*, qui ne possèdent pas le shunt de la glycolyse permettant la génération de NADPH par la voie des pentoses-phosphates, utilisent une glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase non phosphorylante (GAPN) pour la production de NADPH (Boyd et al., 1995). Cette enzyme catalyse la conversion du glycéraldéhyde-3-P en 3-phosphoglycérate avec production d'un NADPH. Elle remplace alors la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) et la phosphoglycérate kinase (PGK) qui réalisent la même réaction en deux étapes successives avec production d'un NADH

et d'un ATP (figure 49). L'utilisation d'une telle enzyme chez *C. acetobutylicum* pourrait alors permettre la génération de NADPH par la voie des phosphocétolases.

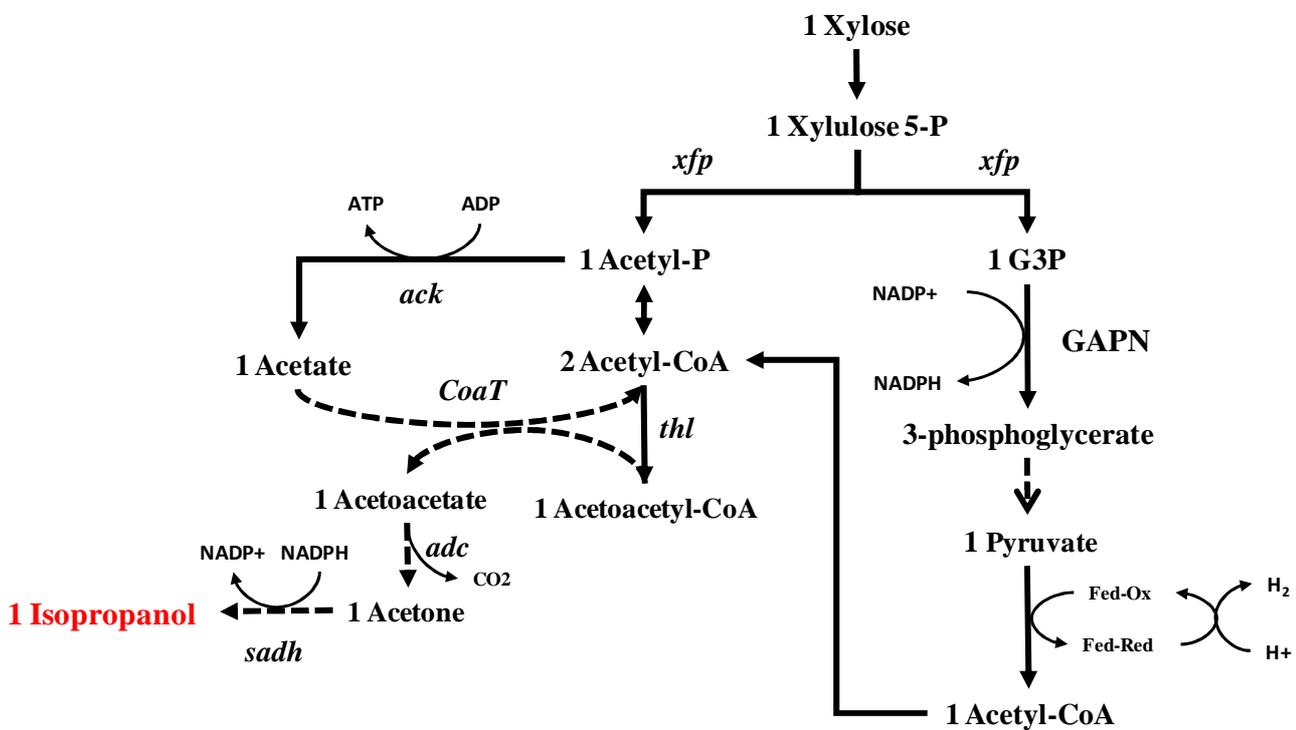


**Figure 49 :** Représentation schématique de la glycolyse utilisant la GAPDH (bleu) et de la glycolyse utilisant la GAPN (vert).

En 2002, Iddar et al ont mis en évidence l'existence d'un gène codant pour une glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase non phosphorylante sur le génome de *C. acetobutylicum*. Le gène *gapN* (ORF *cac3657*) encode une protéine homotrémérique de 240 kDa présentant une activité glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase strictement dépendante du NADP<sup>+</sup>. Les auteurs l'expriment alors chez *E. coli* et la purifient afin de déterminer ses paramètres cinétiques. L'enzyme GapN de *C. acetobutylicum* présente une activité spécifique de 78,8 U.mg<sup>-1</sup> et un Km pour le NADP et le G3-P respectivement de 0,2 et 0,55 mM. Ils ne détectent néanmoins qu'une faible activité GapN de 0,013 U.mg<sup>-1</sup> dans des extraits bruts de *C. acetobutylicum* contre 1,1 U.mg<sup>-1</sup> pour l'activité Gapdh. Cette constatation les amène à penser que le gène *gapN* est peu exprimé chez *C. acetobutylicum* dans des conditions classiques de culture et que la Gapdh est majoritairement impliquée dans la glycolyse. Néanmoins, l'expression du gène *gapN* à partir d'un plasmide chez *E. coli*

induit une augmentation d'un facteur 170 de l'activité mesurée sur extrait brut indiquant qu'il est possible de fortement surexprimer cette enzyme.

La mise en place d'une stratégie d'ingénierie métabolique de *C. acetobutylicum* permettant la métabolisation du xylose par le biais d'une version modifiée de la voie des phosphocétolases, utilisant l'enzyme GapN, devrait en théorie permettre la déletion de la voie du butanol/éthanol et l'obtention d'une souche de *C. acetobutylicum* produisant l'isopropanol comme unique produit de fermentation.



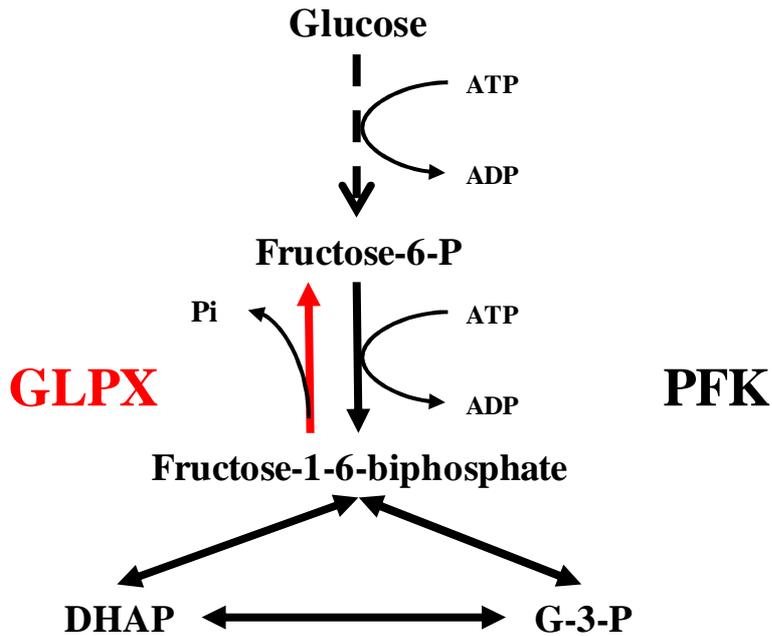
**Figure 50** : Voies métaboliques de production d'isopropanol à partir de xylose par le biais de la phosphocétolase et de la glycéraldéhyde-3-P non phosphorylante.

L'implémentation d'un métabolisme du xylose basé sur la voie des phosphocétolases, tel qu'il est décrit dans la figure 50, présente également l'avantage d'augmenter le rendement maximal théorique de production d'isopropanol par rapport à un métabolisme uniquement basé sur la voie des pentoses-phosphate. La voie des pentoses-phosphate produit pour 1 mole de xylose consommée,  $\frac{5}{3}$  de mole d'acétyl-CoA, soit  $\frac{5}{6}$  de mole d'isopropanol ( $\pm 0,83$  mole), ce qui représente un rendement théorique maximal de 0,33 g.g<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>. La voie des phosphocétolases produit, quant à elle, 2 moles d'acétyl-CoA, soit 1 mole d'isopropanol, ce qui représente un rendement théorique maximal de 0,4 g.g<sup>-1</sup>. Cette augmentation du rendement s'explique par le fait que, comme le montre la figure 48, la voie des phosphocétolases permet de diminuer de 20% la production de CO<sub>2</sub> ce qui représente un gain de carbone non négligeable.

Dans cette configuration, la moitié du CO<sub>2</sub> produit lors de la conversion du xylose en isopropanol est imputable à la Pfor, qui réduit le pyruvate en acétyl-CoA. La seconde moitié est liée à la décarboxylation de l'acétoacétate en acétone. En considérant que la phosphocétolase est également capable de catalyser la conversion du fructose-6-P en acétyl-P et érythrose-4-P (Liu et al., 2012), il est possible d'envisager un métabolisme du xylose où le glycéraldéhyde-3-P initialement produit par la phosphocétolase est converti en fructose-6-P et repasse une seconde fois par la phosphocétolase générant alors un acétyl-CoA supplémentaire sans production de CO<sub>2</sub>. Un tel métabolisme implique alors d'être en mesure de faire remonter, au glycéraldéhyde-3-P une partie de la glycolyse, et à l'érythrose-4-P une partie de la voie des pentoses-phosphates.

Lors de la glycolyse, le fructose-6-P est converti en fructose-1-6-biphosphate par la phosphofruktokinase. Le fructose-1-6-biphosphate est à son tour converti en deux glycéraldéhydes-3-P par l'action combinée d'une aldolase et d'une triosephosphate isomérase. Si les réactions catalysées par l'aldolase et la triosephosphate isomérase sont réversibles, celle réalisée par la phosphofruktokinase ne l'est pas. Néanmoins, il existe une enzyme, la fructose-1-6-biphosphatase capable d'hydrolyser le fructose-1-6-biphosphate en fructose-6-P (figure 51) et qui est impliquée dans la gluconéogenèse chez de nombreux organismes. *C. acetobutylicum* possède lui aussi un gène nommé *glpX* codant pour une fructose-1-6-biphosphatase (GLPX) et dont l'activité a été démontrée (Abdullah, 2012).



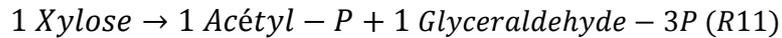
**Figure 51** : Conversions de fructose 1-6-biphosphate en fructose-6-P par la fructose-1-6-biphosphatase (GLPX).

Si l'on considère les réactions suivantes :

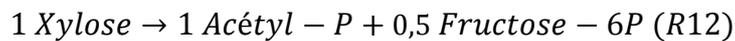
- Glycolyse :
  - $Fructose - 1 - 6 - biP \rightarrow DHAP + Glyceraldehyde - 3P$  (R1)
  - $DHAP \rightarrow G - 3P$  (R2)
- Gluconéogenèse :
  - $Fructose - 1 - 6 - biP \rightarrow Fructose - 6P$  (R3)
- Phosphocétolase :
  - $Xylulose - 5P \rightarrow Acetyl - P + Glyceraldehyde - 3P$  (R4)
  - $Fructose - 6P \rightarrow Acetyl - P + Erythrose - 4P$  (R5)
- Pentoses-phosphates :
  - $Xylose \rightarrow Xylulose - 5P$  (R6)
  - $Xylulose - 5P \rightarrow Ribose - 5P$  (R7)
  - $Ribose - 5P + Xylulose - 5P \rightarrow Glyceraldehyde - 3P + sedoheptulose - 7P$  (R8)
  - $Glyceraldehyde - 3P + sedoheptulose - 7P \rightarrow Erythrose - 4P + Fructose - 6P$  (R9)
- Voie de l'acétate :
  - $Acétyl - CoA \rightarrow Acétyl - P$  (R10)

Le métabolisme suivant peut être envisagé :

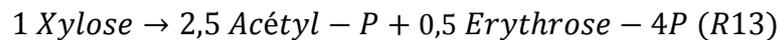
(R6) + (R4) :



(R11) + (R3) :



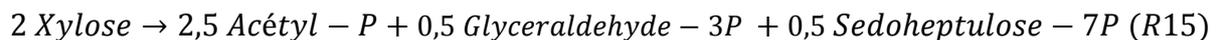
(R12) + (R5) :



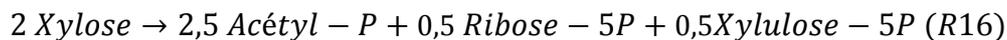
(R13) + (R11) :



(R14) + (R9) rev :



(R15) + (R8)rev :



(R16) + (R7) + (R6) :

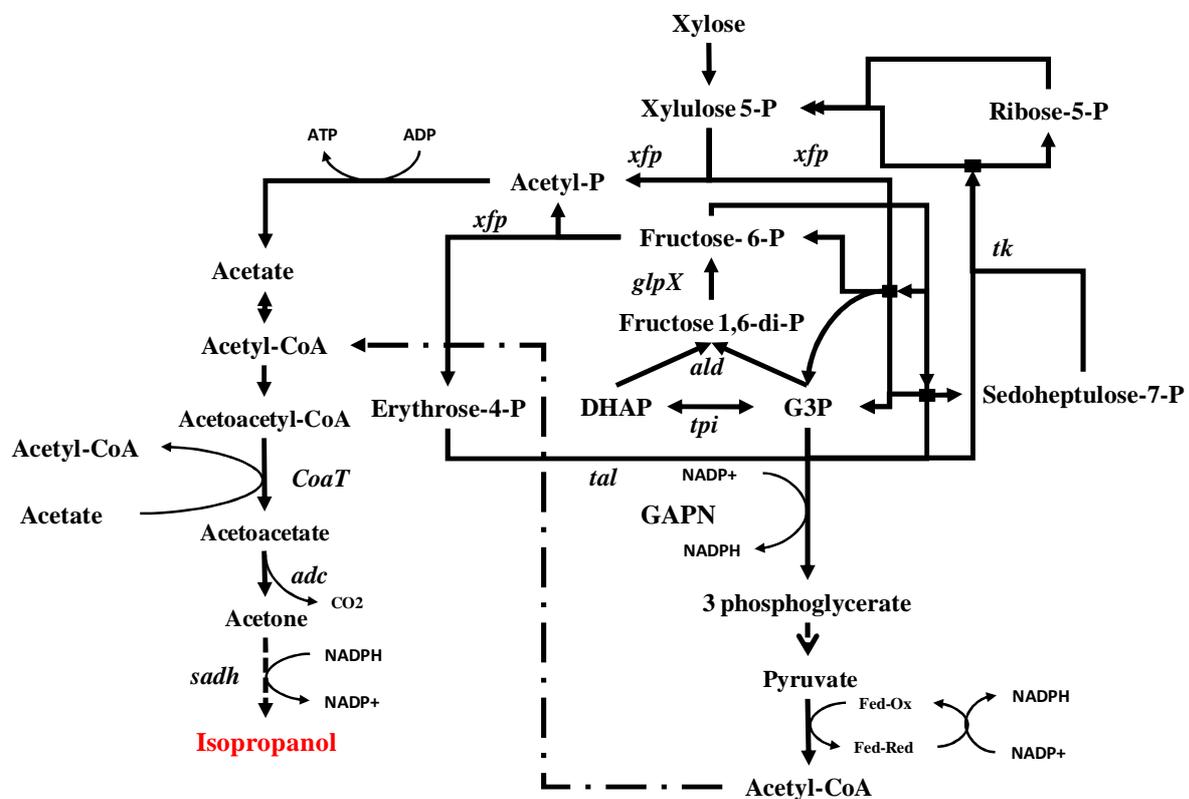


(R17) + (R10) :



Avec ce métabolisme, il est possible de produire 2,5 acétyl-CoA par xylose sans accumuler d'intermédiaires réactionnels et sans production d'équivalent réduit. Néanmoins, pour pouvoir produire de l'isopropanol, il faut que la balance rédox soit équilibrée. Pour cela, une partie de l'acétyl-CoA doit provenir de la voie des pentoses-phosphates « classique » de manière à ce qu'il y ait production de NADPH. Le calcul de la répartition du flux de carbone entre ces deux voies indique que la balance rédox est à l'équilibre si les  $\frac{2}{3}$  du xylose sont pris en charge par la voie des phosphocétolases tandis que le tiers restant passe par la voie des pentoses-phosphates. Un NADPH doit alors être produit par GAPN lors de la

conversion du glycéraldéhyde-3P en 3-phosphoglycérate et un deuxième NADPH doit être produit lors de la conversion du pyruvate en acétyl-CoA par le couple Pyruvate-ferrédoxine oxydoréductase/NADP-ferrédoxine oxydoréductase (figure 52).



**Figure 52** : Voies métaboliques de production d'isopropanol à partir de xylose par le biais de la phosphocétolase, de la glycéraldéhyde-3-P non phosphorylante et de la fructose-1-6-biphosphatase.

Dans ces conditions, la production de CO<sub>2</sub> diminue de 10% supplémentaire et le rendement théorique maximal de production d'isopropanol s'élève à 0,44 g.g<sup>-1</sup>. Ceci représente une augmentation de 35% du rendement de production d'isopropanol à partir de xylose par rapport à un métabolisme basé uniquement sur la voie des pentoses-phosphates.

Un métabolisme similaire a très récemment été implémenté avec succès chez *E. coli* et permet la production de 2,2 moles d'acétate (d'acétyl-CoA) par mole de xylose consommée (Bogorad et al., 2013).

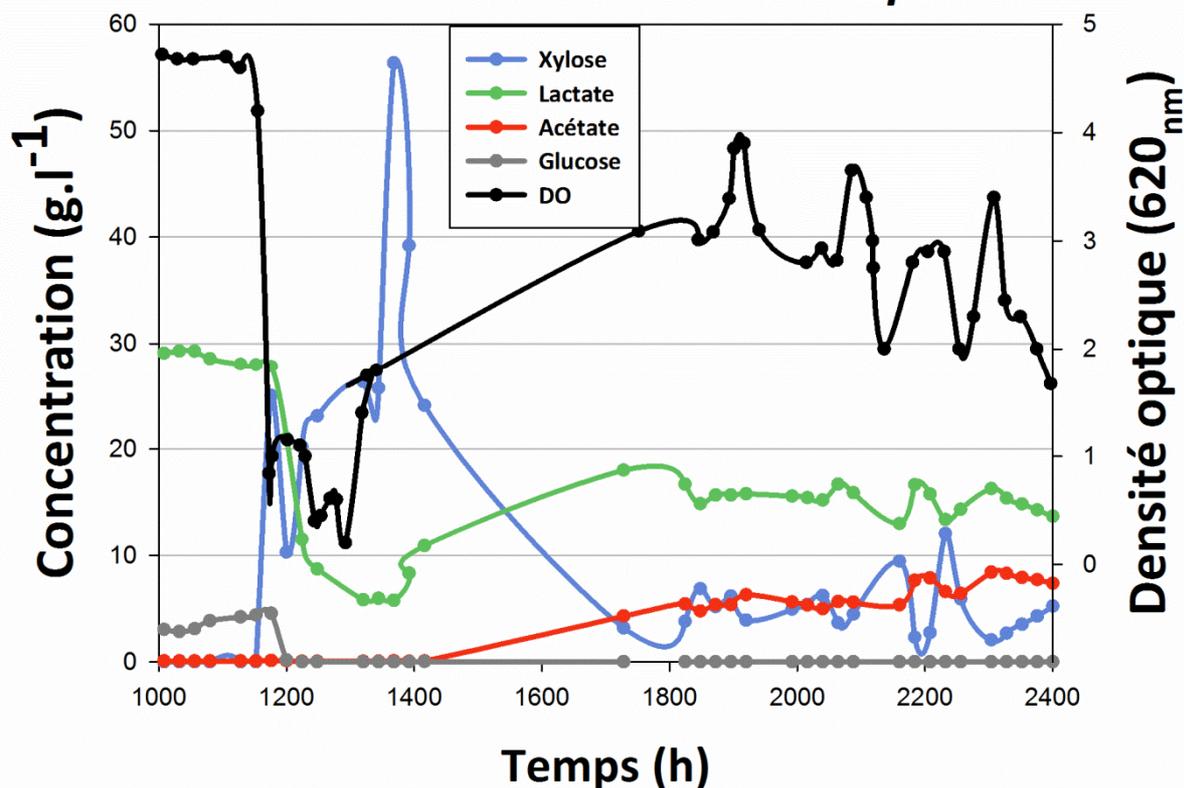
L'utilisation de la voie des phosphocétolases pour la production d'isopropanol à partir de xylose semble donc être une alternative avantageuse, aussi bien pour maintenir l'équilibre des cofacteurs réduits que pour maximiser le rendement de production. La mise en place d'un métabolisme de ce type chez *C. acetobutylicum* a donc été entreprise.

### V.3.1. Adaptation du métabolisme de la souche 824 $\Delta buk\Delta pSOL$ sur xylose

La souche 824  $\Delta buk\Delta pSOL$  présente un métabolisme intéressant pouvant servir de point de départ pour le développement d'une souche productrice d'isopropanol. En effet, la délétion du gène *buk* et la perte du mégaplasmide *pSOL* rendent impossible la production de butyrate, de butanol et d'éthanol. Néanmoins, la stricte corrélation entre la consommation du glucose et la production de lactate rend impossible, en l'état, la mise en place de la voie de l'isopropanol dans cette souche. Cependant, comme nous l'avons vu précédemment, ce problème peut être contourné si la souche est en mesure de consommer du xylose en utilisant la voie des phosphocétolases telle qu'elle est décrite dans la partie V.3 (figure 50).

Afin d'évaluer si la souche 824  $\Delta buk\Delta pSOL$  est capable de se développer sur xylose et de déterminer la voie métabolique utilisée pour dégrader ce substrat, des cultures fioles en milieu MS contenant du xylose comme unique source de carbone ont été réalisées. Dans ces conditions de culture, la souche 824  $\Delta buk\Delta pSOL$  a des difficultés à se développer et seule une très faible croissance est observée. Néanmoins, le fait que la croissance ne soit pas nulle, permet d'envisager la possibilité d'adapter progressivement la souche à ce nouveau substrat et ainsi atteindre une croissance similaire à celle observée sur glucose. Dans ce but, la souche 824  $\Delta buk\Delta pSOL$  a alors été cultivée en chémostat, initialement sur glucose (30 g.l<sup>-1</sup>), puis sur un mélange glucose/xylose (glucose 5 g.l<sup>-1</sup> et xylose 25 g.l<sup>-1</sup>) et enfin sur xylose seul (30 g.l<sup>-1</sup>) (figure 53).

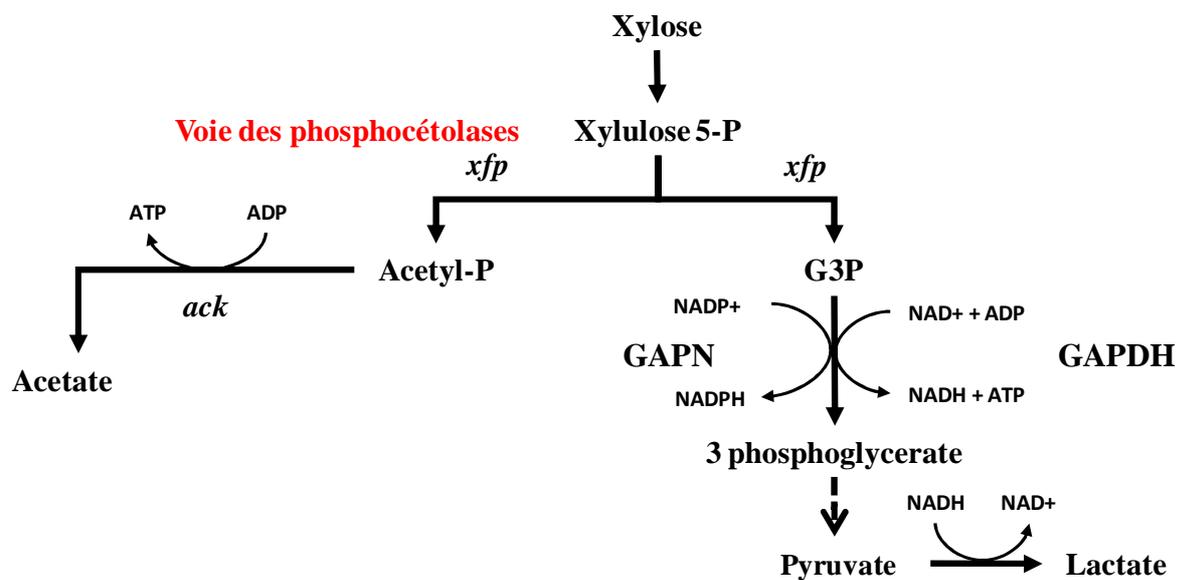
## Chémostat souche 824 $\Delta buk \Delta pSOL$



**Figure 53 :** Profils de fermentation de la souche 824  $\Delta buk \Delta pSOL$  en chémostat en milieu synthétique contenant successivement, du glucose (30g.l<sup>-1</sup>), un mélange xylose/glucose (25 g.l<sup>-1</sup>/5 g.l<sup>-1</sup>) et du xylose (30 g.l<sup>-1</sup>).

