



**HAL**  
open science

# Etude de la fixation du carbone inorganique chez la levure pour la production industrielle de molécules d'intérêt

Anne-Sophie Kirstetter

► **To cite this version:**

Anne-Sophie Kirstetter. Etude de la fixation du carbone inorganique chez la levure pour la production industrielle de molécules d'intérêt. Autre. Université Paris Saclay (COMUE), 2016. Français. NNT : 2016SACLC015 . tel-01320652

**HAL Id: tel-01320652**

**<https://theses.hal.science/tel-01320652>**

Submitted on 24 May 2016

**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.

NNT : 2016SACL015

THESE DE DOCTORAT  
DE  
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY  
PREPAREE A  
"CENTRALESUPELEC"

ECOLE DOCTORALE N°579 Smemag  
Sciences mécaniques et énergétiques, matériaux et géosciences

Spécialité de doctorat : Génie des procédés

Par

**Mme Anne-Sophie KIRSTETTER**

Etude de la fixation du carbone inorganique chez la levure  
pour la production industrielle de molécules d'intérêt

**Thèse présentée et soutenue à Châtenay-Malabry, le 22 janvier 2016 :**

**Composition du Jury :**

M. DUBREUCQ Eric	Professeur, Sup'agro	Président
Mme TAILLANDIER Patricia	Professeur, ENSIACET	Rapporteur
M. SPINLER Eric	Professeur, AgroParisTech	Rapporteur
M. LOPES-FERREIRA Nicolas	Docteur, IFPEN	Examineur
Mme IBARRA Dominique	Ingénieur, Air Liquide	Encadrante
M. FABRE Nicolas	Docteur, ARD	Encadrant
Mme PAREAU Dominique	Professeur, CentraleSupélec	Directrice de thèse
M. TAIDI Behnam	Professeur, CentraleSupélec	Co-directeur de thèse
M. PERRE Patrick	Professeur, CentraleSupélec	Invité



# Remerciements

---

*Ce travail a été réalisé au sein de la Chaire de Biotechnologie du Laboratoire de Génie des Procédés et Matériaux de CentraleSupélec. Je remercie Patrick Perré et Dominique Pareau de m'avoir accueillie au sein du laboratoire pour effectuer ma thèse. Je remercie également ARD, qui a financé ce travail dans le cadre d'une convention CIFRE et m'a accueillie dans le département de Fermentation, et Air Liquide, qui a participé au financement du projet.*

*Je tiens à remercier mes encadrants M. Nicolas Fabre et M. Behnam Taidi pour leurs précieux conseils et leur aide tant dans la conception des essais que dans l'interprétation des résultats. Ils m'ont permis de m'approprier le sujet et de prendre mes marques dans le doctorat comme il se doit. Mes remerciements vont également à Mme Dominique Ibarra pour son implication dans le suivi de ce projet. Je souhaiterais plus particulièrement remercier ma directrice de thèse Mme Dominique Pareau pour son investissement, notamment pour la correction du manuscrit, ses remarques toujours pertinentes malgré mon sujet de thèse assez éloigné de ses domaines de prédilection, et son soutien dans les moments difficiles.*

*Je souhaiterais adresser mes remerciements à M. Eric Spinnler et Mme Patricia Taillandier pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse, ainsi qu'à M. Eric Dubreucq, M. Nicolas Lopes-Ferreira, M. Patrick Perré et M. Anthony Bresin pour leur participation au jury de cette thèse.*

*Merci à Marc-André Théoleyre, qui en tant que responsable du site de Pomacle n'a pas été impliqué directement dans ma thèse mais avec qui j'ai pu avoir de nombreuses discussions toujours intéressantes et constructives. Merci également à son adjoint Touhami Smaoui, dont j'ai partagé le bureau pendant quelques mois, pour son sens de l'humour pour le moins décalé et son aide pour les commandes et la gestion du matériel.*

*Un grand merci à mes collègues qui ont partagé mon quotidien au cours de ces trois années: Carole, Claire-Line, Clément, Fanny, Hélène, Julien, Rayen, Rita, Thomas et Valentin. Je remercie plus spécialement Rayen pour les longues discussions pendant nos covoiturages et Clément, mon voisin de gauche, pour nos papotages et plaisanteries, et surtout pour m'avoir supporté comme voisine pendant ma rédaction. Merci à Carole pour nos discussions et tes conseils toujours avisés, et à Claire-Line pour ses conseils lors de la préparation de mon manuscrit et de mes batailles avec les papiers pour la soutenance. Un merci tout particulier à Fanny, qui est devenue une vraie amie au fil des discussions et péripéties de la vie de labo; merci pour nos repas, nos potins, nos soirées et nos cours de gym. Je pense que ces trois années ont été porteuses de grands changements pour nous deux et je ne doute pas que nous nous reverrons quoi qu'il arrive.*

*Je remercie mes collègues du service fermentation d'ARD que j'ai malheureusement moins eu l'occasion de voir après le déménagement: Anny, Brice, Aurélien, Damien, Katell, Erell, Valérie, Denis, Sylvaine. Je remercie plus particulièrement Anny qui m'a beaucoup aidée au laboratoire lorsque j'ai commencé les manips de biologie moléculaire. Merci également à Farida, que j'ai connue la majorité du temps à l'accueil d'ARD, pour son sourire toujours présent et nos discussions gaies malgré des sujets pas forcément joyeux.*

*Je remercie également mes stagiaires Zouhour et Thibaut pour leur implication et leur sérieux.*

*J'adresserai mes derniers remerciements à mes proches. Tout d'abord je souhaite remercier mes parents, qui m'ont permis de réaliser ces études et m'ont donné le goût d'apprendre, qui m'ont toujours soutenue. Je remercie mon papa qui m'a toujours poussée à donner le meilleur de moi-*

*même. Je remercie ma maman pour nos longues discussions sur le sens de la vie, les décisions à prendre, et aussi pour les discussions culturelles, les films et les sorties. Merci à eux de m'avoir donné un super petit frère qui a égayé mes week-ends quand je rentrais à la maison, m'a fait découvrir Lille et sera toujours un complice idéal de blagues et de discussion.*

*Merci à mon amie Emeline, pour notre amitié "à distance" depuis 10 ans maintenant (on commence à se faire vieilles...!), pour nos repas quand je venais en réunion à Paris, nos coups de téléphone, les discussions interminables, Paris-Plage et le Vélib, et les fous rires avec Pixel! Une page se tourne pour moi, mais où que j'aille tu seras bien entendue invitée pour visiter!*

*Merci à Thomas et Fred pour avoir fini par visiter Reims l'été dernier pour un week-end de jeux et de rires; le "bourlingot" est devenu culte*

*Je remercie également Marie et Alan-John pour nous avoir aidé à déménager, être venus nous voir malgré la distance et pour nous avoir accueillis à de nombreuses reprises en Alsace. Merci à Ann-Eva, Glynis, Jean-Nicolas, Pierre-Louis et Andrew pour les week-ends et les fêtes de famille, les discussions et les jeux; ça m'a changé les idées quand j'en avais bien besoin.*

*Une petite pensée à mes deux petites boules de poils ratounesques qui ont égayé mon temps libre de leurs bêtises et m'ont inspirée pour dessiner plein de petits rats sur le tableau du bureau: Brownie, parti trop soudainement, et Spyro, fidèle au poste malgré son grand âge.*

*Le meilleur pour la fin, merci à Leo pour (entre autres) son soutien, sa compréhension et sa patience. Merci de m'avoir rassurée quand tout allait mal, d'avoir supporté ma colère, ma frustration et mon stress, d'avoir partagé mes joies et d'avoir été à l'origine de nombreux fous rires. Tu sais ce qui t'attend dans un peu moins d'un an et j'espère pouvoir te soutenir comme tu m'as soutenue.*

# Sommaire

---

<b>INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>5</b>
<b>1. Les voies métaboliques naturelles de fixation du carbone inorganique .....</b>	<b>5</b>
1.1. Fixation autotrophe du carbone inorganique.....	5
1.1.1. Cycle de Calvin-Benson-Bassham .....	5
1.1.2. Cycle de l'acide citrique réducteur .....	6
1.1.3. Voie métabolique de Wood-Ljungdahl .....	7
1.1.4. Cycle du 3-hydroxypropionate.....	9
1.1.5. Cycles du 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate et du dicarboxylate/4-hydroxybutyrate .....	10
1.2. Les réactions anaplérotiques .....	11
1.3. Autres utilisations du carbone inorganique dans le métabolisme .....	12
1.3.1. Assimilation de substrats en C2 et C3 .....	12
1.3.2. Carboxylations impliquées dans la méthyliotrophie.....	14
1.3.3. Autres fonctions des carboxylases.....	14
<b>2. Application de réactions de fixation du carbone pour la production de molécules d'intérêt .....</b>	<b>15</b>
2.1. Contexte.....	15
2.2. Fixation de carbone par des organismes autotrophes .....	16
2.3. Utilisation de la fixation de carbone par le cycle de Calvin et la RubisCO chez des microorganismes hétérotrophes .....	17
2.3.1. Chez <i>Escherichia coli</i> .....	17
2.3.2. Chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	19
2.4. Fixation de carbone par les réactions anaplérotiques pour la production d'acides 1,4-dicarboxyliques .....	20
2.4.1. La production d'acide succinique: un cas d'école .....	20
2.4.1.1. Voies métaboliques de production et producteurs naturels .....	21
2.4.1.2. Modification génétique de microorganismes pour la production d'acide succinique .....	22
2.4.1.2.1. Hôtes <i>procaryotes</i> .....	22
2.4.1.2.2. <i>Levures et champignons filamenteux</i> .....	25
2.4.2. Production d'acide malique: un thème de recherche stratégique.....	25

2.4.2.1. Procédés industriels actuellement utilisés .....	26
2.4.2.2. Voies métaboliques de production en fermentation et producteurs naturels .....	26
2.4.2.3. Production par des microorganismes génétiquement modifiés .....	27
2.4.2.3.1. Export et purification de l'acide malique.....	27
2.4.2.3.2. Chez <i>Escherichia coli</i> .....	28
2.4.2.3.3. Chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	29
2.4.2.3.4. Chez <i>Aspergillus oryzae</i> .....	30
2.4.2.3.5. Autres hôtes utilisés .....	31
2.5. Fixation de carbone inorganique pour la production de 3-HP .....	31
2.5.1. Voies métaboliques de production de 3-HP .....	32
2.5.2. Expression de la malonyl-CoA réductase de <i>C. aurantiacus</i> chez <i>Escherichia coli</i> .....	34
2.5.3. Expression d'un cycle du 3-HP/4-HB partiel chez <i>Pyrococcus furiosus</i> .....	34
2.5.4. Mise en place d'une voie de production de 3-HP chez <i>S. cerevisiae</i> .....	35
2.5.4.1. Production à partir de malonyl-CoA par carboxylation de l'acétyl-CoA .....	35
2.5.4.2. Production à partir de $\beta$ -alanine par carboxylation du pyruvate .....	37
<b>3. Production d'éthanol chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....</b>	<b>38</b>
3.1. Contexte de la production de bioéthanol et technologies actuelles.....	38
3.2. Principe de production de l'éthanol .....	39
3.3. Amélioration du rendement de production d'éthanol .....	40
3.3.1. Limitation de la co-production de glycérol .....	40
3.3.1.1. Délétion des gènes <i>gpd</i> .....	40
3.3.1.2. Modulation de l'expression des gènes <i>gpd</i> .....	41
3.3.2. Modification des aspects d'oxydoréduction .....	41
3.3.2.1. Régénération de NAD <sup>+</sup> par expression d'une transhydrogénase.....	41
3.3.2.2. Réoxydation de NADH par couplage avec la production de glutamate.....	42
3.3.2.3. Réoxydation de NADH par couplage avec la réduction de l'acétate .....	42
3.3.2.4. Réoxydation par une NADH oxydase .....	43
3.3.2.5. Phosphorylation de NADH .....	43
3.3.2.6. Contournement de la production de NADH .....	44
3.3.2.7. Effet transhydrogénase par construction d'une voie métabolique .....	44
3.3.3. Diminution de l'ATP disponible.....	45
3.3.4. Recyclage du CO <sub>2</sub> par expression d'une RubisCO.....	46
<b>4. Objectifs: implémentations de voies de fixation de CO<sub>2</sub> pour la production de molécules d'intérêt.....</b>	<b>47</b>
4.1. Organisme hôte.....	47
4.1.1. Développement des "cell factories" .....	47

4.1.2. Contexte particulier de la production d'acides organiques .....	47
4.1.3. Choix de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> comme organisme hôte .....	48
<b>4.2. Développement des stratégies d'ingénierie métabolique.....</b>	<b>48</b>
4.2.1. Production d'acide malique dans une souche <i>Δpyk1</i> .....	48
4.2.1.1. Description de la stratégie .....	48
4.2.1.2. Rendement théorique et bilan réactionnel .....	49
4.2.1.3. Limitations.....	49
4.2.2. Production d'éthanol par expression de la RubisCO .....	50
4.2.2.1. Description de la stratégie .....	50
4.2.2.2. Rendement théorique et bilan réactionnel .....	51
4.2.2.3. Limitations.....	51
4.2.3. Production d'acide 3-hydroxypropionique à partir d'acétate .....	51
4.2.3.1. Description de la stratégie .....	51
4.2.3.2. Rendement théorique et bilan réactionnel .....	52
4.2.3.3. Limitations.....	52
4.2.4. Mise en place d'une fixation de CO <sub>2</sub> avec croissance sur acétate.....	52
4.2.4.1. Description de la stratégie .....	52
4.2.4.2. Rendement théorique et bilan réactionnel .....	53
4.2.4.3. Limitations.....	53
4.3. Choix de la stratégie développée.....	53
<b>CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>55</b>
<b>1. Microorganismes et milieux de culture .....</b>	<b>55</b>
1.1. Milieux de culture .....	55
1.1.1. Bactéries .....	55
1.1.2. Levures .....	55
1.2. Microorganismes .....	57
1.2.1. Bactéries .....	57
1.2.2. Levures .....	57
<b>2. Biologie moléculaire .....</b>	<b>57</b>
<b>A. Construction des souches de levures.....</b>	<b>57</b>
2.1.1. Plasmides utilisés.....	57
2.1.2. Amplification des gènes d'intérêt .....	59
2.1.2.1. Extraction d'ADN génomique .....	59
2.1.2.2. Amplification des gènes d'intérêt par PCR haute fidélité .....	59

2.1.2.3. Purification des amplicons .....	60
2.1.3. Clonage dans le vecteur donneur .....	60
2.1.3.1. Purification du vecteur donneur .....	60
2.1.3.2. Clonage des gènes d'intérêt .....	60
2.1.3.3. Vérification des transformants .....	60
2.1.4. Clonage dans les vecteurs receveurs .....	61
2.1.4.1. Purification des vecteurs receveurs .....	61
2.1.4.2. Clonage des gènes d'intérêt dans les vecteurs receveurs.....	61
2.1.4.3. Vérification des transformants .....	61
2.1.5. Construction d'un plasmide pAG426-pyk1 antisens .....	62
2.1.5.1. Amplification de l'insert pyk1 antisens .....	62
2.1.5.2. Clonage dans le pAG426-GPD-ccdB .....	62
2.1.6. Introduction des plasmides d'intérêt dans les levures .....	63
2.1.6.1. Transformation des levures .....	63
2.1.6.2. Vérification des transformants .....	63
2.1.7. Délétion de la pyruvate kinase .....	64
2.1.7.1. Amplification de la cassette de délétion .....	64
2.1.7.2. Délétion du gène pyk1 chez les levures .....	64
2.1.7.3. Vérification de la délétion.....	64
2.2. Evaluation de l'expression des transgènes .....	65
2.2.1. Extraction des ARN totaux et synthèse des ADNc .....	65
2.2.1.1. Extraction des ARN totaux et élimination de l'ADN génomique .....	65
2.2.1.2. Quantification et vérification de l'intégrité des ARN .....	65
2.2.1.3. Synthèse des ADN complémentaires .....	65
2.2.2. Estimation de l'expression des gènes par PCR quantitative .....	66
2.2.2.1. Construction et étalonnage des amorces.....	66
2.2.2.2. Amplification par PCR quantitative .....	66
2.2.2.3. Exploitation des données par la méthode $\Delta\Delta Cq$ .....	67
<b>3. Fermentation .....</b>	<b>67</b>
3.1. Fermentation en fioles.....	67
3.1.1. Précultures .....	67
3.1.2. Protocole de fermentation en fioles.....	67
3.1.2.1. Préparation des milieux.....	67
3.1.2.2. Ensemencement des fioles .....	68
3.1.2.3. Suivi en point final.....	68
3.1.2.4. Cinétique.....	68

3.1.2.5. Perte de masse et quantité de CO <sub>2</sub> produit.....	68
<b>3.2. Fermentation en bioréacteur.....</b>	<b>68</b>
3.2.1. Précultures .....	68
3.2.2. Protocole de fermentation en bioréacteur.....	69
3.2.2.1. Préparation du bioréacteur .....	69
3.2.2.2. Ensemencement.....	69
3.2.2.3. Culture et prélèvements.....	69
<b>3.3. Méthodes analytiques et exploitation des données .....</b>	<b>70</b>
3.3.1. Méthodes de suivi .....	70
3.3.1.1. Suivi de la biomasse.....	70
3.3.1.2. Suivi de la masse volumique du milieu.....	70
3.3.1.3. Suivi du pH pendant les essais en fioles .....	70
3.3.1.4. Autres paramètres suivis .....	70
3.3.2. Dosages par chromatographie liquide haute performance .....	71
3.3.3. Dosages par chromatographie ionique.....	71
3.3.4. Calcul des rendements de production des composés suivis .....	71
3.3.5. Bilan carbone.....	71
<b>CHAPITRE 3 : CONSTRUCTION DE SOUCHES POUR LA PRODUCTION D'ACIDE MALIQUE:</b>	
<b>CARACTERISATIONS PRELIMINAIRES .....</b>	<b>73</b>
<b>1. Construction des souches.....</b>	<b>73</b>
<b>2. Premières caractérisations de souches exprimant les gènes <i>ecppc</i>, <i>mdh3<sub>c</sub></i> et <i>spmae</i> ...</b>	<b>74</b>
2.1. Souches auxotrophes exprimant <i>ecppc</i> et <i>mdh3<sub>c</sub></i> .....	74
2.1.1. Vérification de l'expression des gènes <i>ecppc</i> et <i>mdh3<sub>c</sub></i> .....	74
2.1.2. Essai en fioles en point final.....	75
2.1.3. Conclusion .....	77
2.2. Souche auxotrophe exprimant <i>ecppc</i> , <i>mdh3<sub>c</sub></i> et <i>spmae</i> .....	77
2.2.1. Expérience en fioles sans prélèvement : évaluation de la production d'acide malique..	77
2.2.2. Cinétique en fioles : influences de l'ajout de carbonate de calcium et du niveau d'aération .....	80
2.3. Discussion.....	84
<b>3. Caractérisation de souches <i>Δpyk1</i> .....</b>	<b>84</b>
3.1. Vérification de l'expression des gènes dans les souches testées .....	85
3.2. Mise en évidence de la production d'un composé non identifié .....	86

3.3. Essais en fioles.....	87
3.3.1. Cinétique en fioles de deux clones de la souche PMS-delta-cen et de deux clones de la souche PMS-delta-2mu .....	87
3.3.2. Cinétique en fioles d'un clone de la souche PMS-delta-cen, d'un clone de la souche PMS-delta-2mu et d'un clone de la souche PMS-delta-mae1.....	90
3.4. Essai d'évolution .....	92
3.5. Discussion.....	94
<b>4. Caractérisation des souches prototrophes PMS-U et PMS-antisens .....</b>	<b>96</b>
4.1. Essais en fioles.....	96
4.2. Discussion.....	100
<b>5. Conclusion .....</b>	<b>101</b>
<b>CHAPITRE 4 : ETUDE PHYSIOLOGIQUE DE LA SOUCHE PMS-U EXPRIMANT LES GENES <i>ECPPC</i>, <i>MDH3<sub>C</sub></i> ET <i>SPMAE</i> EN FIOLES ET EN BIOREACTEURS .....</b>	<b>103</b>
<b>1. Etude physiologique en fioles.....</b>	<b>103</b>
1.1. Caractérisation de la souche PMS-U : cinétiques en fioles.....	103
1.1.1. Influence du sel de carbonate et de la présence de tampon phosphate .....	103
1.1.2. Influence de la concentration en carbonate de calcium .....	108
1.1.3. Influence du substrat: essais en fioles utilisant de l'éthanol.....	113
1.1.4. Répétabilité .....	116
1.2. Discussion.....	117
<b>2. Caractérisation en bioréacteur en présence d'air ou d'air enrichi en CO<sub>2</sub>.....</b>	<b>118</b>
2.1. Suivi des paramètres mesurés .....	118
2.2. Discussion.....	124
<b>1. Conclusion .....</b>	<b>125</b>
<b>CHAPITRE 5 : UTILISATION DE SOUCHES EXPRIMANT LES GENES <i>ECPPC</i> ET <i>MDH3<sub>C</sub></i> POUR LA PRODUCTION D'ETHANOL 1G .....</b>	<b>127</b>
<b>1. Caractérisation préliminaire en fioles: souches auxotrophes exprimant les gènes <i>ecppc</i> et <i>mdh3<sub>C</sub></i>.....</b>	<b>127</b>
<b>2. Caractérisation des souches prototrophes exprimant <i>ecppc</i> et <i>mdh3<sub>C</sub></i>.....</b>	<b>130</b>
2.1. Essai en fioles .....	130
2.2. Essais en bioréacteur .....	131
2.3. Discussion.....	132

<b>3. Conclusion .....</b>	<b>134</b>
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>135</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>139</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>153</b>



# Liste des symboles et abréviations

---

3-HP: 3-hydroxypropionate ou acide 3-hydroxypropionique

4-HB: 4-hydroxybutyrate ou acide 4-hydroxybutyrique

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADN<sub>c</sub> : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire

AOA: Acide OxaloAcétique

ARN : Acide RiboNucléique

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

ARNr : Acide RiboNucléique ribosomique

DNase : DésoxyriboNucléase

dNTP : désoxyriboNucléotide TriPhosphate

EDTA : Acide Ethylène Diamine-Tétraacétique

HPLC : High Liquid Performance Chromatography

LB : Lisogeny Broth

LiAc: acétate de lithium

PCR : Polymerase Chain Reaction

PEG : PolyEthylène Glycol

PEP : PhosphoEnol Pyruvate

PFOR: Pyruvate:Ferrédoxine OxydoRéductase

PYK : Pyruvate Kinase

qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction

RNase : RiboNucléase

Rpm : Round Per Minute

TAE : Tampon Tris-HCl Acétate EDTA

TE : Tampon Tris-EDTA

YNB: Yeast Nitrogen Base

YPAc: Yeast Peptone Acetate

YPD: Yeast Peptone Dextrose

YPE: Yeast Peptone Ethanol

# Liste des gènes et enzymes

---

Gène	Protéine	Fonction
<i>acs</i>	ACS	Acétyl-CoA synthétase
<i>adh1, adh2, adh3, adh4, adh5, adh6, adh7</i>	ADH	Alcool déshydrogénase
<i>bapat</i>	BAPAT	$\beta$ -alanine aminotransférase
<i>ecppc</i>	<i>ec</i> PEPC	PEP carboxylase de <i>Escherichia coli</i>
<i>gpd</i>	GPD	Glycérol-3-phosphate déshydrogénase
<i>gpp</i>	GPP	Glycérol-3-phosphate phosphatase
<i>hibdh</i>	HIBDH	3-hydroxybutyrate déshydrogénase
<i>hpdh</i>	HPDH	3-hydroxypropionate déshydrogénase
<i>mae1</i>	MAE1	Enzyme malique mitochondriale
<i>mae1<sub>c</sub></i>	MAE1 <sub>c</sub>	Enzyme malique relocalisée dans le cytosol
<i>mcr</i>	MCR	Malonyl-CoA réductase
<i>mdh3</i>	MDH3	Malate déshydrogénase
<i>mdh3<sub>c</sub></i>	MDH3 <sub>c</sub>	Malate déshydrogénase relocalisée dans le cytosol
<i>pck</i>	PEPCK	PEP carboxykinase
<i>pda1, pdb1, lat1, lpd1, pdx1</i>	PDH	Complexe pyruvate déshydrogénase
<i>pdcl, pdc5</i>	PDC	Pyruvate décarboxylase
<i>pfo</i>	PFOR	pyruvate:ferrédoxine oxydoréductase
<i>prk</i>	PRK	Phosphofructokinase
<i>pyk1, pyk2</i>	PYK1, PYK2	Pyruvate kinase
<i>rbc</i>	RubisCO	Ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygénase
<i>Seacs<sup>L641P</sup></i>	<i>Se</i> ACS	Acétyl-CoA synthétase d'un variant de <i>Salmonella enterica</i>
<i>spmae</i>	<i>sp</i> MAE	Transporteur d'acide carboxylique de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>



# Liste des figures

---

<b>Figure 1.</b> Cycle de Calvin-Benson-Bassham (d'après Erb, 2011). .....	5
<b>Figure 2.</b> Cycle de l'acide citrique réducteur actif chez les bactéries vertes sulfureuses et voie d'assimilation de l'acétyl-CoA en pyruvate, PEP et oxaloacétate(d'après Berg, 2011). .....	7
<b>Figure 3.</b> Voie métabolique de Wood-Ljungdahl : différences entre acétogènes et méthanogènes (d'après Berg <i>et al.</i> , 2010). .....	8
<b>Figure 4.</b> Voie métabolique de Wood-Ljungdahl chez les acétogènes (d'après Ragsdale and Pierce, 2008). .....	8
<b>Figure 5.</b> Bicyclic du 3-hydropropionate (d'après Berg, 2011). .....	9
<b>Figure 6.</b> Cycle du dicarboxylate/4-hydroxybutyrate (A) et cycle du 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate (B) (d'après Berg, 2011). .....	10
<b>Figure 7.</b> Cycle de Krebs. ....	11
<b>Figure 8.</b> Cycle du glyoxylate. ....	12
<b>Figure 9.</b> Voie métabolique de l'éthylmalonyl-CoA (d'après Erb <i>et al.</i> , 2007). .....	13
<b>Figure 10.</b> Métabolisation du propionate et de la leucine. ....	13
<b>Figure 11.</b> Stratégie de régulation de la balance d'oxydoréduction chez les bactéries pourpres non sulfureuses en croissance sur butyrate. ....	14
<b>Figure 12.</b> Réactions de carboxylation pour l'assimilation de substrats inertes (d'après Erb <i>et al.</i> , 2011). .....	15
<b>Figure 13.</b> Voies de fermentation de gaz aérobies et anaérobies (d'après Dürre and Eiksmann, 2015). .....	16
<b>Figure 14.</b> Schéma simplifié de la place de la voie métabolique basée sur l'expression de la RubisCO par rapport au métabolisme central(d'après Zhuang and Li, 2013). .....	18
<b>Figure 15.</b> Schéma simplifié des améliorations proposées pour la souche exprimant la voie métabolique de la RubisCO(d'après Li <i>et al.</i> , 2015). .....	18
<b>Figure 16.</b> Expression d'une RubisCO dans une souche <i>S. cerevisiae</i> capable de métaboliser le xylose pour la production d'éthanol 2G (d'après Dai <i>et al.</i> , 2008). .....	19
<b>Figure 17.</b> Voies métaboliques pour la production d'acide succinique chez <i>A. succiniciproducens</i> . ....	21
<b>Figure 18.</b> Devenir du pyruvate et voies de synthèse natives des acides dicarboxyliques en anaérobie chez <i>E. coli</i> . .....	22