Comme nous l'avons vu précédemment, lors de la première phase de culture en chémostat, la souche consomme le glucose pour la production de lactate. Quand l'alimentation du réacteur est remplacée par un milieu contenant un mélange glucose/xylose, la DO chute brutalement de 4 à 0,8 et la souche utilise seulement les 5 g.l<sup>-1</sup> de glucose apporté par l'alimentation pour se développer. Il a alors été nécessaire de changer la culture en mode discontinu afin d'éviter un lavage des cellules. De plus, un ajout de xylose est réalisé pour atteindre une concentration finale dans le réacteur de 55 g.l<sup>-1</sup>. L'alimentation est ensuite relancée à un faible taux de dilution. La densité optique de la culture augmente alors progressivement, de manière concomitante avec la consommation du xylose, et atteint une valeur de 3,9 sur une période de 550 heures (23 jours). Une fois la culture stabilisée, l'alimentation est remplacée par un milieu contenant uniquement du xylose comme source de carbone, sans que cela n'impacte significativement la croissance de la souche. Lorsqu'elle est cultivée avec du xylose comme unique source de carbone, la souche 824  $\Delta buk \Delta pSOL$  produit, en moyenne,  $16 \pm 0,18$  g.l<sup>-1</sup> de lactate et  $8 \pm 0,56$  g.l<sup>-1</sup> d'acétate pour  $28,6 \pm 0,77$  g.l<sup>-1</sup> de xylose consommé. Ceci représente un rendement en

lactate de  $0,56 \pm 0,01 \text{ g.g}^{-1}$  et un rendement en acétate de  $0,27 \pm 0,01 \text{ g.g}^{-1}$ . Cette production d'acétate significative montre clairement que la souche utilise, au moins en partie, la voie des phosphocétolases pour métaboliser le xylose. En effet, la voie des phosphocétolases permet de convertir le xylulose -5P en acétyl-P et en glycéraldéhyde-3P sans production de NADH. L'acétyl-P est alors converti en acétate par Ack et le glycéraldéhyde-3P en pyruvate avec production d'un NADH. Le NADH produit est alors consommé par Ldh et conduit à la production d'un lactate (figure 54).

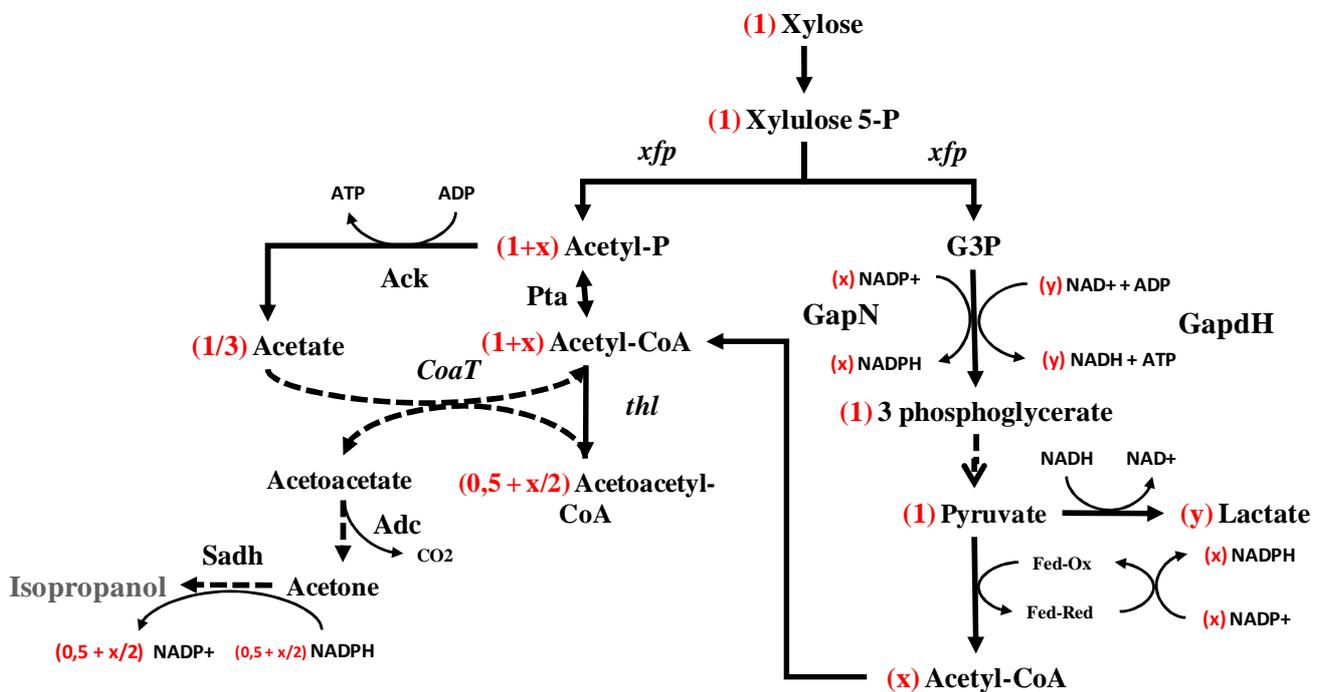


**Figure 54** : Schéma simplifié du métabolisme de la souche 824  $\Delta buk \Delta pSOL$  sur xylose.

En théorie, si la totalité du xylose est consommée par la souche en utilisant cette voie, une mole de lactate et une mole d'acétate sont produites par mole de xylose. Ici,  $0,18 \text{ mol.l}^{-1}$  de lactate et  $0,14 \text{ mol.l}^{-1}$  d'acétate sont produites pour  $0,19 \text{ mol.l}^{-1}$  de xylose consommée, soit  $0,95 \text{ mol}$  de lactate et  $0,74 \text{ mol}$  d'acétate par mole de xylose. On peut donc estimer qu'environ 75% du xylose est consommé par la voie des phosphocétolases et 25% par la voie des PPP classique. La mise en place d'une stratégie d'adaptation de la souche à ce nouveau substrat a donc permis l'obtention d'une nouvelle souche capable de métaboliser efficacement le xylose par la voie des phosphocétolases pour la production d'acétate et de lactate.



De plus, pour chaque isopropanol produit, un NADPH est consommé et permet (et même nécessite) alors la production d'un pyruvate par GapN, ce qui va fournir un acétyl-CoA additionnel. Cet acétyl-CoA va alors rentrer dans la voie de l'isopropanol. Lors de la conversion du pyruvate en acétyl-CoA, une ferrédoxine réduite est produite et ne peut être régénérée par la production d'H<sub>2</sub>. Cette ferrédoxine réduite ne peut donc qu'être utilisée pour la production de NADPH par la NADP-ferrédoxine oxydoréductase. Pour calculer la quantité maximale d'isopropanol qu'il est donc possible de produire, il faut que les productions de NADPH et de NADP<sup>+</sup> soient à l'équilibre (figure 56).



**Figure 56** : Distribution des flux métabolique lors de la production d'isopropanol à partir de xylose dans la souche 824 *ΔbukΔpSOL*. *x* et *y* définissent respectivement la quantité en mole de NADPH et de NADH produit par GapN et Gapdh.

En considérant le métabolisme décrit ci-dessus (figure 12), il faut équilibrer les productions de NADPH et de NADP+ soit :  $0.5 + \frac{x}{2} = 2x$

Dans ce cas,  $x = \frac{1}{3}$  et la production d'isopropanol s'élève à 0,66 mole par mole de xylose consommé. Ceci représente un rendement de 0,25 g d'isopropanol par g de xylose. En considérant que seulement 75% du xylose est consommé par la voie des phosphocétolases, cela permettrait d'obtenir un rendement de 0.19 g-g<sup>-1</sup> de xylose.

### V.3.2.1. Expression du vecteur *pCLF952-thl*

La souche *824 ΔbukΔpSOL* étant *thl*<sup>-</sup>, le gène *thl* doit être réintroduit dans la souche par l'intermédiaire d'un plasmide. La souche *824 ΔbukΔpSOL* est alors transformée avec le plasmide *pCLF952-thl* qui porte le gène codant pour la thiolase, ainsi que l'opéron synthétique isopropanol sous la dépendance du promoteur *pThl*. La souche mutante ainsi obtenue (*824 ΔbukΔpSOL pCLF952-thl*) est alors cultivée en fiole en milieu CGM-MES xylose sans régulation de pH. La souche *824 ΔbukΔpSOL* produisant de grandes quantités de lactate, du MES est ajouté, lors des cultures en fioles, afin de tamponner le milieu et le pH est maintenu autour d'une valeur de 6,0 par ajout d'ammoniac 14%. Sans le maintien d'un pH proche de la neutralité, la production du lactate cause une forte acidification du milieu à un niveau létal pour la bactérie et la croissance s'arrête après quelques heures de culture.

**Tableau 16** : Fermentation de la souche *824 ΔbukΔpSOL pCLF952-thl* à pH non régulé en milieu CGM-MES xylose.

Souche	Xylose consommé et concentration des produits (g.l <sup>-1</sup> )							
	Xylose	Acétate	Acétone	Ethanol	Butanol	Isopropanol	Lactate	Solvant
<i>824 ΔbukΔpSOL pCLF952-thl</i>	14,36	3,92	0,00	0,00	0,00	0,11	10,02	0,11

L'expression de l'opéron synthétique isopropanol avec le gène codant pour la thiolase dans la souche permet d'initier la production d'isopropanol qui s'élève alors à 0,11

g.l<sup>-1</sup>. Cette production est bien inférieure à celle attendue et les deux produits majoritaires restent le lactate et l'acétate (tableau 16).

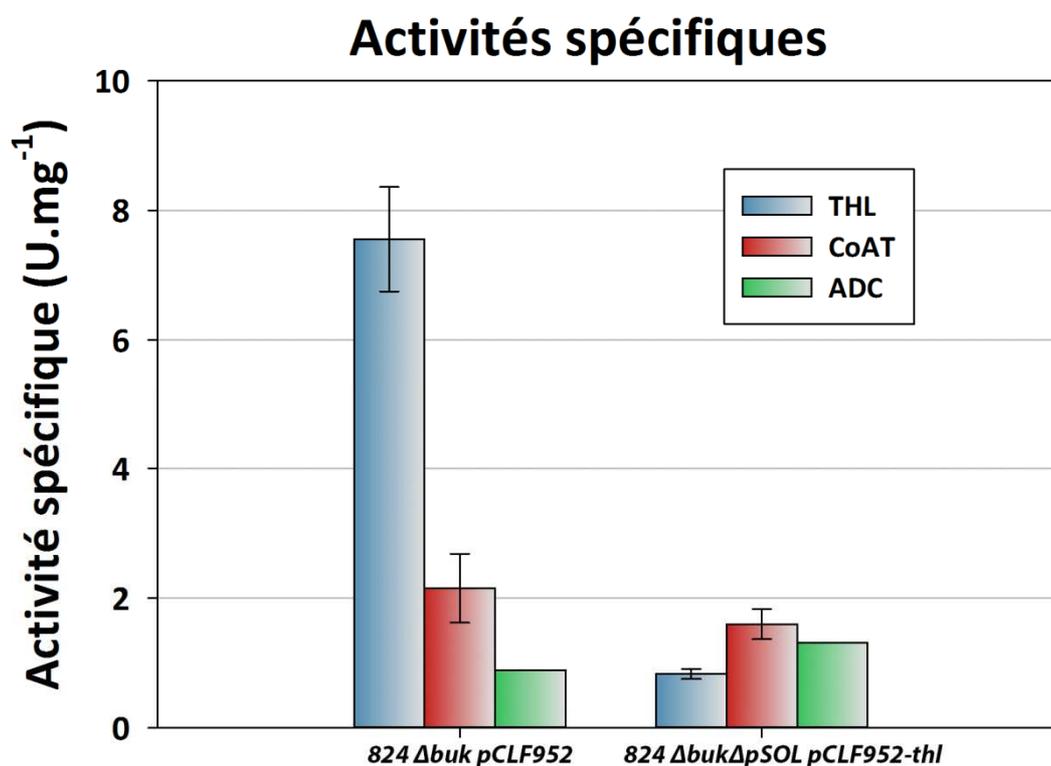
Afin de déterminer si la production de NADPH par GapN est suffisante pour soutenir la production d'isopropanol, une culture de la souche est réalisée en milieu CGM-MES xylose complétement avec 1 g.l<sup>-1</sup> d'acétone.

**Tableau 17** : Fermentation de la souche *824 ΔbukΔpSOL pCLF952-thl* à pH non régulé en milieu CGM-MES xylose avec 1 g.l<sup>-1</sup> d'acétone.

Souche	Xylose consommé et concentration des produits (g.l <sup>-1</sup> )							
	Xylose	Acétate	Acétone	Ethanol	Butanol	Isopropanol	Lactate	Solvant
<i>824 ΔbukΔpSOL pCLF952-thl</i>	14,37	3,69	0,03	0,00	0,00	1,29	9,35	1,32

Lorsque le milieu de culture est supplémenté avec de l'acétone, ce dernier est presque intégralement converti en isopropanol (tableau 17). Ceci indique que la souche dispose de suffisamment de NADPH pour permettre de faire fonctionner la voie de l'isopropanol.

Des mesures d'activités spécifiques des enzymes Thl, CtfAB et Adc ont alors été effectuées sur des extraits bruts de la souche *824 ΔbukΔpSOL pCLF952-thl* et comparées avec les résultats obtenus avec des extraits bruts de la souche *824 Δbuk pCLF952* (figure 57).



**Figure 57** : Activités spécifiques THL, CoAT et ADC mesurées à partir d'extrait bruts des souches 824  $\Delta$ buk pCLF952 et 824  $\Delta$ buk $\Delta$ pSOL pCLF952-thl.

Les mesures d'activité spécifique Thl indiquent que l'expression du gène *thl* à partir du plasmide permet d'augmenter le niveau d'activité thiolase par rapport à la souche 824  $\Delta$ buk $\Delta$ pSOL. Néanmoins, l'activité mesurée dans la souche 824  $\Delta$ buk $\Delta$ pSOL pCLF952-thl reste près de 10 fois inférieure à celle mesurée dans la souche 824  $\Delta$ buk pCLF952. Ce résultat est surprenant dans la mesure où la souche 824  $\Delta$ buk pCLF952 ne possède qu'une expression chromosomique du gène *thl* tandis que la souche 824  $\Delta$ buk $\Delta$ pSOL pCLF952-thl possède une expression du gène *thl* à partir d'un plasmide à haut nombre de copies. En outre, les activités Adc et CtfAB mesurées dans les souches 824  $\Delta$ buk pCLF952 et 824  $\Delta$ buk $\Delta$ pSOL pCLF952-thl sont très similaires, ce qui exclut un problème global d'expression de l'opéron. Le plasmide pCLF952-thl a alors été extrait de la souche 824  $\Delta$ buk $\Delta$ pSOL pCLF952-thl et utilisé comme matrice pour un séquençage du gène *thl*. Ce séquençage n'a révélé aucune mutation sur le plasmide pouvant expliquer la baisse de l'activité thiolase observée.

### V.3.2.2. Optimisation de l'expression du gène *thl*

Les niveaux d'activité CtfAB et Adc observés dans la souche *824 ΔbukΔpSOL pCLF952-thl* semblent écarter un problème de transcription de l'opéron. Il est alors possible qu'un mécanisme de régulation de la traduction du gène *thl* entre en jeu. Pour essayer d'écarter ce problème potentiel, un nouveau vecteur a été construit en remplaçant, sur le vecteur *pCLF952-thl*, le promoteur *pThl* par le promoteur *pPtb* et en changeant le RBS de la thiolase par un RBS synthétique optimisé en utilisant le logiciel RBS calculator (Salis et al., 2009).

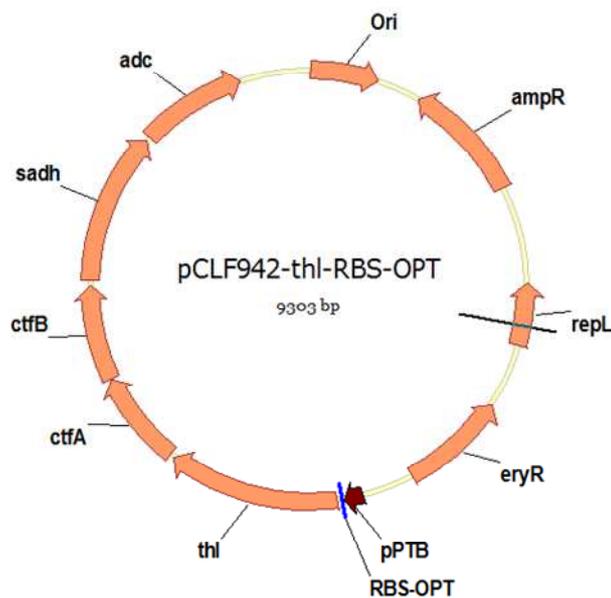


Figure 58 : Vecteur *pCLF942-thl-RBS-OPT*.

Le vecteur *pCLF942-thl-RBS-OPT* (figure 58) a alors été introduit dans la souche *824 ΔbukΔpSOL* et la souche mutante ainsi obtenue (*824 ΔbukΔpSOL pCLF942-thl-RBS-OPT*) a été cultivée en milieu CGM-MES. Une première culture a été réalisée en supplémentant le milieu avec  $2,7 \text{ g.l}^{-1}$  d'acétate (tableau 18). Le but de cette culture dans un milieu avec une concentration initiale en acétate élevée est de favoriser la réaction catalysée par CtfAB en augmentant artificiellement la concentration intracellulaire en acétate. Il a été montré précédemment que cette réaction est probablement l'étape limitante de la voie de l'isopropanol et nécessite une concentration intracellulaire en acétate importante pour

fonctionner (voir partie IV.6). Ceci est d'autant plus vrai que la culture est réalisée à un pH significativement supérieur au pH optimal pour la production d'isopropanol (pH 4,8).

**Tableau 18** : Fermentation de la souche *824 ΔbukΔpSOL pCLF942-thl-RBS-OPT* à pH non régulé en milieu CGM-MES xylose avec 2,7 g.l<sup>-1</sup> d'acétate.

Souche	Xylose consommé et concentration des produits (g.l <sup>-1</sup> )						Rendement par rapport au xylose (g.g <sup>-1</sup> )		Bilan carbone (%)
	Xylose	Acétate	Acétone	Isopropanol	Lactate	Solvant	Acétate	Lactate	
<i>824 ΔbukΔpSOL pCLF942-thl-RBS-OPT</i>	16,46	7,13	0,00	0,09	15,31	0,09	0,20	0,93	95

Les résultats présentés dans le tableau ci-dessus montrent que la souche produit toujours majoritairement du lactate avec une concentration finale de 15,31 g.l<sup>-1</sup>. La production d'acétate à partir de xylose est également élevée avec 4,45 g.l<sup>-1</sup> produits, soit une concentration finale en acétate de 7,13 g.l<sup>-1</sup>. La production d'isopropanol quant à elle reste faible à environ 0,1 g.l<sup>-1</sup>. Le fait que même avec une concentration finale en acétate aussi importante, la souche ne soit pas en mesure de produire plus d'isopropanol que dans des conditions de culture « classiques » (sans ajout d'acétate dans le milieu) semble indiquer que la concentration en acétate intracellulaire n'est pas le principal facteur limitant de la voie de l'isopropanol dans ce cas.

Une autre réaction qui pourrait être limitante est celle catalysée par Pta et qui transforme l'acétyl-P produit par la phosphocétolase en acétyl-CoA. Cet acétyl-CoA est indispensable à la formation d'isopropanol et un déficit de cette molécule bloquerait complètement la voie de production. Afin de déterminer si la disponibilité en acétyl-CoA limite la production d'isopropanol, une culture de la souche a été réalisée en utilisant du glucuronate comme unique source de carbone. Le métabolisme de ce substrat permet la production de deux pyruvates à partir d'un glucuronate sans production d'équivalent réduit (Murarka et al., 2010) (figure 59).

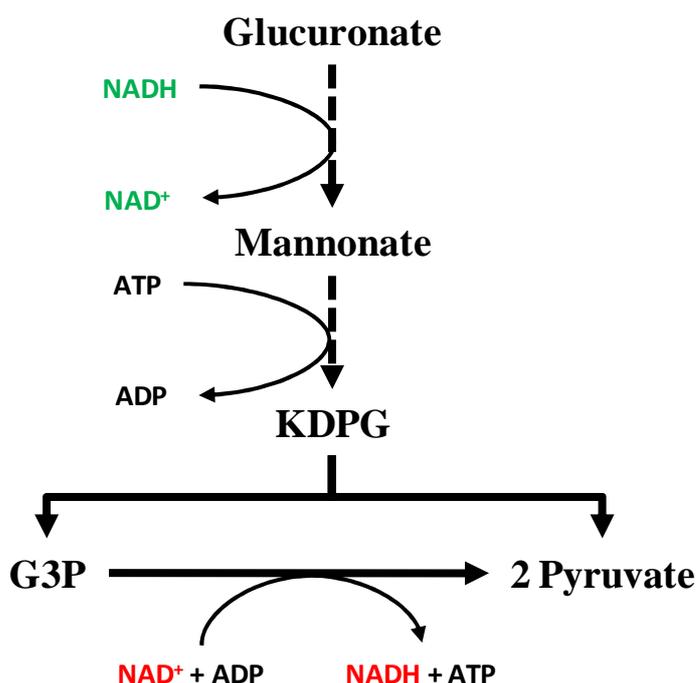


Figure 59 : Métabolisme simplifié du glucuronate chez *E. coli*.

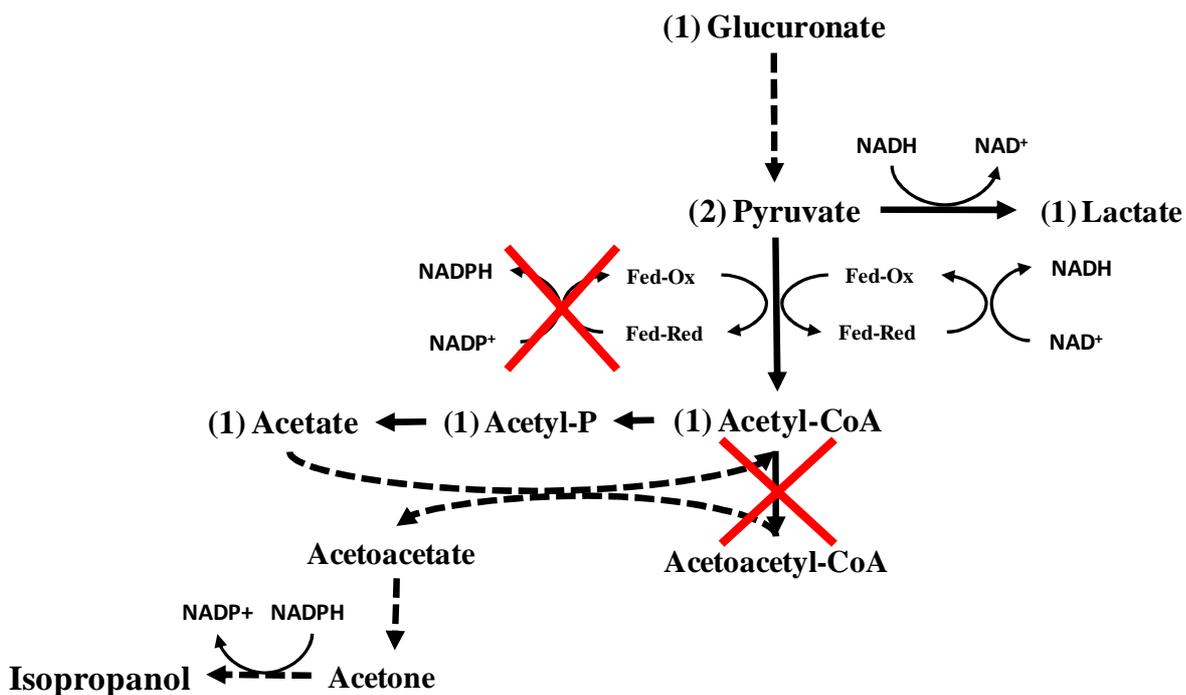
La souche *824 ΔbukΔpSOL pCLF942-thl-RBS-OPT* devrait alors être en mesure de produire de l'acétyl-CoA à partir du pyruvate et de le convertir en acétone/isopropanol. La ferrédoxine réduite qui est produite lors de la conversion du pyruvate en acétyl-CoA va alors être réoxydée par les NAD(P)H ferrédoxine oxydo-réductases et conduire à la génération de NADPH ou de NADH.

Une culture de la souche a donc été effectuée dans un milieu CGM-MES avec 15 g.l<sup>-1</sup> d'acide glucuronique comme unique source de carbone (tableau 19).

Tableau 19 : Fermentation de la souche *824 ΔbukΔpSOL pCLF952-thl-RBS OPT* à pH non régulé en milieu CGM-MES glucuronate.

Souche	Glucuronate consommé et concentration des produits (g.l <sup>-1</sup> )					Rendement par rapport au glucuronate (mol.mol <sup>-1</sup> )	
	Glucuronate	Acétate	Lactate	Acétone	Isopropanol	Acétate	Lactate
<i>824 ΔbukΔpSOL pCLF942-thl-RBS-OPT</i>	12,52	3,88	5,45	0,00	0,00	1,00	0,94

Lorsqu'elle est cultivée dans un milieu contenant du glucuronate, la souche 824 *ΔbukΔpSOL pCLF942-thl-RBS-OPT* produit 3,88 g.l<sup>-1</sup> d'acétate et 5,45 g.l<sup>-1</sup> de lactate. Ceci représente une production de 1 mole d'acétate et de 0,94 mole de lactate par mole de glucuronate consommé. La production d'acétone/isopropanol est nulle ce qui indique que la souche est incapable d'utiliser l'acétyl-CoA pour la formation de ces composés. L'acétyl-CoA est alors intégralement converti en acétate. En l'absence de voie consommatrice de NADPH, la réoxydation de la ferrédoxine réduite est couplée à la production de NADH, ce qui induit la formation de lactate. Au final, la souche produit un acétyl-CoA, un pyruvate et un NADH par glucuronate consommé, soit un acétate et un lactate par glucuronate. Ces résultats pointent donc un problème de conversion de l'acétyl-CoA en acétone et posent à nouveau la question de la fonctionnalité de la thiolase dans cette souche (figure 60).



**Figure 60** : Métabolisme de la souche 824 *ΔbukΔpSOL pCLF942-thl-RBS-OPT* sur milieu CGM contenant de glucuronate comme unique source de carbone.

La production de NADPH par GapN ainsi que la fonctionnalité *in-vivo* des enzymes Adc et Sadh ont également été évaluées par le biais d'une culture supplémentée en acétoacétate (tableau 20).

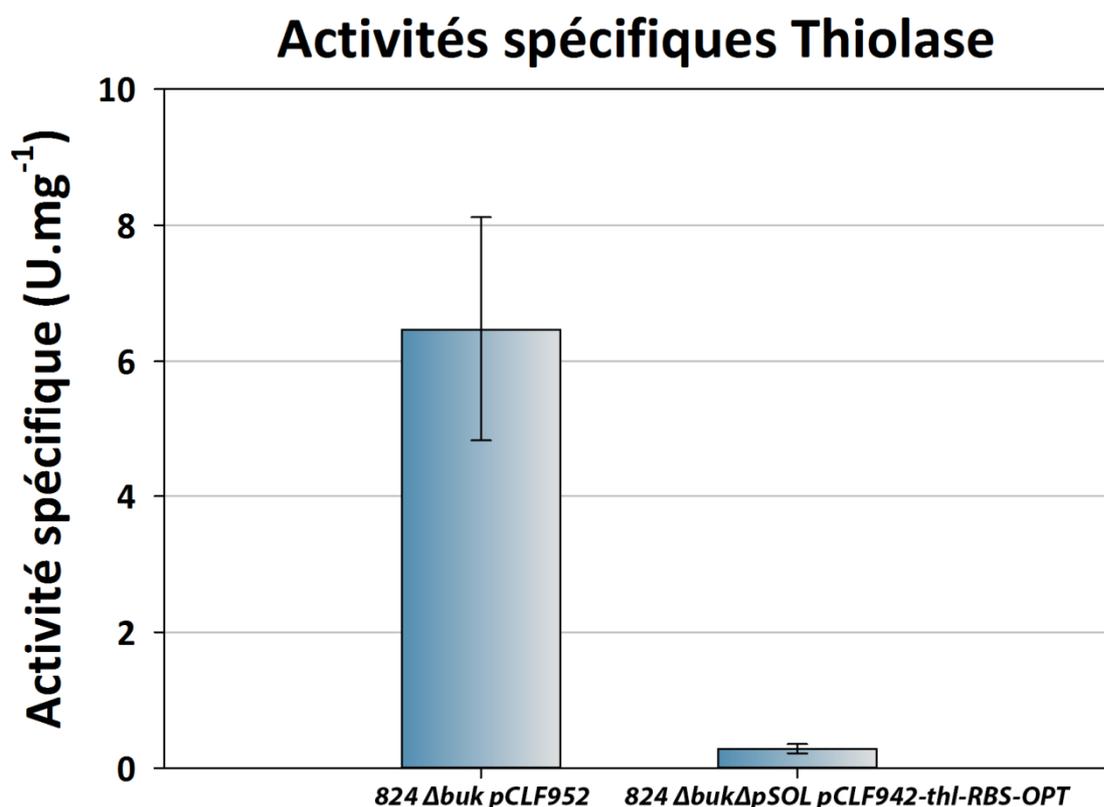
**Tableau 20** : Fermentation de la souche *824 ΔbukΔpSOL pCLF942-thl-RBS-OPT* à pH non régulé en milieu CGM-MES xylose avec 1 g.l-1 d'acétoacétate.

Souche	Xylose consommé et concentration des produits (g.l <sup>-1</sup> )						Rendement par rapport au xylose (g,g-1)		Bilan carbone (%)
	Xylose	Acétate	Acétone	Isopropanol	Lactate	Solvant	Acétate	Lactate	
<i>824 ΔbukΔpSOL pCLF942-thl-RBS-OPT</i>	20,05	4,94	0,04	1,12	12,34	1,16	0,25	0,62	98

Lorsque de l'acétoacétate est ajouté dans le milieu de culture, ce dernier est intégralement converti en isopropanol ce qui indique que : (i) la disponibilité en NADPH est suffisante pour la production d'isopropanol et (ii) les enzymes Adc et Sadh sont fonctionnelles.

Il n'est malheureusement pas possible de tester, de la même manière, l'activité *in-vivo* de CtfAB car l'ajout d'acétoacétyl-CoA dans le milieu serait nécessaire, ce qui est exclu au regard de la grande instabilité et du coût particulièrement élevé de cette molécule.

Des mesures d'activité spécifique *in vitro* de l'enzyme Thl ont alors été effectuées sur des extraits bruts acellulaires de la souche *824 ΔbukΔpSOL pCLF942-thl-RBS-OPT* (récoltés à partir de culture réalisées en fioles) et comparées avec les résultats obtenus avec des extraits bruts acellulaires de la souche *824 Δbuk pCLF952* (figure 61).



**Figure 61** : Activités spécifiques THL mesurées à partir d'extrait bruts des souches 824  $\Delta$ buk pCLF952 et 824  $\Delta$ buk $\Delta$ pSOL pCLF942-thl-RBS-OPT.

L'activité spécifique thiolase mesurée *in vitro* à partir d'extraits acellulaires de la souche 824  $\Delta$ buk $\Delta$ pSOL pCLF942-thl-RBS-OPT est nettement inférieure à celle observée habituellement chez *C. acetobutylicum*. L'activité est du même ordre de grandeur que celle précédemment mesurée dans la souche 824  $\Delta$ buk $\Delta$ pSOL pCLF952-thl et la stratégie d'optimisation de l'expression du gène *thl* mise en place ne parait pas avoir amélioré l'activité enzymatique.

#### V.3.2.3. Discussion

L'ensemble des expérimentations conduites indique que l'étape de conversion de l'acétyl-CoA en acétoacétyl-CoA, catalysée par la thiolase, est le goulot d'étranglement de la voie de production de l'isopropanol dans la souche 824  $\Delta$ buk $\Delta$ pSOL. Malgré les stratégies développées pour optimiser l'expression, la transcription et la traduction du gène *thl* dans

cette souche, le niveau d'activité thiolase reste insuffisant pour permettre une production d'isopropanol satisfaisante.

Ces résultats suggèrent qu'un mécanisme de régulation de l'activité thiolase, non identifié, pourrait favoriser la production d'acétate à partir d'acétyl-CoA plutôt que la production d'acétoacétyl-CoA. D'un point de vue énergétique, la voie de l'acétate présente l'avantage de produire un ATP, ce qui n'est pas le cas de la voie de l'isopropanol. La métabolisation du xylose par la voie des phosphocétolases étant déjà à l'origine d'une baisse de la production d'ATP, il est probable que la souche tente de compenser cette perte par la production d'acétate.

Chez *C. acetobutylicum*, l'acétone est normalement formée lors de la deuxième phase de fermentation, dans le but principal de détoxifier le milieu de la grande quantité d'acides accumulés. Dans la souche *824 ΔbukΔpSOL pCLF952-thl*, la production d'acides est très importante et cause certainement un fort stress à la cellule. Néanmoins, ce stress ne semble pas suffisamment important pour promouvoir la reconsommation de l'acétate et la production d'isopropanol. Ceci peut s'expliquer en partie par le fait que le pH du milieu est maintenu artificiellement à des valeurs proches de la neutralité afin de permettre à la culture de suivre son cours. Si le pH n'est pas contrôlé, celui-ci chute rapidement, causant un arrêt de la croissance et une baisse drastique de la viabilité cellulaire. Il est possible que la mort cellulaire soit trop brutale pour permettre à la souche de s'adapter à ces nouvelles conditions. La viabilité étant liée à la production d'acides par le biais du pH, il serait possible d'envisager un protocole d'évolution *in-vivo* de la souche durant lequel le contrôle du pH est progressivement diminué. La souche ferait alors face à des quantités d'acides de plus en plus toxiques, ce qui pourrait induire une évolution en faveur de la production d'isopropanol.

De plus, d'un point de vue thermodynamique, la réaction thiolytique de clivage de l'acétoacétyl-CoA est favorisée et la réaction de condensation telle qu'elle est observée dans le sens physiologique n'est possible que grâce à l'existence de réactions consommant l'acétoacétyl-CoA de manière efficace. Chez *C. acetobutylicum* la production de butyrate et de butanol tire efficacement le flux vers la voie des C<sub>3</sub>/C<sub>4</sub> et permet la production d'ATP et la régénération du pool de NAD<sup>+</sup>. Au contraire, dans la souche *824 ΔbukΔpSOL pCLF952-thl*, la CoA transférase est la seule enzyme capable de prendre en charge l'acétoacétyl-CoA, et il est

possible que sa faible affinité pour son co-substrat (l'acétate) limite l'efficacité de la réaction. Pour répondre à cette éventualité, il serait envisageable de remplacer la CoA transférase de *C. acetobutylicum* par une enzyme possédant une plus forte affinité pour l'acétate, comme celle d'*E. coli* (AtoAD).

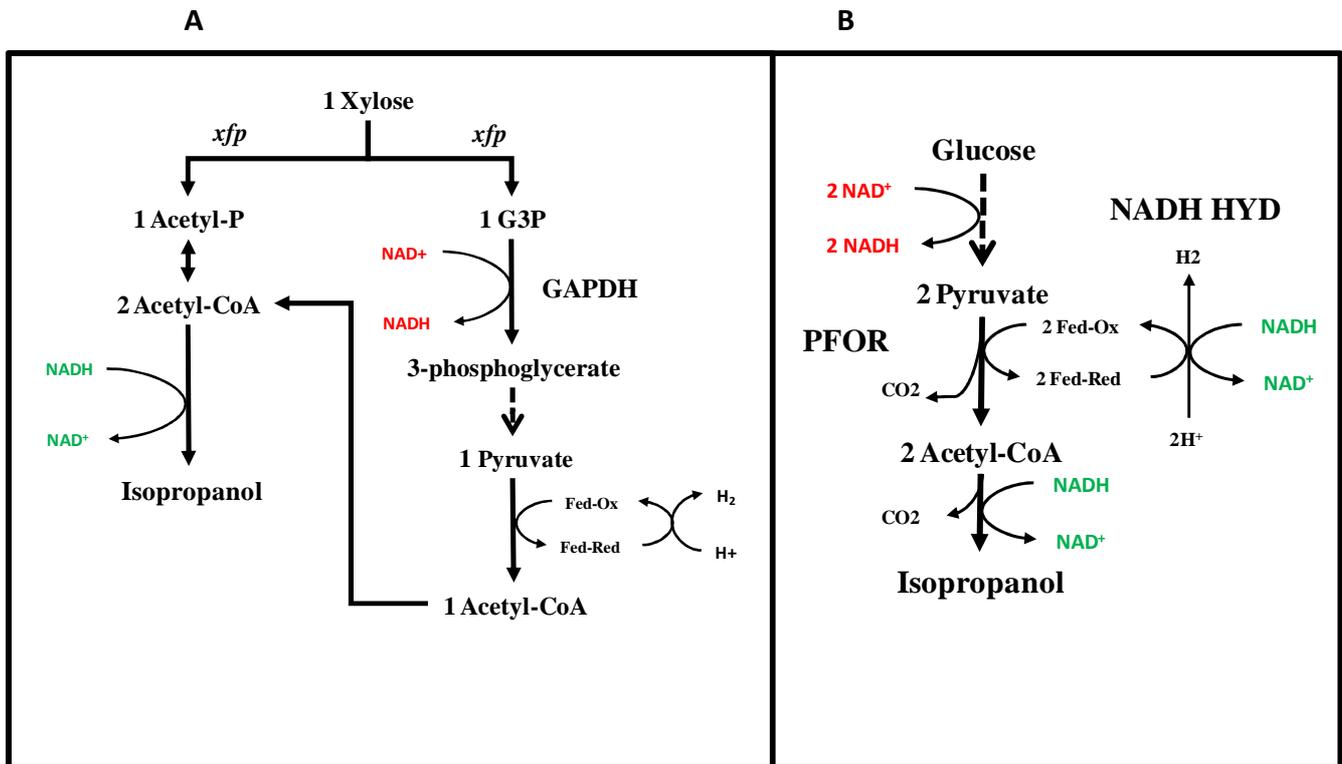
Enfin, Sillers et al (2009) ont montré que la surexpression du gène *thl* à partir d'un plasmide ne permet pas d'augmenter le flux dans la voie centrale et concluent qu'un mécanisme de régulation complexe doit intervenir sur cette enzyme. En 2013, Mann and Lütke-Eversloh construisent une thiolase mutée présentant un degré d'inhibition par le CoA diminué. L'expression de cette thiolase mutante chez *C. acetobutylicum* permet d'augmenter significativement le flux de carbone dans le métabolisme central, ce qui laisse penser qu'une régulation par le CoA a lieu. L'utilisation d'une telle enzyme mutée pourrait se révéler avantageuse pour la production d'isopropanol par la souche 824  $\Delta buk \Delta pSOL$  et des expériences complémentaires dans ce sens sont à envisager. La thiolase d'*E. coli*, encodée par le gène *atoB*, purifiée et caractérisée par Duncombe and Frerman (1976), pourrait également être utilisée à la place de la thiolase de *C. acetobutylicum* dans la mesure où elle présente une faible inhibition par le CoA.

Néanmoins, les expérimentations présentées ici ouvrent de larges perspectives quant à la possibilité d'utiliser la voie des phosphocétolases chez *C. acetobutylicum* pour la production à haut rendement de solvants, et plus particulièrement d'isopropanol. Après l'application d'une stratégie d'adaptation *in-vivo*, la souche 824  $\Delta buk \Delta pSOL$  est désormais en mesure d'utiliser majoritairement cette voie pour le catabolisme du xylose, réduisant ainsi significativement les pertes en carbone. Le principal obstacle à la production de solvants dans cette souche a été identifié comme étant localisé au niveau de la réaction catalysée par la thiolase. Le reste de la voie de l'isopropanol semblant parfaitement fonctionnel, le rétablissement du flux de carbone à travers la thiolase devrait permettre le fonctionnement de la voie, mais aucune production d'isopropanol ne sera possible tant que ce problème ne sera pas adéquatement traité.

## V.4. Changement de la spécificité en co-facteur de l'enzyme Sadh

### V.4.1. Introduction

La dernière stratégie qui a été envisagée pour permettre la production d'isopropanol comme unique produit de fermentation chez *C. acetobutylicum* a consistée en une modification de la voie de l'isopropanol pour que cette dernière consomme du pouvoir réducteur sous la forme de NADH. Cet objectif peut être atteint en changeant la spécificité de l'enzyme Sadh du NADPH vers le NADH liant alors la production d'un isopropanol avec la consommation d'un NADH. Même si ce changement de spécificité seul ne serait pas suffisant pour permettre une fermentation homo-isopropanolique sur glucose, où deux NADH doivent être consommés par isopropanol produit, cela pourrait permettre d'équilibrer la balance rédox dans une souche fermentant le xylose avec la voie des phosphocétolases ou bien faciliter l'implémentation d'une hydrogénase NADH dépendante en prenant en charge une partie du NADH (figure 62).



**Figure 62** : Métabolisme théoriques de production d'isopropanol par le biais de la phosphocétolase (A) ou d'une hydrogénase NADH dépendante (B) à l'aide d'une alcool déshydrogénase secondaire NADH dépendante.

#### V.4.2. Stratégie

L'analyse bioinformatique de l'enzyme Sadh montre que son domaine de liaison au NADPH possède une structure répandue dans la famille des alcools déshydrogénase et bien connue sous le nom de structure de Rossmann. La structure de Rossmann est constituée d'une alternance de feuillet  $\beta$  et d'hélices  $\alpha$  selon le motif  $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ , suivis d'une deuxième répétition, complète ou incomplète, de cette séquence. Une région dite « fingerprint » constituée d'un motif GXGXXG est également identifiée au centre du domaine de liaison au NAD(P)H (Bellamacina, 1996) (Figure 63).

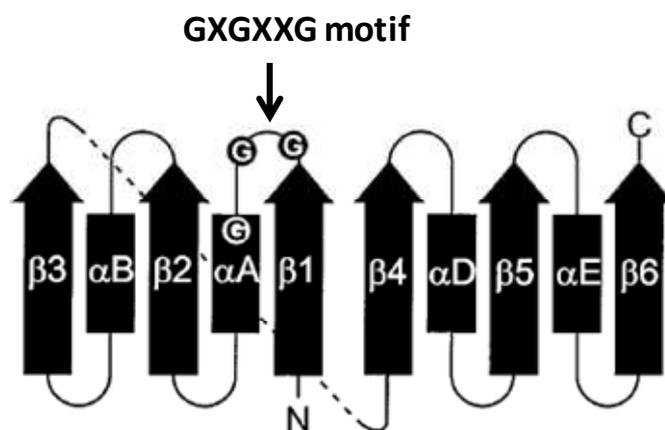
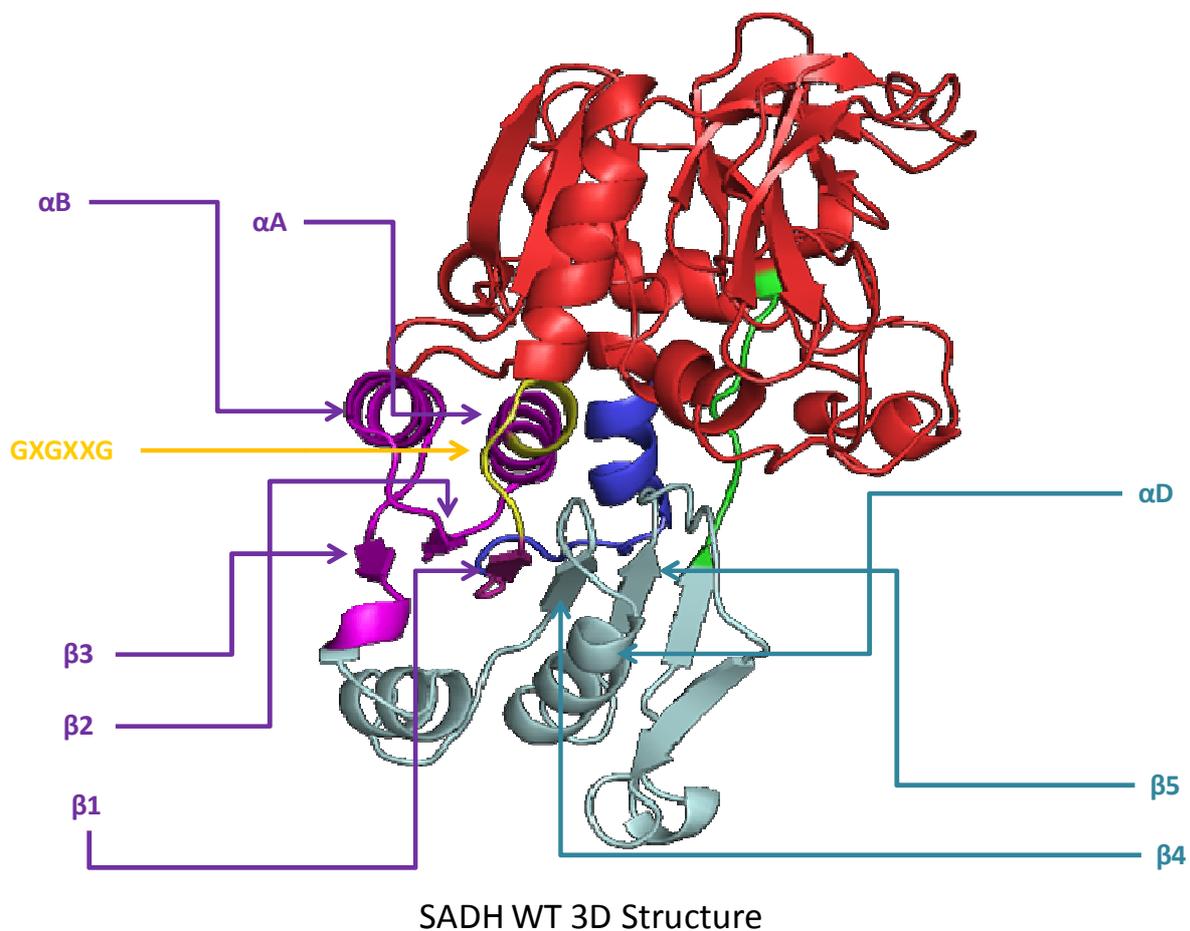


Figure 63 : Structure de Rossmann de référence.

La structure tridimensionnelle de l'enzyme Sadh de *C. beijerinckii* en complexe avec le NADPH ayant été déterminée par cristallographie (Korkhin et al., 1998), les différentes parties composant la structure de Rossmann ont été identifiées à l'aide du logiciel Pymol (figure 64). Cette enzyme possède une structure de Rossmann composée d'un motif  $\beta\alpha\beta\alpha\beta$  suivis d'une répétition incomplète de ce motif sous la forme  $\beta\alpha\beta$ . La région « fingerprint » GXGXXG est également présente sous la forme GIGAVG.



**Figure 64 :** Identification de la structure de Rossmann de la Sadh de *C. beijerinckii* NRRL B593.

Il a été alors envisagé de construire des protéines chimères où la totalité ou une partie de la structure de Rossmann de l'enzyme Sadh est remplacée par la structure de Rossmann d'une autre alcool déshydrogénase NADH dépendante. Le domaine choisi pour effectuer ce remplacement est issu de la Sadh de *Gordonia sp*, qui est une enzyme catalysant la conversion de l'isopropanol en acétone, exclusivement dépendante du  $\text{NAD}^+$  (Kotani et al., 2003). De plus, cette alcool déshydrogénase secondaire est constituée du même nombre d'acides aminés que celle de *C. beijerinckii* et 45% d'entre eux sont identiques. Néanmoins, il a été choisi de ne pas directement utiliser l'enzyme de *Gordonia sp* dans la mesure où celle-ci catalyse principalement la réaction de consommation de l'isopropanol, ce qui n'est l'activité désirée.

Deux enzymes chimériques ont ainsi été dessinées. La première protéine chimère (SADHCHG1M) contient un motif  $\beta\alpha\beta\alpha\beta$  provenant de l'enzyme de *Gordonia sp*, tandis que la deuxième répétition incomplète du motif reste inchangée. La deuxième protéine chimère

(SADHCHG2M) quant à elle contient l'intégralité de la structure de Rossmann de l'enzyme de *Gordonia sp.*

#### V.4.3. Evaluation de la fonctionnalité des protéines chimères chez *E. coli*.

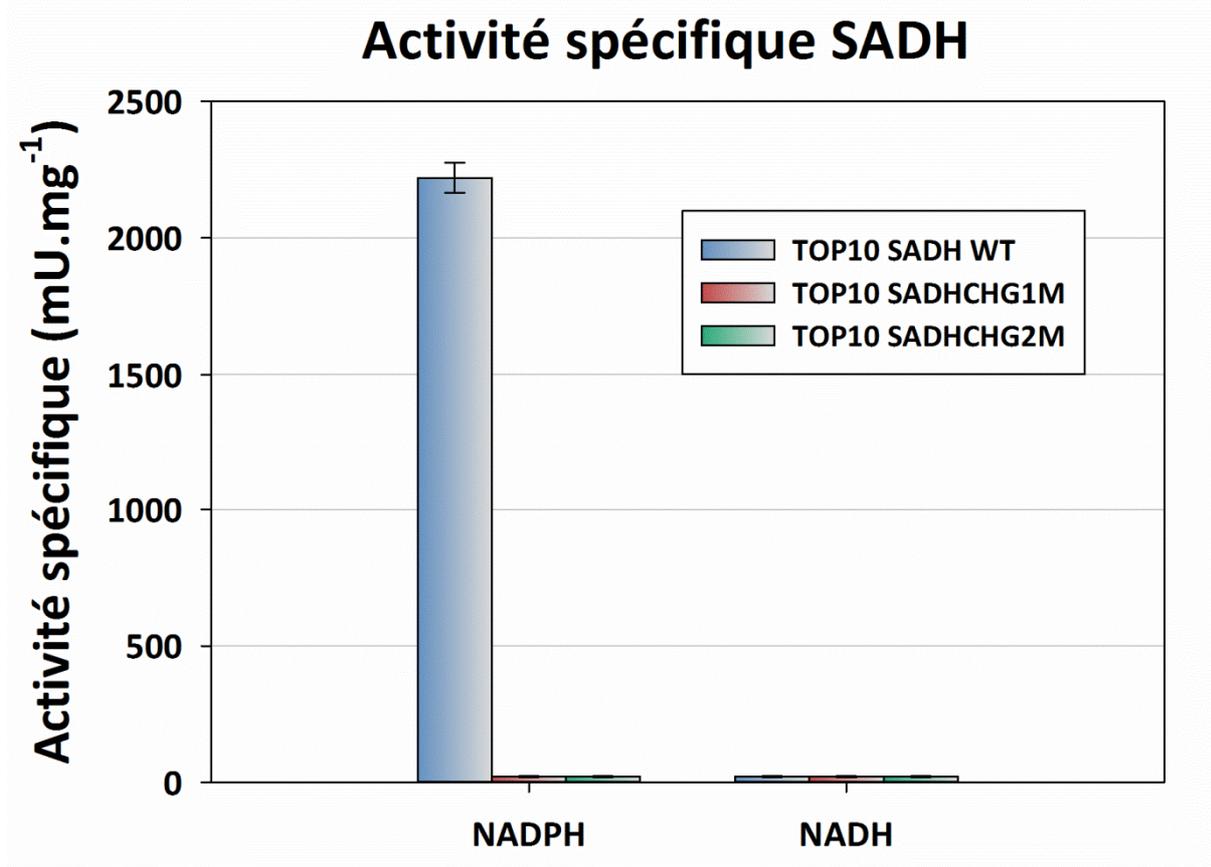
Une fois les gènes codant pour ces deux nouvelles enzymes dessinés, ces derniers ont alors été synthétisés et clonés par recombinaison homologe dans le vecteur *pSOS95-thl* (tableau 1) à la place du gène *sadh* sauvage afin d'obtenir un vecteur exprimant l'ensemble de la voie de production de l'isopropanol et pouvant directement être utilisé chez *E. coli* et chez *C. acetobutylicum*. Les vecteurs *pSOS952-thl-SADHCHG1M* et *pSOS952-thl-SADHG2M* ainsi obtenu ont été introduits chez *E. coli* et les souches recombinantes cultivées en milieu LB additionné de glucose à 20 g.l<sup>-1</sup>.

**Tableau 21** : Fermentation des souches *E.coli TOP10 pSOS952-thl*, *E.coli TOP10 pSOS952-thl-SADHCHG1M* et *E.coli TOP10 pSOS952-thl-SADHCHG2M* en milieu LB glucose.