<b>Figure 19.</b> Modifications des voies métaboliques d' <i>E. coli</i> pour améliorer le rendement de production de succinate sur glucose.....	23
<b>Figure 20.</b> Voie métabolique simplifiée de production du succinate à partir de glycérol chez <i>E. coli</i> (d'après Soellner <i>et al.</i> , 2013).....	24
<b>Figure 21.</b> Voies métaboliques possibles pour la formation du malate d'après Chiet <i>al.</i> , 2013. ....	27
<b>Figure 22.</b> Schéma des modifications génétiques de la souche d' <i>Escherichia coli</i> utilisée par Zhanget <i>al.</i> pour produire du malate. ....	29
<b>Figure 23.</b> Stratégie de production de malate chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (d'après Zelle <i>et al.</i> , 2008). ....	30
<b>Figure 24.</b> Voies de production du 3-hydroxypropionate et ses applications pour la production de composés à haute valeur ajoutée (d'après Valdehuesa <i>et al.</i> , 2013). ....	32
<b>Figure 25.</b> Voies métaboliques synthétiques proposées pour la production de 3-HP à partir de glucose, d'après Valdehuesa <i>et al.</i> , 2013. ....	33
<b>Figure 26.</b> Schéma simplifié de la voie de production chez <i>E. coli</i> pour la production de 3-HP (d'après Rathnasinghet <i>al.</i> , 2012). ....	34
<b>Figure 27.</b> Production de 3-HP à partir de maltose, de CO <sub>2</sub> et d'hydrogène chez <i>P. furiosus</i> exprimant l'acétyl-CoA/propionyl-CoA carboxylase, la malonyl/succinyl-CoA réductase et la malonate semi-aldéhyde réductase de <i>M. sedula</i> .....	35
<b>Figure 28.</b> Modifications génétiques effectuées chez <i>S. cerevisiae</i> pour la production de 3-HP (d'après Chen <i>et al.</i> , 2014). ....	36
<b>Figure 29.</b> Modifications génétiques effectuées chez <i>S. cerevisiae</i> pour la production de 3-HP via la β-alanine (d'après Borodina <i>et al.</i> , 2015). ....	37
<b>Figure 30.</b> Production mondiale d'éthanol par pays/région entre 2007 et 2014. ....	38
<b>Figure 31.</b> Cycle du carbone pour la production de carburants et de produits d'intérêt par pétrochimie ou par biotechnologie industrielle (d'après Van Maris <i>et al.</i> , 2006). ....	39
<b>Figure 32.</b> Métabolisme central du glucose chez <i>S. cerevisiae</i> . ....	40
<b>Figure 33.</b> Voies de formations du glutamate considérées pour l'étude de Nissen <i>et al.</i> ....	42
<b>Figure 34.</b> Stratégie de réoxydation du NADH par consommation d'acétate dans un contexte <i>Δgpd1 Δgpd2</i> . ....	43
<b>Figure 35.</b> Surexpression d'une 3-phosphoglyceraldéhyde déshydrogénase NADP <sup>+</sup> -dépendante et non phosphorylante (GAPN) pour la production d'éthanol.....	44

<b>Figure 36.</b> Description de la voie métabolique créant l'effet transhydrogénase dans une souche de <i>S. cerevisiae</i> exprimant la xylose isomérase (d'après Suga <i>et al.</i> , 2013).....	45
<b>Figure 37.</b> Schéma de la stratégie d'expression d'une RubisCO pour la réoxydation de NADH par fixation de CO <sub>2</sub> chez <i>S. cerevisiae</i> d'après Guadalupe-Medina <i>et al.</i> , 2013. ....	46
<b>Figure 38.</b> Schéma de principe de la stratégie d'ingénierie métabolique de production d'acide malique. ....	49
<b>Figure 39.</b> Stratégie de production d'éthanol de deuxième génération chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> reposant sur la co-fixation de carbone par la RubisCO.....	50
<b>Figure 40.</b> Schéma de principe pour la stratégie de production de 3-HP à partir d'acétate.....	51
<b>Figure 41.</b> Schéma de principe de la stratégie d'ingénierie métabolique pour la croissance sur acétate. ....	53
<b>Figure 42.</b> Set de plasmides Gateway commandé chez Addgene. ....	58
<b>Figure 43.</b> Schéma de principe du clonage avec la technologie Gateway. ....	58
<b>Figure 44.</b> Principe de complémentation de l'auxotrophie pour l'histidine par un plasmide 2μ.....	59
<b>Figure 45.</b> Arbre généalogique des souches construites pour la production de malate. ....	73
<b>Figure 46.</b> Résultats du niveau de transcription normalisé des gènes <i>ecppc</i> (A) et <i>mdh3<sub>c</sub></i> (B) dans la souche contrôle CEN.PK2-1C auxotrophe et dans les clones de la souche PM obtenus par RT-qPCR sur les ARN totaux.....	74
<b>Figure 47.</b> Relation entre la concentration en éthanol et la concentration de masse sèche.....	76
<b>Figure 48.</b> Cinétiques des souches PMS clones 1 et 2 en présence ou en absence de carbonate de calcium dans des fioles à fond lisse ou à baffles.....	81
<b>Figure 49.</b> Rendements massiques de production de malate (g malate/g glucose consommé) en fonction du niveau d'aération et de la présence de carbonate de calcium sur deux clones de la souche PMS. ....	83
<b>Figure 50.</b> Expression normalisée relative des gènes <i>ecppc</i> , <i>mdh3</i> , <i>spmae</i> et <i>mae1</i> dans les clones 28 (PMS-delta-cen), 34 (PMS-delta-2mu) et 36 (PMS-delta-mae1) et expression normalisée relative des gènes <i>pyk</i> dans les clones 28 (PMS-delta-cen), 34 (PMS-delta-2mu), 36 (PMS-delta-mae1) et la souche contrôle 4PL. ....	86
<b>Figure 51.</b> Comparaison de deux chromatogrammes du même échantillon de culture avant et après ajout dosé d'étalon d'acide malique. ....	87
<b>Figure 52.</b> Essais en fioles: comparaison des souches PMS-delta-cen (clones 27 et 28) et PMS-delta-2mu (clones 33 et 34).....	88

<b>Figure 53.</b> Essais en fioles: comparaison des souches PMS-delta-cen (clone 28), PMS-delta-2mu (clone 34) et PMS-delta-mae1 (clone 45).....	91
<b>Figure 54.</b> Suivi d'absorbance des réplicats du clone 28 (A), du clone 34 (B) et du clone 45 (C) au cours du deuxième essai en fioles des souches $\Delta pyk1$ .....	93
<b>Figure 55.</b> Suivi d'absorbance du clone 28 réplicat 1, du clone 34 réplicat 1 et du clone 45 réplicat 3 après un premier repiquage (A), puis du clone 28 réplicat 1 et du clone 45 réplicat 3 après un second repiquage (B) sur milieu YNB glucose 100 g/L tampon phosphate 0,5 M pH 5,5. ....	93
<b>Figure 56.</b> Expression normalisée relative des gènes <i>pyk</i> dans le clone 28 évolué et dans la souche contrôle 4PL. Résultats obtenus par RT-qPCR sur les ARN totaux. ....	94
<b>Figure 57.</b> Essai en fioles: comparaison des souches 4PL, PMS-U et PMS-antisens sur milieu contenant du tampon phosphate ou du $CaCO_3$ . ....	97
<b>Figure 58. A.</b> Rendements massiques de production de malate. <b>B.</b> Rendements massiques de production de succinate. PMS-AS: souche PMS-antisens.....	100
<b>Figure 59.</b> Essais en fioles de la souche PMS-U pour comparer $CaCO_3$ avec et sans tampon phosphate et $Na_2CO_3$ . ....	104
<b>Figure 60.</b> Rendements massiques de production de malate et de succinate de la souche PMS-U pour les différentes conditions testées. ....	107
<b>Figure 61.</b> Essai en fioles sur la souche PMS-U: influence de concentrations en carbonate de calcium comprises entre 2 et 6 g/L.....	109
<b>Figure 62.</b> Rendements massiques de malate et de succinate de la souche PMS-U pour les différentes conditions testées. ....	112
<b>Figure 63.</b> Essais en fioles de comparaison de la souche 4PL et de la souche PMS-U en croissance sur éthanol.....	114
<b>Figure 64.</b> Essai en fermenteur de la souche PMS-U: effet de la teneur en $CO_2$ de l'air introduit.....	120
<b>Figure 65.</b> Calcul de la vitesse de croissance spécifique $\mu$ de la souche PMS-U en présence d'air ou d'air enrichi en $CO_2$ .....	121
<b>Figure 66.</b> Evolution de la concentration en éthanol dans la deuxième phase de croissance (à partir de 27 heures) pour la souche PMS-U en présence d'air ou d'air enrichi en $CO_2$ . ....	122
<b>Figure 67.</b> Graphes de la production rapportée à la biomasse (A), de la productivité (B) et de la productivité spécifique (C) pour le malate. ....	124
<b>Figure 68.</b> Arbre généalogique des souches utilisées pour l'étude de la production d'éthanol. ....	127
<b>Figure 69.</b> Schéma de l'effet transhydrogénase tel qu'il peut se produire dans les souches exprimant la PEP carboxylase et la malate déshydrogénase. ....	129

# Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Antibiotiques utilisés pour les milieux sélectifs de bactéries. ....	55
<b>Tableau 2.</b> Composition détaillée des milieux YPD et YPE. ....	55
<b>Tableau 3.</b> Compositions comparatives du milieu synthétique commercial YNB et du milieu synthétique reconstitué. ....	56
<b>Tableau 4.</b> Concentrations en acides aminés et base azotée utilisées pour compléter les auxotrophies des souches de levures en fonction de la concentration en substrat carboné (d'après Flikweert <i>et al.</i> , 1999).....	56
<b>Tableau 5.</b> Amorces utilisées pour l'amplification des gènes d'intérêt par PCR haute fidélité. ....	60
<b>Tableau 6.</b> Amorces utilisées pour la vérification des clonages des gènes d'intérêt dans le plasmide pDONR221.....	61
<b>Tableau 7.</b> Amorces utilisées pour la vérification des clonages des gènes d'intérêts dans les vecteurs receveurs et pour la vérification de l'introduction des plasmides dans les levures.....	62
<b>Tableau 8.</b> Amorces utilisées pour l'amplification de l'antisens de <i>pyk1</i> . ....	62
<b>Tableau 9.</b> Amorces utilisées pour la vérification du clonage de <i>pyk1</i> antisens dans le plasmide pAG426-GPD. ....	63
<b>Tableau 10.</b> Amorces utilisées pour la vérification de transformation des plasmides vides. ....	64
<b>Tableau 11.</b> Amorces utilisées pour l'amplification de la cassette de délétion <i>KanMX</i> pour la délétion de <i>pyk1</i> .....	64
<b>Tableau 12.</b> Amorces utilisées pour la vérification de la délétion de <i>pyk1</i> . ....	65
<b>Tableau 13.</b> Amorces utilisées en qPCR. ....	66
<b>Tableau 14.</b> Essai en fioles sur la souche CEN.PK2-1C et les clones 7 et 9 de la souche PM. ....	75
<b>Tableau 15.</b> Rendements massiques de production d'éthanol pour la souche contrôle CEN.PK2-1C et les clones 7 et 9 de la souche PM.....	76
<b>Tableau 16.</b> Bilan carbone réalisé sur l'essai en fioles des souches CEN.PK2-1C et PM: comparaison du nombre de moles de carbone en entrée et du nombre de moles de carbone produites.....	77
<b>Tableau 17.</b> Essai en fioles sans prélèvement: comparaison des souches 4PL, PM, PMS clone 1 et PMS clone 2.....	78
<b>Tableau 18.</b> Rendements massiques de production de malate calculés en g de malate par g de glucose consommé.....	79

<b>Tableau 19.</b> Rendements massiques de production d'éthanol en g d'éthanol par g de glucose consommé et rapport glycérol sur éthanol pour la souche contrôle 4PL, la souche PM et les deux clones de la souche PMS. ....	79
<b>Tableau 20.</b> Répétabilité des rendements massiques de malate et de succinate chez les souches PMS-U et 4PL au cours des essais d'une durée de 168 heures sur milieu YNB glucose 50 g/L tampon phosphate 0,5 m pH 5,5 ou YNB glucose 50 g/L CaCO <sub>3</sub> 6 g/L. ....	117
<b>Tableau 21.</b> Rendements massiques de production d'éthanol, de glycérol, d'acétate, de malate, de succinate et de masse sèche calculés à 27,5 heures à la fin de la phase de consommation du glucose et en fin d'essai. ....	122
<b>Tableau 22.</b> Essai en fioles sur la souche CEN.PK2-1C et les clones 7 et 9 de la souche PM. ....	128
<b>Tableau 23.</b> Tableau récapitulatif des rendements massiques de production de masse sèche, d'éthanol et de glycérol et des productivités d'éthanol pour la souche contrôle CEN.PK2-1C et les clones 7 et 9 de la souche PM. ....	128
<b>Tableau 24.</b> Essai en fioles sur milieu YNB ou sur milieu minéral reconstitué avec la souche 4PL et la souche PM-TU. ....	130
<b>Tableau 25.</b> Tableau récapitulatif des rendements massiques de production de masse sèche, d'éthanol et de glycérol et des productivités d'éthanol pour la souche contrôle 4PL et la souche PM-TU sur milieu YNB ou sur milieu minéral reconstitué. ....	131
<b>Tableau 26.</b> Tableau récapitulatif des concentrations finales en éthanol et glycérol, des rendements massiques de production de masse sèche, d'éthanol et de glycérol et des productivités d'éthanol pour la souche contrôle 4PL et la souche PM-TU en bioréacteur sur milieu minéral reconstitué. ....	132

# Introduction générale

---

Les biotechnologies blanches ont pour but de remplacer les procédés de synthèse de molécules d'intérêt de l'industrie chimique classique par des voies de synthèse biologique. La sélection de microorganismes produisant des molécules d'intérêt a ainsi permis la mise au point de procédés de production par voie biologique efficaces et bon marché pour la pénicilline, l'acide citrique, le bioéthanol, ou bien encore des acides aminés comme le glutamate ou la lysine. L'acide citrique, qui est l'acide organique le plus produit au monde avec 1,4 millions de tonnes chaque année, est par exemple produit principalement par des souches d'*Aspergillus niger* en fermentation (Soccol *et al.*, 2006). La levure *Saccharomyces cerevisiae* est quant à elle utilisée à grande échelle, principalement aux Etats-Unis et au Brésil, pour la production de bioéthanol à partir de maïs ou de canne à sucre ; sa production mondiale annuelle s'élève actuellement à 75 milliards de litres (Nielsen *et al.*, 2013).

Le développement des outils de biologie moléculaire a permis de développer les possibilités de production offertes par la voie biologique à travers deux domaines complémentaires: l'ingénierie métabolique, qui se définit comme le développement de méthodes d'analyses des réseaux métaboliques avec l'objectif d'identifier des cibles pour le développement d'usines cellulaires; et la biologie synthétique, qui permet la construction de systèmes biologiques (par exemple des systèmes de contrôle génétique, des voies métaboliques, des chromosomes, des cellules) n'existant pas dans la nature par l'assemblage de composants connus et réutilisables (Nielsen *et al.*, 2014).

Grâce à ces outils, des voies métaboliques de production de composés d'intérêt ont été développées, chez *Escherichia coli* ou *Saccharomyces cerevisiae* le plus souvent, et ont abouti au développement de procédés de production à l'échelle industrielle de molécules telles que le 1,3-propanediol (Dupont, Genencor et Tate&Lyle), l'isobutanol (Gevo et Butamax) (Nakamura and Whited, 2003), l'artémisinine (Amyris et Sanofi) (Hong and Nielsen, 2012; Paddon *et al.*, 2013), le 1,4-butanediol (Genomatica) (Yim *et al.*, 2011), ou encore l'acide succinique (Reverdia) (Smidt, 2011). L'acide succinique, tout comme l'acide malique ou l'acide fumarique, présente un fort intérêt car les acides dicarboxyliques sont des molécules plateformes très utilisées dans les domaines de l'industrie agro-alimentaire, l'industrie chimique et l'industrie pharmaceutique (Patel *et al.*, 2006; Werpy and Petersen, 2004).

Ces acides sont également des intermédiaires du cycle de Krebs et peuvent être produits par les réactions anaplerotiques, qui sont des réactions permettant la fixation de carbone inorganique. Il peut s'agir de co-fixation, c'est-à-dire que le carbone est capté lors d'une réaction, puis relargué dans une réaction ultérieure, mais certaines voies métaboliques permettent la fixation nette de carbone. Cet aspect de fixation du carbone inorganique présente deux principaux avantages: d'une part, sur le plan économique, les rendements massiques de production des molécules d'intérêt sont augmentés de façon proportionnelle à la représentation du carbone d'origine inorganique dans la molécule finale; d'autre part, d'un point de vue environnemental, la fixation de carbone inorganique pendant le procédé de production implique une diminution des émissions de gaz à effet de serre et donc un bilan carbone plus favorable.

A l'échelle des systèmes biologiques, la fixation de carbone inorganique est un processus crucial, car tous les organismes vivants en dépendent directement ou indirectement. De ce fait, la fixation de CO<sub>2</sub> est le procédé biosynthétique le plus important avec 7.10<sup>16</sup> grammes de carbone fixé par an pour la planète (Berg, 2011; Hüglér *et al.*, 2003a). Cette fixation est endergonique, c'est-à-dire qu'elle consomme de l'énergie, puisqu'elle réduit le CO<sub>2</sub> (état d'oxydation du carbone: +4) en carbone cellulaire (état d'oxydation : +0) (Zarzycki *et al.*, 2009). Les sources d'électrons et les équivalents

réducteurs utilisés pour fournir l'énergie nécessaire à la fixation du carbone inorganique dépendent des organismes et des mécanismes qu'ils emploient : il existe à l'heure actuelle six voies métaboliques différentes connues permettant la fixation de CO<sub>2</sub> (Berg, 2011; Erb, 2011). L'étude de ces voies de fixation permet d'une part de sélectionner des organismes producteurs naturels qui peuvent être exploités industriellement, et également d'identifier des enzymes ou voies métaboliques qui peuvent être transposées dans des organismes modèles à l'innocuité reconnue qui pourront se prêter à une exploitation commerciale.

En effet, bien que certaines molécules d'intérêt comme l'acide succinique soient déjà produites à l'échelle industrielle, les procédés permettant de fixer du carbone inorganique dans le cadre de la production de composés d'intérêt restent peu nombreux. Par ailleurs, le Département de l'énergie américain (DOE) et la Commission Européenne ont établi une liste de molécules plateforme qu'il serait intéressant de voir produites à échelle industrielle par des procédés biotechnologiques (Patel *et al.*, 2006; Werpy and Petersen, 2004). Parmi les 12 premiers candidats cités par le DOE, on trouve des acides 1,4-dicarboxyliques comme l'acide succinique et l'acide (L)-malique.

C'est dans ce contexte qu'a été développée une collaboration entre CentraleSupélec, ARD et Air Liquide dans le contexte d'une thèse CIFRE sur le thème de l'étude de la fixation du carbone inorganique chez la levure pour la production de molécules d'intérêt industriel. Plus précisément, l'objectif de ce travail de thèse a été de développer une stratégie d'ingénierie métabolique faisant appel à des réactions de fixation du carbone inorganique chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* pour la production d'une molécule d'intérêt. Le choix du modèle d'étude s'est porté sur la levure de bière *Saccharomyces cerevisiae* pour sa commodité d'utilisation dans les procédés industriels et la disponibilité des outils moléculaires nécessaires à sa modification génétique.

Pour répondre à cet objectif, une étude approfondie des mécanismes naturels de fixation de carbone inorganique a été réalisée et est détaillée dans la première partie de ce mémoire. Cette étude bibliographique inclut une partie portant sur la production d'éthanol chez *S. cerevisiae*, aspect qui a été développé pour ce projet avec la caractérisation de certaines souches pour la production d'éthanol. En nous appuyant sur les travaux publiés de production de molécules d'intérêt dans divers hôtes procaryotes et eucaryotes, nous avons envisagé quatre stratégies d'ingénierie métabolique impliquant des substrats variés (glucose, xylose, acétate) pour la production de plusieurs molécules cibles d'intérêt industriel (malate, 3-hydroxypropionate, éthanol) impliquant de plus, dans un cas, l'utilisation d'hydrogène comme donneur d'électron. Après examen de chaque approche envisagée (utilisation d'hydrogène, nombre de gènes à exprimer, propriété intellectuelle, originalité), nous avons décidé de développer une stratégie de production d'acide malique chez *Saccharomyces cerevisiae* reposant sur l'expression de la phosphoénolpyruvate carboxylase d'*Escherichia coli* pour la fixation de carbone dans un contexte d'inactivation de la pyruvate kinase.

En deuxième partie sont détaillés les matériels et méthodes utilisés en biologie moléculaire et en fermentation pour réaliser ce travail.

Les résultats sont présentés en trois chapitres: le premier présente la construction et la vérification des premières souches recombinantes de levures obtenues pour la production d'acide malique. Les étapes de construction de souches par biologie moléculaire suivies d'essais physiologiques en fioles ont permis d'obtenir une souche exprimant les trois enzymes lui permettant de produire de l'acide malique (PEP carboxylase, malate déshydrogénase et transporteur d'acides dicarboxyliques). Dans le deuxième chapitre, nous avons caractérisé la souche obtenue à travers des essais en fioles faisant varier des paramètres tels que la concentration en carbonate de calcium ou le type de substrat utilisé. Ces essais

en fioles ont été suivis d'un essai en bioréacteur afin d'évaluer l'effet de l'ajout d'un apport en dioxyde de carbone gazeux sur la souche obtenue. Dans le dernier chapitre nous présentons des essais en fioles et en bioréacteurs que nous avons eu l'opportunité de réaliser sur des souches intermédiaires obtenues pour la stratégie de production d'acide malique qui présentaient des caractéristiques intéressantes pour la production d'éthanol.



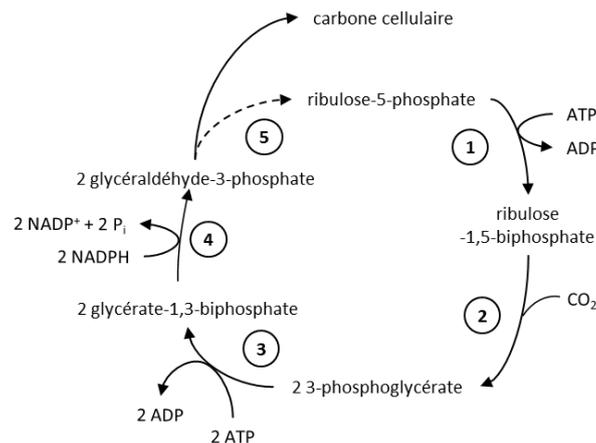
# Chapitre 1 : étude bibliographique

## 1. Les voies métaboliques naturelles de fixation du carbone inorganique

### 1.1. Fixation autotrophe du carbone inorganique

#### 1.1.1. Cycle de Calvin-Benson-Bassham

Le cycle de Calvin-Benson-Bassham (cycle CBB) est également appelé cycle des pentoses réducteurs (Figure 1). Il est présent chez les plantes (Bassham *et al.*, 1950), les algues, les cyanobactéries, certaines archées (Finn and Tabita, 2003) et certaines protéobactéries (Hügler and Sievert, 2011). C'est le cycle de fixation de carbone inorganique le plus important en terme de quantité. L'étape de fixation de CO<sub>2</sub> est catalysée par la ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygénase (RubisCO) et utilise comme substrat un sucre à cinq atomes de carbone, le ribulose-1,5-biphosphate (RuBP). Le produit final du cycle est le glycéraldéhyde-3-phosphate, précurseur de toute la synthèse des glucides pour les organismes photosynthétiques (Bassham *et al.*, 1950). Les organismes utilisant le cycle de Calvin possèdent différentes isoformes de RubisCO, qui peuvent être composées de ses petites et grandes sous-unités en stoechiométries différentes (revu par Portis and Parry, 2007). Il existe également une forme III, propre aux archées et n'étant pas associée à un cycle de Calvin (Sato *et al.*, 2007) et une forme IV, qui ne catalyse pas le même type de réaction. (Whitney *et al.*, 2010).



**Figure 1.** Cycle de Calvin-Benson-Bassham (d'après Erb, 2011).

Enzymes : 1: phosphoribulokinase ; 2: ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase ; 3: 3-phosphoglycérate kinase ; 4: glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase ; 5: réactions permettant la régénération du ribulose-5-phosphate *via* des intermédiaires phosphatés à 4, 5, 6 et 7 atomes de carbone.