Souche	Glucose consommé et concentration des produits (g.l <sup>-1</sup> )			
	Glucose	Acétate	Acétone	Isopropanol
<i>E.coli TOP10 pSOS952-thl</i>	21,78	0,41	0,82	3,12
<i>E.coli TOP10 pSOS952-thl-SADHCHG1M</i>	18,65	0,68	2,96	0,03
<i>E.coli TOP10 pSOS952-thl-SADHCHG2M</i>	14,42	0,54	2,05	0,03

Ces cultures réalisées chez *E. coli* montrent que la voie de l'acétone portée par les vecteur *pSOS952-thl-SADHCHG1M* et *pSOS952-thl-SADHCHG2M* est fonctionnelle mais que la conversion de l'acétone en isopropanol n'est pas effectuée. Contrairement à la souche portant le plasmide *pSOS952-thl* (exprimant le gène codant l'enzyme *Sadh* sauvage) où 3,12 g.l<sup>-1</sup> d'isopropanol est produit, les souches exprimant les chimères de *Sadh* ne produisent que des traces d'isopropanol et l'acétone est le produit de fermentation majoritaire.

Afin d'évaluer l'activité *in-vitro* des protéines chimères SADHCHG1M et SADHCHG2M, des mesures d'activité spécifique ont été réalisées sur des extraits totaux des souches *E.coli* TOP10 *pSOS952-thl-SADHCHG1M* et *E.coli* TOP10 *pSOS952-thl-SADHCHG2M* et comparée avec les résultats obtenus sur des extraits totaux de la souche *E.coli* TOP10 *pSOS952-thl* (Figure 65).



**Figure 65 :** Activités spécifiques SADH sur extraits totaux des souches *E.coli* TOP10 *pSOS952-thl*, *E.coli* TOP10 *pSOS952-thl-SADHCHG1M* et *E.coli* TOP10 *pSOS952-thl-SADHCHG2M* avec du NADH ou du NADPH.

Ces tests effectués aussi bien avec le NADH et le NADPH comme co-facteur, montrent que l'enzyme Sadh sauvage présente une très forte activité chez *E. coli*, avec le NADPH utilisé comme co-facteur (environ 2 U.mg<sup>-1</sup>) et aucune activité en présence de NADH. Ces résultats sont en totale cohérence avec les caractéristiques connues de cette enzyme. En revanche, les deux chimères construites semblent avoir perdues toute activité avec le NADPH comme co-facteur. Ceci indique que le remplacement du domaine de Rossmann a effectivement modifié la structure de l'enzyme de manière à empêcher l'utilisation du

NADPH. Néanmoins, les chimères ne présentent pas d'activité non plus avec le NADH comme co-facteur, ce qui suppose que soit la nouvelle structure de l'enzyme ne permet pas une liaison suffisamment efficace au NADH, soit le repliement a été trop perturbé et provoque une perte totale de fonctionnalité de l'enzyme.

# **Conclusion générale**



Les travaux présentés dans ce manuscrit avaient pour objectif la mise en place d'une stratégie d'ingénierie métabolique de *C. acetobutylicum* pour la production d'isopropanol comme unique produit de fermentation. L'approche choisie pour atteindre le but fixé s'est déroulée en deux temps :

- i). Le développement de la voie synthétique de l'isopropanol et sa mise en œuvre chez *Clostridium acetobutylicum* pour la production d'un mélange Isopropanol/Butanol/Ethanol (IBE) pouvant servir comme biocarburants.
- ii). La réorganisation complète du métabolisme de *C. acetobutylicum* pour la production d'isopropanol comme unique produit de fermentation.

Afin de réaliser la première étape, plusieurs opérons portant les gènes *ctfAB* et *adc* de *C. acetobutylicum* ATCC824 ainsi que le gène *sadh* de *C. beijerinckii* B593, sous la dépendance des promoteurs *pPtb* (*pCLF942*) ou *pThl* (*pCLF952*), ont été construits. Ces vecteurs ont alors été introduits dans les souches *824Δcac15* et *824Δbuk* de *C. acetobutylicum*. La souche portant la délétion de la voie du butyrate (*824Δbuk*) s'est alors avérée la plus performante pour la production de solvants. Des expériences de fermentation en mode discontinu ont également permis de déterminer que l'opéron utilisant le promoteur du gène *thl* pour l'expression de la voie de l'isopropanol (*pCLF952*) permet la meilleure production. Une optimisation du pH de la fermentation de la souche *824Δbuk pLCF952* a alors été conduite et la valeur de 4,8 a été déterminée comme étant optimale avec une production d'isopropanol de  $5 \text{ g.l}^{-1}$ , une production de solvants totaux de  $21 \text{ g.l}^{-1}$ , un rendement en solvants totaux de  $0,34 \text{ g.g}^{-1}$  et une productivité de  $0,8 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Dans l'objectif d'améliorer d'avantage la production d'isopropanol par cette souche, le flux dans la voie a été analysé et il a été suggéré que la réaction catalysée par la CoA-transférase est très certainement l'étape limitant la production d'isopropanol dans cette souche, notamment en raison de la faible affinité pour l'acétate de cette enzyme. Afin de contourner ce problème, il a été choisi de remplacer la CoA-transférase CtfAB de *C. acetobutylicum* par la CoA-transférase AtoAD d'*E. coli*, car cette enzyme a été décrite comme possédant une affinité pour l'acétate bien plus grande. Dans un premier temps, les gènes *atoAD* natifs d'*E. coli* ont été utilisés, mais leurs niveaux d'expression chez *C. acetobutylicum* se sont révélés trop faibles pour soutenir une production d'isopropanol satisfaisante. Une stratégie d'optimisation des gènes *atoAD* pour

leur expression chez *C. acetobutylicum* a été réalisée. L'usage de codons a été harmonisé afin de correspondre à celui de *C. acetobutylicum* et des séquences RBS spécialement conçues pour un fonctionnement optimal chez *C. acetobutylicum* ont été introduites en amont des deux gènes. Une première série de fermentations, réalisées en fioles à pH non régulé, a démontré que l'expression des gènes optimisés *atoAD* (*atoAD-OPT*) permet d'obtenir une production d'isopropanol équivalente à celle obtenue avec les gènes *ctfAB*. Néanmoins des fermentations en mode discontinu réalisées à pH régulé ont mis en évidence une instabilité génétique de la souche qui semble subir un processus « d'évolution » entraînant une forte diminution du flux de carbone dans la voie des composés en C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>. Il en résulte alors une baisse drastique de la production d'isopropanol et de butanol tandis que la production d'éthanol augmente considérablement. Les raisons expliquant ce phénotype particulier ne sont pas encore comprises, et des expériences complémentaires seront entreprises dans ce sens. Malgré cela, des mesures d'activités spécifiques ont permis de montrer que la souche de *C. acetobutylicum* exprimant les gènes *atoAD-OPT* présente une activité CoA-transférase forte et caractéristique de l'enzyme AtoAD, avec une affinité pour l'acétate bien supérieure à celle observée avec l'enzyme CtfAB. Finalement, la production du mélange IBE a été réalisée en utilisant du xylose et du xylane comme unique source de carbone et les résultats obtenus ont montré un fort potentiel de cette souche pour la production de solvants à partir de biomasse hémicellulosique. La production et les rendements devront néanmoins être encore améliorés notamment en levant la répression catabolique par le glucose dans cette souche (Ren et al., 2010; Xiao et al., 2011), en optimisant le métabolisme du xylose (Gu et al., 2009; Xiao et al., 2011) et en augmentant la production de xylanases (Rajagopalan et al., 2014).

La deuxième partie de ces travaux a représenté un challenge bien plus important de part la complexité du métabolisme branché de *C. acetobutylicum* et du grand nombre de modifications à entreprendre pour l'obtention d'une souche homoisopropanolique. En effet, la production d'isopropanol comme unique produit de fermentation nécessite la suppression de 4 voies métaboliques (Butanol, Ethanol, Butyrate et Lactate), voies permettant naturellement la réoxydation des équivalents réducteurs produits pendant la glycolyse, créant alors un fort déséquilibre de la balance électronique de la cellule rendant indispensable l'introduction d'une voie exogène permettant de rétablir l'équilibre redox sans

consommer de carbone. Plusieurs stratégies ont été entreprises pour contourner ce déséquilibre rédox.

Dans un premier temps, trois hydrogénases, appartenant à un type d'enzyme récemment découvert utilisant la bifurcation d'électrons, capable d'utiliser du NADH et de la ferrédoxine pour la production d'H<sub>2</sub>, ont été évalué chez *C. acetobutylicum*. Ce type d'enzyme capable de coupler la consommation de NADH avec la production d'H<sub>2</sub> ouvre de nombreuses possibilités pour l'ingénierie métabolique car elles permettent une régulation de la quantité de pouvoir réducteur disponible en fonction des besoins de la cellule. Deux outils permettant la détermination *in-vivo* et *in-vitro* de l'activité hydrogénase chez *C. acetobutylicum* ont été mis au point et ont permis de déterminer que 2 des 3 enzymes testées sont actives chez *C. acetobutylicum*. Même si cette activité est encore trop faible pour pouvoir directement utiliser ces enzymes pour la production d'isopropanol, ces travaux, qui représentent la première tentative rapportée à ce jour d'expression hétérologue de ce type d'enzyme, posent les fondations sur lesquelles pourront s'appuyer de futures études plus approfondies.

La deuxième stratégie mise en œuvre s'est basée sur l'utilisation d'une voie de métabolisation du xylose, différente de la voie des pentoses phosphates et reposant sur une activité phosphocétolase. Cette voie des phosphocétolases présente l'avantage de produire moins de pouvoir réducteur que la glycolyse et d'augmenter le rendement de conversion du substrat en produits par une baisse de la production de CO<sub>2</sub>. Un métabolisme de *C. acetobutylicum* basé sur cette voie des phosphocétolases a été imaginé afin de permettre la fermentation homoisopropanolique. Une stratégie d'adaptation *in-vivo* a été appliquée sur une souche  $\Delta buk \Delta pSOL thI^{-} hydA^{-}$  de *C. acetobutylicum* et a permis l'obtention d'une souche capable d'utiliser le xylose de manière très efficace en utilisant la voie des phosphocétolases. La voie synthétique de l'isopropanol ainsi que le gène codant pour la thiolase de *C. acetobutylicum* ont alors été introduits dans cette souche, permettant la production d'isopropanol. Cependant, cette production est très minoritaire et l'étape limitante de la voie a été déterminée au niveau de la thiolase. Malgré les stratégies développées pour optimiser l'expression, la transcription et la traduction du gène *thI* dans cette souche, le niveau d'activité thiolase reste insuffisant pour permettre une production d'isopropanol satisfaisante. Il est probable qu'une régulation par le CoA libre soit responsable du défaut

d'activité thiolase dans cette souche et des expérimentations doivent être menées pour implémenter dans cette souche la thiolase AtoB d'*E. coli*, qui présente une sensibilité bien moins importante à cet inhibiteur.

Finalement, cette étude a permis de mettre en évidence le potentiel que représente la production d'isopropanol par voie biologique en utilisant la bactérie *C. acetobutylicum*. La souche *824Δbuk pCLF952* s'avère performante pour la production d'un mélange IBE et sa capacité à métaboliser le xylane lui confère un avantage certain par rapport à d'autres organismes. Même si l'objectif ambitieux de construction d'une souche homoisopropanolique n'a pas été atteint, de nombreuses avancées ont été réalisées dans ce sens et permettront, sans nul doute, de contourner les difficultés et de parvenir au but souhaité dans un avenir proche.

# **Références**

## **Bibliographiques**



## Références bibliographiques :

- Abdullah, A. (2012). Characterisation of class II and III fructose bisphosphatases in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. Thesis (PhD). Napier University.
- Adams, M.W., and Mortenson, L.E. (1984). The physical and catalytic properties of hydrogenase II of *Clostridium pasteurianum*. A comparison with hydrogenase I. *J. Biol. Chem.* *259*, 7045–7055.
- Alsaker, K.V., Paredes, C., and Papoutsakis, E.T. (2010). Metabolite stress and tolerance in the production of biofuels and chemicals: gene-expression-based systems analysis of butanol, butyrate, and acetate stresses in the anaerobe *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnol. Bioeng.* *105*, 1131–1147.
- Andersch, W., Bahl, H., and Gottschalk, G. (1983). Level of enzymes involved in acetate, butyrate, acetone and butanol formation by *Clostridium acetobutylicum*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* *18*, 327–332.
- Bahl, H., Andersch, W., and Gottschalk, G. (1982a). Continuous production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum* in a two-stage phosphate limited chemostat. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* *15*, 201–205.
- Bahl, H., Andersch, W., Braun, K., and Gottschalk, G. (1982b). Effect of pH and butyrate concentration on the production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum* grown in continuous culture. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* *14*, 17–20.
- Ballongue, J., Masion, E., Amine, J., Petitdemange, H., and Gay, R. (1987). Inhibitor effect of products of metabolism on growth of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *26*, 568–573.
- Bellamacina, C.R. (1996). The nicotinamide dinucleotide binding motif: a comparison of nucleotide binding proteins. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *10*, 1257–1269.
- Berndt, H., and Schlegel, H.G. (1975). Kinetics and properties of beta-ketothiolase from *Clostridium pasteurianum*. *Arch. Microbiol.* *103*, 21–30.
- BERTANI, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *62*, 293–300.
- Bertram, J., Kuhn, A., and Dürre, P. (1990). Tn916-induced mutants of *Clostridium acetobutylicum* defective in regulation of solvent formation. *Arch. Microbiol.* *153*, 373–377.
- Bogorad, I.W., Lin, T.-S., and Liao, J.C. (2013). Synthetic non-oxidative glycolysis enables complete carbon conservation. *Nature* *502*, 693–697.
- Boyd, D.A., Cvitkovitch, D.G., and Hamilton, I.R. (1995). Sequence, expression, and function of the gene for the nonphosphorylating, NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* *177*, 2622–2627.
- Boynton, Z.L., Bennet, G.N., and Rudolph, F.B. (1996a). Cloning, sequencing, and expression of clustered genes encoding beta-hydroxybutyryl-coenzyme A (CoA) dehydrogenase, crotonase, and butyryl-CoA dehydrogenase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J. Bacteriol.* *178*, 3015–3024.

- Boynton, Z.L., Bennett, G.N., and Rudolph, F.B. (1996b). Cloning, sequencing, and expression of genes encoding phosphotransacetylase and acetate kinase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl. Environ. Microbiol.* *62*, 2758–2766.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* *72*, 248–254.
- Cary, J.W., Petersen, D.J., Papoutsakis, E.T., and Bennett, G.N. (1988). Cloning and expression of *Clostridium acetobutylicum* phosphotransbutyrylase and butyrate kinase genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *170*, 4613–4618.
- Cary, J.W., Petersen, D.J., Papoutsakis, E.T., and Bennett, G.N. (1990). Cloning and expression of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 acetoacetyl-coenzyme A:acetate/butyrate:coenzyme A-transferase in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* *56*, 1576–1583.
- Chen, J.S. (1995). Alcohol dehydrogenase: multiplicity and relatedness in the solvent-producing clostridia. *FEMS Microbiol. Rev.* *17*, 263–273.
- Chen, J.-S., and Hiu, S.F. (1986). Acetone-butanol-isopropanol production by *Clostridium beijerinckii* (synonym, *Clostridium butylicum*). *Biotechnol. Lett.* *8*, 371–376.
- Colby, G.D., and Chen, J.S. (1992). Purification and properties of 3-hydroxybutyryl-coenzyme A dehydrogenase from *Clostridium beijerinckii* ("*Clostridium butylicum*") NRRL B593. *Appl. Environ. Microbiol.* *58*, 3297–3302.
- Collas, F., Kuit, W., Clément, B., Marchal, R., López-Contreras, A.M., and Monot, F. (2012a). Simultaneous production of isopropanol, butanol, ethanol and 2,3-butanediol by *Clostridium*
- Contag, P.R., Williams, M.G., and Rogers, P. (1990). Cloning of a lactate dehydrogenase gene from *Clostridium acetobutylicum* B643 and expression in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* *56*, 3760–3765.
- Cooksley, C.M., Zhang, Y., Wang, H., Redl, S., Winzer, K., and Minton, N.P. (2012). Targeted mutagenesis of the *Clostridium acetobutylicum* acetone-butanol-ethanol fermentation pathway. *Metab. Eng.* *14*, 630–641.
- Cornillot, E., Nair, R.V., Papoutsakis, E.T., and Soucaille, P. (1997). The genes for butanol and acetone formation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 reside on a large plasmid whose loss leads to degeneration of the strain. *J. Bacteriol.* *179*, 5442–5447.
- Crofts, A.R., Meinhardt, S.W., Jones, K.R., and Snozzi, M. (1983). The role of the quinone pool in the cyclic electron-transfer chain of *Rhodospseudomonas sphaeroides* A modified Q-cycle mechanism. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* *723*, 202–218.
- Dai, Z., Dong, H., Zhu, Y., Zhang, Y., Li, Y., and Ma, Y. (2012). Introducing a single secondary alcohol dehydrogenase into butanol-tolerant *Clostridium acetobutylicum* Rh8 switches ABE fermentation to high level IBE fermentation. *Biotechnol. Biofuels* *5*, 44.
- Datta, R., and Zeikus, J.G. (1985). Modulation of acetone-butanol-ethanol fermentation by carbon monoxide and organic acids. *Appl. Environ. Microbiol.* *49*, 522–529.

Demuez, M., Cournac, L., Guerrini, O., Soucaille, P., and Girbal, L. (2007a). Complete activity profile of *Clostridium acetobutylicum* [FeFe]-hydrogenase and kinetic parameters for endogenous redox partners. *FEMS Microbiol. Lett.* *275*, 113–121.

Dong, H., Zhang, Y., Dai, Z., and Li, Y. (2010). Engineering clostridium strain to accept unmethylated DNA. *PLoS One* *5*, e9038.

Dürre, P., Kuhn, A., Gottwald, M., and Gottschalk, G. (1987). Enzymatic investigations on butanol dehydrogenase and butyraldehyde dehydrogenase in extracts of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *26*, 268–272.

Duncombe, G.R., and Frerman, F.E. (1976). Molecular and catalytic properties of the acetoacetyl-coenzyme A thiolase of *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* *176*, 159–170.

Energy Information Administration, U.. Europe Brent Spot Price FOB.

Espah Borujeni, A., Channarasappa, A.S., and Salis, H.M. (2014). Translation rate is controlled by coupled trade-offs between site accessibility, selective RNA unfolding and sliding at upstream standby sites. *Nucleic Acids Res.* *42*, 2646–2659.

Fontaine, L., Meynial-Salles, I., Girbal, L., Yang, X., Croux, C., and Soucaille, P. (2002). Molecular characterization and transcriptional analysis of *adhE2*, the gene encoding the NADH-dependent aldehyde/alcohol dehydrogenase responsible for butanol production in alcohologenic cultures of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J. Bacteriol.* *184*, 821–830.

Freier, D., and Gottschalk, G. (1987). L(+)-lactate dehydrogenase of *Clostridium acetobutylicum* is activated by fructose-1,6-bisphosphate. *FEMS Microbiol. Lett.* *43*, 229–233.

George, H.A., Johnson, J.L., Moore, W.E., Holdeman, L.V., and Chen, J.S. (1983). Acetone, Isopropanol, and Butanol Production by *Clostridium beijerinckii* (syn. *Clostridium butylicum*) and *Clostridium aurantibutyricum*. *Appl. Environ. Microbiol.* *45*, 1160–1163.

Gerischer, U., and Dürre, P. (1990). Cloning, sequencing, and molecular analysis of the acetoacetate decarboxylase gene region from *Clostridium acetobutylicum*. *J. Bacteriol.* *172*, 6907–6918.

Girbal, L., and Soucaille, P. (1998). Regulation of solvent production in *Clostridium acetobutylicum*. *Trends Biotechnol.* *16*, 11–16.

Girbal, L., Croux, C., Vasconcelos, I., and Soucaille, P. (1995). Regulation of metabolic shifts in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *FEMS Microbiol. Rev.* *17*, 287–297.

Girbal, L., Mortier-Barrière, I., Raynaud, F., Rouanet, C., Croux, C., and Soucaille, P. (2003). Development of a sensitive gene expression reporter system and an inducible promoter-repressor system for *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* *69*, 4985–4988.

Girbal, L., von Abendroth, G., Winkler, M., Benton, P.M.C., Meynial-Salles, I., Croux, C., Peters, J.W., Happe, T., and Soucaille, P. (2005). Homologous and heterologous overexpression in *Clostridium acetobutylicum* and characterization of purified clostridial and algal Fe-only hydrogenases with high specific activities. *Appl. Environ. Microbiol.* *71*, 2777–2781.

González-Pajuelo, M., Meynial-Salles, I., Mendes, F., Andrade, J.C., Vasconcelos, I., and Soucaille, P. (2005). Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* for the industrial production of 1,3-propanediol from glycerol. *Metab. Eng.* *7*, 329–336.

- Gorwa, M.F., Croux, C., and Soucaille, P. (1996). Molecular characterization and transcriptional analysis of the putative hydrogenase gene of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J. Bacteriol.* *178*, 2668–2675.
- Gottwald, M., and Gottschalk, G. (1985). The internal pH of *Clostridium acetobutylicum* and its effect on the shift from acid to solvent formation. *Arch. Microbiol.* *143*, 42–46.
- Green, E.M., and Bennett, G.N. (1996). Inactivation of an aldehyde/alcohol dehydrogenase gene from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl. Biochem. Biotechnol.* *57-58*, 213–221.
- Green, E.M., Boynton, Z.L., Harris, L.M., Rudolph, F.B., Papoutsakis, E.T., and Bennett, G.N. (1996). Genetic manipulation of acid formation pathways by gene inactivation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Microbiol. Read. Engl.* *142 ( Pt 8)*, 2079–2086.
- Grimmler, C., Held, C., Liebl, W., and Ehrenreich, A. (2010). Transcriptional analysis of catabolite repression in *Clostridium acetobutylicum* growing on mixtures of D-glucose and D-xylose. *J. Biotechnol.* *150*, 315–323.
- Gu, Y., Li, J., Zhang, L., Chen, J., Niu, L., Yang, Y., Yang, S., and Jiang, W. (2009). Improvement of xylose utilization in *Clostridium acetobutylicum* via expression of the *talA* gene encoding transaldolase from *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* *143*, 284–287.
- Gu, Y., Ding, Y., Ren, C., Sun, Z., Rodionov, D.A., Zhang, W., Yang, S., Yang, C., and Jiang, W. (2010). Reconstruction of xylose utilization pathway and regulons in Firmicutes. *BMC Genomics* *11*, 255.
- Guerrini, O., Burlat, B., Léger, C., Guigliarelli, B., Soucaille, P., and Girbal, L. (2007). Characterization of Two 2[4Fe4S] Ferredoxins from *Clostridium acetobutylicum*. *Curr. Microbiol.* *56*, 261–267.
- Hanai, T., Atsumi, S., and Liao, J.C. (2007). Engineered synthetic pathway for isopropanol production in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* *73*, 7814–7818.
- Harris, L.M., Desai, R.P., Welker, N.E., and Papoutsakis, E.T. (2000). Characterization of recombinant strains of the *Clostridium acetobutylicum* butyrate kinase inactivation mutant: need for new phenomenological models for solventogenesis and butanol inhibition? *Biotechnol. Bioeng.* *67*, 1–11.
- Hartmanis, M.G. (1987). Butyrate kinase from *Clostridium acetobutylicum*. *J. Biol. Chem.* *262*, 617–621.
- Hartmanis, M.G., and Gatenbeck, S. (1984). Intermediary Metabolism in *Clostridium acetobutylicum*: Levels of Enzymes Involved in the Formation of Acetate and Butyrate. *Appl. Environ. Microbiol.* *47*, 1277–1283.
- Hartmanis, M.N., Klason, T., and Gatenbeck, S. (1984). Uptake and activation of acetate and butyrate in *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *20*.
- Heap, J.T., Pennington, O.J., Cartman, S.T., Carter, G.P., and Minton, N.P. (2007). The Clostron: a universal gene knock-out system for the genus *Clostridium*. *J. Microbiol. Methods* *70*, 452–464.
- Heap, J.T., Kuehne, S.A., Ehsaan, M., Cartman, S.T., Cooksley, C.M., Scott, J.C., and Minton, N.P. (2010). The Clostron: Mutagenesis in *Clostridium* refined and streamlined. *J. Microbiol. Methods* *80*, 49–55.

- Herrmann, G., Jayamani, E., Mai, G., and Buckel, W. (2008). Energy conservation via electron-transferring flavoprotein in anaerobic bacteria. *J. Bacteriol.* *190*, 784–791.
- Al-Hinai, M.A., Fast, A.G., and Papoutsakis, E.T. (2012). Novel system for efficient isolation of clostridium double-crossover allelic exchange mutants enabling markerless chromosomal gene deletions and DNA integration. *Appl. Environ. Microbiol.* *78*, 8112–8121.
- Hiu, S.F., Zhu, C.X., Yan, R.T., and Chen, J.S. (1987a). Butanol-Ethanol Dehydrogenase and Butanol-Ethanol-Isopropanol Dehydrogenase: Different Alcohol Dehydrogenases in Two Strains of *Clostridium beijerinckii* (*Clostridium butylicum*). *Appl. Environ. Microbiol.* *53*, 697–703.
- Holt, R.A., Stephens, G.M., and Morris, J.G. (1984). Production of Solvents by *Clostridium acetobutylicum* Cultures Maintained at Neutral pH. *Appl. Environ. Microbiol.* *48*, 1166–1170.
- Hou, X., Peng, W., Xiong, L., Huang, C., Chen, X., Chen, X., and Zhang, W. (2013). Engineering *Clostridium acetobutylicum* for alcohol production. *J. Biotechnol.* *166*, 25–33.
- Hüsemann, M.H.W., and Papoutsakis, E.T. (1989). Enzymes limiting butanol and acetone formation in continuous and batch cultures of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *31-31*, 435–444.
- Huang, K.X., Huang, S., Rudolph, F.B., and Bennett, G.N. (2000). Identification and characterization of a second butyrate kinase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* *2*, 33–38.
- Huang, L., Gibbins, L.N., and Forsberg, C.W. (1985). Transmembrane pH gradient and membrane potential in *Clostridium acetobutylicum* during growth under acetogenic and solventogenic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* *50*, 1043–1047.
- Huang, L., Forsberg, C.W., and Gibbins, L.N. (1986). Influence of External pH and Fermentation Products on *Clostridium acetobutylicum* Intracellular pH and Cellular Distribution of Fermentation Products. *Appl. Environ. Microbiol.* *51*, 1230–1234.
- Iddar, A., Valverde, F., Serrano, A., and Soukri, A. (2002). Expression, purification, and characterization of recombinant nonphosphorylating NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Clostridium acetobutylicum*. *Protein Expr. Purif.* *25*, 519–526.
- Inokuma, K., Liao, J.C., Okamoto, M., and Hanai, T. (2010). Improvement of isopropanol production by metabolically engineered *Escherichia coli* using gas stripping. *J. Biosci. Bioeng.* *110*, 696–701.
- Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* *96*, 23–28.
- Inui, M., Suda, M., Kimura, S., Yasuda, K., Suzuki, H., Toda, H., Yamamoto, S., Okino, S., Suzuki, N., and Yukawa, H. (2008). Expression of *Clostridium acetobutylicum* butanol synthetic genes in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *77*, 1305–1316.
- Ismail, A.A., Zhu, C.X., Colby, G.D., and Chen, J.S. (1993). Purification and characterization of a primary-secondary alcohol dehydrogenase from two strains of *Clostridium beijerinckii*. *J. Bacteriol.* *175*, 5097–5105.

- Jacob, U., Mack, M., Clausen, T., Huber, R., Buckel, W., and Messerschmidt, A. (1997). Glutaconate CoA-transferase from *Acidaminococcus fermentans*: the crystal structure reveals homology with other CoA-transferases. *Struct. Lond. Engl.* *1993* *5*, 415–426.
- Jang, Y.-S., Lee, J.Y., Lee, J., Park, J.H., Im, J.A., Eom, M.-H., Lee, J., Lee, S.-H., Song, H., Cho, J.-H., et al. (2012). Enhanced butanol production obtained by reinforcing the direct butanol-forming route in *Clostridium acetobutylicum*. *mBio* *3*.
- Jang, Y.-S., Woo, H.M., Im, J.A., Kim, I.H., and Lee, S.Y. (2013a). Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* for enhanced production of butyric acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *97*, 9355–9363.
- Jang, Y.-S., Malaviya, A., and Lee, S.Y. (2013b). Acetone-butanol-ethanol production with high productivity using *Clostridium acetobutylicum* BKM19. *Biotechnol. Bioeng.* *110*, 1646–1653.
- Jarzębski, A.B., Goma, G., and Soucaille, P. (1992). A tentative physiological model of batch acetobutylic fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *37*, 714–717.
- Jojima, T., Inui, M., and Yukawa, H. (2008). Production of isopropanol by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *77*, 1219–1224.
- Junelles, A.M., Janati-Idrissi, R., Petitdemange, H., and Gay, R. (1988). Iron effect on acetone-butanol fermentation. *Curr. Microbiol.* *17*, 299–303.
- Kanouni, A.E., Zerdani, I., Znassni, M., Loutfi, M., and Boudouma, M. (1998). The improvement of glucose/xylose fermentation by *Clostridium acetobutylicum* using calcium carbonate. *World J. Microbiol. Biotechnol.* *14*, 431–435(5).
- Karberg, M., Guo, H., Zhong, J., Coon, R., Perutka, J., and Lambowitz, A.M. (2001). Group II introns as controllable gene targeting vectors for genetic manipulation of bacteria. *Nat. Biotechnol.* *19*, 1162–1167.
- Kaster, A.-K., Moll, J., Parey, K., and Thauer, R.K. (2011). Coupling of ferredoxin and heterodisulfide reduction via electron bifurcation in hydrogenotrophic methanogenic archaea. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 2981–2986.
- Katahira, S., Fujita, Y., Mizuike, A., Fukuda, H., and Kondo, A. (2004). Construction of a Xylan-Fermenting Yeast Strain through Codisplay of Xylanolytic Enzymes on the Surface of Xylose-Utilizing *Saccharomyces cerevisiae* Cells. *Appl. Environ. Microbiol.* *70*, 5407–5414.
- Kell, D.B., Peck, M.W., Rodger, G., and Morris, J.G. (1981). On the permeability to weak acids and bases of the cytoplasmic membrane of *Clostridium pasteurianum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *99*, 81–88.
- Kim, B.H., Bellows, P., Datta, R., and Zeikus, J.G. (1984). Control of Carbon and Electron Flow in *Clostridium acetobutylicum* Fermentations: Utilization of Carbon Monoxide to Inhibit Hydrogen Production and to Enhance Butanol Yields. *Appl. Environ. Microbiol.* *48*, 764–770.
- King, P.W., Posewitz, M.C., Ghirardi, M.L., and Seibert, M. (2006). Functional studies of [FeFe] hydrogenase maturation in an *Escherichia coli* biosynthetic system. *J. Bacteriol.* *188*, 2163–2172.
- Kondo, A., and Ueda, M. (2004). Yeast cell-surface display--applications of molecular display. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *64*, 28–40.

- Korkhin, Y., Kalb(Gilboa), A.J., Peretz, M., Bogin, O., Burstein, Y., and Frolov, F. (1998). NADP-dependent bacterial alcohol dehydrogenases: crystal structure, cofactor-binding and cofactor specificity of the ADHs of *Clostridium beijerinckii* and *Thermoanaerobacter brockii*. *J. Mol. Biol.* **278**, 967–981.
- Korolev, S., Koroleva, O., Petterson, K., Gu, M., Collart, F., Dementieva, I., and Joachimiak, A. (2002). Autotracing of *Escherichia coli* acetate CoA-transferase alpha-subunit structure using 3.4 Å MAD and 1.9 Å native data. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **58**, 2116–2121.
- Kotani, T., Yamamoto, T., Yurimoto, H., Sakai, Y., and Kato, N. (2003). Propane monooxygenase and NAD<sup>+</sup>-dependent secondary alcohol dehydrogenase in propane metabolism by *Gordonia* sp. strain TY-5. *J. Bacteriol.* **185**, 7120–7128.
- Kuit, W., Minton, N.P., López-Contreras, A.M., and Eggink, G. (2012). Disruption of the acetate kinase (ack) gene of *Clostridium acetobutylicum* results in delayed acetate production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **94**, 729–741.
- Kusakabe, T., Tatsuke, T., Tsuruno, K., Hirokawa, Y., Atsumi, S., Liao, J.C., and Hanai, T. (2013). Engineering a synthetic pathway in cyanobacteria for isopropanol production directly from carbon dioxide and light. *Metab. Eng.* **20**, 101–108.
- Lee, J., Jang, Y.-S., Choi, S.J., Im, J.A., Song, H., Cho, J.H., Seung, D.Y., Papoutsakis, E.T., Bennett, G.N., and Lee, S.Y. (2012). Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 for isopropanol-butanol-ethanol fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 1416–1423.
- Lee, S.F., Forsberg, C.W., and Gibbins, L.N. (1985). Xylanolytic Activity of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 1068–1076.
- Lee, S.Y., Bennett, G.N., and Papoutsakis, E.T. (1992). Construction of *Escherichia coli*-*Clostridium acetobutylicum* shuttle vectors and transformation of *Clostridium acetobutylicum* strains. *Biotechnol. Lett.* **14**, 427–432.
- Lehmann, D., and Lütke-Eversloh, T. (2011). Switching *Clostridium acetobutylicum* to an ethanol producer by disruption of the butyrate/butanol fermentative pathway. *Metab. Eng.* **13**, 464–473.
- Lehmann, D., Hönicke, D., Ehrenreich, A., Schmidt, M., Weuster-Botz, D., Bahl, H., and Lütke-Eversloh, T. (2012a). Modifying the product pattern of *Clostridium acetobutylicum*: physiological effects of disrupting the acetate and acetone formation pathways. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **94**, 743–754.
- Lehmann, D., Radomski, N., and Lütke-Eversloh, T. (2012b). New insights into the butyric acid metabolism of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **96**, 1325–1339.
- Li, F., Hinderberger, J., Seedorf, H., Zhang, J., Buckel, W., and Thauer, R.K. (2008). Coupled ferredoxin and crotonyl coenzyme A (CoA) reduction with NADH catalyzed by the butyryl-CoA
- Liu, L., Zhang, L., Tang, W., Gu, Y., Hua, Q., Yang, S., Jiang, W., and Yang, C. (2012). Phosphoketolase pathway for xylose catabolism in *Clostridium acetobutylicum* revealed by <sup>13</sup>C metabolic flux analysis. *J. Bacteriol.* **194**, 5413–5422.
- LOVENBERG, W., BUCHANAN, B.B., and RABINOWITZ, J.C. (1963). STUDIES ON THE CHEMICAL NATURE OF CLOSTRIDIAL FERREDOXIN. *J. Biol. Chem.* **238**, 3899–3913.

- Madan, V.K., Hillmer, P., and Gottschalk, G. (1973). Purification and properties of NADP-dependent L(+)-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase from *Clostridium kluveri*. *Eur. J. Biochem. FEBS* *32*, 51–56.
- Mann, M.S., and Lütke-Eversloh, T. (2013). Thiolase engineering for enhanced butanol production in *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnol. Bioeng.* *110*, 887–897.
- Martin, J.R., Petitdemange, H., Ballongue, J., and Gay, R. (1983). Effects of acetic and butyric acids on solvents production by *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnol. Lett.* *5*, 89–94.
- Mavrovouniotis, M.L. (1991). Estimation of standard Gibbs energy changes of biotransformations. *J. Biol. Chem.* *266*, 14440–14445.
- Meinecke, B., Bertram, J., and Gottschalk, G. (1989). Purification and characterization of the pyruvate-ferredoxin oxidoreductase from *Clostridium acetobutylicum*. *Arch. Microbiol.* *152*, 244–250.
- Mermelstein, L.D., and Papoutsakis, E.T. (1993). In vivo methylation in *Escherichia coli* by the *Bacillus subtilis* phage phi 3T I methyltransferase to protect plasmids from restriction upon transformation of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl. Environ. Microbiol.* *59*, 1077–1081.
- Mermelstein, L.D., Welker, N.E., Bennett, G.N., and Papoutsakis, E.T. (1992). Expression of Cloned Homologous Fermentative Genes in *Clostridium Acetobutylicum* ATCC 824. *Bio/Technology* *10*, 190–195.
- Mermelstein, L.D., Papoutsakis, E.T., Petersen, D.J., and Bennett, G.N. (1993). Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 for increased solvent production by enhancement of acetone formation enzyme activities using a synthetic acetone operon. *Biotechnol. Bioeng.* *42*, 1053–1060.
- MORTENSON, L.E., VALENTINE, R.C., and CARNAHAN, J.E. (1962). An electron transport factor from *Clostridium pasteurianum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *7*, 448–452.
- Murarka, A., Clomburg, J.M., and Gonzalez, R. (2010). Metabolic flux analysis of wild-type *Escherichia coli* and mutants deficient in pyruvate-dissimilating enzymes during the fermentative metabolism of glucuronate. *Microbiol. Read. Engl.* *156*, 1860–1872.
- Nair, R.V., and Papoutsakis, E.T. (1994). Expression of plasmid-encoded aad in *Clostridium acetobutylicum* M5 restores vigorous butanol production. *J. Bacteriol.* *176*, 5843–5846.
- Nair, R.V., Bennett, G.N., and Papoutsakis, E.T. (1994). Molecular characterization of an aldehyde/alcohol dehydrogenase gene from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J. Bacteriol.* *176*, 871–885.
- Nitschke, W., and Russell, M.J. (2012). Redox bifurcations: mechanisms and importance to life now, and at its origin: a widespread means of energy conversion in biology unfolds.... *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* *34*, 106–109.
- Oh, E., Becker, A.H., Sandikci, A., Huber, D., Chaba, R., Gloge, F., Nichols, R.J., Typas, A., Gross, C.A., Kramer, G., et al. (2011). Selective ribosome profiling reveals the cotranslational chaperone action of trigger factor in vivo. *Cell* *147*, 1295–1308.

- Palosaari, N.R., and Rogers, P. (1988). Purification and properties of the inducible coenzyme A-linked butyraldehyde dehydrogenase from *Clostridium acetobutylicum*. *J. Bacteriol.* *170*, 2971–2976.
- Panitz, J.C., Zverlov, V.V., Pham, V.T.T., Stürzl, S., Schieder, D., and Schwarz, W.H. (2014). Isolation of a solventogenic *Clostridium* sp. strain: fermentation of glycerol to n-butanol, analysis of the *bcs* operon region and its potential regulatory elements. *Syst. Appl. Microbiol.* *37*, 1–9.
- Peguín, S., and Soucaille, P. (1995). Modulation of Carbon and Electron Flow in *Clostridium acetobutylicum* by Iron Limitation and Methyl Viologen Addition. *Appl. Environ. Microbiol.* *61*, 403–405.
- Petersen, D.J., and Bennett, G.N. (1990). Purification of acetoacetate decarboxylase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and cloning of the acetoacetate decarboxylase gene in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* *56*, 3491–3498.
- Petersen, D.J., Welch, R.W., Rudolph, F.B., and Bennett, G.N. (1991). Molecular cloning of an alcohol (butanol) dehydrogenase gene cluster from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J. Bacteriol.* *173*, 1831–1834.
- Plotkin, J.B., and Kudla, G. (2011). Synonymous but not the same: the causes and consequences of codon bias. *Nat. Rev. Genet.* *12*, 32–42.
- Rajagopalan, G., He, J., and Yang, K.L. (2014). Direct fermentation of xylan by *Clostridium* strain BOH3 for the production of butanol and hydrogen using optimized culture medium. *Bioresour. Technol.* *154*, 38–43.
- Rassadin, V.G., Shlygin, O.Y., Likhterova, N.M., Slavin, V.N., and Zharov, A.V. (2006). Problems in production of high-octane, unleaded automotive gasolines. *Chem. Technol. Fuels Oils* *42*, 235–242.
- Ren, C., Gu, Y., Hu, S., Wu, Y., Wang, P., Yang, Y., Yang, C., Yang, S., and Jiang, W. (2010). Identification and inactivation of pleiotropic regulator CcpA to eliminate glucose repression of xylose utilization in *Clostridium acetobutylicum*. *Metab. Eng.* *12*, 446–454.
- Salis, H.M., Mirsky, E.A., and Voigt, C.A. (2009). Automated design of synthetic ribosome binding sites to control protein expression. *Nat. Biotechnol.* *27*, 946–950.
- Sambrook, J. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual* (Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sá-Pessoa, J., Paiva, S., Ribas, D., Silva, I.J., Viegas, S.C., Arraiano, C.M., and Casal, M. (2013). SATP (YaaH), a succinate-acetate transporter protein in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* *454*, 585–595.
- Schuchmann, K., and Müller, V. (2012). A bacterial electron-bifurcating hydrogenase. *J. Biol. Chem.* *287*, 31165–31171.
- Schut, G.J., and Adams, M.W.W. (2009). The iron-hydrogenase of *Thermotoga maritima* utilizes ferredoxin and NADH synergistically: a new perspective on anaerobic hydrogen production. *J. Bacteriol.* *191*, 4451–4457.
- Sillers, R., Al-Hinai, M.A., and Papoutsakis, E.T. (2009). Aldehyde-alcohol dehydrogenase and/or thiolase overexpression coupled with CoA transferase downregulation lead to higher alcohol titers and selectivity in *Clostridium acetobutylicum* fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* *102*, 38–49.

- Soma, Y., Inokuma, K., Tanaka, T., Ogino, C., Kondo, A., Okamoto, M., and Hanai, T. (2012). Direct isopropanol production from cellobiose by engineered *Escherichia coli* using a synthetic pathway and a cell surface display system. *J. Biosci. Bioeng.* *114*, 80–85.
- Sommer, B., Garbe, D., Schrepfer, P., and Brück, T. (2013). Characterization of a highly thermostable  $\beta$ -hydroxybutyryl CoA dehydrogenase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J. Mol. Catal. B Enzym.* *98*, 138–144.
- Sørensen, M.A., Kurland, C.G., and Pedersen, S. (1989). Codon usage determines translation rate in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* *207*, 365–377.
- Soucaille, P., Figge, R., and Croux, C. (2006). Process for Chromosomal Integration and DNA Sequence Replacement in Clostridia (Saint Beuzire).
- Sramek, S.J., and Frerman, F.E. (1975). Purification and properties of *Escherichia coli* coenzyme A-transferase. *Arch. Biochem. Biophys.* *171*, 14–26.
- Sramek, S.J., and Frerman, F.E. (1977). Steady state kinetic mechanism of the *Escherichia coli* coenzyme A transferase. *Arch. Biochem. Biophys.* *181*, 178–184.
- Stadtman, E.R. (1955). [98] Phosphotransacetylase from *Clostridium kluveri*. In *Methods in Enzymology*, (Elsevier), pp. 596–599.
- Survase, S.A., Jurgens, G., van Heiningen, A., and Granström, T. (2011). Continuous production of isopropanol and butanol using *Clostridium beijerinckii* DSM 6423. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *91*, 1305–1313.
- Thauer, R.K., Jungermann, K., Rupprecht, E., and Decker, K. (1969). Hydrogen formation from NADH in cell-free extracts of *Clostridium kluveri*. Acetyl coenzyme A requirement and ferredoxin dependence. *FEBS Lett.* *4*, 108–112.
- Thauer, R.K., Jungermann, K., and Decker, K. (1977). Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol. Rev.* *41*, 100–180.
- Tummala, S.B., Junne, S.G., and Papoutsakis, E.T. (2003a). Antisense RNA downregulation of coenzyme A transferase combined with alcohol-aldehyde dehydrogenase overexpression leads to predominantly alcohologenic *Clostridium acetobutylicum* fermentations. *J. Bacteriol.* *185*, 3644–3653.
- Tummala, S.B., Welker, N.E., and Papoutsakis, E.T. (2003b). Design of antisense RNA constructs for downregulation of the acetone formation pathway of *Clostridium acetobutylicum*. *J. Bacteriol.* *185*, 1923–1934.
- Valentine, R.C., Jackson, R.L., and Wolfe, R.S. (1962). Role of ferredoxin in hydrogen metabolism of. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *7*, 453–456.
- Vasconcelos, I., Girbal, L., and Soucaille, P. (1994). Regulation of carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* grown in chemostat culture at neutral pH on mixtures of glucose and glycerol. *J. Bacteriol.* *176*, 1443–1450.
- Walter, K.A., Bennett, G.N., and Papoutsakis, E.T. (1992). Molecular characterization of two *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 butanol dehydrogenase isozyme genes. *J. Bacteriol.* *174*, 7149–7158.

- Wang, S., Huang, H., Kahnt, J., and Thauer, R.K. (2013). A reversible electron-bifurcating ferredoxin- and NAD-dependent [FeFe]-hydrogenase (HydABC) in *Moorella thermoacetica*. *J. Bacteriol.* *195*, 1267–1275.
- Waterson, R.M., Castellino, F.J., Hass, G.M., and Hill, R.L. (1972). Purification and characterization of cottonase from *Clostridium acetobutylicum*. *J. Biol. Chem.* *247*, 5266–5271.
- Welch, R.W., Rudolph, F.B., and Papoutsakis, E.T. (1989). Purification and characterization of the NADH-dependent butanol dehydrogenase from *Clostridium acetobutylicum* (ATCC 824). *Arch. Biochem. Biophys.* *273*, 309–318.
- Wiesenborn, D.P., Rudolph, F.B., and Papoutsakis, E.T. (1988). Thiolase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and Its Role in the Synthesis of Acids and Solvents. *Appl. Environ. Microbiol.* *54*, 2717–2722.
- Wiesenborn, D.P., Rudolph, F.B., and Papoutsakis, E.T. (1989a). Phosphotransbutyrylase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and its role in acidogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* *55*, 317–322.
- Wiesenborn, D.P., Rudolph, F.B., and Papoutsakis, E.T. (1989b). Coenzyme A transferase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and its role in the uptake of acids. *Appl. Environ. Microbiol.* *55*, 323–329.
- Wietzke, M., and Bahl, H. (2012). The redox-sensing protein Rex, a transcriptional regulator of solventogenesis in *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *96*, 749–761.
- Winzer, K., Lorenz, K., and Dürre, P. (1997). Acetate kinase from *Clostridium acetobutylicum*: a highly specific enzyme that is actively transcribed during acidogenesis and solventogenesis. *Microbiol. Read. Engl.* *143 ( Pt 10)*, 3279–3286.
- Xiao, H., Gu, Y., Ning, Y., Yang, Y., Mitchell, W.J., Jiang, W., and Yang, S. (2011). Confirmation and elimination of xylose metabolism bottlenecks in glucose phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system-deficient *Clostridium acetobutylicum* for simultaneous utilization of glucose, xylose, and arabinose. *Appl. Environ. Microbiol.* *77*, 7886–7895.
- Zhao, Y., Tomas, C.A., Rudolph, F.B., Papoutsakis, E.T., and Bennett, G.N. (2005). Intracellular butyryl phosphate and acetyl phosphate concentrations in *Clostridium acetobutylicum* and their implications for solvent formation. *Appl. Environ. Microbiol.* *71*, 530–537.
- Zheng, Y.-N., Li, L.-Z., Xian, M., Ma, Y.-J., Yang, J.-M., Xu, X., and He, D.-Z. (2009). Problems with the microbial production of butanol. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* *36*, 1127–1138.



# Liste des Figures



## Liste des figures :

Figure 1 : Evolution du prix du baril de pétrole brut entre 1987 et 2014 (US Energie Information Administration., 2014).....	20
Figure 2 : Schéma général de l'organisation du projet Biocore .....	22
Figure 3 : Voie de la glycolyse de <i>C. acetobutylicum</i> .....	30
Figure 4 : Enzymes impliquées dans l'utilisation du xylose chez <i>C. acetobutylicum</i> . XylT : transporteur de xylose; XylA-II : xylose isomérase ; XylB : xylulose kinase (Gu et al.,2010). A : Schéma simplifié de la voie d'utilisation du xylose. B : Organisation chromosomique des gènes impliqués dans l'utilisation du xylose. Les sites impliqués dans la régulation par XylR sont indiqué par un triangle rouge.....	32
Figure 5 : Les deux voies métaboliques permettant l'utilisation du xylose par <i>C. acetobutylicum</i> (Liu et al., 2012).....	35
Figure 6 : Mécanisme réactionnel au sein du site actif de la CoA-transférase .....	50
Figure 7 : Schéma général du métabolisme du glucose par <i>C.acetobutylicum</i> . PFOR : Pyruvate ferrédoxine oxydoréductase ; NFOR : NAD(P) ferrédoxine oxydoréductase ; AAD : Aldéhyde-alcools déshydrogénase ; ADH : alcools déshydrogénase ; THL : Thiolase ; PTA : Phosphotransacétylase ; ACK : Acétate kinase ; CoAT : CoA transférase ; ADC : Acétoacétate décarboxylase ; HBD : $\beta$ -hydroxybutyryl-CoA déshydrogénase ; CRT : Crotonase ; BCD : Butyryl-CoA déshydrogénase ; PTB : phosphotransbutyrylase ; BK : Butyrate kinase. ....	54
Figure 8 : 1 : Pyruvate-ferrédoxine oxydoréductase ; 2 : Hydrogénase ; 3 : Ferrédoxine NAD <sup>+</sup> réductase ; 4 : NADH-ferrédoxine réductase ; 5 : Ferrédoxine NADP <sup>+</sup> réductase (Girbal et al., 1995).	59
Figure 9 : Méthode de délétion de gène chez <i>C. acetobutylicum</i> par double crossing-over (Soucaille et al., 2006).....	68
Figure 10 : la molécule d'isopropanol .....	79
Figure 11 : Formation de l'isopropanol à partir d'acétone .....	79

Figure 12 : Réduction de l'acétone en isopropanol par l'alcool déshydrogénase secondaire de <i>C. beijerinckii</i> .....	80
Figure 13 : Stratégie d'ingénierie métabolique d' <i>E.coli</i> pour la production d'isopropanol. THL : Thiolase; CTF : CoA transférase; ADC : Acétoacétate décarboxylase; ADH : Alcool déshydrogénase secondaire (Jojima et al., 2008).....	82
Figure 14 : Mécanisme proposée de la réduction de la ferrédoxine et du crotonyl-CoA par le NADH au sein du complexe Bcd/EtfAB de <i>C.kluyveri</i> (Li et al., 2008). ....	86
Figure 15 : Courbes théoriques de titration de composés rédox à deux électrons. La partie bleue de la courbe de Nernst représente le passage de l'état réduit à l'état semi-oxydé. La partie rouge de la courbe représente le passage de l'état semi-oxydé à l'état oxydé. La courbe de Nernst verte représente le passage de l'état réduit à l'état oxydé sans passage par un état semi-oxydé (Nitschke et Russell, 2012). ....	87
Figure 16: Transition rédox au sein d'une flavoprotéine hypothétique (Nitschke et Russell, 2012)....	88
Figure 17 : Structure et mécanisme hypothétique de transfert d'électrons au sein de l'hydrogénase de <i>T.maritima</i> (Schut et Adams ,2009). ....	90
Figure 18 : Stratégie de clonage de l'opéron isopropanol dans les vecteur <i>pCLF942</i> et <i>pCLF952</i> . ....	118
Figure 19 : Stratégie de clonage des gènes <i>atoAD</i> dans le vecteur <i>pCLF952-thl-atoAD</i> . ....	119
Figure 20 : Voie de l'isopropanol chez <i>C. acetobutylicum</i> après introduction de l'enzyme SADH. ....	133
Figure 21 : Délétion du gène <i>buk</i> du génome de <i>C. acetobutylicum</i> par double crossing-over (Soucaille et al.,2006).....	134
Figure 22: Profil de fermentation de la souche 824 $\Delta$ buk d'une culture régulée à pH 5,0 en milieu CGM glucose.....	135
Figure 23 : Activités spécifiques mesurées à partir d'extraits cellulaires collectés en phase exponentielle pour les souches 824 $\Delta$ buk <i>pCLF942</i> , 824 $\Delta$ buk <i>pCLF952</i> et 824 $\Delta$ buk. ....	141
Figure 24 : Evolution de la concentration en glucose, acétate, éthanol, isopropanol et butanol, ainsi que celle de la densité optique, lors de fermentation de la souche 824 $\Delta$ buk <i>pCLF952</i> réalisées à 5 pHs différents. ....	143