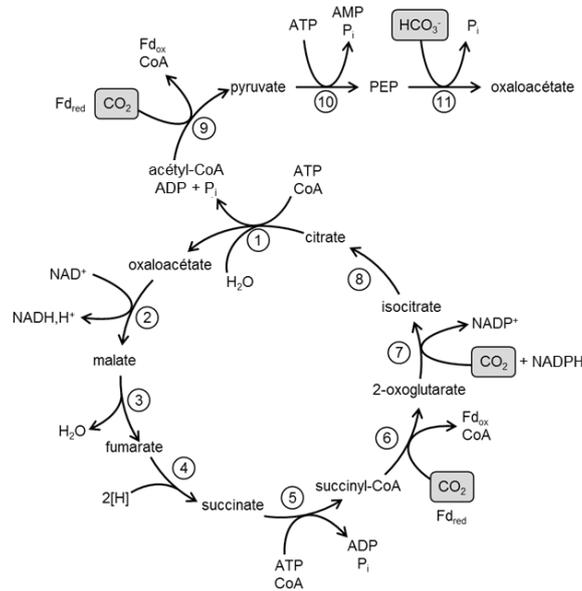
La RubisCO doit être activée par une molécule de CO<sub>2</sub> qui permet de former un carbamate, stabilisé ultérieurement par un ion Mg<sup>2+</sup>. La complexité de cette activation comporte le risque de former au cours de l'une des étapes des produits indésirables qui peuvent provoquer le blocage total de l'enzyme (Parry *et al.*, 2007; Pearce, 2006). Le retrait des molécules inhibitrices nécessite l'intervention de la RubisCO activase, et requiert de l'ATP (Portis *et al.*, 2007). Par ailleurs, la RubisCO est susceptible de catalyser une réaction parasite d'oxygénation qui conduit à la formation de phosphoglycolate, un composé toxique pour la cellule. Sa détoxification s'effectue par photorespiration (revu par

Peterhansel *et al.*, 2008). et entraîne une consommation d'ATP ainsi que le relargage d'une partie du carbone fixé sous forme de CO<sub>2</sub>(Berg, 2011).La double spécificité de la RubisCO est un facteur qui impacte grandement son efficacité catalytique. En effet, l'enzyme possède une plus grande affinité pour l'oxygène que pour le dioxyde de carbone et dans l'atmosphère actuelle, O<sub>2</sub> est présent en quantités bien plus importantes que CO<sub>2</sub>. De plus, le taux de conversion catalytique de l'enzyme est faible (1 à 12 s<sup>-1</sup> site actif<sup>-1</sup>) (Badger and Bek, 2007). En revanche, la RubisCO est très fortement exprimée : dans les chloroplastes des plantes en C3 et dans les bactéries, la proportion de RubisCO peut atteindre jusqu'à 50% du total des protéines solubles (Berg, 2011). Les cyanobactéries séquestrent l'enzyme dans des organites spécialisés, les carboxysomes, où la teneur en CO<sub>2</sub> est fortement augmentée par rapport à la teneur atmosphérique (Badger, 2003; Raven *et al.*, 2012). Chez les plantes en C4, la fixation de CO<sub>2</sub> est réalisée par la phosphoénolpyruvate (PEP) carboxylase dans les cellules du mésophylle, ce qui mène à la formation d'oxaloacétate. L'oxaloacétate est ensuite transporté dans les cellules du parenchyme où la RubisCO est fortement exprimée, puis décarboxylé, ce qui l'augmente de la teneur en CO<sub>2</sub> dans ces cellules et optimise la fixation de carbone par la RubisCO (Nobel, 1991).

### 1.1.2. Cycle de l'acide citrique réducteur

Le cycle de l'acide citrique réducteur a été mis en évidence pour la première fois chez la bactérie verte sulfureuse *Chlorobium limicola* dans les années soixante (Evans *et al.*, 1966). Il est présent chez des bactéries des phyla *Aquificae*, *Proteobacteria* et *Nitrospirae*, vivant dans des environnements ne contenant pas ou très peu d'oxygène (Hugler *et al.*, 2005). Ce cycle est basé sur l'inversion des réactions constituant le cycle de Krebs (Figure 2), dont la plupart sont réversibles, à l'exception de trois d'entre elles, catalysées par la citrate synthase, la succinate déshydrogénase et la 2-oxoglutarate déshydrogénase. L'inversion de ces réactions est prise en charge respectivement par l'ATP-citrate lyase, la fumarate réductase et la 2-oxoglutarate synthase ferrédoxine dépendante (Evans *et al.*, 1966). Ces trois enzymes sont considérées comme étant caractéristiques du cycle (Berg, 2011).

Les bactéries utilisant ce cycle possèdent également une autre enzyme caractéristique : la pyruvate:ferrédoxine oxydoréductase (PFOR), qui convertit l'acétyl-CoA en pyruvate, utilisé dans les réactions du métabolisme central (Evans *et al.*, 1966). Cette enzyme, ainsi que la 2-oxoglutarate synthase, sont très sensibles à l'oxygène car elles contiennent des clusters fer-soufre. Cela explique la limitation de l'utilisation de ce cycle à des microorganismes vivant dans des milieux privés d'oxygène, bien qu'il soit plus efficace d'un point de vue énergétique que le cycle de Calvin par exemple: il n'utilise en effet que deux équivalents ATP pour former une molécule de pyruvate, contre sept pour le cycle CBB(Berg, 2011; Berg *et al.*, 2010).

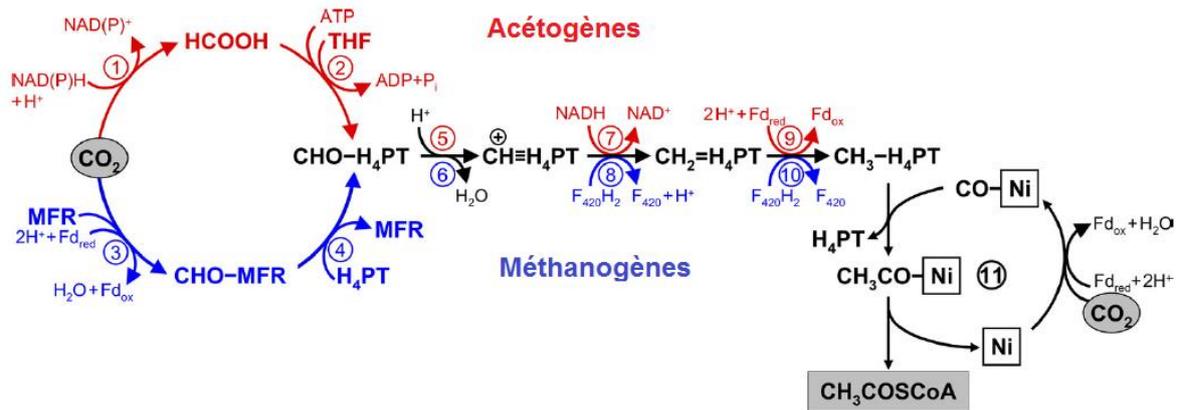


**Figure 2.** Cycle de l'acide citrique réducteur actif chez les bactéries vertes sulfureuses et voie d'assimilation de l'acétyl-CoA en pyruvate, PEP et oxaloacétate(d'après Berg, 2011).

Enzymes : 1, ATP-citrate lyase ; 2, malate déshydrogénase ; 3, fumarate hydratase ; 4, fumarate réductase (donneur d'électrons inconnu) ; 5, succinyl-CoA synthétase ; 6, 2-oxoglutarate synthétase ferrédoxine dépendante ; 7, isocitrate déshydrogénase ; 8, aconitate hydratase ; 9, pyruvate: ferrédoxine oxydoréductase (PFOR) ; 10, PEP synthase ; 11, PEP carboxylase.

### 1.1.3. Voie métabolique de Wood-Ljungdahl

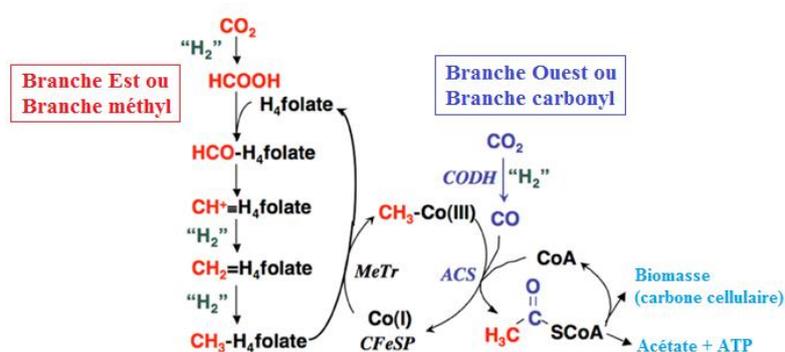
La voie métabolique de Wood-Ljungdahl est aussi nommée voie de l'acétyl-CoA réducteur. Présente chez les bactéries acétogènes et sulfatoréductrices ainsi que chez les archées méthanogènes, elle leur permet de transformer deux molécules de  $\text{CO}_2$  en une molécule d'acétyl-CoA (Figure 3). Cette voie métabolique acyclique utilise entre autres deux enzymes caractéristiques: la PFOR, déjà citée pour le cycle précédent et la monoxyde de carbone déshydrogénase CODH (Ragsdale and Wood, 1991). Il existe deux classes de CODH: les Mo-Cu-Se-CODH, qui ne sont pas sensibles à l'oxygène et opèrent chez les carboxydobactéries qui oxydent  $\text{CO}$  avec  $\text{O}_2$  (Ragsdale, 2004, 2008), et les Ni-CODH, que l'on retrouve chez les acétogènes et les méthanogènes. Les CODH peuvent être monofonctionnelles ou bifonctionnelles lorsqu'elles sont couplées à une fonction acétyl-CoA synthase (ACS) (Ragsdale, 2008). Dans le cas des CODH bifonctionnelles, la réaction catalysée est celle de la formation d'acétyl-CoA à partir de  $\text{CO}_2$ .



**Figure 3.** Voie métabolique de Wood-Ljungdahl : différences entre acétogènes et méthanogènes (d'après Berg *et al.*, 2010).

Fd, ferrédoxine ; THF, tétrahydrofolate ; H<sub>4</sub>PT, tétrahydroptérine (THF chez les acétogènes et tétrahydrométhanoptérine ou tétrahydrosarcinoptérine chez les méthanogènes) ; MFR, méthanofurane ; F<sub>420</sub>, coenzyme F<sub>420</sub>. Enzymes : 1, formate déshydrogénase ; 2, formyl-THF synthétase ; 3, formyl-THF déshydrogénase ; 4, formyl-MFR:tétrahydrométhanoptérine formyltransférase ; 5, méthényl-THF cyclohydrolase ; 6, méthényl-tétrahydrométhanoptérine cyclohydrolase ; 7, méthylène-THF déshydrogénase ; 8, méthylène-tétrahydrométhanoptérine déshydrogénase ; 9, méthylène-THF réductase ; 10, méthylène-tétrahydrométhanoptérine réductase ; 11, CO déshydrogénase acétyl-CoA synthétase.

La voie métabolique de Wood-Ljungdahl est constituée de deux étapes, consommant chacune une molécule de CO<sub>2</sub> (Figure 4). La première étape (aussi appelée branche Est) consiste en la réduction d'une molécule de CO<sub>2</sub> en un groupement CH<sub>3</sub> qui va être lié à une protéine fer-soufre à corrinnoïde (Ragsdale and Pierce, 2008). Dans la branche Ouest, une autre molécule de CO<sub>2</sub> est réduite en CO par la CODH. Le monoxyde de carbone, qui tient lieu ici d'intermédiaire réactionnel, est lié au nickel central et reste donc confiné au sein du complexe enzymatique (Ragsdale, 2008). Le groupement méthyl lié à la protéine fer-soufre à corrinnoïde est transféré sur l'atome de nickel lié au monoxyde de carbone. Le groupement acétyl est finalement relargué en présence de coenzyme A pour former l'acétyl-CoA (Ragsdale, 2004, 2008).



**Figure 4.** Voie métabolique de Wood-Ljungdahl chez les acétogènes (d'après Ragsdale and Pierce, 2008).

*MeTr* : méthyltransférase ; *CFeSP* : protéine corrinnoïde fer-soufre ; *CODH* : monoxyde de carbone déshydrogénase ; *ACS* : acétyl-CoA synthétase. "H<sub>2</sub>" correspond ici à un apport de deux électrons et de deux protons à la réaction.

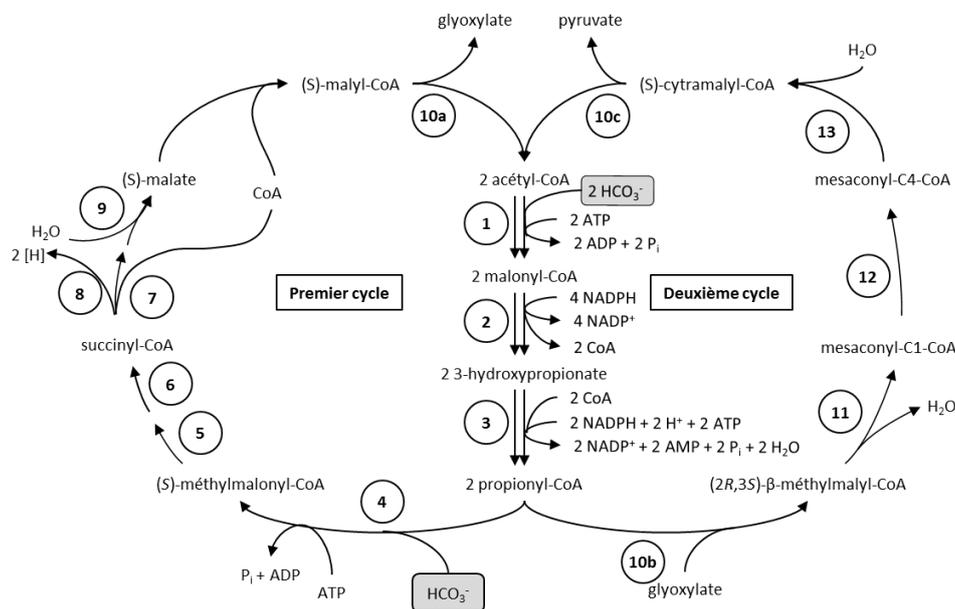
D'une façon plus générale, les acétogènes, les méthanogènes et les sulfatoréducteurs peuvent utiliser la voie de Wood-Ljungdahl en autotrophie dans le sens réducteur; mais ils ont également la possibilité d'utiliser la voie dans le sens inverse, le sens oxydant, afin d'utiliser l'acétate comme source de carbone

et d'électrons. Toutefois, l'oxydation de l'acétate en  $\text{CO}_2 + \text{H}_2$  étant thermodynamiquement défavorable, elle doit être couplée à une autre réaction, comme la méthanogénèse ou la réduction des sulfates (Ragsdale and Pierce, 2008).

Du point de vue énergétique, la voie métabolique de Wood-Ljungdahl est économique car elle ne consomme qu'environ un équivalent ATP pour produire une molécule de pyruvate (Berg *et al.*, 2010). Cependant, l'anaérobiose stricte indispensable au fonctionnement de certaines enzymes de cette voie constitue une contrainte qui limite son utilisation à des niches écologiques très spécifiques (Berg, 2011; Berg *et al.*, 2010).

### 1.1.4. Cycle du 3-hydroxypropionate

Le cycle du 3-hydroxypropionate (3-HP), ou bicycle Fuchs-Holo, est constitué de deux cycles distincts comprenant une série de réactions communes. Ce cycle fut élucidé grâce à l'étude de *Chloroflexus aurantiacus* (Holo, 1989; Strauss and Fuchs, 1993) et a été trouvé uniquement chez les bactéries vertes non sulfureuses de la famille des *Chloroflexaceae* (Berg *et al.*, 2010). Il permet la fixation de trois molécules de  $\text{HCO}_3^-$  en 19 étapes grâce à 13 enzymes différentes (Zarzycki *et al.*, 2009). Les trois réactions communes aux deux cycles consistent en la carboxylation réductrice de l'acétyl-CoA en propionyl-CoA en trois étapes (Strauss and Fuchs, 1993). L'acétyl-CoA, qui constitue le point d'entrée du cycle, est carboxylé pour produire du malonyl-CoA. Le malonyl-CoA est ensuite converti en 3-HP, qui est par ailleurs un intermédiaire caractéristique de ce cycle (Berg, 2011).



**Figure 5.** Bicycle du 3-hydroxypropionate (d'après Berg, 2011).

Enzymes : 1, acétyl-CoA/propionyl-CoA carboxylase ; 2, malonyl-CoA réductase ; 3, propionyl-CoA synthétase ; 4, acétyl-CoA/propionyl-CoA carboxylase ; 5, méthylmalonyl-CoA épimérase ; 6, méthylmalonyl-CoA mutase ; 7, succinyl-CoA:(S)-malate-CoA transférase ; 8, succinate déshydrogénase ; 9, fumarate hydratase ; 10a, b et c : (S)-malyl-CoA (a)/ $\beta$ -methylmalonyl-CoA (b)/(S)-citramalyl-CoA (c) lyase trifonctionnelle ; 11, mésoaconyl-CoA hydratase ; 12, mésoaconyl-CoA C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> CoA transférase ; 13, mésoaconyl-C<sub>4</sub>-CoA hydratase.

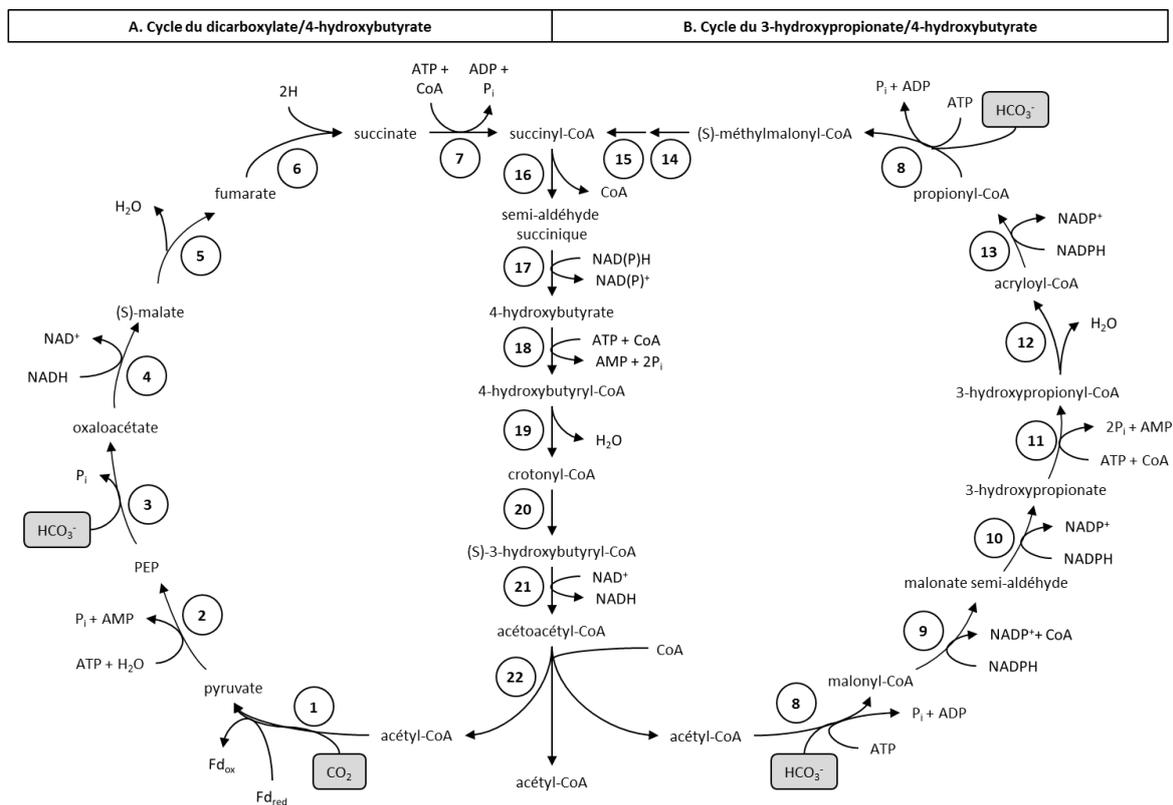
Les réactions de fixation du bicarbonate ont lieu lors des carboxylations de l'acétyl-CoA et du propionyl-CoA (Zarzycki *et al.*, 2009). Ces deux réactions distinctes sont catalysées par la même enzyme : l'acétyl-CoA/propionyl-CoA carboxylase, qui est une carboxylase bifonctionnelle ATP et biotine-dépendante (Tong, 2012). Elle permet la formation de malonyl-CoA et de méthylmalonyl-CoA

à partir, respectivement, d'acétyl-CoA et de propionyl-CoA. Le mécanisme réactionnel consiste en l'activation du bicarbonate par l'ATP pour former avec la biotine un adduit carboxybiotine, qui peut alors transférer le CO<sub>2</sub> activé au niveau du site actif de l'enzyme

. D'un point de vue énergétique, le cycle du 3-HP est équivalent au cycle de Calvin en dépit du fait que la carboxylase requiert une hydrolyse d'ATP et une activation par la biotine (Zarzycki *et al.*, 2009).

### 1.1.5. Cycles du 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate et du dicarboxylate/4-hydroxybutyrate

Le cycle du 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate (3-HP/4-HB) permet la formation d'une molécule d'acétyl-CoA à partir d'une molécule de CO<sub>2</sub> et d'une molécule de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> et opère chez les archées thermoacidophiles des genres *Sulfolobus*, *Acidianus* et *Metallosphaera* (Berget *et al.*, 2007). Le cycle du 3-HP/4-HB ressemble au bicycle du 3-HP, mais même si certains intermédiaires sont les mêmes, les enzymes ne sont pas homologues (Thauer, 2007). Son enzyme clé est l'acétyl-CoA/propionyl-CoA carboxylase (Hugler *et al.*, 2002).



**Figure 6.** Cycle du dicarboxylate/4-hydroxybutyrate (A) et cycle du 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate (B) (d'après Berg, 2011).

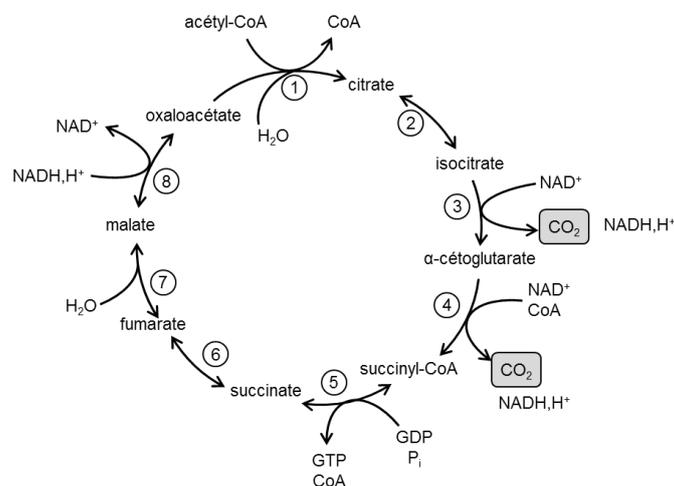
Enzymes : 1, pyruvate:ferredoxine oxydoréductase ; 2, pyruvate:H<sub>2</sub>O dikinase ; 3, PEP carboxylase ; 4, malate déshydrogénase ; 5, fumarate hydratase ; 6, fumarate réductase ; 7, succinyl-CoA synthétase ; 8, acétyl-CoA/propionyl-CoA carboxylase ; 9, malonyl-CoA réductase ; 10, semi-aldéhyde malonique réductase ; 11, 3-hydroxypropionate-CoA ligase ; 12, 3-hydroxypropionyl-CoA déshydratase ; 13, acryloyl-CoA réductase ; 14, méthylmalonyl-CoA épimérase ; 15, méthylmalonyl-CoA mutase ; 16, succinyl-CoA réductase ; 17, semi-aldéhyde succinique réductase ; 18, 4-hydroxybutyrate-CoA ligase ; 19, 4-hydroxybutyryl-CoA déshydratase ; 20, crotonyl-CoA hydratase ; 21, (S)-3-hydroxybutyryl-CoA déshydrogénase ; 22, acétoacétyl-CoA β-cétothiolase.

Le cycle du dicarboxylate/4-hydroxybutyrate (DC/4-HB) permet la formation d'une molécule d'acétyl-CoA à partir de deux molécules de  $\text{HCO}_3^-$  et est présent chez les archées anaérobies et microaérobies des ordres *Thermoproteales* et *Desulfococcales* (Huberet *et al.*, 2008).

Le cycle 3-HP/4-HB et le cycle du DC/4-HB utilisent la même suite réactionnelle pour convertir le succinyl-CoA en deux molécules d'acétyl-CoA en sept étapes via le 4-HB, mais se différencient dans leur façon de réduire et de carboxyler l'acétyl-CoA en succinyl-CoA (Figure 6) (Berget *et al.*, 2007). Ils possèdent des bilans énergétiques différents du fait des enzymes différentes mises en jeu pour les étapes de carboxylation : un tour du cycle du 3-HP/4-HB nécessite neuf équivalents ATP tandis qu'un tour du cycle DC/4-HB n'en consomme de cinq (Berg *et al.*, 2010). Cependant, le cycle DC/4-HB est limité à des espèces anaérobies du fait de la sensibilité à l'oxygène des enzymes et coenzymes impliquées : PFOR et ferrédoxine (Berg *et al.*, 2010; Erb, 2011).

## 1.2. Les réactions anapérotiques

De nombreux intermédiaires utilisés pour la biosynthèse sont fournis par le cycle de Krebs (Figure 7) : près de la moitié des acides aminés sont synthétisés directement à partir d'intermédiaires du cycle (Erb, 2011). Ces intermédiaires quittent le cycle pour participer à d'autres réactions du métabolisme et doivent être remplacés, ce qui est le rôle des réactions anapérotiques (Kornberg, 1965).



**Figure 7.** Cycle de Krebs.

Enzymes : 1, citrate synthase ; 2, aconitase, 3, isocitrate déshydrogénase ; 4,  $\alpha$ -cétoglutarate déshydrogénase ; 5, succinyl-CoA synthétase ; 6, succinate déshydrogénase ; 7, fumarase ; 8, malate déshydrogénase.

Les composés concernés par les réactions anapérotiques sont principalement le pyruvate, le phosphoenolpyruvate (PEP), le malate et l'oxaloacétate. L'oxaloacétate peut être formé par carboxylation du pyruvate ou du PEP; le malate peut être produit par carboxylation du pyruvate.

La pyruvate carboxylase est la principale enzyme anapérolique. C'est une enzyme biotine-dépendante qui convertit le pyruvate en oxaloacétate en consommant du carbone inorganique sous forme  $\text{HCO}_3^-$ , de l'ATP et du magnésium (Jitrapakdee *et al.*, 2008). Cette enzyme est présente dans la mitochondrie chez les eucaryotes et dans le cytosol chez les champignons (revu par Tong, 2012). Chez *Saccharomyces cerevisiae*, la pyruvate carboxylase possède deux isoformes PYC1 et PYC2 (revu par Pronk *et al.*, 1996). La délétion de l'une des deux isoformes peut être compensée par la seconde; un

double mutant *Δpyc1 Δpyc2* est en revanche incapable de croître sur glucose (revu par Pronk *et al.*, 1996).