Figure 25 : Rendements en isopropanol et en solvants mesurés lors de fermentations de la souche <i>824 Δbuk pCLF952</i> réalisées à 5 pHs différents.....	144
Figure 26 : Production totale d'acétate lors de fermentations de la souche <i>824 Δbuk pCLF952</i> réalisées à 5 pHs différents. ....	145
Figure 27 : Quantité d'acétate métabolisée lors de fermentations de la souche <i>824 Δbuk pCLF952</i> réalisées à 5 pHs différents. ....	146
Figure 28 : Activités spécifiques mesurées à partir d'extraits cellulaires collectés en phase exponentielle pour la souche <i>824Δ buk pCLF952</i> cultivée à différents pH.....	147
Figure 29 : Evolution en fonction du pH de culture de la concentration en acétate intracellulaire et des flux in-vivo et in-vitro à travers la CoA transférase .....	149
Figure 30 : Alignement des séquences protéiques de la CoA transférase de <i>C. acetobutylicum</i> et de la CoA transférase d' <i>E. coli</i> .....	151
Figure 31 : Activités spécifiques CoA transférase mesurées dans les souches <i>824Δbuk</i> , <i>824Δbuk pCLF952</i> et <i>824Δbuk pCLF952-thl-atoAD</i> . ....	155
Figure 32 : Région intergénique entre <i>atoD</i> et <i>atoA</i> . Codon stop <i>atoD</i> en rouge et codon start <i>atoA</i> en vert. ....	157
Figure 33 : Région intergénique entre <i>atoD</i> et <i>atoA</i> . Codon stop <i>atoD</i> en rouge, codon start <i>atoA</i> en vert et codon start alternatif en bleue.....	158
Figure 34 : Structure 3D de la sous unité alpha de la CoA transférase d' <i>E.coli</i> . Les 5 derniers acides aminés de l'extrémité C terminal sont représentés en rouge.....	159
Figure 35 : Profils de production d'acétate et d'isopropanol par les souches <i>824 Δbuk pCLF952</i> et <i>824Δbuk pCLF952-thl-atoAD-OPT</i> en milieu CGM glucose. ....	161
Figure 36 : Activité spécifique thiolase mesurée à partir d'extrait totaux des souches <i>824Δbuk pCLF952</i> et <i>824Δbuk pCLF952-thl-atoAD-OPT</i> . ....	164

Figure 37 : Activité spécifique CoA transférase avec 150 mM d'acétate dans le milieu réactionnel mesurée à partir d'extrait totaux des souches <i>824Δbuk pCLF952</i> et <i>824Δbuk pCLF952-thl-atoAD-OPT</i> . .....	165
Figure 38 : Activité spécifique CoA transférase avec 70 mM d'acétate dans le milieu réactionnel mesurée à partir d'extrait totaux des souches <i>824Δbuk pCLF952</i> et <i>824Δbuk pCLF952-thl-atoAD-OPT</i> . .....	166
Figure 39 : Evolution de la concentration en glucose, acétate, éthanol, isopropanol et butanol, ainsi que celle de la densité optique, lors de fermentations de la souche <i>824 Δbuk pCLF952</i> réalisées à pH 5,0 et 4,8 sur milieu xylose.....	168
Figure 40 : Evolution de la concentration des produits de fermentation de la souche <i>824 Δbuk pCLF952</i> sur milieu xylane.....	170
Figure 41 : Voies métaboliques théorique de production d'isopropanol à partir de glucose. ....	176
Figure 42: Déséquilibre de la balance rédox provoqué par la suppression simultanée des voies de l'éthanol et de butanol dans la souche <i>824Δbuk</i> . ....	177
Figure 43 : Profils de fermentation de la souche <i>824 ΔbukΔpSOL</i> en chimostat en milieu synthétique contenant 30 g.l <sup>-1</sup> de glucose. ....	181
Figure 44 : Schéma simplifié du métabolisme de la souche <i>824 ΔbukΔpSOL</i> sur glucose.....	182
Figure 45 : Contrôles PCR effectués sur la souche <i>Δbuk hydA ::intron pTLS_hydA</i> . pSOSterm + hydA milieu D : PCR spécifique du vecteur <i>pTLS_hydA-C-long-linker-Tag</i> , taille attendue de 1323 bp. HydAB+HydA milieu R : PCR spécifique du gène <i>hydA</i> chromosomique, taille attendue avec intron de 3102 bp, taille attendue sans intron de 2153 bp. ItrA : PCR spécifique du gène <i>ItrA</i> sur le plasmide <i>pCONS_hydA ::int</i> , c :contrôle positif, taille attendue de 1498 bp .....	188
Figure 46 : Comparaison des séquences en acides aminés des hydrogénases NADH dépendantes de <i>T. maritima</i> et de <i>C. beijerinckii</i> NCIMB8052. ....	192
Figure 47 : Organisation génétiques des opérons <i>Tm_1424-Tm_1426</i> et <i>Cbei_4110-Cbei_4112</i> sur les génomes de <i>T. maritima</i> et <i>C. beijerinckii</i> NCIMB8052.....	192

Figure 48 : Représentation schématique de la voie des pentoses-phosphate (noir) et de la voie des phosphocétolases (rouge).....	195
Figure 49 : Représentation schématique de la glycolyse utilisant la GAPDH (bleu) et de la glycolyse utilisant la GAPN (vert).....	196
Figure 50 : Voies métaboliques de production d'isopropanol à partir de xylose par le biais de la phosphocétolase et de la glycéraldéhyde-3-P non phosphorylante.....	197
Figure 51 : Conversions de fructose 1-6-biphosphate en fructose-6-P par la fructose-1-6-biphosphatase (GLPX). .....	199
Figure 52 : Voies métaboliques de production d'isopropanol à partir de xylose par le biais de la phosphocétolase, de la glycéraldéhyde-3-P non phosphorylante et de la fructose-1-6-biphosphatase. ....	201
Figure 53 : Profils de fermentation de la souche <i>824 ΔbukΔpSOL</i> en chémostat en milieu synthétique contenant successivement, du glucose ( $30\text{g.l}^{-1}$ ), un mélange xylose/glucose ( $25\text{ g.l}^{-1}/5\text{ g.l}^{-1}$ ) et du xylose ( $30\text{ g.l}^{-1}$ ).....	203
Figure 54 : Schéma simplifié du métabolisme de la souche <i>824 ΔbukΔpSOL</i> sur xylose.....	204
Figure 55 : Voies métaboliques de production d'isopropanol à partir de xylose par la souche <i>824 ΔbukΔpSOL</i> par le biais de la phosphocétolase.....	205
Figure 56 : Distribution des flux métabolique lors de la production d'isopropanol à partir de xylose dans la souche <i>824 ΔbukΔpSOL</i> . x et y définissent respectivement la quantité en mole de NADPH et de NADH produit par GapN et Gapdh. ....	206
Figure 57 : Activités spécifiques THL, CoAT et ADC mesurées à partir d'extrait bruts des souches <i>824 Δbuk pCLF952</i> et <i>824 ΔbukΔpSOL pCLF952-thl</i> .....	209
Figure 58 : Vecteur <i>pCLF942-thl-RBS-OPT</i> .....	210
Figure 59 : Métabolisme simplifié du glucuronate chez <i>E. coli</i> .....	212

Figure 60 : Métabolisme de la souche 824 $\Delta$ buk $\Delta$ pSOL pCLF942-thl-RBS-OPT sur milieu CGM contenant de glucuronate comme unique source de carbone.....	213
Figure 61 : Activités spécifiques THL mesurées à partir d'extrait bruts des souches 824 $\Delta$ buk pCLF952 et 824 $\Delta$ buk $\Delta$ pSOL pCLF942-thl-RBS-OPT.....	215
Figure 62 : Métabolisme théoriques de production d'isopropanol par le biais de la phosphocétolase (A) ou d'une hydrogénase NADH dépendante (B) à l'aide d'une alcool déshydrogénase secondaire NADH dépendante. ....	218
Figure 63 : Structure de Rossmann de référence.....	219
Figure 64 : Identification de la structure de Rossmann de la SADH de <i>C. beijerinckii</i> NRRL B593.....	220
Figure 65 : Activités spécifiques SADH sur extraits totaux des souches <i>E.coli</i> TOP10 pSOS952-thl, <i>E.coli</i> TOP10 pSOS952-thl-SADHCHG1M et <i>E.coli</i> TOP10 pSOS952-thl-SADHCHG2M avec du NADH ou du NADPH.....	222

# Liste des Tableaux



## Liste des tableaux :

Tableau 1 : Liste des souches et plasmides utilisés dans cette étude.....	94
Tableau 2 : Liste des oligonucléotides utilisés dans cette étude. ....	111
Tableau 3 : Comparaison des résultats de fermentations obtenus à pH non régulé avec les souches parentales et recombinantes de <i>C. acetobutylicum</i> . ....	136
Tableau 4 : Comparaison des résultats de fermentations obtenus à pH non régulé de la souche 824 $\Delta$ buk avec ou sans ajout de carbonate de calcium. ....	137
Tableau 5 : Concentration finale en métabolites lors de cultures régulée à pH 5,0 des souches <i>C. acetobutylicum</i> 824 $\Delta$ buk pCLF942, <i>C. acetobutylicum</i> 824 $\Delta$ buk pCLF952 et de la souche parentale <i>C. acetobutylicum</i> 824 $\Delta$ buk. ....	139
Tableau 6 : Concentrations finales en solvants lors de fermentations de la souche 824 $\Delta$ buk pCLF952, régulée à 5 différents pH.....	142
Tableau 7 : Cultures des souches <i>E. coli</i> TOP10 pCLF952-thl et TOP10 pCLF952-thl-atoAD en milieu LB glucose.....	153
Tableau 8 : Cultures des souches 824 $\Delta$ buk pCLF952 et 824 $\Delta$ buk pCLF952-thl-atoAD en milieu CGM glucose.....	154
Tableau 9 : Cultures des souches 824 $\Delta$ buk pCLF952 et 824 $\Delta$ buk pCLF952-thl-atoAD-OPT en milieu CGM glucose.....	160
Tableau 10 : Concentration finale en métabolites lors de cultures régulée à pH 5,2 et 4,8 de la souche 824 $\Delta$ buk pCLF952-thl-atoAD-OPT. ....	162
Tableau 11 : Concentrations finales des produits de fermentations de la souche 824 $\Delta$ buk pCLF952, régulée à pH 5,0 et 4,8 ; sur milieu xylose. ....	168
Tableau 12 : Principales réactions constituant le métabolisme de <i>C. acetobutylicum</i> . ....	175

Tableau 13 : Activités spécifiques de consommation et de production d'hydrogène mesurées sur des extraits totaux des souches <i>824 Δbuk</i> , <i>824 ΔbukΔpSOL</i> et <i>824 ΔbukΔpSOL pPHydA-C-longLinker-Tag-catP-upp</i> . .....	183
Tableau 14 : Activité spécifiques de consommation d'hydrogène mesurées sur des extraits totaux des souches <i>824 ΔbukΔpSOL</i> et <i>824 ΔbukΔpSOL pCLF_NADH_hydTm</i> . .....	184
Tableau 15 : Activité spécifiques de consommation d'hydrogène mesurées sur des extraits totaux des souches <i>824 ΔbukΔpSOL</i> et <i>824 ΔbukΔpSOL pCLF_NADH_hydTAw</i> . .....	186
Tableau 16 : Fermentation de la souche <i>824 ΔbukΔpSOL pCLF952-thl</i> à pH non régulé en milieu CGM-MES xylose.....	207
Tableau 17 : Fermentation de la souche <i>824 ΔbukΔpSOL pCLF952-thl</i> à pH non régulé en milieu CGM-MES xylose avec 1 g.l <sup>-1</sup> d'acétone.....	208
Tableau 18 : Fermentation de la souche <i>824 ΔbukΔpSOL pCLF942-thl-RBS-OPT</i> à pH non régulé en milieu CGM-MES xylose avec 2,7 g.l <sup>-1</sup> d'acétate. ....	211
Tableau 19 : Fermentation de la souche <i>824 ΔbukΔpSOL pCLF952-thl-RBS OPT</i> à pH non régulé en milieu CGM-MES glucuronate. ....	212
Tableau 20 : Fermentation de la souche <i>824 ΔbukΔpSOL pCLF942-thl-RBS-OPT</i> à pH non régulé en milieu CGM-MES xylose avec 1 g.l <sup>-1</sup> d'acétoacétate. ....	214
Tableau 21 : Fermentation des souches <i>E.coli TOP10 pSOS952-thl</i> , <i>E.coli TOP10 pSOS952-thl-SADHCHG1M</i> et <i>E.coli TOP10 pSOS952-thl-SADHCHG2M</i> en milieu LB glucose.....	221

# Abréviations



## Abréviations:

**AA** : Acide aminé

**Aad** : Aldéhyde-alcools déshydrogénase

**ABE** : Acétone-Butanol-Ethanol

**Ack** : Acétate kinase

**Adc** : Acétoacétate décarboxylase

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**Adh** : Alcool déshydrogénase

**ARN** : Acide ribonucléique

**ARNm** : Acide ribonucléique messenger

**ADP** : Adénosine-5' diphosphate

**ATP** : Adénosine-5' triphosphate

**Bcd** : Butyryl-CoA déshydrogénase

***B.subtilis*** : Bacillus subtilis

**BET** : Bromure d'éthidium

**BSA** : Bovin Albumin Serum

**Buk** : Butyrate kinase

***C. acetobutylicum*** : Clostridium acetobutylicum

***C. beijerinckii*** : Clostridium beijerinckii

***C. butylicum*** : Clostridium butylicum

***C. kluyveri*** : Clostridium kluyveri

**CO<sub>2</sub>** : Dioxyde de carbone

**CoA** : Coenzyme A

**CoAT** : CoA transférase

***C. pasterianum*** : Clostridium pasterianum

**Crt** : Crotonase

**dNTPs** : Désoxyribonucléotides-5'-triphosphate

**DO** : Densité optique

**DTT**: Dithioerythriol

***E. coli*** : Escherichia coli

**EtfA** : Electron transferring factor A

**EtfB** : Electron transferring factor B

**ETP** : Electron transport phosphorylation

**FMN** : Flavomononucleotide

**FRT** : FLP recognition target

**Gapdh** : Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase

**GC** : Gaz chromatography

**H<sub>2</sub>** : Dihydrogène

**Hbd** : β-hydroxybutyryl-CoA déshydrogénase

**HCl** : Acide chlorydrique

**HPLC** : High performance liquid chromatography

**IBE** : Isopropanol-Butanol-Ethanol

**kb** : Kilobase

**kDa** : Kilodalton

**Km** : Constante michaélienne

**LB** : Lysogeny broth

**Ldh** : Lactate déshydrogénase

**ln** : Logarithme népérien

**M** : mol.l<sup>-1</sup>

**MES** : 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid

**mg** : milligramme

**mol, mmol,  $\mu$ mol, nmol** : Mole, millimole, micromole, nanomole

**$\mu$ F** : Microfaraday

**NAD<sup>+</sup>** : Nicotinamide adénine dinucléotide oxydé

**NADH** : Nicotinamide adénine dinucléotide réduit

**NADP<sup>+</sup>** : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydé

**NADPH** : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit

**Nfor** : NAD(P) ferrédoxine oxydoréductase

**nm** : Nanomètre

**ORF** : Open reading frame

**P** : Phosphate

**pb** : Paire de bases

**PCR** : Polymerase chain reaction

**PEP** : Phosphoénolpyruvate

**Pfk** : Phosphofructokinase

**Pfor** : Pyruvate ferrédoxine oxydoréductase

**Pgk** : Phosphoglycérate kinase

**pHYDA** : Promoteur de l'hydrogénase de *C. acetobutylicum*

**PPP** : Pentoses-phosphate pathway

**pPTB** : Promoteur de la phosphotransbutyrylase de *C. acetobutylicum*

**PTA** : Phosphotransacétylase

**PTB** : Phosphotransbutyrylase

**pThl** : Promoteur de la thiolase de *C. acetobutylicum*

**Pyk** : Pyruvate kinase

**RBS** : Ribosome binding site

**rpm** : Rotations par minute

**Sadh** : Secondary alcohol dehydrogenase

***S. cerevisiae*** : Saccharomyces cerevisiae

**SLP** : Substrate level phosphorylation

**SOC** : Super optimal broth with catabolite repression

**Thl** : Thiolase

**TTP** : Thiamine-pyrophosphate

**UV** : Ultraviolet

**V<sub>max</sub>** : Vitesse maximale

**V, kV** : Volt, Kilovolt

**WT** : Wild type

**°C** : Degré Celsius

# Annexes



## Annexes:

### 1. Séquence des gènes *atoD* et *atoA* après la première étape d'optimisation pour l'expression chez *C. acetobutylicum*

#### *atoD*:

1 ATGAAAACAA AATTGATGAC ATTACAAGAC GCCACCGGCT TCTTTCGTGA  
M K T K L M T L Q D A T G F F R D Frame 1

51 CGGCATGACC ATCATGGTGG GCGGATTTAT GGGGATTGGC ACTCCATCCC  
G M T I M V G G F M G I G T P S R Frame 1

101 GCCTGGTTGA AGCATTACTG GAATCTGGTG TTCGCGACCT GACATTGATA  
L V E A L L E S G V R D L T L I Frame 1

151 GCCAATGATA CCGCGTTTGT TGATAACCGGC ATCGGTCCGC TCATCGTCAA  
A N D T A F V D T G I G P L I V N Frame 1

201 TGGTCGAGTC CGCAAAGTGA TTGCTTCACA TATCGGCACC AACCCGAAAA  
G R V R K V I A S H I G T N P E T Frame 1

251 CAGGTCGGCG CATGATATCT GGTGAGATGG ACGTCGTTCT GGTGCCGCAA  
G R R M I S G E M D V V L V P Q Frame 1

301 GGTACGCTAA TCGAGCAAAT TCGCTGTGGT GGAGCTGGAC TTGGTGGTTT  
G T L I E Q I R C G G A G L G G F Frame 1

351 TCTCACCCCA ACGGGTGTGCG GCACCGTCGT AGAGGAAGGC AAACAGACAC  
L T P T G V G T V V E E G K Q T L Frame 1

401 TGACACTCGA CGGTAAAACC TGGCTGCTCG AACGCCCACT GCGCGCCGAC  
T L D G K T W L L E R P L R A D Frame 1

451 CTGGCGCTAA TTCGCGCTCA TCGTTGCGAC ACACTTGGCA ACCTGACCTA  
L A L I R A H R C D T L G N L T Y Frame 1

501 TCAACTTAGC GCCCGCAACT TTAACCCCTT GATAGCCCTT GCGGCTGATA  
Q L S A R N F N P L I A L A A D I Frame 1

551 TCACGCTGGT AGAGCCAGAT GAACTGGTCG AAACCGGCGA GCTGCAACCT  
T L V E P D E L V E T G E L Q P Frame 1

601 GACCATATTG TCACCCCTGG TGCCGTTATC GACCACATCA TCGTTTCACA  
D H I V T P G A V I D H I I V S Q Frame 1

651 GGAGAGCAAA TAA  
E S K \* Frame

**atoA:**

1 ATGGATGCGA AACAAACGTAT TGCGCGCCGT GTGGCGCAAG AGCTTCGTGA  
M D A K Q R I A R R V A Q E L R D Frame 1

51 TGGTGACATC GTTAACTTAG GGATCGGTTT ACCCACAATG GTCGCCAATT  
G D I V N L G I G L P T M V A N Y Frame 1

101 ATTTACCGGA GGGTATTCAT ATCACTCTGC AATCGGAAAA CGGCTTCCTC  
L P E G I H I T L Q S E N G F L Frame 1

151 GGTTTAGGCC CGGTCACGAC AGCGCATCCA GATCTGGTGA ACGCTGGCGG  
G L G P V T T A H P D L V N A G G Frame 1

201 GCAACCGTGC GGTGTTTTAC CCGGTGCAGC CATGTTTGAT AGCGCCATGT  
Q P C G V L P G A A M F D S A M S Frame 1

251 CATTTCGCGT AATCCGTGGC GGTTCATATTG ATGCCTGCGT GCTCGGCGGT  
F A L I R G G H I D A C V L G G Frame 1

301 TTGCAAGTAG ACGAAGAAGC AAACCTCGCG AACTGGGTAG TGCCTGGGAA  
L Q V D E E A N L A N W V V P G K Frame 1

351 AATGGTGCCC GGTATGGGTG GCGCGATGGA TCTGGTGACC GGGTCGCGCA  
M V P G M G G A M D L V T G S R K Frame 1

401 AAGTGATCAT CGCCATGGAA CATTGCGCCA AAGATGGTTC AGCAAAAATT  
V I I A M E H C A K D G S A K I Frame 1

451 TTGCGCCGCT GCACCATGCC ACTCACTGCG CAACATGCGG TGCATATGCT  
L R R C T M P L T A Q H A V H M L Frame 1

501 GGTTACTGAA CTGGCTGTCT TTCGTTTTAT TGACGGCAAA ATGTGGCTCA  
V T E L A V F R F I D G K M W L T Frame 1

551 CCGAAATTGC CGACGGGTGT GATTTAGCCA CCGTCCGTGC CAAAACAGAA  
E I A D G C D L A T V R A K T E Frame 1

601 GCTCGGTTTG AAGTCGCCGC CGATCTGAAT ACGCAACGGG GTGATTTA  
A R F E V A A D L N T Q R G D L ? Frame 1

## 2. Séquence complète de l'opéron atoAD optimisé

RBS *atoD atoA*

```

1 ACACAAGGCG CCGCCTTAAC AGAAAGGAGA CGAAATGAAA AAAAACTTA
                                     M K T K L M Frame 2

51 TGACACTTCA AGATGCAACT GGTTTCTTTC GTGATGGGAT GACAATTATG
   T L Q D A T G F F R D G M T I M Frame 2

101 GTAGGAGGTT TTATGGGTAT AGGCACTCCA AGCAGATTAG TAGAAGCATT
   V G G F M G I G T P S R L V E A L Frame 2

151 ATTAGAAAGT GGAGTTAGAG ATTTAACGCT TATAGCTAAT GATACAGCAT
   L E S G V R D L T L I A N D T A F Frame 2

201 TTGTAGATAC AGGTATTGGT CCTTTAATTG TAAATGGAAG AGTAAGAAAAG
   V D T G I G P L I V N G R V R K Frame 2

251 GTGATTGCTT CACATATAGG CACGAACCCA GAAACTGGCA GAAGAATGAT
   V I A S H I G T N P E T G R R M I Frame 2

301 ATCTGGAGAA ATGGATGTAG TACTCGTACC CCAAGGAACT CTAATTGAAC
   S G E M D V V L V P Q G T L I E Q Frame 2

351 AAATACGTTG TGGCGGAGCT GGCTTAGGTG GTTTTCTAAC TCCAACAGGT
   I R C G G A G L G G F L T P T G Frame 2

401 GTTGGAAGT TGGTAGAAGA AGGAAAGCAA ACATTAAGTT TAGATGGAAA
   V G T V V E E G K Q T L T L D G K Frame 2

451 GACATGGTTG TTAGAGAGGC CTTTAAGAGC CGATTTAGCA TTAATTAGAG
   T W L L E R P L R A D L A L I R A Frame 2

501 CTCATCGTTG TGATACATTG GGAAACCTGA CTTATCAATT AAGTGCAAGA
   H R C D T L G N L T Y Q L S A R Frame 2

551 AACTTTAATC CCTTAATAGC ATTAGCAGCT GATATCACAT TAGTTGAACC
   N F N P L I A L A A D I T L V E P Frame 2

601 TGATGAATTA GTTGAGACAG GAGAACTACA ACCTGATCAT ATTGTTACCC
   D E L V E T G E L Q P D H I V T P Frame 2

651 CCGGAGCAGT GATAGATCAT ATAGTAAAGG AGCCTGCATA AAATGGACGC
   G A V I D H I V K E P A * Frame 2
                                     M D A Frame 3

701 GAAACAAAGA ATAGCCAGAA GAGTTGCACA AGAATTAAGA GATGGTGATA
   K Q R I A R R V A Q E L R D G D I Frame 3

751 TTGTAAACTT AGGTATTGGT TTACCTACAA TGTTGCAAAA TTATTTACCA
   V N L G I G L P T M V A N Y L P Frame 3

801 GAAGGAATTC ATATTACTCT TCAATCAGAA AACGGATTTT TAGGATTAGG
   E G I H I T L Q S E N G F L G L G Frame 3

851 CCCTGTTACA ACTGCACATC CAGATTTAGT AAATGCAGGA GGACAGCCAT
   P V T T A H P D L V N A G G Q P C Frame 3