La PEP carboxylase catalyse la carboxylation du PEP en oxaloacétate chez certaines bactéries; elle joue un rôle important dans la fixation du carbone chez les plantes en C4 (O’Leary, 1982). La PEP carboxylase utilise préférentiellement le carbone sous forme  $\text{HCO}_3^-$  mais n’a pas besoin de biotine contrairement à la pyruvate carboxylase (O’Leary, 1982). La double délétion *Δpyc1 Δpyc2* chez *S. cerevisiae* peut être complétée par expression de la PEP carboxylase d’*E. coli* (Flores and Gancedo, 1997).

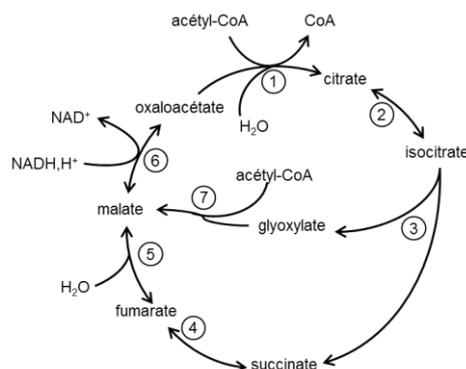
L’enzyme malique catalyse la carboxylation du pyruvate en malate (Kornberg, 1965). Chez *Saccharomyces cerevisiae* l’enzyme malique est localisée dans la mitochondrie: elle est exprimée de façon constitutive et son expression est augmentée en conditions anaérobies (Boles *et al.*, 1998). Elle peut utiliser du  $\text{NAD}^+$  ou du  $\text{NADP}^+$  comme cofacteurs pour la réaction de carboxylation (Boles *et al.*, 1998).

### 1.3. Autres utilisations du carbone inorganique dans le métabolisme

#### 1.3.1. Assimilation de substrats en C2 et C3

Les substrats tels que l’acétate, les acides gras à nombre de carbone pair, les alcanes, alcènes, alcools, esters, cires et le polyhydroxybutyrate (PHA) peuvent être convertis en acétyl-CoA (Alber *et al.*, 2006; Erb, 2011). Chez les organismes anaérobies, l’acétyl-CoA est reconverti en pyruvate par la PFOR, ce qui est impossible chez les organismes aérobies ou microaérobies du fait de la haute sensibilité à l’oxygène de la PFOR. L’acétyl-CoA doit donc être reconverti en intermédiaires métaboliques via des réactions anaplerotiques.

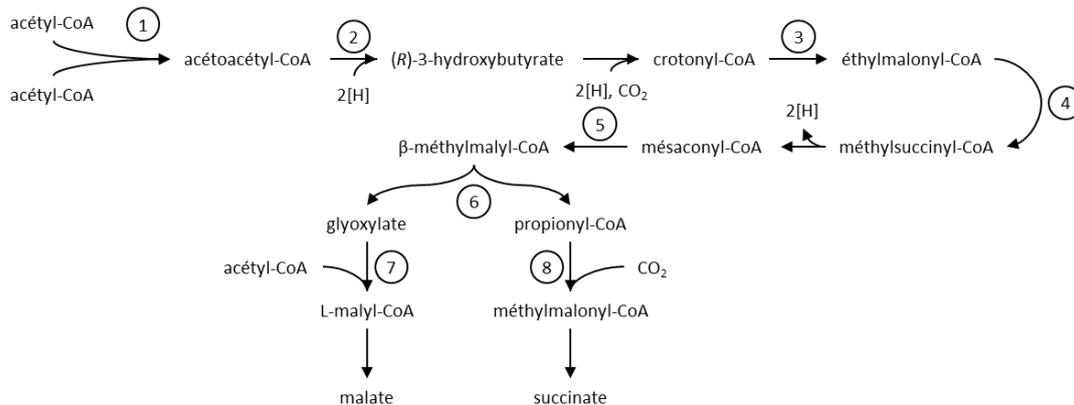
Les plantes, les invertébrés, les champignons et certaines bactéries utilisent le cycle du glyoxylate (Figure 8), une séquence de réactions anaplerotiques qui permettent à un substrat en C<sub>2</sub> de rentrer dans le cycle de Krebs au niveau de l’acétyl-CoA ; il en résulte une production d’isocitrate qui est clivé en succinate et glyoxylate par une enzyme spécifique de ce cycle, l’isocitrate lyase. Le glyoxylate obtenu est ensuite condensé avec une molécule d’acétyl-CoA pour former du malate (Kornberg and Krebs, 1957). Il n’y a pas de fixation de CO<sub>2</sub> dans ce cycle, mais les réactions de décarboxylation du cycle de Krebs sont contournées.



**Figure 8.** Cycle du glyoxylate.

Enzymes : 1, citrate synthase ; 2, aconitase, 3, isocitrate lyase ; 4, succinate déshydrogénase ; 5, fumarase ; 6, malate déshydrogénase ; 7, malate synthase.

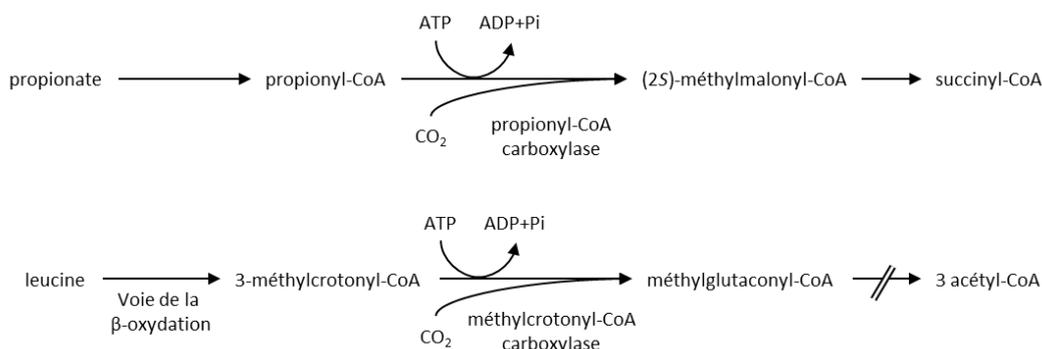
Certains microorganismes tels que *Methylobacterium extorquens*, *Rhodobacter sphaeroides* et *Rhodospirillum rubrum* assimilent les composés en C<sub>2</sub> par la voie de l'éthylmalonyl-CoA qui comprend deux étapes de carboxylation (Figure 9) (Erb *et al.*, 2007). Cette voie permet la formation d'une molécule de malate et d'une molécule de succinate à partir de trois molécules d'acétyl-CoA et de deux molécules de CO<sub>2</sub>; elle inclut donc une réelle co-fixation de carbone inorganique, dont la part peut atteindre 33% (Erb, 2011).



**Figure 9.** Voie métabolique de l'éthylmalonyl-CoA (d'après Erb *et al.*, 2007).

Enzymes numérotées : 1, β-cétothiolase ; 2, acétoacétyl-CoA réductase ; 3, crotonyl-CoA carboxylase/réductase ; 4, éthylmalonyl-CoA mutase ; 5, mésoaconyl-CoA hydratase ; 6, β-malyl-CoA/L-malyl-CoA lyase ; 7, β-malyl-CoA/L-malyl-CoA lyase ; 8, propionyl-CoA carboxylase.

L'assimilation d'unités C<sub>3</sub> issues de l'oxydation des acides gras, alcanes, alcènes, alcools et cires à nombre de carbone impair, et des acides aminés tels que la valine ou l'isoleucine est impossible par la voie classique de la β-oxydation des acides gras. Cependant, le propionate et les composés en C<sub>3</sub> qui lui sont semblables peuvent être métabolisés grâce à la propionyl-CoA carboxylase biotine-dépendante (Wood and Barden, 1977) (Figure 10). Dans le cas du propionate, cette carboxylation mène à la formation de succinyl-CoA qui rejoint le cycle de Krebs. Le bilan final de l'assimilation est la formation d'une molécule de succinyl-CoA à partir du propionate et de CO<sub>2</sub> (Erb, 2011). La leucine ne peut pas non plus être métabolisée via la voie de β-oxydation des acides gras du fait de la présence d'un groupement méthyl: sa métabolisation est prise en charge par la 3-méthylcrotonyl-CoA carboxylase biotine-dépendante (Wood and Barden, 1977) formant trois acétyl-CoA à partir de la leucine et d'une molécule de CO<sub>2</sub> (Figure 10). Les carboxylations impliquées dans la métabolisation du propionate et de la leucine mènent à une co-fixation de CO<sub>2</sub> théorique de 25% et 17% respectivement (Erb, 2011).



**Figure 10.** Métabolisation du propionate et de la leucine.

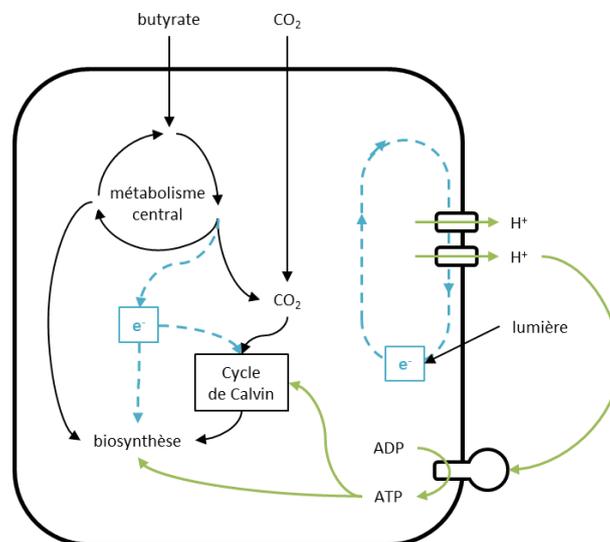
### 1.3.2. Carboxylations impliquées dans la méthylothrophie

Les méthylotrophes sont des microorganismes hétérotrophes capables de croître sur des substrats à un ou à plusieurs atomes de carbone mais ne contenant aucune liaison carbone-carbone. Les méthylotrophes obligatoires ne peuvent croître que sur des substrats en C<sub>1</sub> (méthane, méthanol, méthylamine, formaldéhyde, etc.) tandis que les méthylotrophes facultatifs peuvent croître sur des substrats multicarbonés (diméthyléther diméthylamine, triméthylamine, triméthylammonium, etc.). Parmi ces méthylotrophes, certains sont incapables de pousser sur méthane du fait de l'absence de la méthane mono-oxygénase (revu par Anthony, 1982). Certains méthylotrophes oxydent les substrats à un atome de carbone en CO<sub>2</sub>, qu'ils sont capables de fixer en utilisant le cycle de Calvin et de la lumière ou l'oxydation de l'hydrogène (revu par Anthony, 1982). Il existe également un cycle du ribulose monophosphate, qui permet l'assimilation du carbone du formaldéhyde et aboutit à la formation de composés en C<sub>3</sub>(revu par Anthony, 1982). Enfin, certains méthylotrophes utilisent le cycle de la sérine pour assimiler le formaldéhyde (revu Chistoserdova *et al.*, 2009).

### 1.3.3. Autres fonctions des carboxylases

Les voies de biosynthèse peuvent faire appel à des réactions de carboxylation pour la synthèse des acides gras et des polycétides, qui utilisent des esters d'acyl-CoA activés pour former des chaînes carbonées (Rock and Jackowski, 2002).

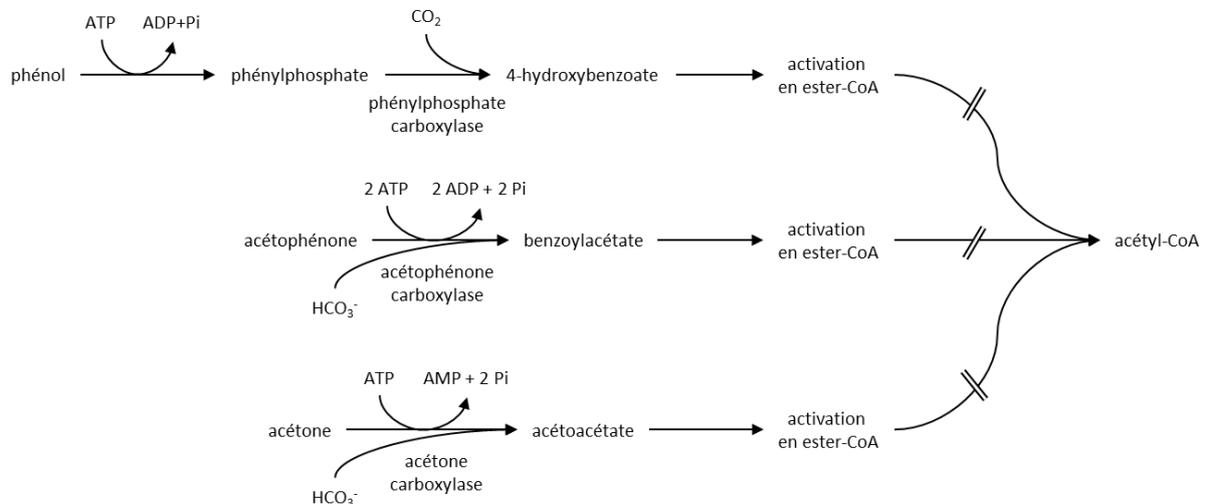
La carboxylation joue également un rôle dans la régulation de la balance redox cellulaire chez les bactéries pourpres non sulfureuses en condition de croissance photohétérotrophe anaérobie (Figure 11)(McKinlay and Harwood, 2010). Chez *Rhodobacter sphaeroides* notamment, la croissance sur butyrate, fumarate, succinate ou malate dépend de l'assimilation de CO<sub>2</sub> par les deux formes de RubisCO présentes chez le microorganisme (Hallenbeck *et al.*, 1990; Laguna *et al.*, 2011). Le butyrate étant un substrat plus réduit que le carbone cellulaire, une addition externe de CO<sub>2</sub> est même requise pour la croissance cellulaire. Le CO<sub>2</sub> joue ici un rôle de siphon à électrons et non de source de carbone, ce qui est confirmé par le fait que le remplacement de CO<sub>2</sub> par d'autres accepteurs d'électrons (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, DMSO, triméthylamine) n'entrave pas la croissance (Erb, 2011; McKinlay and Harwood, 2010).



**Figure 11.** Stratégie de régulation de la balance d'oxydoréduction chez les bactéries pourpres non sulfureuses en croissance sur butyrate.

Flèches noires: métabolisme du carbone; flèches vertes: métabolisme énergétique; flèches bleues en pointillés: métabolisme des électrons (d'après McKinlay and Harwood, 2010).

Les carboxylases jouent par ailleurs un rôle important dans les réactions d'assimilation de substrats inertes (phénol, acétophénone, acétone) par les microorganismes en permettant leur métabolisation par fonctionnalisation en conditions anaérobies (Erb, 2011).



**Figure 12.** Réactions de carboxylation pour l'assimilation de substrats inertes (d'après Erbet *et al.*, 2011). Après l'étape de carboxylation, les composés sont activés en esters d'acyl-CoA puis métabolisés, par exemple par la voie de la  $\beta$ -oxydation.

## 2. Application de réactions de fixation du carbone pour la production de molécules d'intérêt

### 2.1. Contexte

Jusqu'à récemment, l'utilisation de ressources fossiles sous forme de pétrole, de charbon et de gaz constituait un procédé majeur de production pour produire des composés organiques d'intérêt. Les fluctuations du prix du pétrole et la volonté de réduire l'utilisation de ces énergies fossiles et les émissions de gaz à effet de serre associées ont amorcé un changement: il existe à présent un marché pour la production industrielle de produits biosourcés (Patel *et al.*, 2006; Werpy and Petersen, 2004). Dans ce contexte, la fixation de carbone inorganique présente un intérêt économique, en augmentant les rendements massiques de production des molécules d'intérêt de façon proportionnelle à la représentation du carbone d'origine inorganique dans la molécule finale. Par ailleurs, d'un point de vue environnemental, la fixation de carbone inorganique permet de réduire les émissions de gaz à effet de serre.

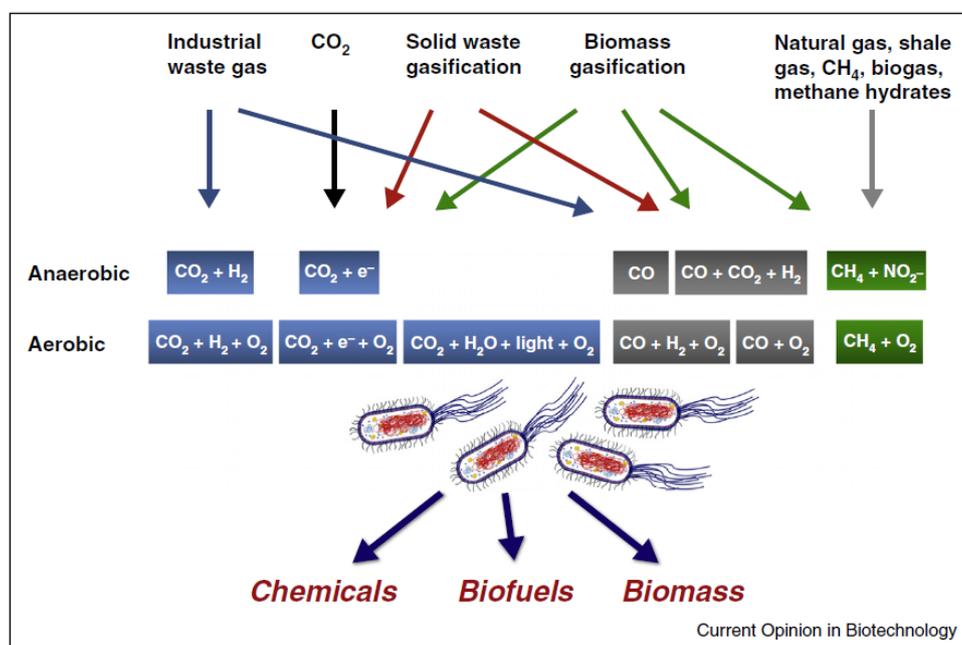
Nous allons décrire brièvement l'utilisation d'organismes autotrophes pour la production de molécules d'intérêt avec fixation de carbone inorganique; l'étude détaillée portera sur l'utilisation de microorganismes hétérotrophes pour la production de molécules d'intérêt avec fixation de carbone inorganique.

## 2.2. Fixation de carbone par des organismes autotrophes

En matière de fixation de carbone, les organismes photosynthétiques, notamment les microalgues eucaryotes et procaryotes (cyanobactéries), sont étudiées pour la production de molécules d'intérêt (acides gras, pigments, principes actifs) pour des applications cosmétiques, pharmaceutiques et agroalimentaires, pour le traitement des eaux, pour la séquestration de CO<sub>2</sub> et comme biomasse pour la production d'éthanol de troisième génération (revu par Mata *et al.*, 2010).

Depuis plusieurs dizaines d'années, les plantes, les algues et les cyanobactéries font l'objet de recherches pour améliorer leur capacité de fixation du carbone de plusieurs façons différentes, notamment en ce qui concerne l'optimisation de la vitesse de catalyse et de l'activation de la RubisCO, l'amélioration de la phase de régénération du cycle de Calvin et l'enrichissement de l'environnement de la RubisCO en CO<sub>2</sub> (revu par Rosgaard *et al.*, 2012). L'ingénierie portant sur la RubisCO elle-même s'est révélée assez complexe, puisque l'amélioration de la vitesse de catalyse s'accompagne de pertes par photorespiration. Cependant, il existe d'autres pistes d'amélioration: la résistance à la chaleur de la RubisCO activase, qui est thermolabile, peut être augmentée; l'absorption de la lumière par les pigments photocollecteurs comme la chlorophylle peut aussi être optimisée, puisqu'une absorption trop importante de lumière peut avoir des effets néfastes, comme la dissipation d'énergie excédentaire sous forme de chaleur, de fluorescence, ou d'émissions d'espèces radicalaires (revu par Ducat and Silver, 2012).

Les organismes photosynthétiques ne sont pas les seuls organismes autotrophes qui peuvent être utilisés pour produire des composés d'intérêt: l'utilisation de microorganismes capables de consommer des déchets gazéifiés pour produire des molécules d'intérêt ou de la biomasse (Figure 13) est également en pleine expansion. Ces microorganismes sont capables de croître sur des substrats à un atome de carbone tels que le monoxyde de carbone, le dioxyde de carbone et le méthane, ainsi que sur des substrats issus de l'industrie (gaz de raffineries, de charbon ou gaz naturel) et des substrats synthétiques, les syngas, produits par les déchets agricoles ou ménagers (revu par Dürre and Eikmanns, 2015).



**Figure 13.** Voies de fermentation de gaz aérobies et anaérobies (d'après Dürre and Eiksmann, 2015).

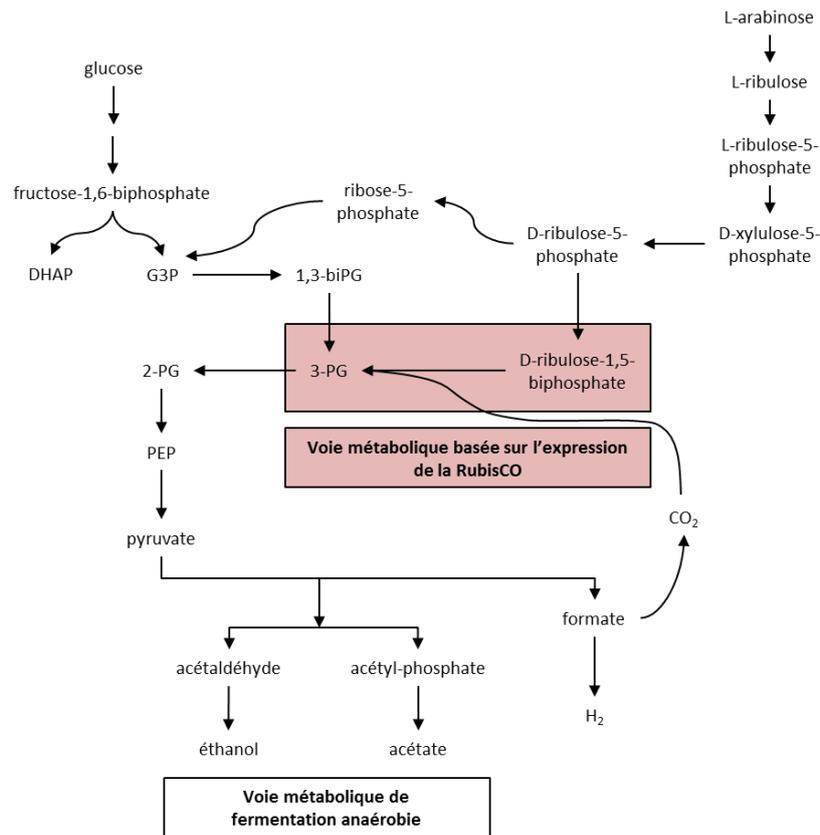
Ce schéma inclut les réactions d'électrosynthèse microbienne.

Les syngas peuvent être produits à partir de ressources fossiles ou de sources de carbone renouvelable; ils contiennent majoritairement du monoxyde de carbone et du dihydrogène (Henstra *et al.*, 2007). Les microorganismes capables de métaboliser des syngas sont très divers: ils peuvent être trouvés dans le sol, les sédiments marins, les fèces; ils présentent des morphologies variées, des optima thermiques différents, et leur sensibilité à l'oxygène est également variable (revu par Latif *et al.*, 2014). Le panel des molécules qu'ils sont susceptibles de produire est également assez large: acétate, éthanol, butanol, butyrate, formate, H<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S, méthane. La plupart des microorganismes métabolisant les syngas sont des acétogènes, qui fixent le CO<sub>2</sub> par la voie de Wood-Ljungdahl: *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium autoethanogenum*, *Acetobacterium woodii*, *Clostridium carboxydivorans* et *Peptostreptococcus productus* (revu par Munasinghe and Khanal, 2010); ils sont notamment utilisés pour produire des biocarburants.

## **2.3. Utilisation de la fixation de carbone par le cycle de Calvin et la RubisCO chez des microorganismes hétérotrophes**

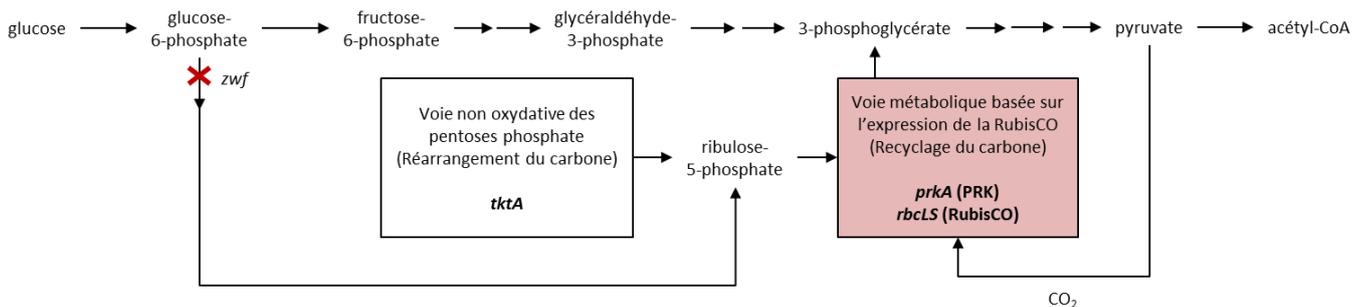
### **2.3.1. Chez *Escherichia coli***

L'utilisation de la RubisCO et du cycle de Calvin pour la fixation de carbone inorganique chez des organismes hétérotrophes fait l'objet de travaux de recherche récemment publiés. Chez *Escherichia coli*, l'expression individuelle ou simultanée d'une RubisCO et d'une phosphoribulokinase (PRK) a été testée en croissance sur arabinose (Zhuang and Li, 2013) (Figure 14). Les gènes utilisés codant pour la petite et la grande sous-unité de la RubisCO ainsi que pour la PRK proviennent de *Synechococcus* PCC6301, et ont été mutés puis sélectionnés pour améliorer les activités spécifiques des enzymes chez *E. coli* (Parikh *et al.*, 2006). La co-expression des deux enzymes a permis de réduire de 15% les émissions de CO<sub>2</sub>, soit une fixation de 67 mg de CO<sub>2</sub> par mole d'arabinose, par litre et par heure, ce qui est comparable avec les valeurs relevées chez les cyanobactéries et les microalgues. L'expression de la RubisCO permet d'augmenter la croissance bactérienne et la vitesse de consommation de l'arabinose d'un facteur 2 environ.



**Figure 14.** Schéma simplifié de la place de la voie métabolique basée sur l'expression de la RubisCO par rapport au métabolisme central (d'après Zhuang and Li, 2013).