```

901 GTGGTGTACT TCCTGGTGCG GCAATGTTTCG ATAGCGCTAT GTCGTTTGCT  
 G V L P G A A M F D S A M S F A Frame 3

951 CTAATCCGTG GTGGTCACAT TGATGCTTGT GTTTTAGGGG GTCTCCAGGT  
 L I R G G H I D A C V L G G L Q V Frame 3

1001 AGATGAAGAG GCTAATTTAG CCAATTGGGT AGTTCCTGGA AAAATGGTCC  
 D E E A N L A N W V V P G K M V P Frame 3

1051 CTGGTATGGG TGGAGCTATG GATTTAGTAA CAGGAAGTCG TAAAGTAATA  
 G M G G A M D L V T G S R K V I Frame 3

1101 ATTGCAATGG AACATTGTGC AAAAGATGGT AGTGCTAAAA TTTTAAGAAG  
 I A M E H C A K D G S A K I L R R Frame 3

1151 ATGTACAATG CCCCTCACGG CACAACACGC AGTTCATATG TTAGTAACAG  
 C T M P L T A Q H A V H M L V T E Frame 3

1201 AACTTGCAAGT ATTCCGTTTT ATTGATGGAA AGATGTGGCT CACTGAAAATT  
 L A V F R F I D G K M W L T E I Frame 3

1251 GCAGATGGTT GTGACTTAGC AACAGTTAGG GCTAAAACTG AGGCAAGATT  
 A D G C D L A T V R A K T E A R F Frame 3

1301 TGAGGTTGCC GCAGATCTTA ATACCCAACG TGGTGATTTA TGA  
 E V A A D L N T Q R G D L \* Frame 3

# Publication





# Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 for the high-yield production of a biofuel composed of an isopropanol/butanol/ethanol mixture



Simon Dusséaux<sup>a,b,c</sup>, Christian Croux<sup>a,b,c</sup>, Philippe Soucaille<sup>a,b,c</sup>, Isabelle Meynial-Salles<sup>a,b,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Université de Toulouse, INSA, UPS, INP, LISBP, 135 Avenue de Rangueil, F-31077 Toulouse, France

<sup>b</sup> INRA, UMR792 Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, F-31400 Toulouse, France

<sup>c</sup> CNRS, UMR5504, F-31400 Toulouse, France

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 28 December 2011

Accepted 18 March 2013

Available online 26 March 2013

### Keywords:

Synthetic isopropanol pathway

Biofuel production

*Clostridium acetobutylicum*

Metabolic engineering

## ABSTRACT

*Clostridium acetobutylicum* was metabolically engineered to produce a biofuel consisting of an isopropanol/butanol/ethanol mixture. For this purpose, different synthetic isopropanol operons were constructed and introduced on plasmids in a butyrate minus mutant strain (*C. acetobutylicum* ATCC 824  $\Delta$ cac15 $\Delta$ upp $\Delta$ buk). The best strain expressing the isopropanol operon from the *thl* promoter was selected from batch experiments at pH 5. By further optimizing the pH of the culture, a biofuel mixture with almost no by-products was produced at a titer, a yield and productivity never reached before, opening the opportunities to develop an industrial process for alternative biofuels with Clostridial species. Furthermore, by performing *in vivo* and *in vitro* flux analysis of the synthetic isopropanol pathway, this flux was identified to be limited by the [acetate]<sub>int</sub> and the high *K*<sub>m</sub> of CoA-transferase for acetate. Decreasing the *K*<sub>m</sub> of this enzyme using a protein engineering approach would be a good target for improving isopropanol production and avoiding acetate accumulation in the culture medium.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

The production of fuels and bulk chemicals from renewable resources has attracted a great deal of attention during the last few decades as the atmospheric carbon dioxide level rises and petroleum resources become increasingly expensive. As a result, there is an urgent need to gradually shift from petroleum to renewable biomass as a feedstock. Fuels production from biomass must satisfy two criteria (i) the bulk density of the resource should be increased while preserving its energy content and (ii) the targeted molecules should, have high octane value, and be compatible with existing fuel supply, distribution systems and current engines (Fisher et al., 2008; Lee et al., 2008). Bioethanol is currently commercialized as an alternative fuel in the market worldwide but its characteristics do not meet the requirement of a perfectly ideal fuel. So, as alternatives to gasoline, advanced biofuels (1-butanol, isobutanol or 1-propanol), which involve higher carbon chains, are believed to circumvent the current problems of ethanol. Intensive efforts to engineer strains for the efficient production of C3–C5 alcohols as the only fermentation products are currently done (Deng and Fong, 2011; Smith and Liao, 2011; Stephanopoulos, 2008; Yu et al., 2011). However, there is not, up to

now, an economical viable bioprocess to produce these molecules in large enough quantities for fuel applications due to high product toxicity, low yield and productivity and high cost of downstream processing (Nicolaou et al., 2010).

Solvents have already been industrially produced from biomass using anaerobic microorganisms that belong to the genus *Clostridium*. *Clostridium acetobutylicum* produces a mixture of acetone, butanol and ethanol (ABE) (Girbal and Soucaille, 1998), in which acetone is considered as an un-desirable product due to its corrosiveness to rubber engine parts and its poor fuel properties. On the other hand, some *Clostridium beijerinckii* strains (George et al., 1983) produce isopropanol, instead of acetone, together with butanol and ethanol (IBE) producing then an interesting biofuel mixture. However, the IBE production with these natural isopropanol producers is still low (a total solvent concentration of 5.87 g/l) and slow (a productivity of 0.12 g/l h) in batch cultures (Survase et al., 2011) and no genetic tools have been developed to genetically engineer their metabolism to improve those performances.

*C. acetobutylicum* displays a biphasic metabolism tightly associated with different growth stages. During the exponential growth, cells mainly produce acetic acid, butyric acid, H<sub>2</sub>, ATP and NAD(P)H. In response to the steep decrease of the pH, the metabolism switches to solventogenesis, acids are reconsumed and acetone, butanol and ethanol produced to regenerate reducing equivalents maintaining the glycolytic flux. Depending on the redox state of cells or the level of the glycolytic flux, lactate or/and acetoin can also be produced from pyruvate as co-products

\* Corresponding author at: LISBP, INSA, 135 Avenue de Rangueil, 31077 Toulouse cedex 4, France. Fax: +33 561 559 400.

E-mail address: [meynial@insa-toulouse.fr](mailto:meynial@insa-toulouse.fr) (I. Meynial-Salles).

(Jones and Woods, 1986). A key enzyme of the *C. acetobutylicum* central metabolism is the pyruvate ferredoxin oxidoreductase (PFOR) which catalyzes the oxidative decarboxylation of pyruvate to produce acetylCoA, CO<sub>2</sub> and reduced ferredoxin. The reduced ferredoxin plays a key role as an electron carrier and is able, under appropriate conditions, to transfer electron to the iron hydrogenase for H<sub>2</sub> production or to the NAD(P)H ferredoxin oxidoreductases, which finely tune the redox balance through the production of either NADH or NADPH (Vasconcelos et al., 1994) to produce butanol and ethanol. Some *C. beijerinckii* strains possess an additional primary–secondary alcohol dehydrogenase (SADH) that catalyzes the NADPH dependent reduction of acetone (Ismail et al., 1993).

As genetic tools are available for *C. acetobutylicum* ATCC 824 (Soucaille et al., 2006; Lehmann and Lütke-Eversloh, 2011), there is a strong interest to transform this native ABE producer, a bacterium that is widely recognized for its industrial use, into an efficient IBE producer. This approach could be achieved by expressing the SADH-encoding gene from *C. beijerinckii* to reduce acetone into isopropanol and, if combined with overexpression of the acetone pathway, this approach should also decrease acetate production and improve the mass yield of the IBE mixture from glucose. During the review process of this manuscript, a similar strategy was published demonstrating the feasibility of the approach (Lee et al., 2012). These authors also described the *in situ* recovery of the (IBE) alcohol by gas stripping that can be further purified by distillation and molecular sieves to be directly used as an alternative biofuel to replace gasoline in internal combustion engine, avoiding any costly downstream steps for acetone elimination.

In our study, we report the metabolic engineering of *C. acetobutylicum* ATCC824 for the stable production of an IBE mixture (Fig. 1) with very low amount of co-products. Fermentation parameters have also been optimized to maximize titers, yields on glucose and productivities. Furthermore, by applying a flux analysis, we identified one bottleneck of the isopropanol pathway to further improve the biofuel yield by an enzyme engineering approach.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Bacterial strains and plasmids

All bacterial strains, plasmids and oligonucleotides used or derived from this study are listed in Table 1.

### 2.2. Materials

All of the chemicals were reagent grade. Coenzymes such as CoASH, acetoacetyl-CoA, NADH and NADPH were purchased from Sigma Chimie (St. Quentin Fallavier, France). All gases used (carbon monoxide, nitrogen and a mixture of carbon monoxide, hydrogen and nitrogen) were of the highest purity available and were purchased from Air Liquid (Paris, France). DNA restriction enzymes, Antarctic phosphatase enzyme and T4 DNA ligase were obtained from New England Biolabs, (Evry, France) and used following the manufacturer's instructions. The proof-reading Fusion DNA polymerase (Finnzyme) was used for PCR amplification prior to vector construction, and the *Crimson taq* DNA polymerase (New England Biolabs) was used for routine, control PCR amplifications. TOPO cloning was performed with the Zero Blunt TOPO cloning kit for sequencing as recommended by the manufacturer's instructions (Invitrogen, Saint Aubin, France).

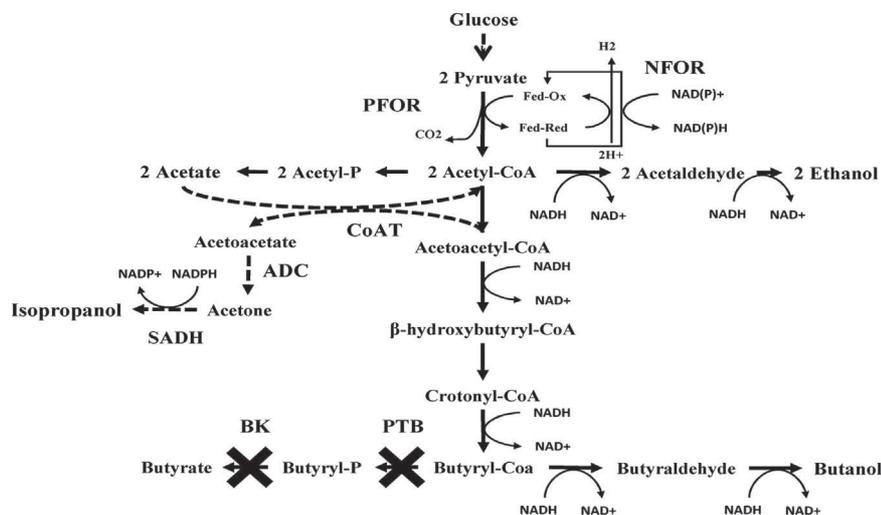
### 2.3. Transformation procedures

*E. coli* Top10 (Invitrogen) was transformed using heat-shock (30 s at 42 °C) following the manufacturer's instructions.

*C. acetobutylicum* 824  $\Delta cac15$  and 824  $\Delta buk$  (Table 1) were electroporated as previously described (Mermelstein et al., 1992), except that unmethylated DNA was used because the *cac1502* gene encoding the type II restriction endonuclease Cac824I was deleted in both strains (Soucaille et al., 2006). After 5 h of recovery, cells were placed on RCA (Clostridium Nutrient Medium with 15 g/l agar, Fluka (Saint-Quentin Fallavier, France, n°27546) medium supplemented with erythromycin (40 µg/ml) and thiamphenicol (10 µg/ml)). Single colonies were chosen from the plate and streaked separately on an RCA plate with erythromycin (40 µg/ml) and thiamphenicol (50 µg/ml). The transformants were screened using PCR amplification of the *sadh* gene. The cells were then transferred and grown on an MS agar plate with erythromycin (40 µg/ml) and thiamphenicol (50 µg/ml) before inoculation into liquid MS medium.

### 2.4. Plasmid constructions

The *sadh* gene (accession number AF157307) was amplified from the genomic DNA of *C. beijerinckii* NRRL B593 purchased from DSMZ (Germany) using primers P01 and P02 (Table 1). The primers were designed to amplify the natural *sadh* RBS region



**Fig. 1.** Schematic view of the metabolism of the engineered 824  $\Delta buk$  pCLF942 or pCLF952 strains. CoAT: CoA transferase; ADC: acetoacetate decarboxylase; SADH: secondary alcohol dehydrogenase; BK: butyrate kinase; PTB: phosphotransbutyrylase; PFOR: pyruvate ferredoxin oxidoreductase.

**Table 1**  
Bacterial strains plasmids and oligonucleotides.

Strains/plasmids/primers	Relevant characteristics <sup>a</sup>	Source
<b>C. acetobutylicum</b>		
ATCC 824ΔCAC15 (824 Δcac15)	Deletion of the <i>cac1502</i> gene encoding the type II restriction endonuclease CAC324I	Soucaille et al. (2006)
ATCC824ΔCAC15Δbuk::MLS <sup>r</sup> ptbΔ499–906(824 Δbuk)	Replacement of the butyrate kinase gene by the MLSR cassette, deletion of 408 nucleotides (from position 499 to 906) at the 3' end phosphotransbutyrylase gene	Soucaille 2007
<b>E. coli</b>		
TOP10		Invitrogen
<b>Plasmids</b>		
pSOS95-VL	MLS <sup>r</sup> ; AP <sup>r</sup> ; <i>repL</i> ; <i>ctfA</i> ; <i>ctfB</i> ; <i>adc</i> with <i>thl</i> promoter and <i>adc</i> terminator	GenBank accession no.AY187686
pSOS94	MLS <sup>r</sup> ; AP <sup>r</sup> ; <i>repL</i> ; <i>ctfA</i> ; <i>ctfB</i> ; <i>adc</i> with <i>ptb</i> promoter and <i>adc</i> terminator	Unpublished results
pSOS952	pSOS95-VL derivative with <i>adh</i> insertion	This study
pSOS942	pSOS952 derivative with pTHL replacement with pPTB	This study
pCLF1	Cmr; <i>repL</i> ; <i>flp1</i>	Soucaille et al. (2006)
pCLF952	pCLF1 derivative with <i>ctfA</i> ; <i>ctfB</i> ; <i>adh</i> ; <i>adc</i> with <i>thl</i> promoter and <i>adc</i> terminator	This study
pCLF942	pCLF1 derivative with <i>ctfA</i> ; <i>ctfB</i> ; <i>adh</i> ; <i>adc</i> with <i>ptb</i> promoter and <i>adc</i> terminator	This study
<b>Primers</b>		
PO1	5'-TAAATGATATCTTTAAGGAGGAACATATTTTATGAAAGGTTTTGCAATGCT-3'	
PO2	5'-TTAAAAATTGATATCTTATAATATAACTACTGCTT-3'	

<sup>a</sup> Abbreviations: MLS<sup>r</sup>: macrolide, lincosamide, streptogramin B resistance; AP<sup>r</sup>: ampicillin resistance; catP: thiamphenicol resistance.

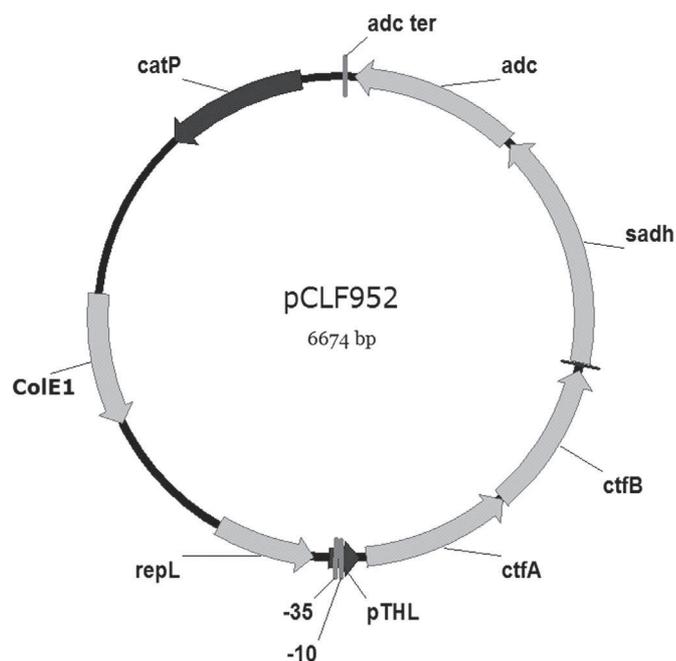
along with the *sadh* gene, as well as placing EcoRV restriction sites both upstream and downstream. The amplified PCR fragment was then subcloned into a Zero Blunt TOPO vector (Invitrogen, Saint Aubin, France) to yield the Zero Blunt TOPO-*sadh* plasmid and sequenced using universal primers T7P and T3P to assure that no mutations were introduced. The fragment containing the *sadh* gene was purified on an agarose gel after digestion of the Zero Blunt TOPO-*sadh* vector with EcoRV. The 6.9 kb pSOS95-VL vector was also digested with EcoRV, treated with Antarctic phosphatase and ligated to the EcoRV-digested *sadh* gene, yielding the 8 kb pSOS952 vector. The pSOS942 vector was constructed by replacing the *thl* promoter on the pSOS952 vector with the *ptb* promoter recovered from the pSOS94 vector using a BamHI–ClaI double digestion.

Both pSOS942 and pSOS952 were digested with Sall, and the operon-containing fragments from each vector were purified on an agarose gel. The 4.9 kb pCLF1 vector was digested with Sall, treated with Antarctic phosphatase and ligated with the previously purified operon-containing fragments to yield the pCLF942 and pCLF952 vectors (Fig. 2).

## 2.5. Culture media and growth conditions

*E. coli* strains were grown aerobically at 37 °C in Luria–Bertani (LB) medium supplemented, when necessary, with ampicillin (100 μg/ml) and/or chloramphenicol (30 μg/ml). Agar (15 g/l) was added prior to sterilization for LB agar plates.

All *C. acetobutylicum* strains were kept in spore form at –20 °C in the synthetic medium (MS), as previously described (Meynial-Salles et al., 2005). The flask cultures of *C. acetobutylicum* strains were grown anaerobically in clostridium growth medium (CGM) containing, per liter, yeast extract (6.25 g), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.95 g), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.95 g), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.5 g), MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.013 g), FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.013 g), NaCl (1.25 g), asparagine (2.5 g) and (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2.5 g). CGM medium was supplemented with glucose (50 g/l) and, when necessary, with erythromycin (40 μg/ml) and thiamphenicol (50 μg/ml) prior to inoculation. The pH of the



**Fig. 2.** pCLF952 plasmid used for expression of the synthetic isopropanol pathway into *C. acetobutylicum*. pTHL: thiolase promoter; *ctfA*: gene encoding the CoA transferase subunit A; *ctfB*: gene encoding the CoA transferase subunit B; *sadh*: gene encoding the secondary alcohol dehydrogenase; *adc*: gene encoding the acetoacetate decarboxylase; *adc ter*: *adc* terminator region; *catP*: gene conferring thiamphenicol resistance; ColE1: replication origin for *E. coli*; *repL*: gene encoding a functional RepL protein in *C. acetobutylicum*.

medium was adjusted, when needed, to 6.6 with NH<sub>4</sub>OH (6 N) prior to sterilization.

The pH-controlled batch fermentations were performed in CGM medium supplemented with glucose (80 g/l). A 2 l Biostat B bioreactor (Sartorius, Aubagne, France) was used with a working volume of 1.5 l. Cultures were stirred at 300 rpm, the temperature was set at 35 °C, and the pH was maintained with automatic

addition of  $\text{NH}_4\text{OH}$  (3 N). After sterilization, the medium was sparged with  $\text{O}_2$ -free nitrogen for 30 min. During the course of the experiment, the medium was maintained under a slight nitrogen overpressure to avoid  $\text{O}_2$  entry into the reactor. All tubing was made of butyl rubber, and the reactor gas outlet was protected with a pyrogallol arrangement. The spore suspensions of the strains were inoculated into CGM medium at 10% (v/v) and heat-shocked at 80 °C for 15 min. Cells were grown up to an  $\text{OD}_{620 \text{ nm}}$  of approximately 2.0 in a 500 ml flask containing 400 ml of CGM medium prior to inoculation of the bioreactor at 10% (v/v).

## 2.6. Analytical procedures

The cell concentration was measured turbidimetrically by monitoring the optical density (OD) at 620 nm; an experimentally derived correlation factor of 0.3 g cellular dry weight per  $\text{OD}_{620 \text{ nm}}$  (path length 1 cm) was used for the biomass concentration calculations. Glucose, acetate, butyrate, ethanol, isopropanol, acetone and butanol concentrations were measured in duplicate using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) analysis (Agilent 1200 series, Massy, France). The separations were performed on a Biorad Aminex HPX-87H column (300 mm  $\times$  7.8 mm), and detection was achieved using either a refractive index measurement or a UV absorbance measurement (210 nm). The operating conditions were as follows: temperature, 14 °C; mobile phase,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (0.03 mM); and flow rate, 0.5 ml/min. For the highest concentrations, samples were diluted twice.

## 2.7. Preparation of cell extracts and enzyme assays

During the pH-controlled batch fermentations, 100 ml of culture was sampled at the mid-exponential phase (an  $\text{OD}_{620 \text{ nm}}$  of approximately 4.0) to prepare cell extracts using the entire anaerobic procedure as previously described (Vasconcelos et al., 1994), except that the harvested cells were resuspended in 2 ml of 100 mM Tris-HCl (pH 7.5) buffer containing 0.5 M of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 20% (v/v) glycerol and 2 mM dithiothreitol and centrifugation was done at room temperature. The cell suspensions were sonicated, centrifuged, and 2 ml of the cell-free extract was dialyzed anaerobically overnight at 4 °C against 2 l of the same buffer (degassed) as above. The dialysis was performed using a cellulose membrane (Sigma-Aldrich) with a molecular weight cut-off of 11,325 Da. The total protein concentration of the cell-free extract was determined using the Bradford method (Biorad reagent) (Bradford, 1976) with bovine serum albumin as the standard.

The thiolase activity was measured anaerobically at 30 °C in the direction of acetyl-CoA formation by monitoring the decrease in  $A_{310}$  as an indication of the disappearance of the enolate form of acetoacetyl-CoA. The assay was performed as described elsewhere (Inui et al., 2008). One unit is defined as the amount of enzyme that converts 1  $\mu\text{mol min}^{-1}$  of acetoacetyl-CoA under these conditions. The extinction coefficient of acetoacetyl-CoA at 310 nm was 14.0  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ . The secondary alcohol dehydrogenase activity (SADH) was measured anaerobically at 25 °C in the direction of acetone reduction (NADPH oxidation) by monitoring the decrease in  $A_{340}$  as an indication of the disappearance of NADPH. The assay was performed as described elsewhere (Hiu et al., 1987). One unit is defined as the amount of enzyme that oxidized 1  $\mu\text{mol min}^{-1}$  of NADPH under these conditions. The extinction coefficient of NADPH at 340 nm was 6.22  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ . The acetoacetate decarboxylase activity was measured aerobically at 30 °C in the direction of acetone formation by monitoring acetone concentration using HPLC. The acetone standards were prepared at various concentrations in 0.2 M acetate potassium buffer (pH 5) with 2 N NaOH. The reaction was initiated with the addition of the cell-free extract and stopped with the addition of 2 N NaOH. The assay

mixture for the ADC activity measurement contained, in a final volume of 1 ml, 0.2 M acetate potassium buffer (pH 5) and 0.2 M acetoacetate. The CoA transferase activity was measured anaerobically at 30 °C in the direction of acetoacetate formation by monitoring the decrease in  $A_{303}$  as an indication of the disappearance of the enolate form of acetoacetyl-CoA. The assay was performed as described elsewhere (Vasconcelos et al., 1994). One unit is defined as the amount of enzyme that converts 1  $\mu\text{mol min}^{-1}$  of acetoacetyl-CoA under these conditions. The extinction coefficient of acetoacetyl-CoA at 303 nm was 8.0  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ .

## 2.8. Intracellular acetate concentrations calculation

The calculations of intracellular acetate levels were made based on the assumptions presented by Jarzębski et al. (1992) and on the intracellular pH values determined by Huang et al. (1986) and Gottwald and Gottschalk (1985). The extracellular concentration of acetate, measured at the maximum *in vivo* flux of the CoA-transferase, was used for these calculations. In all of these calculations, the neutral form of acetic acid is assumed to pass freely through the cell membrane and to be in equilibrium inside and outside the cells.

## 2.9. Calculation of *in vivo* fluxes and *in vitro* fluxes of the CoA-transferase

The *in vivo* flux of the CoA-transferase was the sum of the specific rates of isopropanol formation and acetone formation. The *in vitro* flux of the CoA-transferase was calculated from the Michaelis-Menten equation of the CoA-transferase using the calculated intracellular acetate concentration and a  $K_m$  value of 1200 mM for acetate (Wiesenborn et al., 1989). For each fermentations ran at the five different pHs, the maximum flux and the corresponding extracellular concentration of acetate were used for further computation/analysis of the data.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Engineering strategy of *C. acetobutylicum* for the production of IBE mixtures

The objective of the strain engineering part of this work was to construct a stable strain that would produce an IBE mixture (the “biofuel”) with a low amount of other by-products. This engineering strategy included two parts: (i) the construction of a synthetic operon to couple acetate production/re-consumption to isopropanol formation early in the fermentation and (ii) the implementation of this operon in a strain that no longer produced butyric acid due to a stable deletion of butyrate kinase- and phosphotransbutyrylase-encoding genes (Soucaille, 2007).

Two synthetic isopropanol operons under the control of the *ptb* and *thl* promoters (resulting in plasmid pCLF942 and pCLF952 respectively, Fig. 2), were constructed to express, early in the fermentation, *ctfAB* (for efficient acetate re-consumption and acetoacetate production, Fig. 1), *adc* (for acetoacetate decarboxylation, Fig. 1) and *sadh* (from *C. beijerinckii* NRRL B593, for acetone reduction to isopropanol) (Hiu et al., 1987). In our strategy, we chose these two promoters which are either constitutive (*thl* promoter) or active during the acidogenic phase (*ptb* promoter) (Girbal et al., 2003) because we wanted to initiate isopropanol production early in the fermentation to minimize acetate accumulation. This strategy was different from the one published by Lee et al. (2012) that used the *adc* promoter that is active late in the fermentation during the switch to solventogenesis (Girbal et al., 2003).

Both pCLF942 and pCLF952 were introduced into 824  $\Delta buk$  (Table 1) that can no longer produce butyrate due to a stable deletion of butyrate kinase- and phosphotransbutyrylase-encoding gene. This strategy also differs from the one published by Lee et al. (2012) who used an unstable strain with a *buk* gene inactivated by a reversible insertion of a non-replicative plasmid (Green et al., 1996).