Dans la continuité de ce travail, deux possibilités d'amélioration de la souche d'*E. coli* exprimant la RubisCO et la PRK en croissance sur glucose ont été testées (Li *et al.*, 2015): la surexpression de la transkétoylase (TKTA) qui permet d'augmenter l'activité de la voie non oxydative des pentoses phosphate, qui recycle le CO<sub>2</sub>; la délétion du gène *zwf*, qui permet de bloquer l'entrée dans la voie oxydative des pentoses phosphate (Figure 15). Le rendement de production de CO<sub>2</sub> par mole de substrat consommé montre que la souche exprimant la RubisCO, la PRK et la TKTA est au même niveau que la souche ne possédant que la délétion de *zwf*, avec une diminution de 50% de la production de CO<sub>2</sub> par rapport à la souche sauvage. La production de CO<sub>2</sub> de la souche exprimant la RubisCO et la PRK et possédant la délétion de *zwf* était en dessous de la limite de détection de l'analyseur infrarouge, montrant une diminution encore plus importante de la production de CO<sub>2</sub>. La production de CO<sub>2</sub> rapportée à la production d'une mole d'éthanol a été réduite d'au moins 40%.



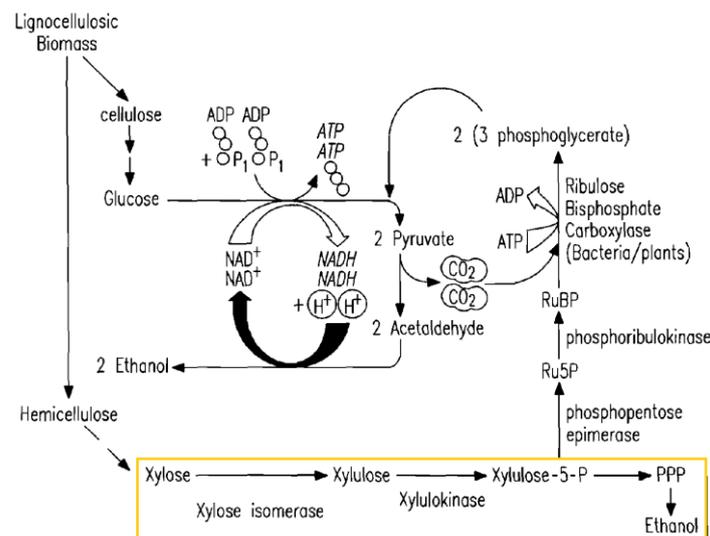
**Figure 15.** Schéma simplifié des améliorations proposées pour la souche exprimant la voie métabolique de la RubisCO (d'après Li *et al.*, 2015).

*zwf*: gène dont l'expression est impliquée dans l'entrée du flux de carbone dans la voie oxydative des pentoses phosphate; *tktA*: transkétole impliquée dans la voie non oxydative des pentoses phosphate; PRK: phosphoribulokinase.

Un travail récent impliquant une souche d'*E. coli* exprimant la RubisCO et la PRK de *Synechococcus* PCC6301, éventuellement avec une anhydrase carbonique, a porté sur le développement d'une méthode pour évaluer le flux de CO<sub>2</sub> fixé par la voie mise en place par rapport aux voies métaboliques centrales (Gong *et al.*, 2015). Les mesures ont été réalisées par LC-MS/MS en ajoutant du carbonate de sodium marqué au carbone 13 dans le milieu. Les résultats montrent que dans la souche exprimant la RubisCO et la PRK, le flux de CO<sub>2</sub> passant par cette voie représente 13% de celui du métabolisme central; en ajoutant l'anhydrase carbonique, cette valeur est augmentée à 17%. Cette dernière souche, surexprimant la RubisCO, la PRK et l'anhydrase carbonique, est capable de fixer 19,6 mg de CO<sub>2</sub> par litre et par heure, ce qui est comparable avec les vitesses de fixation obtenues chez des cyanobactéries et des microalgues, comme ce qui a été développé dans les travaux de Zhuang et Li.

### 2.3.2. Chez *Saccharomyces cerevisiae*

Une stratégie portant sur l'expression d'une RubisCO et d'une phosphoribulokinase (PRK) chez *S. cerevisiae* a fait l'objet d'un dépôt de brevet (Dai *et al.*, 2008). La RubisCO permet la réoxydation du NADH produit en excès et la co-fixation de CO<sub>2</sub> dans le cadre d'une production d'éthanol de deuxième génération à partir de biomasse lignocellulosique (Figure 16).



**Figure 16.** Expression d'une RubisCO dans une souche *S. cerevisiae* capable de métaboliser le xylose pour la production d'éthanol 2G (d'après Dai *et al.*, 2008).

Les réactions dans l'encadré correspondent aux réactions de métabolisation du xylose (produit à partir de l'hémicellulose) catalysées par des enzymes hétérologues.

Dans le brevet est mentionnée une amélioration du titre d'éthanol de 2 à 25% sur glucose et de 3 à 20% sur xylose chez les souches modifiées par rapport à la souche contrôle après 12 heures de fermentation. Cependant, les rendements ne sont pas indiqués et sont impossibles à calculer car les quantités de substrat consommées ne sont pas mentionnées. La production de glycérol, qui devrait être abaissée dans la souche exprimant la RubisCO, n'est pas donnée. Les résultats fournis semblent trop incomplets pour pouvoir estimer clairement l'influence de l'expression de la RubisCO et de la PRK sur la production d'éthanol.

Une stratégie de mise en place d'un métabolisme autotrophe chez *Saccharomyces cerevisiae* est également actuellement en développement et a déjà fait l'objet d'un dépôt de brevet (Pompon *et al.*, 2015). Cette approche repose sur l'expression en proportions stoechiométriques de la petite et la grande sous-unité d'une RubisCO bactérienne de forme I, d'une PRK, ainsi que de chaperonnes d'origines mixtes: RbcX d'une cyanobactérie et GroEL et GroES d'*E. coli*. Les gènes sont clonés sur un même vecteur d'expression et la PRK est placée sous le contrôle d'un promoteur inductible, tandis que les autres gènes sont sous le contrôle d'un promoteur constitutif.

La capacité de la souche à fixer CO<sub>2</sub> a été testée en présence de formate, puisque l'équipe a constaté que le transport de CO<sub>2</sub> de l'extérieur vers l'intérieur de la levure n'était pas optimal. L'utilisation de formate permet la formation de CO<sub>2</sub> intracellulaire par action de la formate déshydrogénase, qui oxyde le formate en CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>. Les essais d'incorporation de formiate marqué au carbone 13 n'avaient pas pu être exploités du fait d'un bruit de fond trop important probablement causé par les réactions anaplérotiques. Les résultats présentés dans le brevet apportent cependant une preuve de concept puisque la croissance sur milieu contenant du formate est améliorée chez les levures exprimant les gènes hétérologues (RubisCO+PRK+chaperonnes) par rapport à la souche sauvage. Chez ces souches modifiées, la consommation du formate est complète, ce qui n'est pas le cas chez la souche sauvage. Les perspectives évoquées dans le brevet pour continuer la construction de la souche incluent l'expression d'un transporteur de CO<sub>2</sub> (aquaporines de *Synechococcus elongatus* par exemple), ainsi que des étapes d'ingénierie supplémentaires pour permettre l'apport de pouvoir réducteur.

## **2.4. Fixation de carbone par les réactions anaplérotiques pour la production d'acides 1,4-dicarboxyliques**

Les réactions anaplérotiques présentent un grand intérêt en biotechnologie industrielle car elles permettent notamment de produire des acides dicarboxyliques, qui sont des molécules plateformes utilisables par les industries pharmaceutique, chimique et agro-alimentaire, *via* des réactions capables de fixer du carbone inorganique (dioxyde de carbone ou hydrogénocarbonate selon les enzymes). L'acide succinique est un bon exemple puisqu'il est à présent produit à l'échelle commerciale par voie biotechnologique.

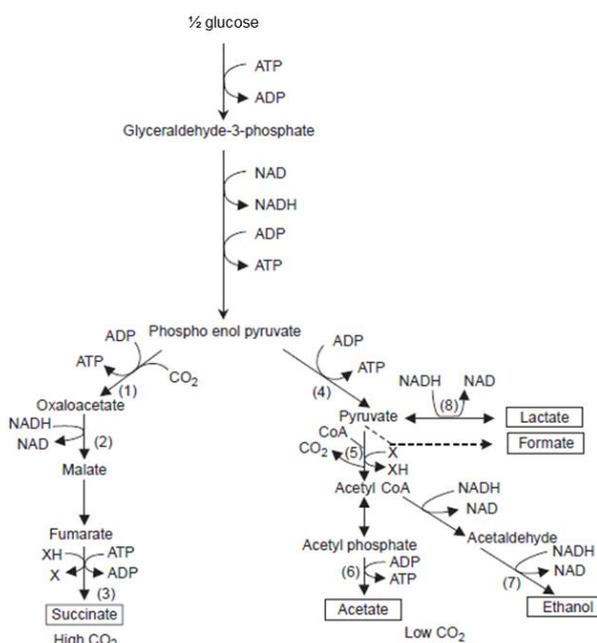
### **2.4.1. La production d'acide succinique: un cas d'école**

L'acide succinique fait l'objet de recherches intensives depuis une vingtaine d'années et compte quatre marchés d'application: il peut être utilisé comme surfactant et détergent, comme chélateur d'ions pour protéger les métaux de la corrosion, comme acidifiant, exhausteur de goût et conservateur dans l'industrie agro-alimentaire et comme synthon pour l'industrie pharmaceutique (Zeikus *et al.*, 1999). Il possède également des applications dans la fabrication de polymères comme le poly(butylène succinate), issu de la conversion de l'acide succinique en 1,4-butanediol et de sa condensation, et le poly(1,3-propylène succinate), issu de la polycondensation de l'acide succinique avec le 1,3-propanediol (revu par Cheng *et al.*, 2012). Les recherches sur sa production par voie biotechnologique menées durant les deux dernières décennies ont permis d'arriver à la production commerciale d'acide succinique biosourcé dans des pilotes de démonstration par des entreprises telles que BioAmber, Reverdia (Roquette et DSM), Myriant, MBI International, Purac, BASF, Mitsubishi Chemicals et PTT (revu par Cheng *et al.*, 2012 et Yuzbashev *et al.*, 2011) et de développer des procédés à l'échelle industrielle. Le cheminement des travaux de recherche qui ont permis d'atteindre ce but peut donc servir d'exemple pour la production d'autres acides organiques ou molécules d'intérêt par biotechnologie.

### 2.4.1.1. Voies métaboliques de production et producteurs naturels

Il existe trois voies de formation d'acide succinique: la branche réductrice du cycle des acides tricarboxyliques, la branche oxydante de ce même cycle et le cycle du glyoxylate (revu par Chenget *al.*, 2012). Le rendement maximal théorique est de 2 moles de succinate par mole de glucose consommée, soit un rendement massique de 131% du fait de la fixation d'une mole de CO<sub>2</sub> par mole de succinate produite.

De nombreuses espèces de microorganismes produisent naturellement de l'acide succinique, par exemple les bactéries *Anaerobiospirillum succiniproducens* (Glassner and Datta, 1992) et *Actinobacillus succinogenes* (Guettler *et al.*, 1996), qui sont actuellement utilisées à l'échelle commerciale pour produire de l'acide succinique (Patel *et al.*, 2006). Pour *A. succinogenes* les titres de succinate peuvent atteindre 110 g/L pour un rendement de 1,4 mole par mole de glucose consommée, soit un rendement massique de 92% (Guettler *et al.*, 1996). Le succinate est produit par une voie fermentaire qui implique la PEP-carboxykinase, la malate déshydrogénase, la fumarase et la fumarate déshydrogénase (Zeikus *et al.*, 1999) et qui est régulée par le taux de CO<sub>2</sub> (Figure 17) (Samuelovet *al.*, 1991). Bien que ces souches aient été optimisées de sorte à pouvoir produire du succinate à partir de pentoses et d'hexoses, les méthodes conventionnelles d'amélioration de souches semblent avoir atteint leurs limites et le manque d'outils génétiques permettant l'amélioration de ces souches restreint leur optimisation (Patel *et al.*, 2006).



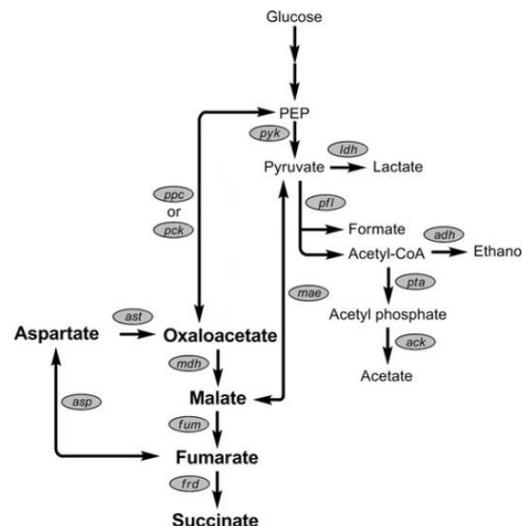
**Figure 17.** Voies métaboliques pour la production d'acide succinique chez *A. succiniproducens*.

1: PEP carboxykinase; 2: malate déshydrogénase; 3: fumarate réductase; 4: pyruvate kinase; 5: pyruvate:ferrédoxine oxidoréductase; 6: acétate kinase; 7: alcool déshydrogénase; 8: lactate déshydrogénase (Samuelovet *al.*, 1991).

Plus récemment, la bactérie *Corynebacterium glutamicum* a été identifiée comme candidat potentiel pour la production de succinate lors d'expériences en batch en anaérobiose, avec un rendement de 0,44 mole d'acide succinique produit par mole de glucose consommée en présence de 400 mM de

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(Okino *et al.*, 2005). *C. glutamicum* étant déjà très utilisé pour la production d'acides aminés, des améliorations par ingénierie métabolique ont été entreprises et seront détaillées en 2.4.1.2.1.

Chez *Escherichia coli*, le succinate peut potentiellement être formé par six voies métaboliques différentes (Zeikus *et al.*, 1999). En conditions aérobies, le succinate est formé dans le cycle de Krebs et converti en fumarate: il n'y a pas d'accumulation possible, à moins d'inactiver le gène de la succinate déshydrogénase (Kanget *et al.*, 2010). En anaérobie, l'accumulation d'intermédiaires du cycle de Krebs est favorisée, mais leur formation à partir du PEP et du pyruvate dépend de plusieurs routes métaboliques, et les produits majoritaires sont l'acétate, l'éthanol, le lactate et le formate, et en moindres quantités le succinate (Cao *et al.*, 2010). En effet, le PEP peut servir de substrat à la pyruvate kinase ou à la PEP carboxylase, pour former respectivement du pyruvate ou de l'oxaloacétate. Le pyruvate peut alors servir à la formation de lactate, acétyl CoA ou malate selon qu'il sert de substrat à la lactate déshydrogénase, la pyruvate formate lyase ou à l'enzyme malique (Figure 18). Cependant, *E. coli* dispose d'outils génétiques très développés, d'une croissance rapide et de milieux de culture économiques, ce qui en a fait un hôte très utilisé pour la construction de souches recombinantes pour la production d'acide succinique.



**Figure 18.** Devenir du pyruvate et voies de synthèse natives des acides dicarboxyliques en anaérobie chez *E. coli*.

Les enzymes encodées par les gènes dont les noms sont indiqués sont les suivantes : *pyk* : pyruvate kinase ; *ppc* : PEP-carboxylase ; *pck* : PEP-carboxykinase ; *ast* : aspartate aminotransférase ; *asp* : aspartase ; *mdh* : malate déshydrogénase ; *fum* : fumarase ; *frd* : fumarate réductase ; *mae* : enzyme malique ; *ldh* : lactate déshydrogénase ; *pfl* : pyruvate-formate lyase ; *adh* : acétaldéhyde déshydrogénase ; *pta* : phosphotransacétylase ; *ack* : acétate kinase (Cao *et al.*, 2010).

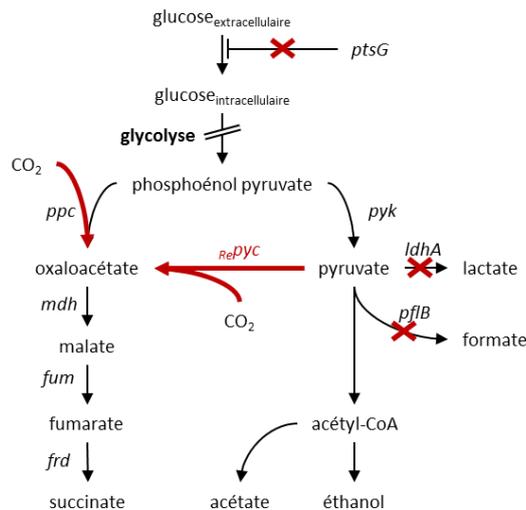
## 2.4.1.2. Modification génétique de microorganismes pour la production d'acide succinique

### 2.4.1.2.1. Hôtes procaryotes

Les stratégies d'ingénierie métabolique utilisées pour l'amélioration de la production de succinate ont dans un premier temps été développées dans des modèles bactériens, notamment chez *Escherichia coli*. Elles concernent plusieurs aspects: le transport du substrat dans la cellule, l'amélioration des voies menant à la production de succinate et la délétion de voies menant à la production de co-produits.

Une première étape d'ingénierie métabolique a consisté en la surexpression de la PEP carboxylase native, ce qui a augmenté la production d'acide succinique de 3,26 g/L à 3,44 g/L (Millardet *et al.*, 1996). L'expression d'une pyruvate carboxylase de *Rhizobium etli* a également permis d'obtenir une meilleure production de succinate, avec un titre augmenté de 150%, passant de 1,18 g/L à 1,77 g/L (Gokarnet *et al.*, 1998).

Une amélioration importante de la production de succinate par *E. coli* est due à l'identification d'une mutation du gène *ptsG*, qui code pour une perméase glucose spécifique membranaire (Chatterjee *et al.*, 2001). Cette mutation spontanée a été identifiée dans une souche d'*E. coli*  $\Delta pfl \Delta ldh$  incapable de croître sur glucose en anaérobiose. La mutation, qui modifie le produit du gène *ptsG* et lève l'inhibition normalement exercée par le glucose sur la perméase, a restauré la capacité de fermentation des cellules (Figure 19). La souche ainsi obtenue produit une mole de succinate par mole de glucose consommée, avec comme co-produits 0,5 moles d'éthanol et 0,5 moles d'acétate. Le même phénotype est obtenu par délétion de *ptsG* dans la souche  $\Delta pfl \Delta ldh$ . La délétion de *ptsG* dans une souche non  $\Delta pfl \Delta ldh$  a également conduit à une augmentation de la production de succinate.



**Figure 19.** Modifications des voies métaboliques d'*E. coli* pour améliorer le rendement de production de succinate sur glucose.

Dans un premier temps, trois délétions ont permis d'augmenter la production de succinate (Chatterjee *et al.*, 2001). L'introduction de la pyruvate carboxylase de *R. etli* a également permis d'améliorer les rendements (Vemuri *et al.*, 2002). Gènes : *ptsG*, système phosphotransférase ; *ldhA*, lactate déshydrogénase ; *pflB*, pyruvate-formate lyase ; *pyc*, pyruvate carboxylase.

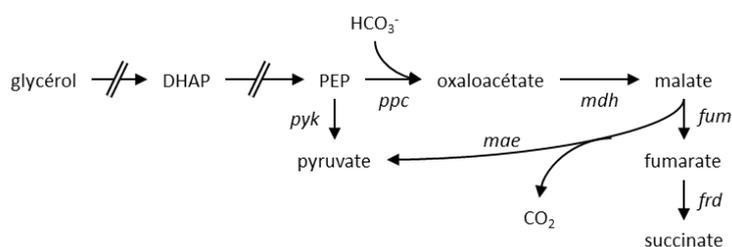
Une approche mettant en jeu le génie des procédés consiste à découpler la phase de croissance aérobie et de la phase de production anaérobie: cela permet d'optimiser la production de biomasse pendant la première phase et d'obtenir avec une souche *E. coli*  $\Delta ldh \Delta pfl \Delta ptsG$  exprimant la pyruvate carboxylase de *Rhizobium etli* (Figure 19), une concentration finale en succinate de 99,2 g/L pour un rendement massique de 110% (soit environ 1,6 mole/mole) (Vemuri *et al.*, 2002).

Par ailleurs, le pouvoir réducteur de la cellule s'est révélé être limitant. La balance rédox a donc été optimisée en activant le cycle du glyoxylate en conditions anaérobies. En effet, le cycle du glyoxylate produit, à partir d'1 mole d'oxaloacétate et 2 moles d'acétyl-CoA, 1 mole de succinate et 1 mole de malate ; ce dernier peut lui-même être converti en succinate, ce qui permet de diminuer le NADH consommé à 1,25 mole par mole de succinate produit, contre 2 moles de NADH pour la voie fermentaire classique. L'inactivation du gène *iclR*, qui a permis l'activation du cycle du glyoxylate en

conditions anaérobies, a conduit à une augmentation du rendement de production à 1,6 mole par mole de glucose (Sánchez *et al.*, 2005).

Des stratégies reposant uniquement sur des délétions de gènes ont également été testées. Une première approche est basée sur l'utilisation d'une souche *E. coli*  $\Delta aldA \Delta adhE \Delta ackA \Delta focA \Delta pflB \Delta mgsA \Delta poxB$  qui a été améliorée par évolution dirigée sur plus de 2000 générations pour optimiser la production d'ATP. Il s'est avéré que la production d'ATP en anaérobie était obligatoirement dépendante de la malate déshydrogénase et de la fumarate réductase, conduisant à la sélection de souches produisant à la fois du succinate et du malate. La souche ainsi obtenue a permis d'atteindre un titre de 98 g/L de succinate pour un rendement de 1,6 mole par mole de glucose, mais la présence de co-produits tels que le malate, l'acétate et le pyruvate reste dommageable (Jantama *et al.*, 2008a). Cette souche a donc été utilisée pour procéder à de nouvelles délétions portant sur les gènes *tdcD* et *tdcE*, codant respectivement pour un homologue de l'acétate kinase et un homologue de la pyruvate formate lyase, conduisant à un rendement de 1,3 mole par mole de glucose et une réduction de 50% de l'acétate produit. La délétion de deux gènes impliqués dans le métabolisme de l'oxaloacétate a finalement permis d'obtenir une souche produisant 93,8 g/L de succinate pour un rendement de 1,5 mole par mole de glucose (Jantama *et al.*, 2008b).

Plus récemment, une souche *E. coli*  $\Delta pykA \Delta pykF$  a été développée pour la production de succinate à partir de glycérol, substrat pour lequel le rendement théorique maximal de production de succinate est de 1 mole par mole de glycérol consommée. Les gènes des deux isoformes de la pyruvate kinase ont été délétés de sorte à favoriser la voie métabolique de production du succinate à partir du glycérol sans que le PEP ne soit transformé en pyruvate (Figure 20). Les souches obtenues présentaient une mauvaise croissance sur glycérol, mais la sélection de clones à croissance rapide a permis de mettre en évidence une mutation de la PEP carboxylase indispensable à la croissance sur glycérol en contexte  $\Delta pykA \Delta pykF$ . La mutation sélectionnée augmente l'activité de la PEP carboxylase et permet d'augmenter le flux de carbone transformé en oxaloacétate, qui permet à la fois la formation de succinate et de pyruvate, indispensable au fonctionnement cellulaire. Le flux de pyruvate produit n'entrave cependant pas la production de succinate puisque des essais ont permis d'obtenir des rendements allant jusqu'à 0,9 mole de succinate par mole de glycérol et des titres d'environ 6 g/L (Soellner *et al.*, 2013).



**Figure 20.** Voie métabolique simplifiée de production du succinate à partir de glycérol chez *E. coli* (d'après Soellner *et al.*, 2013).

PPC: PEP carboxylase; PYK: pyruvate kinase; MDH: malate déshydrogénase; FUM: fumarase; FRD: fumarate réductase; MAE: enzyme malique.

Des travaux ont également été effectués pour permettre la production de succinate par *Corynebacterium glutamicum* qui a récemment été identifié comme un producteur naturel de succinate (Okino *et al.*, 2005). La délétion de la lactate déshydrogénase et la surexpression de la pyruvate carboxylase ont permis d'atteindre un rendement de 1,4 mole de succinate par mole de glucose, avec production d'acétate comme co-produit, à raison de 0,29 mole par mole de glucose (Okino *et al.*, 2008).

Une production importante de succinate en anaérobiose a été obtenue avec une souche de *C. glutamicum* comportant les modifications suivantes: délétions des quatre gènes de biosynthèse de l'acétate; surexpression des gènes de la glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase, de la pyruvate carboxylase et de la formate déshydrogénase de *Mycobacterium vaccae* (ce dernier gène permettant un rééquilibrage de la balance rédox de la cellule). La souche montre un titre de 133 g/L de succinate, pour un rendement de 1,67 mole de succinate par mole de glucose, avec un rendement de production de co-produits de 0,10 mole par mole de glucose consommée (Litsanov *et al.*, 2012).

#### 2.4.1.2.2. Levures et champignons filamenteux

La levure *Yarrowia lipolytica* a été utilisée comme hôte pour produire de l'acide succinique à pH bas. Dans un premier temps, des mutants thermosensibles possédant un changement d'acide aminé dans l'une des sous-unités de l'isoforme 1 de la succinate déshydrogénase ont été générés. Une délétion de *sdh2*, la deuxième isoforme, a été effectuée chez les mutants sélectionnés. Les mutants ainsi obtenus se sont révélés incapables de croître sur glucose, mais ont permis d'obtenir en croissance en fioles sur glycérol des titres de succinate de 45 g/L en présence de CaCO<sub>3</sub> (soit un rendement de 0,35 mole par mole de glycérol), et de 17 g/L sans tamponner le milieu (0,13 mole par mole de glycérol) (Yuzbashev *et al.*, 2010). Cette stratégie de production d'acide succinique à pH acide a donné lieu à un dépôt de brevet (Sineoky *et al.*, 2011).

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, une stratégie mettant en jeu des délétions, simultanées ou non, des deux isoformes de la succinate déshydrogénase et de l'isocitrate déshydrogénase ont été testées. Ces délétions permettent de couper le flux de carbone dirigé vers le cycle de Krebs et de le détourner vers le cycle du glyoxylate pour accumuler du succinate. La souche portant les quatre délétions a permis d'obtenir 3,62 g/L de succinate pour un rendement de 0,11 mole par mole de glucose, malgré une diminution de 20% de la vitesse de croissance (Raab and Lang, 2011).

Une stratégie de production d'acide succinique a été développée et brevetée par DSM pour la production d'acide succinique chez une souche de champignon filamenteux: dans une souche *Δsdh* sont exprimés une PEP-carboxykinase, une pyruvate carboxylase, une malate déshydrogénase, une fumarase, une fumarate réductase et un transporteur d'acides dicarboxyliques (Verwaal *et al.*, 2008).

Un autre brevet portant sur une stratégie similaire pour la production d'acide succinique chez la levure a également été déposé par la suite: dans une souche possédant une délétion d'un des deux gènes *gpd* sont exprimés une PEP-carboxykinase hétérologue, une malate déshydrogénase, une fumarase, une fumarate réductase et un transporteur d'acides dicarboxyliques (Jansen *et al.*, 2012). Cette souche de levure permettant la production d'acide succinique en anaérobiose à pH acide (entre 1 et 5) et le procédé de purification de l'acide succinique qui lui est associésont exploités par la société Reverdia (joint-venture de Roquette et DSM) pour la production commerciale d'acide succinique. La production de l'acide succinique se fait à pH 3 et la purification est réalisée par cristallisation: le milieu de fermentation est centrifugé pour éliminer les cellules, puis évaporé pour permettre une première cristallisation; les cristaux sont ensuite redissous et une deuxième étape de cristallisation permet la récupération de l'acide succinique (Smidt, 2011).

#### 2.4.2. Production d'acide malique: un thème de recherche stratégique

L'acide malique, du fait de la présence d'un carbone asymétrique, possède un isomère (D) et un isomère (L). Il est commercialisé sous forme d'acide-malique (L), qui est l'isomère naturel, ou sous

forme d'un mélange racémique lorsqu'il est produit par synthèse chimique. L'acide malique est utilisé dans l'industrie agro-alimentaire comme acidifiant et exhausteur de goût. Comme l'acide succinique, il possède des applications dans le domaine de la santé comme synthon pour l'industrie pharmaceutique et composant de désinfectants, et dans l'industrie des métaux, pour le polissage et le nettoyage (Goldberget *al.*, 2006). Il est actuellement produit principalement par synthèse chimique ou par conversion enzymatique (voir 2.4.2.1); cependant, l'entreprise Novozymes a développé récemment une souche de microorganismes (*Aspergillus oryzae*) capable de produire de l'acide malique à l'échelle industrielle (Brown *et al.*, 2014).

#### **2.4.2.1. Procédés industriels actuellement utilisés**

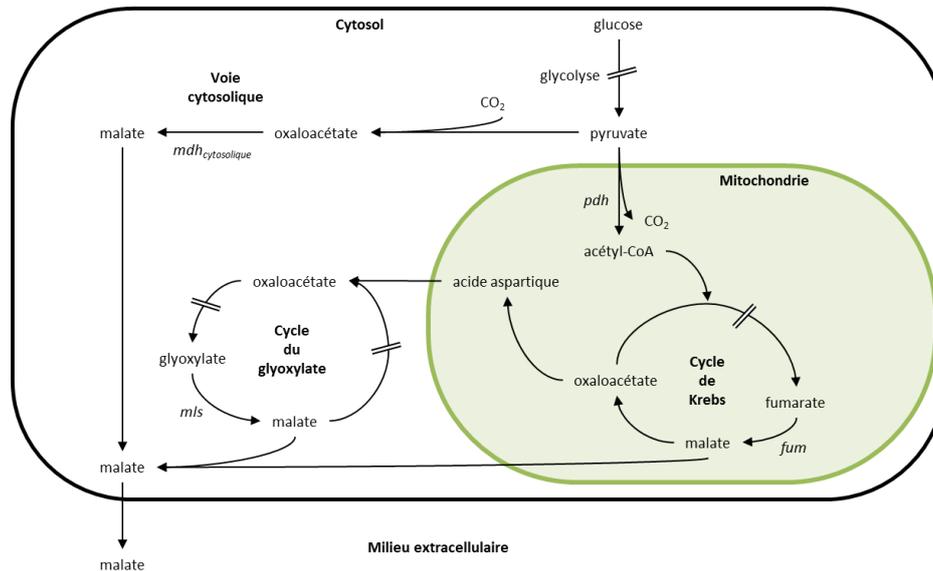
L'acide malique est actuellement produit à l'échelle industrielle par plusieurs procédés. La synthèse chimique d'acide malique est effectuée par hydratation de l'acide maléique ou de l'acide fumarique dans des conditions de hautes température et pression (Goldberget *al.*, 2006). Comme la réaction n'est pas stéréospécifique, elle conduit à l'obtention d'un mélange racémique des isomères D et L. Cependant, ce procédé présente des inconvénients majeurs: l'utilisation de ressources fossiles, des conditions réactionnelles dures gourmandes en énergie et l'obtention d'un mélange racémique, alors que certains domaines comme l'alimentaire ou la synthèse de polymères requièrent l'isomère gauche pur.

L'acide malique peut être produit sous forme (L) pure par des procédés de conversion enzymatique, en utilisant des enzymes purifiées ou des cellules immobilisées perméabilisées exprimant fortement une fumarase, le plus souvent des *Brevibacterium* (Presečki and Vasić-Rački, 2005). La fumarase (fumarate hydratase, EC 4.2.1.2) est une enzyme du cycle de Krebs qui catalyse la réaction réversible de transformation du fumarate en L-malate. Le rendement massique théorique de la réaction est de 115%, mais le rendement réel se situe plutôt aux alentours de 80-90% (Tsaoet *al.*, 1999). Par ailleurs, la transformation enzymatique nécessite de purifier des enzymes ou de traiter des cellules et d'apporter un substrat purifié également. De nombreux travaux de recherche portent donc sur l'implémentation d'un procédé de production de l'acide malique par fermentation microbienne.

#### **2.4.2.2. Voies métaboliques de production en fermentation et producteurs naturels**

L'acide malique peut être produit par les voies métaboliques suivantes: la branche oxydante du cycle des acides tricarboxyliques, la voie métabolique cytosolique non oxydante et le cycle du glyoxylate (Figure 21). Dans le cas du cycle de Krebs et du cycle du glyoxylate, le rendement théorique maximal est de 1 mole de malate par mole de glucose.

La production de malate par la voie cytosolique ne produit pas d'ATP et implique la fixation d'une molécule de CO<sub>2</sub> par molécule de malate produite. Le glucose est métabolisé par la voie de la glycolyse et de l'oxaloacétate est formé à partir du PEP par la PEP carboxylase ou à partir du pyruvate par la pyruvate carboxylase. L'oxaloacétate est ensuite converti en malate par la malate déshydrogénase. Le rendement théorique maximal de cette voie est de 2 moles par mole de glucose, soit un rendement massique de 149%, ce qui le rend particulièrement intéressant pour la production industrielle d'acide malique.



**Figure 21.** Voies métaboliques possibles pour la formation du malate d'après Chiet *al.*, 2013.

Le champignon filamenteux *Aspergillus flavus* est un bon producteur naturel d'acide malique: un rendement de production de 1,26 mole de malate par mole de glucose (avec un titre de 113 g/L) a été obtenu en conditions microaérobies et en présence de  $\text{CaCO}_3$  (Battat *et al.*, 1991). Cependant, le malate issu de cultures d'*A. flavus* ne peut pas être utilisé en industrie du fait de la présence potentielle d'aflatoxine. Des souches d'*Aspergillus niger* (ATCC 9029, ATCC 9142 et ATCC 10577) et d'*Aspergillus flavus* (ATCC 13697) ont également été testées pour la production d'acide malique à partir de vinasses: le meilleur titre obtenu est de 17 g/L avec un rendement de 0,8 g de malate par g de substrat consommé sur un mélange de glucose et de glycérol (West, 2011). Une autre souche, *Aspergillus oryzae*, NRRL 3488, a permis d'obtenir un titre de 30,3 g/L de malate pour un rendement de 0,33 mol/mol de glucose consommée (Knufet *al.*, 2013). Cette souche a fait l'objet d'une modélisation métabolique à l'échelle du génome qui a permis de révéler quelles voies cibler pour améliorer la souche par ingénierie métabolique (voir 2.4.2.3.4). D'autres organismes sont également à l'étude en tant que producteurs naturels d'acide malique, tels que *Zygosaccharomyces rouxii* et des souches de *Penicillium* provenant d'environnements marins (revu par Chiet *al.*, 2014).

### 2.4.2.3. Production par des microorganismes génétiquement modifiés

#### 2.4.2.3.1. Export et purification de l'acide malique

L'export de l'acide malique constitue un point important pour la production de cette molécule. Bien que ses mécanismes de sécrétion restent encore actuellement mal compris, on sait que sa production est cytotoxique: l'export de l'acide malique de façon active est donc indispensable. Pourtant, chez *S. cerevisiae* par exemple, il n'existe pas de transporteur de malate; l'acide sous forme moléculaire diffuse simplement à travers la membrane selon son gradient.

Des travaux ont été menés sur la possibilité de réaliser une extraction *in situ* du malate dans un milieu contenant du carbonate de calcium, sous forme de malate de calcium. Les premiers travaux rapportent une cristallisation du malate de calcium au niveau des hyphes d'*A. flavus* dès le début de la sécrétion sous forme de particules insolubles (Peleg *et al.*, 1988). Des travaux plus récents, réalisés sur *Penicillium viticola* (Khanet *al.*, 2014) et *Penicillium sclerotium* (Wanget *al.*, 2013) relativisent ces

observations: le malate de calcium étant relativement soluble, la formation de cristaux ne débute qu'après trois jours de fermentation, lorsque le milieu est saturé en malate de calcium.

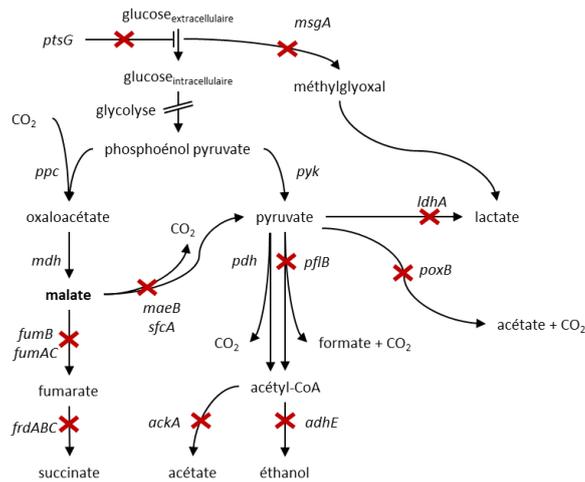
Chez la levure *Schizosaccharomyces pombe* il existe un transporteur d'acides dicarboxyliques qui fonctionne en symport  $H^+$ /dicarboxylate monoanionique (Sousaet al., 1992). Il permet le transport de divers acides (malique D, malique L, succinique, fumarique,  $\alpha$ -cétoglutarique, maléique, malonique), n'est pas sujet à une répression par le glucose et est exprimé de façon constitutive (Grobleret al., 1995). Ce transporteur a été exprimé et caractérisé chez *S. cerevisiae*, où il permet l'export de malate (Camarasaet al., 2001) et a depuis été utilisé dans des stratégies de production d'acide malique chez *S. cerevisiae* (Zelleet al., 2008) et *T. glabrata* (Chenet al., 2013). Un autre transporteur d'acides dicarboxyliques permettant le transport d'acides malique D, malique L, succinique et fumarique, et fonctionnant également en symport  $H^+$ /dicarboxylate a été mis en évidence chez *Kluyveromyces marxianus*. Cependant, ce transporteur étant soumis à une répression par le glucose (Queiroset al., 1998), son utilisation en l'état pour la production de malate ou d'un autre acide organique semble compromise.

#### 2.4.2.3.2. Chez *Escherichia coli*

Chez *E. coli*, une modélisation des flux métaboliques a montré que la production de malate pouvait être améliorée en augmentant le flux de carboxylation du PEP en oxaloacétate. La PEP carboxylase d'*E. coli* assure la carboxylation sans générer d'ATP; la stratégie a donc consisté en l'expression d'une PEP carboxykinase pour assurer la carboxylation du PEP en produisant de l'ATP. Cependant, comme la PEP carboxykinase native d'*E. coli* fonctionne préférentiellement dans le sens de la formation de PEP, c'est l'expression de la PEP carboxykinase de *Mannheimia succiniproducens* qui a permis d'obtenir une souche produisant 9,25 g/L de malate en 12 heures, pour un rendement de 0,75 mole de malate par mole de glucose consommé (Moonet al., 2008).

En parallèle, des travaux sur la production de succinate chez *E. coli* par délétion de gènes et évolution dirigée (cités en 2.4.1.2.1) ont permis d'obtenir une souche produisant du malate comme composé majoritaire. La souche *E. coli*  $\Delta$ ldhA  $\Delta$ adhE  $\Delta$ ackA  $\Delta$ focA  $\Delta$ pflB  $\Delta$ mgsA a permis d'obtenir un titre de 69 g/L de malate pour un rendement de 1,4 mole par mole de glucose consommé, mais avec une importante co-production de succinate (33 g/L) (Jantamaet al., 2008a).

Une autre étude a utilisé une souche d'*E. coli* ayant été modifiée à l'origine pour la production d'acide succinique. La stratégie initiale consistait en la délétion des gènes des isoenzymes de la fumarase dans une souche  $\Delta$ ldhA  $\Delta$ mgsA  $\Delta$ pflB  $\Delta$ ackA  $\Delta$ adhE  $\Delta$ poxB. Cependant, cette nouvelle délétion n'a pas permis d'accumulation de malate. La délétion du gène de la fumarate réductase a cependant permis d'accumuler du malate, et ce même sans déléter les gènes des fumarases. Afin d'empêcher la reconversion du malate en pyruvate, les gènes *sfcA* et *maeB* codant pour les enzymes maliques ont également été délétés (Figure 22). De façon surprenante, ces délétions ont provoqué l'accumulation de D-lactate, bien que la souche utilisée présente des délétions pour les deux gènes impliqués dans la formation du lactate. Bien que la raison de l'accumulation du lactate n'ait pas été identifiée, la souche finale a permis d'obtenir sur milieu minéral en présence de  $CaCO_3$  un titre de 22 g/L de malate pour un rendement de 1 mole par mole de glucose consommée, soit la moitié du rendement théorique maximal. Une optimisation du procédé de fermentation en réalisant une phase de croissance aérobie, puis une phase de production anaérobie, a augmenté le titre à 34 g/L pour un rendement de 1,42 mole par mole de glucose (Zhanget al., 2010).



**Figure 22.** Schéma des modifications génétiques de la souche d'*Escherichia coli* utilisée par Zhanget *al.* pour produire du malate.

*ptsG*: perméase glucose-spécifique du complexe membranaire phospho-transférase; *msgA*: méthylglyoxal synthétase; *pyk*: pyruvate kinase; *ppc*: PEP carboxylase; *mdh*: malate déshydrogénase; *fumABC* fumarase; *frdABC*: fumarate réductase; *sfcA* et *maeB*: isoformes de l'enzyme malique; *pdh*: pyruvate déshydrogénase; *pflB*: pyruvate formate lyase; *ackA*: acétate kinase; *adhE*: alcool déshydrogénase; *poxB*: pyruvate oxydase; *ldhA*: lactate déshydrogénase.

#### 2.4.2.3.3. Chez *Saccharomyces cerevisiae*

La surexpression du gène *mdh2* codant pour l'isoforme cytosolique de la malate déshydrogénase native chez *Saccharomyces cerevisiae* semble avoir un effet positif sur la production d'acide malique en l'augmentant d'un facteur 3,7 (Pineset *al.*, 1997). Cela semble surprenant dans la mesure où cette isoforme est sujette à une protéolyse en présence de glucose (Minard and McAlister-Henn, 1992). Par ailleurs, une des limitations majeures à l'utilisation de *S. cerevisiae* réside dans la production importante d'éthanol comme co-produit.

Une stratégie d'ingénierie métabolique a donc consisté à créer une souche ne produisant plus d'éthanol par délétion des gènes *pdcl*, *pdcc5* et *pdcc6* codant pour les trois isoformes de la pyruvate décarboxylase (Hohmann, 1991). Cette souche est capable de croître sur glucose en batch en milieu complexe, mais pas en milieu synthétique sans apport de composés à deux atomes de carbone (Flikweert *et al.*, 1996, 1999) et elle produit de grandes quantités de pyruvate en présence de hautes concentrations en glucose (Flikweert *et al.*, 1997). Il semble que le défaut de croissance soit dû au rôle négatif de la pyruvate décarboxylase dans la synthèse d'acétyl-CoA cytosolique, essentiel pour la synthèse des lipides et de la lysine (Flikweert *et al.*, 1996). Cette hypothèse est vérifiée par le fait que la surexpression du gène de la thréonine aldolase *gly1*, qui permet de constituer une voie de substitution pour la production d'acétyl-CoA cytosolique (Figure 23), restaure la croissance de la souche *pdcc* sur glucose en milieu synthétique (van Mariset *et al.*, 2003). Ces observations montrent donc qu'il n'y a pas de transport de l'acétyl-CoA mitochondrial dans le cytosol chez *S. cerevisiae*.



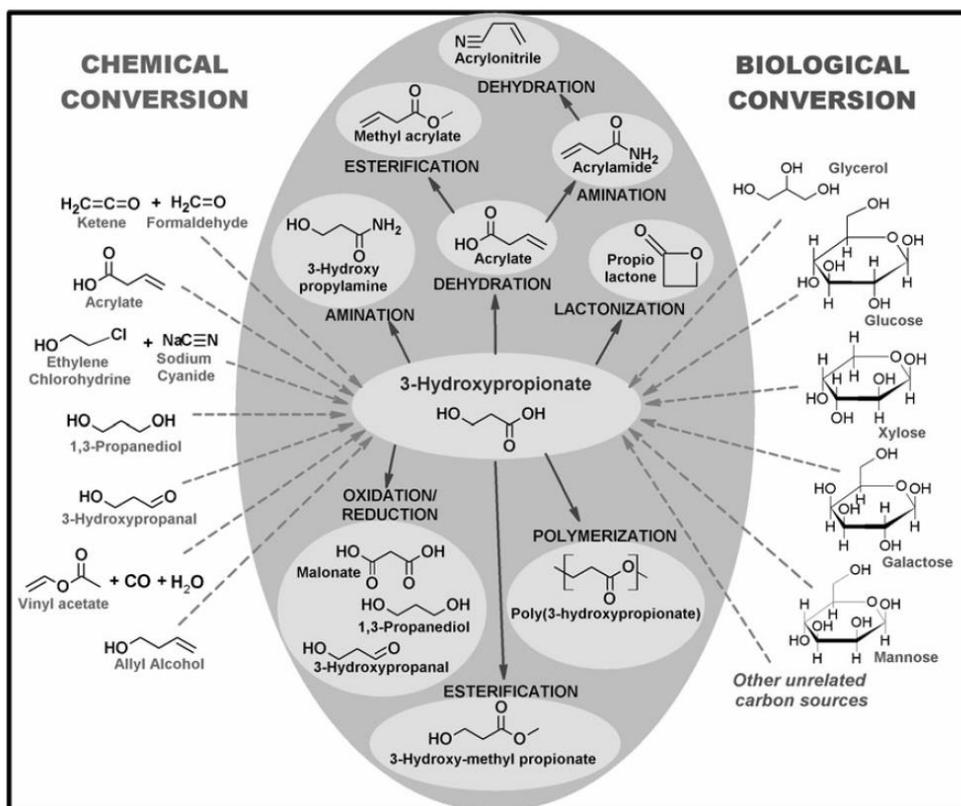
précédemment (1,49 mol/mol) (Knufet *al.*, 2014). Cette souche a fait l'objet d'un dépôt de brevet (Brown *et al.*, 2014) et est exploitée commercialement par la société Novozymes.

#### **2.4.2.3.5. Autres hôtes utilisés**

D'autres hôtes pour la production d'acide malique ont également été testés, tels que *Torulopsis glabrata* (Chenet *al.*, 2013) et *Bacillus subtilis* (Mu and Wen, 2013). Cependant, la surexpression de la pyruvate carboxylase et de la malate déshydrogénase de *R. oryzae* et du transporteur d'acides dicarboxyliques de *S. pombe* n'a permis d'accumuler que 8,5 g/L de malate pour un rendement de 0,19 mole par mole de glucose. De la même façon chez *B. subtilis*, la surexpression de la PEP-carboxylase d'*E. coli* et de la malate déshydrogénase de *S. cerevisiae* n'ont permis de produire que 1,23 g/L de malate en fermentation. L'optimisation des conditions de culture avec une phase de croissance aérobie et une phase production anaérobie a augmenté le titre produit à 2 g/L mais ces valeurs restent trop faibles pour envisager des applications industrielles de ces souches sans modification supplémentaire.

### **2.5. Fixation de carbone inorganique pour la production de 3-HP**

Le 3-HP (acide 3-hydroxypropionique) est un intermédiaire qui apparaît dans le cycle qui porte son nom, le cycle du 3-HP Holo (Holo, 1989; Strauss and Fuchs, 1993), et le cycle du 3-HP/4-HB (Berget *al.*, 2007). C'est une molécule plateforme possédant de nombreuses applications industrielles en tant que synthon (Figure 24), des fonctions de lubrifiant pour les métaux et d'antistatique pour les textiles (Kumar *et al.*, 2013). Sa condensation permet l'obtention de biopolymère de poly(3-hydroxypropionate) (Valdehuesa *et al.*, 2013). Sa production par synthèse chimique est problématique à cause notamment des coûts des réactifs comme l'acide acrylique et de la toxicité de certains intermédiaires réactionnels ou catalyseurs comme le cyanure de sodium (Kumar *et al.*, 2013; Valdehuesa *et al.*, 2013). Il est donc fortement souhaitable de développer un procédé de production par voie biotechnologique.



**Figure 24.** Voies de production du 3-hydroxypropionate et ses applications pour la production de composés à haute valeur ajoutée (d'après Valdehuesa *et al.*, 2013).

### 2.5.1. Voies métaboliques de production de 3-HP

Le 3-HP est produit naturellement par les bactéries vertes non sulfureuses possédant un cycle éponyme (voir 1.1.4) et chez les archées thermoacidophiles possédant un cycle du 3-HP/4-HB (voir 1.1.5). Il est par exemple sécrété par la bactérie phototrophe *Chloroflexus aurantiacus*, dont l'étude a permis la mise en évidence du cycle du 3-HP, mais en concentrations très faibles, de l'ordre de 1,5  $\mu\text{M}$  à 0,35 mM (Holo, 1989). Le 3-HP peut par ailleurs être issu de la dégradation du diméthylsulfoniopropionate par *Alcaligenes faecalis* et de la dégradation de l'uracile chez les levures et les bactéries (revu par (Valdehuesa *et al.*, 2013).

Du fait de l'absence de microorganismes produisant naturellement de grandes quantités de 3-HP, des stratégies d'ingénierie métabolique *in silico* ont été entreprises afin de mettre au point des voies de production potentielles à partir de glucose (Figure 25). Ces modélisations ont fait l'objet de publications et de brevets (Brunk *et al.*, 2011; Burk and Osterhout, 2010; Cho *et al.*, 2010; Bar-Even *et al.*, 2010; Gokarn *et al.*, 2003; Henry *et al.*, 2010; Lynch, 2011).

Numéro	Voie métabolique de production du 3-HP	$\Delta G^\circ$ (kJ/mol)
1	<p>Pyruvate → Lactate → Lactoyl-CoA → Acryloyl-CoA → Hydroxypropionyl-CoA → 3-Hydroxypropionate</p>	+19.9
2	<p>Pyruvate → Succinate → Propionate → Propionyl-CoA → Acryloyl-CoA → Hydroxypropionyl-CoA → 3-Hydroxypropionate</p>	+79.6
3	<p>Phosphoenolpyruvate → Oxaloacetate → Aspartate → <math>\beta</math>-Alanine → <math>\beta</math>-Alanyl-CoA → Acryloyl-CoA → Hydroxypropionyl-CoA → 3-Hydroxypropionate</p>	+10.6
4	<p>Pyruvate → L-Alanine → <math>\beta</math>-Alanine → <math>\beta</math>-Alanyl-CoA → Acryloyl-CoA → Hydroxypropionyl-CoA → 3-Hydroxypropionate</p>	+28.6
5	<p>Phosphoenolpyruvate → Oxaloacetate → Aspartate → <math>\beta</math>-Alanine → Malonate semialdehyde → 3-Hydroxypropionate</p>	- 32.3
6	<p>Pyruvate → L-Alanine → <math>\beta</math>-Alanine → Malonate semialdehyde → 3-Hydroxypropionate</p>	- 14.3
7	<p>Pyruvate → Acetyl-CoA → Malonyl-CoA → 3-Hydroxypropionate</p>	- 14.5
8	<p>Phosphoenolpyruvate → Oxaloacetate → Malonate semialdehyde → 3-Hydroxypropionate</p>	- 37.8
9	<p>Phosphoenolpyruvate → Oxaloacetate → Malonyl-CoA → 3-Hydroxypropionate</p>	- 34.6
10	<p>Phosphoenolpyruvate → Oxaloacetate → Malate → 3-Hydroxypropionate</p>	- 53.9

**Figure 25.** Voies métaboliques synthétiques proposées pour la production de 3-HP à partir de glucose, d'après Valdehuesa *et al.*, 2013.

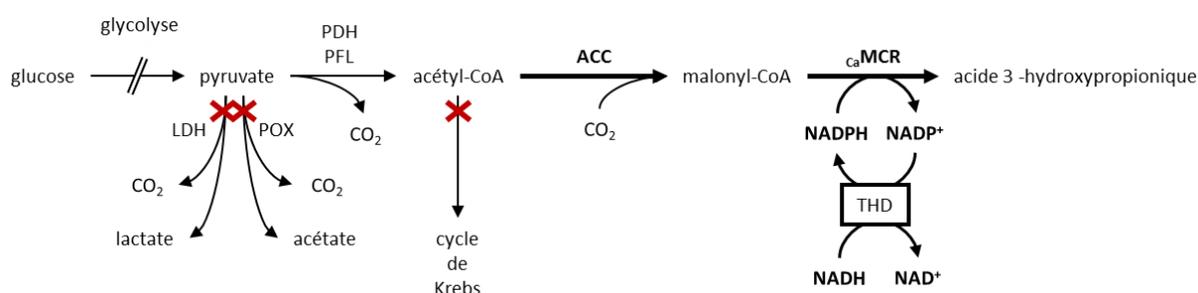
Parmi les voies métaboliques proposées, les voies 1 à 4 possèdent un  $\Delta G^\circ$  positif, ce qui signifie que les voies sont défavorables d'un point de thermodynamiques et vont donc être coûteuses en énergie. Par ailleurs, l'intermédiaire réactionnel acryloyl-CoA qui apparaît dans chacune de ces voies est modérément toxique (Bar-Even *et al.*, 2010), ce qui peut être gênant pour la viabilité cellulaire. Les voies métaboliques 5 et 6 sont thermodynamiquement favorables, mais peuvent poser des problèmes au niveau de la balance d'oxydoréduction. Les voies métaboliques 8 à 10 impliquent l'utilisation d'enzymes pouvant catalyser des réactions de conversion de l'oxaloacétate en malonate semi-aldéhyde ou en malonyl-CoA et du malate en 3-HP; de telles enzymes ne sont pour l'instant pas répertoriées (revu par Valdehuesa *et al.*, 2013). La voie métabolique 7 est basée sur le cycle du 3-HP (Hügler *et al.*, 2003a). Une limitation possible est due à la malonyl-CoA réductase (MCR) catalysant la réduction du malonyl-CoA en 3-HP: lorsque le gène de la MCR de *C. aurantiacus* a été cloné dans *E. coli* pour la caractériser, son optimum d'activité enzymatique a été obtenu à des températures de 55 à 60°C (Hügler *et al.*, 2003b).