### 3.2. Initial evaluation of the recombinant strains in batch cultures

The two metabolically engineered strains and four control strains (Table 1) were grown anaerobically at 37 °C in clostridium growth medium (CGM) without pH regulation and with glucose (50 g/l) as the sole carbon source. As expected, the total solvent yield (isopropanol/acetone/butanol/ethanol) was higher (Table 2) for both strains in which the genes encoding the butyrate pathway were deleted ( $0.34 \pm 0.01$  g/g for both 824  $\Delta buk$  pCLF942 and 824  $\Delta buk$  pCLF952 versus 0.29 for 824  $\Delta cac15$  pCLF942 and 0.31 for 824  $\Delta cac15$  pCLF952).

To evaluate the potential of both 824  $\Delta buk$  pCLF942 and 824  $\Delta buk$  pCLF952 to produce IBE from glucose, controlled fermentations were performed at pH 5 in CGM medium. The growth and metabolic profiles were compared to the parental 824  $\Delta buk$  strain without plasmid (Table 3). The maximum specific growth rates of all the strains were fairly similar ( $0.24 \text{ h}^{-1}$ ). On the other hand, the molar isopropanol yields of both 824  $\Delta buk$  pCLF942 and 824  $\Delta buk$  pCLF952

were higher (0.207 and 0.224 mol/mol respectively) than the molar acetone yield of the parental  $\Delta buk$  strain (0.169 mol/mol) (Table 3B). In agreement with this result, the final [acetate] were lower for both 824  $\Delta buk$  pCLF942 and 824  $\Delta buk$  pCLF952 (1.79 and 1.88 g/l respectively) compared to the parental 824  $\Delta buk$  strain (2.82 g/l) (Table 3A) indicating a positive effect of the early expression of the *ctfAB* genes encoding the CoaT. Another difference between parental and recombinant strains fermentation profiles was the acetoin production which decreased from 1.88 g/l to 0.19 g/l and 0.12 g/l when the synthetic isopropanol pathway is expressed. The reason for this decrease is not obvious and more physiological studies will be needed to explain it.

Furthermore, when the distribution of the electron flow (NAD(P)H produced from reduced ferredoxin and  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  ratio) was analyzed for each strain and compared between them (Table 3B), it is clear that for both strains expressing the *sadh* gene, a large part of the electrons from reduced ferredoxin is now used to produce NAD(P)H (leading to an increase of the molar yield) instead of hydrogen (a decreasing of the  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  ratio is observed), providing the electrons required for acetone reduction to isopropanol. The NAD(P)H produced during the glycolytic pathway was not sufficient for the alcohols formation and part of the reduced ferredoxin produced by pyruvate ferredoxine oxidoreductase has to be reoxidized by the ferredoxin NAD(P) reductase to produce NAD(P)H (Fig. 1).

The early expression in *C. acetobutylicum* of the synthetic isopropanol operon allowed the efficient (i) re-consumption of acetate, (ii) production of NAD(P)H from reduced ferredoxin at the

**Table 2**

Comparison of fermentation results at non-regulated pH obtained with the engineered *C. acetobutylicum* strains and parental *C. acetobutylicum* strains.

Strains	Glucose consumed (g/l)	Isopropanol (g/l)	Solvents (g/l)	Yield relative to glucose consumption (g/g)	
				Isopropanol	Solvents
824 $\Delta cac15$	31.43 ± 2.74	0.00	10.1 ± 1.10	0.00	0.31 ± 0.01
824 $\Delta buk$	11.45 ± 0.60	0.00	3.49 ± 0.14	0.00	0.31 ± 0.00
824 $\Delta cac15$ pCLF942	27.64 ± 0.34	2.05 ± 0.05	7.96 ± 0.40	0.074 ± 0.00	0.29 ± 0.01
824 $\Delta cac15$ pCLF952	21.00 ± 0.66	1.59 ± 0.03	6.59 ± 0.26	0.076 ± 0.00	0.31 ± 0.01
824 $\Delta buk$ pCLF942	16.04 ± 0.57	1.21 ± 0.09	5.46 ± 0.32	0.075 ± 0.00	0.34 ± 0.01
824 $\Delta buk$ pCLF952	26.40 ± 0.24	2.00 ± 0.04	8.95 ± 0.30	0.076 ± 0.00	0.34 ± 0.01

All results shown are average value ± standard deviations from triplicate experiments.

**Table 3**

The final product concentrations in controlled batch fermentations (pH 5) of the *C. acetobutylicum* 824  $\Delta buk$  (pCLF942), *C. acetobutylicum* 824  $\Delta buk$  (pCLF952) and the parental *C. acetobutylicum* 824  $\Delta buk$  strains:

A. Fermentation of engineered and control strain of <i>C. acetobutylicum</i> at pH 5										
Strains	Glucose consumed and products titer (g/l)								Total solvent yield (g/g)	% of carbon Recovery <sup>a</sup>
	Glucose consumed	Acetate	Butyrate	Acetone	Ethanol	Isopropanol	Butanol	Acetoin		
824 $\Delta buk$	71.87 ± 0.19	2.82 ± 0.17	1.14 ± 0.1	3.91 ± 0.21	1.54 ± 0.06	0 ± 0.00	14.74 ± 0.06	1.88 ± 0.06	0.28	96
824 $\Delta buk$ pCLF942	61.1 ± 0.18	1.79 ± 0.21	1.3 ± 0.08	0.33 ± 0.01	0.46 ± 0.06	4.22 ± 0.15	13.8 ± 0.06	0.19 ± 0.01	0.31	97
824 $\Delta buk$ pCLF952	63.47 ± 0.18	1.88 ± 0.24	1.03 ± 0.12	0.36 ± 0.00	1.01 ± 0.01	4.75 ± 0.16	14.63 ± 0.16	0.12 ± 0.01	0.33	101

B. Stoichiometric analysis of <i>C. acetobutylicum</i> fermentation at pH 5										
Strains	Yields relative to glucose consumption (mol/mol)								$\text{H}_2/\text{CO}_2^b$	
	Acetate	Butyrate	Acetone	Ethanol	Isopropanol	Butanol	NAD(P)H produced from ferredoxin <sup>b</sup>			
824 $\Delta buk$	0.118	0.032	0.169	0.084	0	0.498	0.52	0.577		
824 $\Delta buk$ pCLF942	0.088	0.044	0.017	0.029	0.207	0.549	0.79	0.485		
824 $\Delta buk$ pCLF952	0.089	0.033	0.018	0.062	0.224	0.560	0.83	0.480		

All results shown are average value ± standard deviations from duplicate experiments.

<sup>a</sup> % of carbon recovery is calculated based on the biomass and product formation compared to glucose consumption.

<sup>b</sup>  $\text{H}_2$ ,  $\text{CO}_2$  and NAD(P)H produced from ferredoxin were calculated based on the stoichiometric equations of the central metabolism. NAD(P)H produced from reduced ferredoxin is the difference between NAD(P)H consumption and NAD(P)H formation in the glycolytic pathway and was calculated with the following equation:  $M_{\text{NAD(P)H}}$  from  $\text{Fd} = M_{\text{Ethanol}} + 2M_{\text{Butanol}} - M_{\text{Acetate}} - 2M_{\text{Acetone}} - 2M_{\text{Acetoin}}$ . M: mol/l.

expense of H<sub>2</sub> and (iii) reduction of acetone into isopropanol. Moreover, a comparison of the metabolic profiles of 824  $\Delta$ buk pCLF942 and 824  $\Delta$ buk pCLF952 indicates that when the isopropanol operon was expressed from the *thl* promoter, isopropanol, butanol and ethanol titers were higher. Accordingly, the total solvent yield was slightly higher ( $0.33 \pm 0.01$  g/g) with 824  $\Delta$ buk pCLF952 than with 824  $\Delta$ buk pCLF942 ( $0.31 \pm 0.01$  g/g), suggesting that the former strain is more efficient for biofuel production. Lee et al. (2012) evaluated recently the late (in the fermentation) expression of a synthetic isopropanol operon under the control of the *adc* promoter (active during the solventogenic phase (Girbal et al., 2003) in the PjBC4BK *buk* knockout strain (Harris et al., 2000; Lee et al., 2012)). In these conditions, lower final solvent concentration (20.4 g/l) and solvent yield on glucose (0.30 g/g) and a higher acetate concentration (2.9 g/l) were obtained in comparison to those obtained when the synthetic isopropanol pathway is expressed early in the fermentation under the expression of the *thl* promoter.

### 3.3. Optimization of the culture pH to maximize the performances of the 824 $\Delta$ buk pCLF952 strain

The impact of culture pH on controlled batch fermentations of 824  $\Delta$ buk pCLF952 was evaluated at pH 4.4, 4.6, 4.8, 5, and 5.2. Experiments were done in duplicate and as shown in Fig. 3, after 30 h of batch culture, the isopropanol concentrations at pH 4.4, 4.6, 4.8, 5, and 5.2 were 3.7, 4.1, 5, 4.7 and 4.2 g/l, respectively; the ethanol concentrations follow a similar pattern with values of 0.36, 0.95, 1.09, 1.01 and 0.88 g/l, respectively. Butanol production levels were also affected by the decrease of pH. Finally, the maximum and final acetate levels increased with increasing pH (Fig. 3).

At pH 4.8, under the best conditions tested, the strain performed as follows: a final biofuel titer of 21 g/l, a yield of 0.34 g/g glucose and a productivity of 0.8 g/l h with a combined concentration of by-products (acetate, butyrate and acetoin) of less than 2 g/l (Fig. 4). Such high performances for IBE biofuel production in batch culture have never been obtained before with a Clostridial species. To date, the best performances described with the natural

isopropanol producer *C. beijerinckii* were (i) a total solvent (isopropanol+butanol) concentration of 5.87 g/l at a productivity of 0.12 g/l h in a batch culture containing 60 g/l of glucose as the carbon source (Survase et al., 2011) and (ii) a concentration of 16 g/l of total solvent when the strain was grown on 80 g/l maize mash (Shaheen et al., 2000). Finally, Lee et al. (2012) with a late overexpression of a synthetic isopropanol operon reported final IBE titer, yield and productivity lower (20.4 g/l, 0.30 g/g and 0.66 g/l h respectively) than the values reported here and associated to higher final acetate concentration. So, the early overexpression of the isopropanol synthetic operon under the *thl* promoter and the pH optimization allowed the selection of the best experimental conditions. Moreover, the 824  $\Delta$ buk pCLF952 presents the additional advantage to be stable during repeated subcultures in the absence of antibiotics.

### 3.4. Why is the *in vivo* CoA-transferase flux changing with the pH of the culture of 824 $\Delta$ buk pCLF952

To understand why the *in vivo* CoA-transferase flux is changing with the pH of the culture of 824  $\Delta$ buk pCLF952, we first measured the levels of the three isopropanol pathway enzymes using the crude extract from the mid-exponential phase (16 h) cells collected from the cultures at pH 4.4, 4.6, 4.8, 5 and 5.2. The levels of CoAT, and SADH were within the experimental errors for all extracts and very close for ADC, indicating that there is no pH effect on the operon expression and the enzyme stabilities (Fig. 5).

The CoAT from *C. acetobutylicum* has been previously purified (Wiesenborn et al., 1989) and demonstrated to have a high K<sub>m</sub> (1200 mM) for acetate. To investigate the possibility that the intracellular acetate concentration ([acetate]<sub>int</sub>) may limit acetate re-consumption and isopropanol production, we performed the following calculations (Fig. 6) when the *in vivo* CoA-transferase flux was maximum at the five pH of the cultures: (i) *in vivo* CoAT fluxes normalized to the pH 5 value, (ii) the [acetate]<sub>int</sub> based on intracellular pH values (Huang et al., 1986; Gottwald and Gottschalk, 1985) and previously published assumptions (Jarzębski et al., 1992) and (iii) *in vitro* CoAT fluxes (based on its

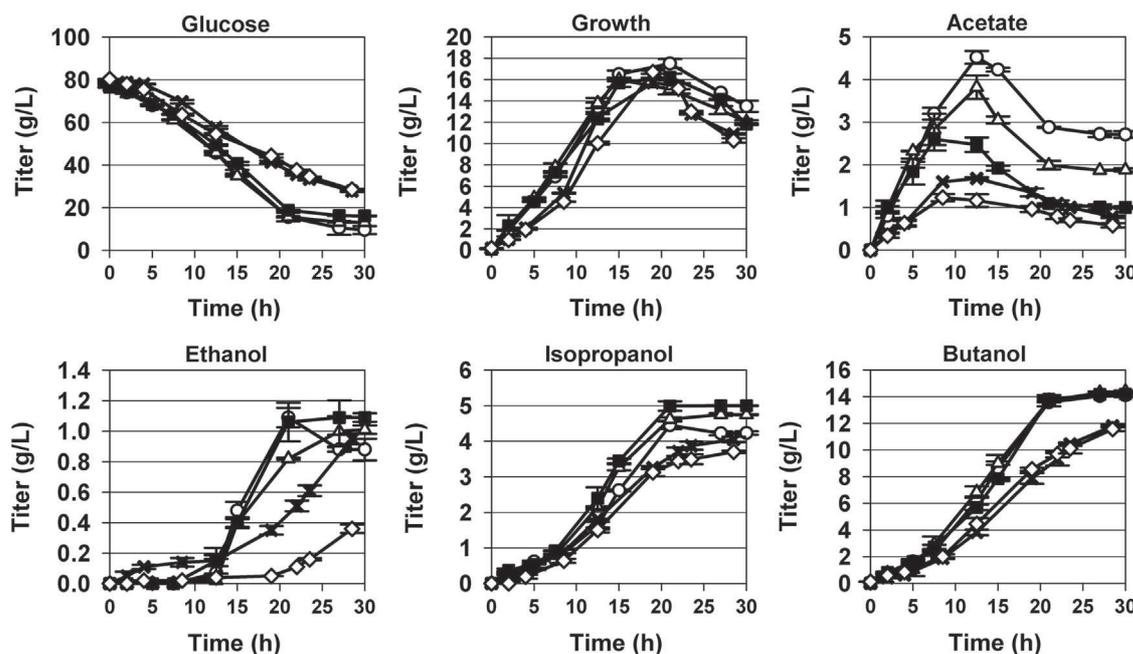
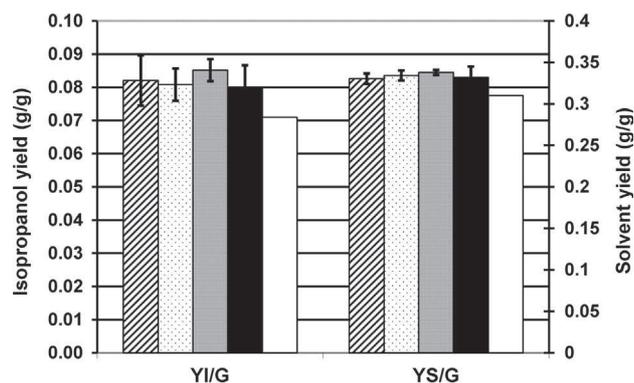
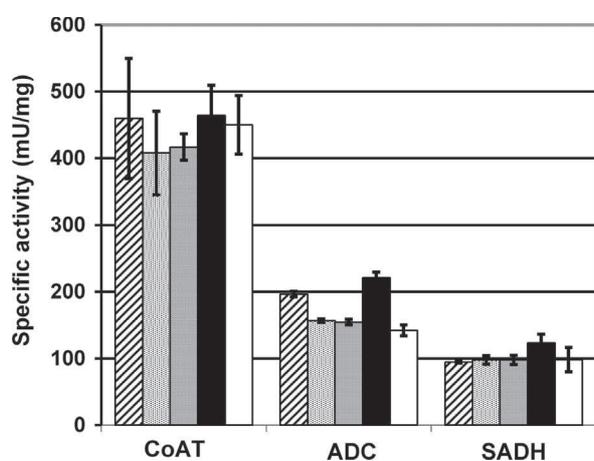


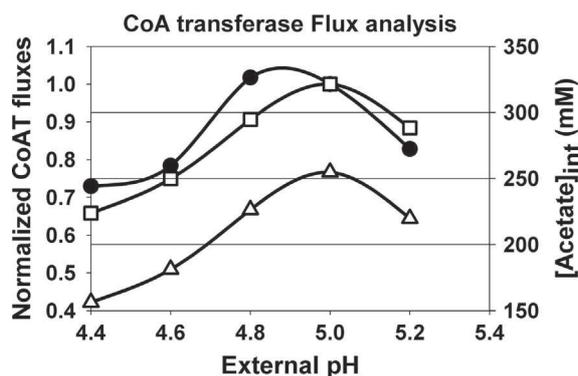
Fig. 3. The pH-controlled fermentations of 824  $\Delta$ buk pCLF952. The growth and metabolic profiles of 824  $\Delta$ buk pCLF952 fermentations at various fermentation pH values are shown: pH 4.4 (open diamonds), pH 4.6 (crosses), pH 4.8 (closed squares), pH 5.0 (open triangles) and pH 5.2 (open circles). Experiments were done in duplicate and each sample was analyzed in duplicate. All time points are then average of four values.



**Fig. 4.** Comparison of fermentation results obtained with the engineered strain 824  $\Delta$ buk pCLF952 at pH 4.4 (dashed), pH 4.6 (dotted), pH 4.8 (gray), pH 5.0 (black) and pH 5.2 (white). Isopropanol yield ( $Y_{I/G}$ ) and total solvent yield ( $Y_{S/G}$ ) relative to glucose consumption are presented.



**Fig. 5.** The specific activity measurements for 824  $\Delta$ buk pCLF952 cells collected during the mid-exponential phase of the batch fermentation regulated at pH 4.4 (dashed), pH 4.6 (dotted), pH 4.8 (gray), pH 5.0 (black) and pH 5.2 (white). The CoA transferase (CoAT), acetoacetate decarboxylase (ADC) and primary–secondary alcohol dehydrogenase (SADH) specific activities are shown.



**Fig. 6.** Intracellular acetate concentration (white triangles), normalized *in vivo* (black circles) and *in vitro* (white squares) fluxes through the CoA transferase as a function of external pH. Intracellular acetate concentrations were calculated using the assumption of Jarzembki et al. (1992). *In vivo* fluxes were measured at the time of maximal isopropanol/acetone specific production rates and normalized by the flux at pH 5.0. Normalized *in vitro* fluxes were calculated from the Michaelis–Menten equation of the CoAT using the calculated  $[\text{acetate}]_{\text{int}}$  at different pH and were normalized by the *in vitro* flux at pH 5.0.

published kinetic properties (Wiesenborn et al., 1989) and the calculated  $[\text{acetate}]_{\text{int}}$  values of this study) normalized to the pH 5 value. These calculations (Fig. 6) suggest levels of the  $[\text{acetate}]_{\text{int}}$

below the  $K_m$  value of the CoAT are responsible for changes in the *in vivo* CoAT fluxes.

#### 4. Conclusions

To develop new strategies for alternative biofuel production, a stable metabolically engineered *C. acetobutylicum* strain was developed for the efficient production of biofuel mixtures consisting of isopropanol, butanol and ethanol with very low amount of by-products. Indeed, the production of this biofuel mixture presents a strong advantage in comparison to the regular ABE solvent mixture produced in *Clostridium* species. To the best of our knowledge, the high performances described in this work for biofuel production in batch culture have never been obtained before with a Clostridial species. These results also suggest that isopropanol production is currently limited by the  $[\text{acetate}]_{\text{int}}$  and the high  $K_m$  of CoAT for acetate. Decreasing the  $K_m$  of this enzyme using a protein engineering approach would be a good target for improving isopropanol production and further decreasing acetate accumulation in the culture medium.

#### Acknowledgments

This work was supported financially by the BIOCORE European Project (Contract no. FP7-241566) from the seventh framework program (web site: [www.biocore-europe.org](http://www.biocore-europe.org)).

#### References

- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Deng, Y., Fong, S.S., 2011. Metabolic engineering of *Thermobifida fusca* for direct aerobic bioconversion of untreated lignocellulosic biomass to 1-propanol. *Metab. Eng.* 13, 570–577.
- Fisher, C.R., Klein-Marcuschamer, D., Stephanopoulos, G., 2008. Selection and optimization of microbial hosts for biofuels production. *Metab. Eng.* 10, 295–304.
- George, H.A., Johnson, J.L., Moore, W.E.C., Holdeman, L.V., Chen, J.S., 1983. Acetone, isopropanol, and butanol production by *Clostridium beijerinckii* (syn. *Clostridium butylicum*) and *Clostridium aurantibutyricum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 1160–1163.
- Girbal, L., Soucaille, P., 1998. Regulation of solvent production in *Clostridium acetobutylicum*. *Trends Biotechnol.* 16, 11–16.
- Girbal, L., Mortier-Barrière, I., Raynaud, F., Rouanet, C., Croux, C., Soucaille, P., 2003. Development of a sensitive gene expression reporter system and an inducible promoter–repressor system for *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4985–4988.
- Gottwald, M., Gottschalk, G., 1985. The internal pH of *Clostridium acetobutylicum* and its effect on the shift from acid to solvent formation. *Arch. Microbiol.* 143, 42–46.
- Green, E.M., Boynton, Z.L., Harris, L.M., Rudolph, F.B., Papoutsakis, E.T., Bennett, G.N., 1996. Genetic manipulation of acid formation pathways by gene inactivation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Microbiology* 142, 2079–2086.
- Harris, L., Desai, R., Welker, N., Papoutsakis, E., 2000. Characterization of recombinant strains of the *Clostridium acetobutylicum* butyrate kinase inactivation mutant: need for new phenomenological models for solventogenesis and butanol inhibition? *Biotechnol. Bioeng.* 5, 1–11.
- Hui, S.F., Zhu, C.X., Yan, R.T., Chen, J.S., 1987. Butanol–ethanol dehydrogenase and butanol–ethanol–isopropanol dehydrogenase: different alcohol dehydrogenases in two strains of *Clostridium beijerinckii* (*Clostridium butylicum*). *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 697–703.
- Huang, L., Forsberg, C.W., Gibbins, L.N., 1986. Influence of external pH and fermentation products on *Clostridium acetobutylicum* intracellular pH and cellular distribution of fermentation products. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 1230–1234.
- Inui, M., Suda, M., Kimura, S., Yasuda, K., Suzuki, H., Toda, H., Yamamoto, S., Okino, S., Suzuki, N., Yukawa, H., 2008. Expression of *Clostridium acetobutylicum* butanol synthetic genes in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77, 1305–1316.
- Ismaiel, A.A., Zhu, C.X., Colby, G.D., Chen, J.S., 1993. Purification and characterization of a primary–secondary alcohol dehydrogenase from two strains of *Clostridium beijerinckii*. *J. Bacteriol.* 175, 5097–5105.
- Jarzembki, A.B., Goma, G., Soucaille, P., 1992. A tentative physiological model of batch acetobutylic fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37, 714–717.

- Jones, D.T., Woods, D.R., 1986. Acetone–butanol revisited. *Microbiol. Rev.* 50, 484–524.
- Lehmann, D., Lütke-Eversloh, T., 2011. Switching *Clostridium acetobutylicum* to an ethanol producer by disruption of the butyrate/butanol fermentative pathway. *Metab. Eng.* 13, 464–473.
- Lee, S.K., Chou, H., Ham, T.S., Lee, T.S., Keasling, J.D., 2008. Metabolic engineering of microorganisms for biofuels production: from bugs to synthetic biology to fuels. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19, 556–563.
- Lee, J., Jang, Y.S., Choi, S.J., Im, J.A., Song, H., Cho, J.H., Seung, D.Y., Papoutsakis, E.T., Bennett, G.N., Lee, S.Y., 2012. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 for isopropanol–butanol–ethanol fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 1416–1423.
- Mermelstein, L.D., Welker, N.E., Bennett, G.G., Papoutsakis, E.T., 1992. Expression of cloned homologous fermentative genes in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Biotechnology* 10, 190–195.
- Meynial-Salles, I., Gonzalez-Pajuelo, M., Mendes, P., Andrade, J.C., Vasconcelos, I., Soucaille, P., 2005. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* for the industrial production of 1,3 propanediol from glycerol. *Metab. Eng.* 7, 329–336.
- Nicolaou, S., Gaida, S.M., Papoutsakis, E.T., 2010. A comparative view of metabolite and substrate stress and tolerance in microbial bioprocessing: from biofuels and chemicals, to biocatalysis and bioremediation. *Metab. Eng.* 12, 307–331.
- Shaheen, R., Shirley, M., Jones, D., 2000. Comparative fermentation studies of industrial strains belonging to four species of solvent-producing clostridia. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2, 115–124.
- Smith, K.M., Liao, J.C., 2011. An evolutionary strategy for isobutanol production strain development in *Escherichia coli*. *Metab. Eng.* 13, 674–681.
- Soucaille, P., 2007. Process for the Biological Production of *n*-Butanol with High Yield. Patent EP20070821988 20071029.
- Soucaille, P., Figge, R., Croux, C., 2006. Process for Chromosomal Integration and DNA Sequence Replacement in Clostridia. Patent WO2006EP66997 20061003.
- Stephanopoulos, G., 2008. Metabolic engineering: enabling technology for biofuels production. *Metab. Eng.* 10, 293–294.
- Survase, S.A., Jurgens, G., Van Heiningen, A., Granström, T., 2011. Continuous production of isopropanol and butanol using *Clostridium beijerinckii* DSM 6423. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 5, 1305–1313.
- Vasconcelos, I., Girbal, L., Soucaille, P., 1994. Regulation of carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* grown in chemostat culture at neutral pH on mixtures of glucose and glycerol. *J. Bacteriol.* 176, 1443–1450.
- Wiesenborn, D.P., Rudolph, F.B., Papoutsakis, E.T., 1989. Coenzyme A transferase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and its role in the uptake of acids. *Appl. Environ. Microbiol.* 55 (2), 323–329.
- Yu, M., Zhang, Y., Tang, I.-C., Yang, S.-T., 2011. Metabolic engineering of *Clostridium tyrobutyricum* for *n*-butanol production. *Metab. Eng.* 13, 373–382.