Les stratégies développées récemment pour la production de 3-HP passent soit par le malonyl-CoA, soit par la  $\beta$ -alanine comme intermédiaires réactionnels. Elles incluent une réaction de carboxylation et une réaction de décarboxylation: il n'y a pas de fixation nette de  $\text{CO}_2$  mais il est recyclé dans l'enchaînement réactionnel. Nous ne considérerons ici que les réactions qui impliquent une fixation de carbone.

## 2.5.2. Expression de la malonyl-CoA réductase de *C. aurantiacus* chez *Escherichia coli*

Une voie de production de 3-HP a été mise en place chez *E. coli* (Rathnasingh *et al.*, 2012). La MCR de *C. aurantiacus* a d'abord été surexprimée seule afin de vérifier son niveau d'expression et son activité: l'enzyme était bien active, fortement exprimée en conditions aérobies et peu exprimée en conditions anaérobies. L'expression de la  $c_a$ MCR seule a permis d'obtenir un titre en 3-HP de 0,71 mM à partir de 100 g/L de glucose. D'autres modifications génétiques ont ensuite été testées: l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) et de la biotinyllase natives de *E. coli* ont été surexprimées afin d'augmenter la production de malonyl-CoA et d'optimiser la biotinyllation de l'acétyl-CoA carboxylase. Le gène *pntAB* d'*E. coli* codant pour la nicotinamide nucléotide transhydrogénase (THD) catalysant la conversion du NADH en NADPH a également été surexprimé (Figure 26) afin d'augmenter le niveau de cofacteur nécessaire au fonctionnement de la  $c_a$ MCR. La surexpression de la  $c_a$ CMR avec l'ACC seule a permis d'obtenir un titre de 1,6 mM. La surexpression de la  $c_a$ CMR avec la PTN seule a permis d'obtenir un titre de 1,5 mM. La surexpression de la  $c_a$ MCR avec l'ACC et la THD a conduit à un titre de 2,14 mM.

La production de 3-HP a été obtenue uniquement en conditions aérobies. Après avoir mesuré les concentrations intracellulaires en lactate et en acétate, une nouvelle étape d'optimisation génétique a été entreprise en effectuant des délétions pour bloquer soit la voie de synthèse du lactate, soit la voie de synthèse de l'acétate, soit l'entrée de l'acétyl-CoA dans le cycle de Krebs (Figure 26). La délétion du gène de la lactate déshydrogénase n'a pas eu d'effet; les deux autres délétions ont en revanche eu un impact négatif sur la production de 3-HP avec des titres réduits. La preuve de concept pour la production de 3-HP chez *E. coli* a donc été faite mais des améliorations doivent encore être effectuées pour envisager des applications industrielles.



**Figure 26.** Schéma simplifié de la voie de production chez *E. coli* pour la production de 3-HP (d'après Rathnasinghet *al.*, 2012).

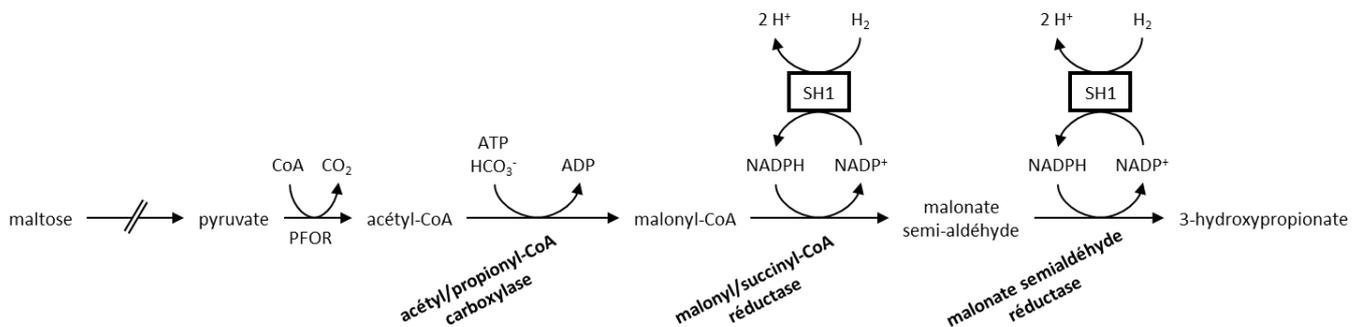
Les flèches en gras indiquent les enzymes surexprimées, croix indiquent les délétions. LDH: lactate déshydrogénase; POX: pyruvate oxydase; PDH: pyruvate déshydrogénase; PFL: pyruvate formate lyase; ACC: acétyl-CoA carboxylase et biotinyllase;  $c_a$ MCR: malonyl-CoA carboxylase de *Chloroflexus aurantiacus*; THD: transhydrogénase.

## 2.5.3. Expression d'un cycle du 3-HP/4-HB partiel chez *Pyrococcus furiosus*

Une étude a été réalisée chez *Pyrococcus furiosus* pour la production de 3-HP par mise en place d'une partie du cycle du 3-HP/4HB de l'archée *Metallosphaera sedula*. En effet, une souche naturellement compétente de *P. furiosus*, COM1, a été récemment découverte et a permis un développement génétique pour l'ingénierie métabolique (Lipscomb *et al.*, 2011). Par ailleurs, *P. furiosus* a une

température de croissance optimale de 100°C mais conserve son activité métabolique à des températures de l'ordre de 70°C (Basen *et al.*, 2012), ce qui crée une base naturelle pour le développement d'un procédé en deux phases croissance/production découplées.

L'enjeu de l'approche développée chez *P. furiosus* réside dans la production de 3-HP par la mise en place d'une voie métabolique fixant CO<sub>2</sub> et utilisant l'hydrogène comme source d'électron. Les trois gènes de l'acétyl-CoA/propionyl-CoA carboxylase, le gène de la malonyl/succinyl-CoA réductase et le gène de la malonate semi-aldéhyde réductase de *M. sedula* ont été utilisés pour construire un opéron placé sous le contrôle d'un promoteur de *P. furiosus* et permettent de produire du 3-HP en trois étapes à partir d'acétyl-CoA synthétisé par la cellule (Figure 27). La stratégie comporte également une part de mise au point de procédé car la température optimale de croissance de *P. furiosus* est de 100°C alors que celle de *M. sedula* est de 73°C. Le procédé utilisé comportait une phase de croissance des cellules de *P. furiosus* à 95°C et une phase de production de 3-HP à 72°C. Des essais en bouteille dans un milieu contenant du maltose, du bicarbonate et de l'hydrogène ont permis d'obtenir jusqu'à 0,6 mM (environ 60 mg/L) de 3-HP, soit un rendement d'environ 1%. Des essais en fermenteur sur maltose avec CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> et une régulation du pH ont montré des titres d'environ 0,25 mM (Keller *et al.*, 2013).



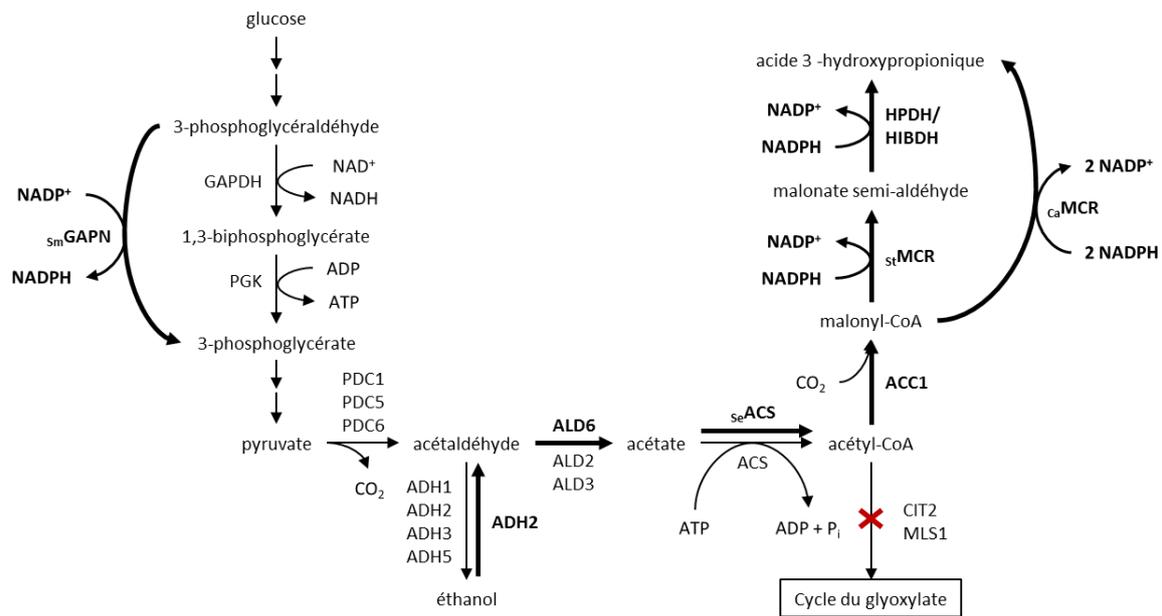
**Figure 27.** Production de 3-HP à partir de maltose, de CO<sub>2</sub> et d'hydrogène chez *P. furiosus* exprimant l'acétyl-CoA/propionyl-CoA carboxylase, la malonyl/succinyl-CoA réductase et la malonate semi-aldéhyde réductase de *M. sedula*.

PFOR: pyruvate:ferredoxine oxydoréductase; SH1: hydrogénase soluble. Les enzymes en gras sont les enzymes hétérologues surexprimées.

## 2.5.4. Mise en place d'une voie de production de 3-HP chez *S. cerevisiae*

### 2.5.4.1. Production à partir de malonyl-CoA par carboxylation de l'acétyl-CoA

Une stratégie de production de 3-HP mettant en oeuvre l'intermédiaire réactionnel malonyl-CoA a été développée chez *S. cerevisiae* (Chen *et al.*, 2014). Elle est basée sur la surexpression de la MCR de *C. aurantiacus*, la surexpression de l'acétyl-CoA carboxylase native, l'optimisation de l'apport en acétyl-CoA et l'amélioration du renouvellement du NADPH (Figure 28).



**Figure 28.** Modifications génétiques effectuées chez *S. cerevisiae* pour la production de 3-HP (d'après Chen *et al.*, 2014).

Les flèches en gras indiquent les réactions surexprimées. *sm*GAPN: glycéraldéhyde-3-phosphate non phosphorylante de *Streptococcus mutans*; GAPDH: glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase; PGK: phosphoglycérate kinase; PDC: pyruvate décarboxylase; ADH: alcool déshydrogénase; ALD: aldéhyde déshydrogénase; ACS: acétyl-CoA synthétase; *se*ACS: acétyl-CoA synthétase d'un variant de *Salmonella enterica*; ACC: acétyl-CoA carboxylase; *st*MCR: malonyl-CoA réductase de *Sulfolobus tokodaii*; HPDH: 3-HP déshydrogénase de *Metallosphaera sedula*; HIBDH: 3-hydroxybutyrate déshydrogénase de *Pseudomonas aeruginosa*; *ca*MCR: malonyl-CoA réductase de *Chloroflexus aurantiacus*.

La conversion du malonyl-CoA en 3-HP peut s'effectuer en une seule étape par action de la MCR de *C. aurantiacus* ou en deux étapes (via la génération de malonate semi-aldéhyde) par l'action combinée d'une MCR et d'une 3-HP déshydrogénase (HPDH) ou une 3-hydroxybutyrate déshydrogénase (HIBDH) (Figure 28). Trois combinaisons ont été testées: expression de la MCR de *C. aurantiacus*; expression de la MCR de *Sulfolobus tokodaii* et de la HDPH de *Metallosphaera sedula*; expression de la MCR de *Sulfolobus tokodaii* et de la HIBDH de *Pseudomonas aeruginosa*. C'est la MCR de *C. aurantiacus* qui a été retenue: elle a permis de produire un titre de 92,6 mg/L en 3-HP à partir de 20 g/L de glucose.

La surexpression de l'acétyl-CoA carboxylase endogène de *S. cerevisiae*, qui catalyse la carboxylation de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA, a permis d'augmenter le titre en 3-HP à 159 mg/L, soit une augmentation de 65% par rapport à la souche exprimant la MCR seule.

L'apport en acétyl-CoA a également été optimisé par surexpression simultanée des gènes *adh2* (alcool déshydrogénase), *ald6* (acétaldéhyde déshydrogénase) et *seacs*<sup>L641P</sup> (acétyl-CoA synthétase de *S. enterica* insensible à l'acétylation) et délétion des gènes *cit2* et *mls1*, qui permettent l'entrée de l'acétyl-CoA dans le cycle du glyoxylate, a également été étudiée. La délétion de *cit2* dans la souche surexprimant *adh2ald6 seacs*<sup>L641P</sup> et *ca*mcr a permis d'atteindre un titre en 3-HP de 249 mg/L. La délétion de *mls1* dans la même souche a conduit à un titre de 271 mg/L de 3-HP.

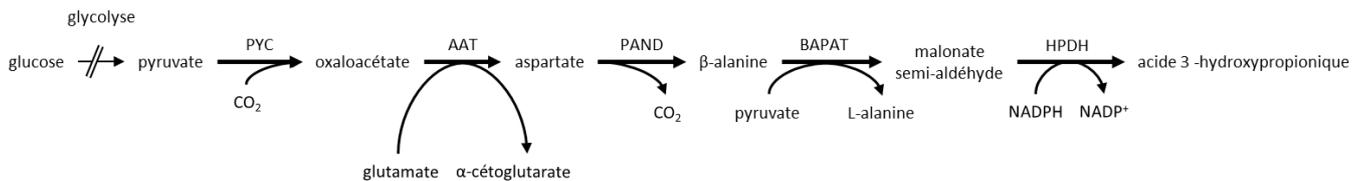
Comme la production d'une mole de 3-HP consomme deux moles de NADPH (Figure 28), la régénération de NADPH a également fait l'objet d'améliorations. L'expression d'une déshydrogénase glycéraldéhyde-3-phosphate NADP<sup>+</sup>-dépendante non phosphorylante hétérologue (GAPN) de *Streptococcus mutans* et d'une déshydrogénase glycéraldéhyde-3-phosphate NADP<sup>+</sup>-dépendante (GAPDH) de *Kluyveromyces lactis* ont été testées dans une souche exprimant seulement la MCR. La

GAPN a donné les meilleurs résultats, avec un titre de 122 mg/L en 3-HP, soit une augmentation de 30% par rapport à la souche exprimant la MCR seule.

La souche finale *adh2ald6<sub>sc</sub>acs<sup>L641P</sup><sub>ca</sub>mcr<sub>sm</sub>gapn<sub>Δ</sub>mls1* a permis d'atteindre un titre de 463 mg/L de 3-HP, soit une amélioration d'un facteur 5 par rapport à la production de la souche exprimant la MCR seule. Le rendement reste cependant très faible: 2,3% de rendement massique, soit 0,04 mole de 3-HP produit par mole de glucose consommée.

### 2.5.4.2. Production à partir de β-alanine par carboxylation du pyruvate

Très récemment une voie de production de 3-HP a été développée chez *S. cerevisiae*: elle permet la synthèse de 3-HP à partir de glucose en passant par la β-alanine (Figure 29) (Borodina *et al.*, 2015). Cette voie métabolique est semblable à la voie métabolique synthétique 5 citée précédemment (Figure 25), à ceci près que c'est le pyruvate qui est carboxylé en oxaloacétate.



**Figure 29.** Modifications génétiques effectuées chez *S. cerevisiae* pour la production de 3-HP via la β-alanine (d'après Borodina *et al.*, 2015).

Les flèches en gras indiquent les surexpressions. PYC: pyruvate carboxylase; AAT: aspartate aminotransférase; PAND: aspartate décarboxylase; BAPAT: β-alanine aminotransférase; HPDH: 3-HP déshydrogénase.

La première étape a consisté à choisir une β-alanine aminotransférase (BAPAT) qui serait exprimée et fonctionnelle chez *S. cerevisiae*. Les gènes des BAPAT de *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus cereus* ont été optimisés pour l'expression chez *S. cerevisiae*. Le gène de *B. cereus* a été validé mais aucune activité n'a été obtenue à partir de la BAPAT de *P. aeruginosa*.

Plusieurs enzymes de type 3-HP déshydrogénase (HPDH) ou 3-hydroxybutyrate déshydrogénase (HIBDH) ont été testées pour l'étape de conversion du malonate semi-aldéhyde en 3-HP: HPDH de *Metallosphaera sedula* (gène *M<sub>s</sub>hpdh*), *Sulfolobus tokadaii* (gène *S<sub>h</sub>hpdh*) ou de *E. coli* (gène *ydfg* ou *rute*) et HIBDH de *P. aeruginosa* (gène *P<sub>a</sub>hibadh*), *P. putida* (*P<sub>p</sub>hibadh*), *B. cereus* (*B<sub>c</sub>hibadh*) ou *Candida albicans* (*C<sub>a</sub>hibadh*). Les enzymes ont été optimisées pour l'expression chez *S. cerevisiae* et ont été introduites dans une souche exprimant la BAPAT de *B. cereus*. L'évaluation de la capacité des levures à produire du 3-HP en croissance sur milieu minéral contenant de la β-alanine a montré que la souche transformée avec le gène *ydfg* d'*E. coli* donnait les meilleurs résultats avec 2,14 g/L de 3-HP produit à partir de 10 g/L de β-alanine.

La souche ainsi obtenue exprimant la BAPAT et la HPDH ne produisait pas de 3-HP en croissance sur glucose. La voie de biosynthèse d'aspartate à partir du glucose a donc été optimisée par expression de l'aspartate décarboxylase de *Tribolium castaneum*: les titres obtenus en 3-HP étaient de 0,83 g/L sur milieu minéral avec glucose et 3,66 g/L sur milieu "feed-in-time" (relargage du glucose par activité enzymatique pour simuler un fed-batch en fioles).

Une dernière étape d'optimisation a porté sur l'expression des gènes hétérologues introduits et des gènes natifs de l'aspartate aminotransférase et de la pyruvate carboxylase, qui sont également

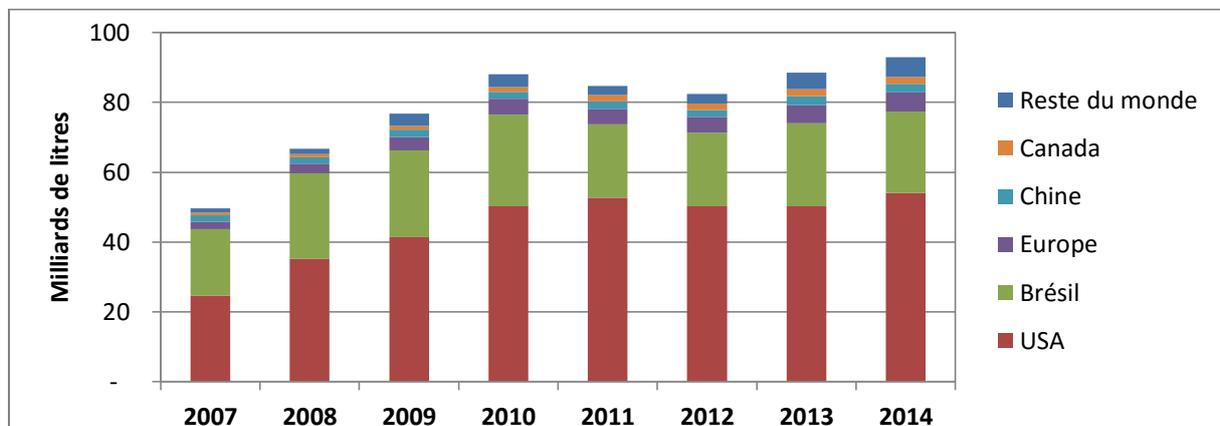
importants pour la voie de synthèse du 3-HP (Figure 29). Différentes combinaisons de surexpression ont été testées et les meilleurs résultats ont été obtenus en surexprimant l'aspartate aminotransférase, les deux isoformes de la pyruvate carboxylase, la BAPAT, la HPDH et en surexprimant plusieurs copies de l'aspartate décarboxylase. Cette optimisation a permis d'obtenir des titres de 1,27 g/L en milieu minéral avec glucose et de 8,51 g/L en milieu "feed-in-time".

Des essais en fermenteur en fed-batch et conditions aérobies à pH 5 ont permis d'obtenir des titres de 13,6 g/L de 3-HP, soit un rendement de 0,28 mole de 3-HP par mole de glucose, sans production de co-produits indésirables. Des essais ont également été réalisés en utilisant un protocole de fed-batch et ont permis d'obtenir des titres de 12,2 g/L à pH 5 et 9,2 g/L à pH 3,5. Cette étude montre donc qu'il est possible de produire du 3-HP chez *S. cerevisiae* à des titres intéressants, même à pH acide.

### 3. Production d'éthanol chez *Saccharomyces cerevisiae*

#### 3.1. Contexte de la production de bioéthanol et technologies actuelles

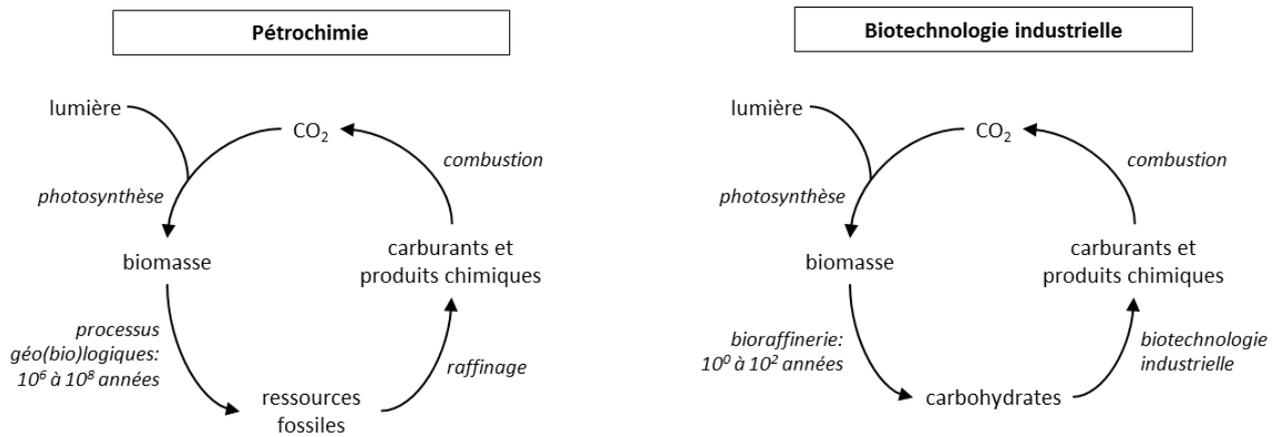
L'éthanol est le premier biocarburant produit au niveau mondial en termes de volume (Figure 30): plus de 92 milliards de litres ont été produits en 2014, dont la majorité provient des USA (52 milliards de litres), où le bioéthanol est produit à partir de maïs. Le Brésil est le deuxième producteur mondial et utilise majoritairement la canne à sucre comme matière première (Nielsen *et al.*, 2013). Dans l'Union Européenne, le bioéthanol est issu d'amidon de blé et de betterave à sucre.



**Figure 30.** Production mondiale d'éthanol par pays/région entre 2007 et 2014.

Source: Alternative Fuel Data Center ([www.afdc.energy.gov/data/](http://www.afdc.energy.gov/data/))

L'utilisation de biocarburants est sujette à controverse dans la mesure où l'utilisation de ressources agricoles pour la production de biocarburants peut entrer en compétition avec leur fonction alimentaire et contribuer à la déforestation pour établir des champs (Caspeta *et al.*, 2013). Un autre aspect débattu concerne les émissions de gaz à effet de serre, car la production de bioéthanol par fermentation émet de grandes quantités de CO<sub>2</sub> (voir 3.2). Cependant, le dioxyde de carbone produit est issu de ressources végétales qui ont utilisé du CO<sub>2</sub> atmosphérique pour croître et il ne contribue donc pas à l'augmentation des gaz à effets de serre dans l'atmosphère. C'est le carbone fossile issu du pétrole du charbon ou du gaz naturel qui, en brûlant, contribue à cette augmentation, sa régénération étant infiniment longue à l'échelle humaine (Van Maris *et al.*, 2006) (Figure 31).

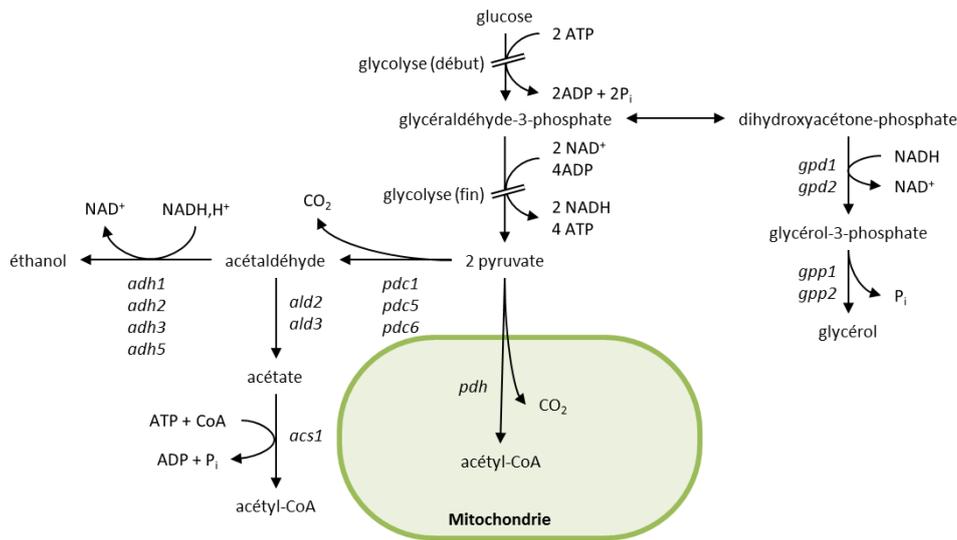


**Figure 31.** Cycle du carbone pour la production de carburants et de produits d'intérêt par pétrochimie ou par biotechnologie industrielle (d'après Van Maris *et al.*, 2006).

### 3.2. Principe de production de l'éthanol

L'éthanol produit par voie biotechnologique est issu de la fermentation de sucres par des microorganismes, le plus utilisé étant *Saccharomyces cerevisiae*, qui produit naturellement de l'éthanol et peut facilement être manipulé génétiquement. Certains industriels utilisent toutefois d'autres microorganismes, comme par exemple l'entreprise Deinove qui exploite un procédé de production de bioéthanol par des bactéries déinocoques. Dans le cas de l'éthanol dit de première génération (1G), les sucres utilisés sont des hexoses tels que le glucose et le fructose, obtenus à partir d'amidon de maïs ou de blé extraits de végétaux tels que la canne à sucre ou la betterave sucrière. L'éthanol de première génération constitue le procédé de production majoritaire de bioéthanol à l'heure actuelle.

La production d'éthanol 1G par *S. cerevisiae* repose sur la métabolisation des sucres par la voie de la glycolyse. *S. cerevisiae* est une levure Crabtree-positive et possède un métabolisme respiro-fermentatif en conditions aérobies en présence de fortes concentrations en sucres: du fait d'une capacité respiratoire limitée, la réoxydation du NADH produit par la glycolyse et les réactions de biosynthèse cellulaire ne peut être entièrement prise en charge par la chaîne respiratoire (Vemuri *et al.*, 2007). Le flux de carbone est alors dévié vers la production d'éthanol qui permet la production de NAD<sup>+</sup> (Figure 32). *S. cerevisiae* est également un microorganisme anaérobie facultatif: elle peut croître en conditions anoxiques en fermentant la totalité des sucres disponibles, majoritairement en éthanol avec une co-production de glycérol. Le glycérol permet de réoxyder le NADH en excès produit par les réactions de biosynthèse de la cellule qui ne peut être réoxydé par la production d'éthanol (Albers *et al.*, 1996); il possède également une fonction protectrice en conditions de stress osmotique, en présence de hautes concentrations en sucres par exemple (van Dijken and Scheffers, 1986). De ce fait, pour la production industrielle d'éthanol, ce sont les conditions de culture anaérobies qui sont privilégiées. Le rendement théorique maximal de la production d'éthanol est de 2 moles par mole de glucose consommée, soit 0,511 g d'éthanol par g de glucose (rendement de Gay-Lussac).



**Figure 32.** Métabolisme central du glucose chez *S. cerevisiae*.

*gpd*: gènes des isoformes de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase; *gpp*: gènes des isoformes de la glycérol-3-phosphate phosphatase; *pdh*: complexe pyruvate déshydrogénase; *pdc*: gènes des isoformes de la pyruvate décarboxylase; *adh*: gènes des isoformes de l'acétaldéhyde déshydrogénase; *ald*: gènes des isoformes de l'aldéhyde déshydrogénase; *acs*: gène de l'acétyl-CoA synthétase cytosolique.

Cependant, l'utilisation de végétaux à valeur alimentaire pour la production de bioéthanol peut poser des problèmes de concurrence entre les deux utilisations et de répartition des cultures. Une autre stratégie de production de bioéthanol reposant sur l'utilisation de déchets végétaux a donc été développée: il s'agit de l'éthanol de deuxième génération (éthanol 2G). Le substrat de la fermentation est constitué de biomasse lignocellulosique qui est dans un premier temps hydrolysée en xylose (composé majoritaire), L-arabinose, L-rhamnose et acide galacturonique, qui sont des pentoses. Le principal verrou de cette technologie repose sur la nécessité d'utiliser des microorganismes capables de métaboliser les pentoses, de façon naturelle ou par génie génétique, ce qui n'est pas simple.

*S. cerevisiae* est capable de transporter le xylose du fait de la non spécificité de son transporteur d'hexoses, mais la vitesse de transport est très lente (revu par Van Vleet and Jeffries, 2009). Elle n'est pas capable de le métaboliser, mais peut métaboliser le D-xylulose, isomère du xylose, qui est un intermédiaire généré par les microorganismes capables de croître sur D-xylose. Il existe deux façons d'arriver à cet intermédiaire chez les microorganismes pouvant croître sur xylose: l'isomérisation du xylose en xylulose, rencontrée chez les bactéries, ou le passage par un intermédiaire, le xylitol, chez les champignons utilisant le xylose en anaérobie.

### 3.3. Amélioration du rendement de production d'éthanol

#### 3.3.1. Limitation de la co-production de glycérol

##### 3.3.1.1. Délétion des gènes *gpd*

Chez *S. cerevisiae*, deux gènes, *gpd1* et *gpd2*, codent pour deux isoformes de la glycérol phosphate déshydrogénase, qui catalyse la synthèse de glycérol à partir de dihydroxyacétone-phosphate (DHAP). L'isoforme 1 est plutôt impliquée dans l'osmotolérance, puisque l'expression de *gpd1* est induite en cas de stress osmotique, tandis que l'expression de *gpd2* est induite en conditions anoxiques (Ansell *et al.*,

1997). Pour éviter la formation de glycérol il est donc envisageable de déléter un des gènes *gpd* ou les deux.

Une première étude a testé les effets de la délétion de chaque gène en conditions anaérobies. La délétion de *gpd1* n'a eu que peu d'influence sur la quantité de glycérol formé et n'a pas eu d'impact sur la vitesse de croissance. La délétion de *gpd2* a conduit à une baisse de 40% de la production de glycérol et une augmentation de 13% de la production d'éthanol, mais a également provoqué une longue phase de latence et une vitesse de croissance réduite (Valadi *et al.*, 1998). Par ailleurs, il semble qu'un mécanisme de compensation partiel se soit mis en place dans le mutant  $\Delta gpd2$  puisque la délétion de *gpd2* a provoqué une augmentation de l'expression *gpd1* par rapport à la souche sauvage.

### **3.3.1.2. Modulation de l'expression des gènes *gpd***

Une alternative à la délétion simultanée de *gpd1* et *gpd2*, qui empêche la croissance en anaérobiose, réside dans la diminution de l'expression des gènes *gpd* par remplacement du promoteur par un promoteur plus faible. Le promoteur natif de *gpd1* ou *gpd2* a été remplacé par un promoteur TEF modifié dans un contexte  $\Delta gpd1$  ou  $\Delta gpd2$ . La combinaison des deux gènes *gpd* sous contrôle de promoteurs faibles a également été testée. Les résultats sur milieu synthétique avec glucose en conditions anaérobies montrent une diminution du rendement de glycérol allant jusqu'à 60% couplée à une augmentation du rendement d'éthanol de plus de 5%. Cependant, certaines des souches modifiées montraient une productivité très diminuée, avec un temps de fermentation plus de 3 fois supérieur à la condition contrôle, ce qui limite les applications industrielles (Hubmann *et al.*, 2011).

### **3.3.2. Modification des aspects d'oxydoréduction**

Pour limiter la production de glycérol, il est possible d'introduire d'autres réactions ou voies métaboliques pour réoxyder le NADH en excès. Différentes stratégies ont été testées.

#### **3.3.2.1. Régénération de NAD<sup>+</sup> par expression d'une transhydrogénase**

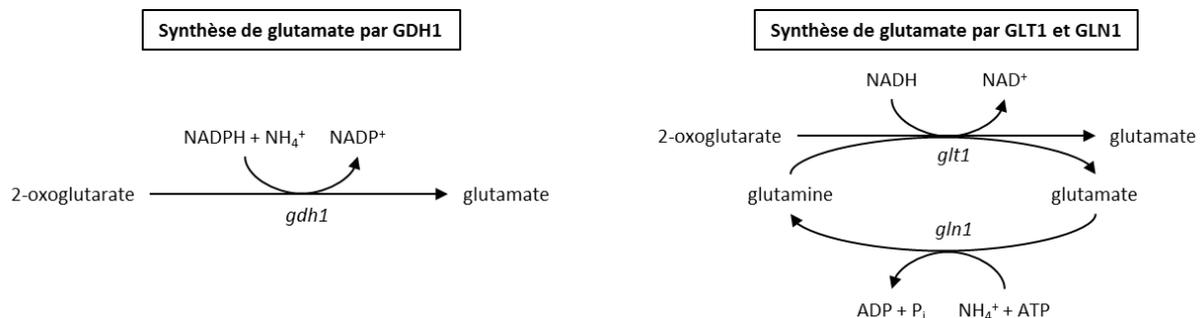
Une transhydrogénase membranaire d'*E. coli* a été exprimée chez *S. cerevisiae* dans le but de réoxyder le NADH excédentaire. En effet, chez *E. coli*, cette enzyme est capable de produire NADPH et NAD<sup>+</sup> à partir de NADP<sup>+</sup> et NADH et elle serait donc susceptible chez la levure de régénérer NAD<sup>+</sup> à la place de la glycérol-phosphate déshydrogénase. Son expression chez *S. cerevisiae* a conduit en conditions anaérobies à la production de 2-oxoglutarate, qui est liée à un excès de NADP<sup>+</sup> et a augmenté la production de glycérol et d'acétate du fait d'un excès de NADH. Contrairement à ce qui était attendu, la transhydrogénase n'était pas localisée dans la membrane plasmique, mais dans la membrane du réticulum endoplasmique, sans que cela ne nuise à son efficacité catalytique. La mesure des concentrations intracellulaires de NADP<sup>+</sup>, NADPH, NAD<sup>+</sup> et NADH a montré que la transhydrogénase fonctionnait dans le sens contraire au sens souhaité et catalysait la consommation de NADPH pour produire du NADH (Anderlund *et al.*, 1999).

Un autre essai a été réalisé en exprimant une transhydrogénase cytosolique d'*Azotobacter vinelandii* dans une souche  $\Delta gpd1 \Delta gpd2$ . Cependant, l'expression de la transhydrogénase n'a pas suffi à compléter les délétions en conditions anaérobies: comme la réaction de transhydrogénation est réversible, il faut une déplétion assez importante en NAD<sup>+</sup> avant que la réaction ne soit favorisée dans le sens de sa synthèse. Cette déplétion était visiblement trop importante et empêchait la biosynthèse cellulaire avant que la réaction ne soit favorisée dans le sens désiré. En conditions aérobies, la double

délétion *Δgpd1 Δgpd2* a provoqué un retard de croissance important qui, dans le cas de l'expression de la transhydrogénase, était encore aggravé car la réaction catalysée allait à nouveau dans le sens de la formation de NADH (Nissen *et al.*, 2000a). L'expression de la transhydrogénase d'*A. vinelandii* dans une souche de *S. cerevisiae* non délétée a confirmé le fonctionnement de l'enzyme dans le sens de la formation de NADP<sup>+</sup> et NADH, avec pour conséquence la production d'oxoglutarate et de glycérol, la diminution de la production d'éthanol et une baisse de la vitesse de croissance (Nissen *et al.*, 2001).

### 3.3.2.2. Réoxydation de NADH par couplage avec la production de glutamate

Une autre stratégie testée consiste en la surexpression de certaines réactions du métabolisme de l'ammonium pour réoxyder le NADH. Chez *S. cerevisiae*, la production de glutamate provient principalement de l'action de la glutamate déshydrogénase 1, encodée par le gène *gdh1*, qui transforme l'oxoglutarate en glutamate en consommant du NADPH (Figure 33). La formation de glutamate est également possible par une voie ayant pour intermédiaire la glutamine et faisant appel à la glutamate synthase et la glutamine synthétase, encodées respectivement par les gènes *glt1* et *gln1*. La formation de glutamate par ce couple de réactions consomme du NADH et de l'ATP.



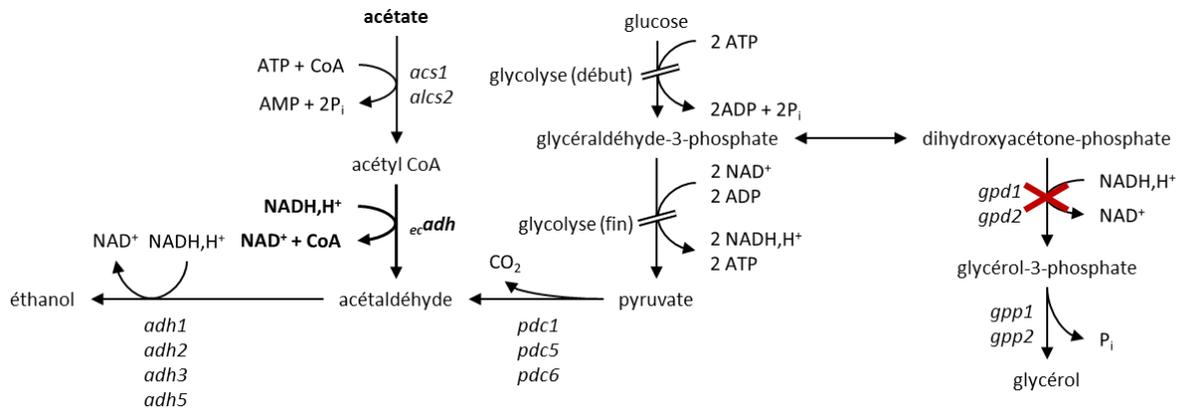
**Figure 33.** Voies de formations du glutamate considérées pour l'étude de Nissen *et al.*  
*gdh1*: glutamate déshydrogénase; *glt1*: glutamate synthase; *gln1*: glutamine synthétase.

Pour assurer la réoxydation de NADH dans le cadre de la production d'éthanol, la stratégie mise en place a consisté en la délétion de *gdh1* et la surexpression de *glt1* et *gln1*. Cette stratégie a permis d'augmenter le rendement de production d'éthanol de 10% et de baisser le rendement de production de glycérol de 38%. La souche ainsi obtenue présentait une vitesse de croissance légèrement inférieure à la souche contrôle, mais il semble que le fait d'augmenter encore la surexpression de *glt1* et *gln1* pourrait résoudre ce problème (Nissen *et al.*, 2000b).

### 3.3.2.3. Réoxydation de NADH par couplage avec la réduction de l'acétate

Une approche consistant à remplacer le glycérol par de l'acétate comme substrat pour la réoxydation de NADH a été testée. Cette utilisation de l'acide acétique est notamment valorisable dans le cadre de la production d'éthanol 2G, car l'acide acétique fait partie des co-produits issus de l'hydrolyse de la biomasse lignocellulosique. Dans un contexte *Δgpd1 Δgpd2*, une acétaldéhyde déshydrogénase NAD-dépendante d'*E. coli* a été exprimée (Figure 34) et a permis de restaurer la croissance en conditions anaérobies sur un milieu contenant 2 g/L d'acide acétique. Le rendement en éthanol a également été augmenté de 13%. Cependant, la souche modifiée a montré une vitesse de croissance diminuée de moitié par rapport à la souche contrôle, probablement à cause de problèmes d'osmotolérance en l'absence de production de glycérol (Medina *et al.*, 2010). La surexpression de l'acétaldéhyde

déshydrogénase d'*E. coli* dans une souche non délétée en conditions anaérobies a permis d'augmenter le rendement de production d'éthanol de 1,4% et de baisser le rendement de production de glycérol de 11% sans ajout d'acide acétique (Zhang *et al.*, 2011). En supplémentant le milieu avant inoculation avec 2 g/L d'acide acétique, l'augmentation du rendement de production d'éthanol s'élevait à 4,3% et la baisse du rendement de production de glycérol était de 40%, sans effet négatif sur la croissance.



**Figure 34.** Stratégie de réoxydation du NADH par consommation d'acétate dans un contexte  $\Delta gpd1 \Delta gpd2$ . *gpd*: gènes des isoformes de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase; *gpp*: gènes des isoformes de la glycérol-3-phosphate phosphatase; *pdc*: gènes des isoformes de la pyruvate décarboxylase; *adh*: gènes des isoformes de l'acétaldéhyde déshydrogénase; *ecadh*: gène de l'acétaldéhyde déshydrogénase NAD-dépendante d'*E. coli*.

### 3.3.2.4. Réoxydation par une NADH oxydase

Des études ont été menées pour déterminer l'impact d'une modification des cofacteurs d'oxydoréduction sur le métabolisme de *S. cerevisiae*. Ces études reposaient sur deux stratégies de surexpression: surexpression d'un gène *nox* de *Streptococcus pneumoniae* (Hou *et al.*, 2009a; Vemuri *et al.*, 2007) ou de *Lactococcus lactis* (Heux *et al.*, 2006) codant pour une NADH oxydase ou surexpression d'une oxydase alternative de *Histoplasma capsulatum* (Hou *et al.*, 2009a; Vemuri *et al.*, 2007). Ces deux oxydases catalysent la réaction d'oxydation de NADH en  $NAD^+$  par  $O_2$ . Les essais ont donc été menés en conditions aérobies ou microaérobies. Les résultats montrent que l'expression de la NADH oxydase, qui est localisée dans le cytosol, a provoqué une baisse de production de glycérol, mais sans impact positif sur la production d'éthanol, avec parfois même une diminution de celle-ci (Heux *et al.*, 2006). L'expression de l'oxydase alternative, localisée dans la mitochondrie, n'a pas eu d'impact sur la formation de glycérol (Hou *et al.*, 2009b). La stratégie de réoxydation de NADH par des oxydases ne semble pas adaptée à la production d'éthanol, surtout en raison des conditions aérobies requises pour le fonctionnement des enzymes.

### 3.3.2.5. Phosphorylation de NADH

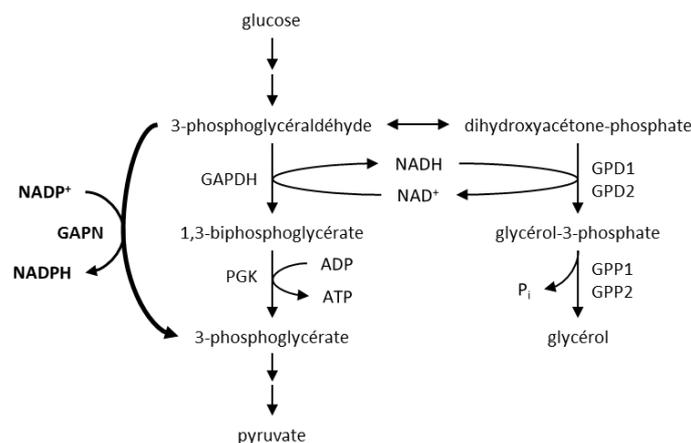
L'impact de la phosphorylation de NADH sur la production d'éthanol a également été étudié. *S. cerevisiae* possède deux enzymes NADH kinases cytosoliques, codées par les gènes *utr1* et *yef1* et une enzyme NADH kinase mitochondriale, codée par le gène *pos5*. Ces enzymes catalysent la réaction de formation de NADPH en consommant du NADH et de l'ATP. Pour augmenter la production d'éthanol, la NADH kinase a été surexprimée soit dans la mitochondrie, soit dans le cytosol, en supprimant le signal d'adressage mitochondrial de la séquence du gène *pos5*. La surexpression de l'enzyme dans le cytosol en croissance sur glucose montre une redirection du flux de carbone de  $CO_2$  vers l'éthanol en conditions aérobies et de  $CO_2$  vers l'éthanol et l'acétate en conditions anaérobies. En

croissance sur xylose, l'effet n'est pas le même et l'enzyme favorise la formation de xylitol au détriment de l'éthanol. L'augmentation de l'expression de la NADH kinase dans la mitochondrie n'a par contre montré aucun effet physiologique significatif (Hou *et al.*, 2009b).

### 3.3.2.6. Contournement de la production de NADH

Une stratégie pour limiter la production de glycérol a été obtenue grâce à une modélisation à l'échelle du génome de *S. cerevisiae* et consiste à contourner la réaction produisant du NADH en exprimant une enzyme, la 3-phosphoglyceraldéhyde déshydrogénase NADP<sup>+</sup>-dépendante et non phosphorylante (GAPN), qui permet de former du 3-phosphoglycérate directement à partir du 3-phosphoglyceraldéhyde en consommant du NADP<sup>+</sup> (Figure 35). L'expression de la GAPN de *Streptococcus mutans* a permis de diminuer le rendement de production de glycérol de 40% et d'augmenter le rendement de production d'éthanol de 3% sans effet négatif sur la vitesse de croissance (Bro *et al.*, 2006). La surexpression de la GAPN de *Bacillus cereus* en conditions anaérobies a eu un effet moins important et a conduit à une augmentation du rendement de production d'éthanol de 2,5% et une diminution du rendement de production de glycérol de 23% (Zhang *et al.*, 2011).

L'expression de GAPN a également été testée dans un contexte *Δgpd2*: la surexpression de la GAPN de *Bacillus cereus* a conduit à une augmentation du rendement de production d'éthanol de 7,6% et une diminution du rendement de production de glycérol de 48,7%. La surexpression de la GAPN de *Kluyveromyces lactis* en conjonction avec la délétion *gpd2* a permis d'augmenter le rendement de production d'éthanol de 7,34% et de baisser le rendement de production de glycérol de 52,9% (Guo *et al.*, 2011).



**Figure 35.** Surexpression d'une 3-phosphoglyceraldéhyde déshydrogénase NADP<sup>+</sup>-dépendante et non phosphorylante (GAPN) pour la production d'éthanol.

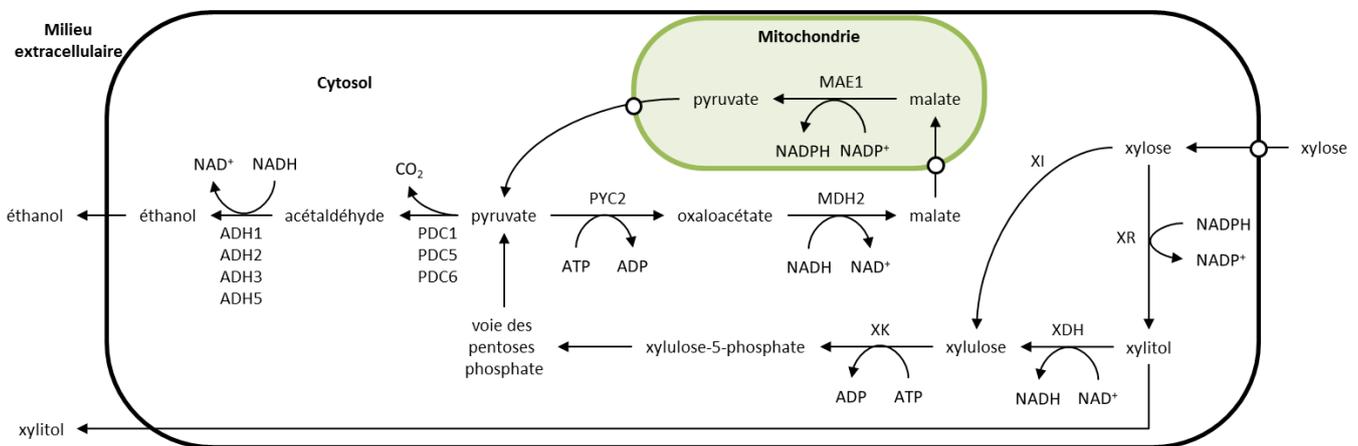
GAPDH: 3-phosphoglyceraldéhyde déshydrogénase phosphorylante; PGK: phosphoglycérate kinase; GPD: glycérol phosphate déshydrogénase; GPP: glycérol phosphate phosphatase; GAPN: 3-phosphoglyceraldéhyde déshydrogénase non phosphorylante NADP<sup>+</sup> dépendante.

### 3.3.2.7. Effet transhydrogénase par construction d'une voie métabolique

Un effet transhydrogénase peut être obtenu par les réactions de la pyruvate carboxylase PYC2, de la malate déshydrogénase cytosolique MDH2 et de l'enzyme malique mitochondriale MAE1 (Figure 36): le bilan global de ces trois réactions montre une consommation de NADH et d'ATP et une production de NADPH, ce qui correspond à une réaction de transhydrogénation. Dans le cadre de la production

d'éthanol 2G chez une souche de *S. cerevisiae* pouvant métaboliser les pentoses, les trois gènes *pyc2*, *mdh2* et *mae1* ont donc été surexprimés selon différentes combinaisons dans le but de tempérer les problèmes de réoxydation de cofacteurs en croissance sur xylose et xylulose (Suga *et al.*, 2012). Des essais de fermentation en conditions semi-anaérobies ont montré une amélioration du rendement de production d'éthanol pour la souche surexprimant soit uniquement *mae1* (rendement augmenté de plus de 20%), soit *mae1* et *mdh2* (rendement augmenté de 13%). La surexpression simultanée des trois gènes n'a cependant pas permis d'augmenter le rendement d'éthanol. Ceci semblait dû à une augmentation de la production de xylitol par rapport à la souche contrôle, alors que les souches surexprimant *mae1* ou *mae1* et *mdh2* métabolisaient le xylitol plus rapidement que la souche contrôle.

Des essais sur glucose n'ont montré aucune amélioration du rendement de production d'éthanol, bien que la vitesse de consommation du glucose ait été améliorée chez la souche exprimant *pyc2*, *mdh2* et *mae1*. L'explication avancée s'appuie sur la spécificité de substrat de MAE1, qui peut consommer du  $\text{NAD}^+$  et du  $\text{NADP}^+$ . Si l'enzyme consomme du  $\text{NAD}^+$ , l'effet transhydrogénase n'est pas réalisé et le cycle mis en place ne fait que drainer de l'ATP, ce qui peut être compensé en augmentant la vitesse de consommation du substrat. Cette explication avancée par les auteurs ne tient cependant pas compte du fait qu'en croissance sur glucose, l'enzyme MDH2 est dégradée et ne devrait donc pas fonctionner (Minard and McAlister-Henn, 1992).



**Figure 36.** Description de la voie métabolique créant l'effet transhydrogénase dans une souche de *S. cerevisiae* exprimant la xylose isomérase (d'après Suga *et al.*, 2013).

ADH: isoformes de l'acétaldéhyde déshydrogénase; XR: xylose réductase; XI: xylose isomérase; XDH: xylitol déshydrogénase; XK: xylulokinase; PDC: isoformes de la pyruvate décarboxylase; PYC2: pyruvate carboxylase; MDH2: malate déshydrogénase cytosolique; MAE1: enzyme malique.

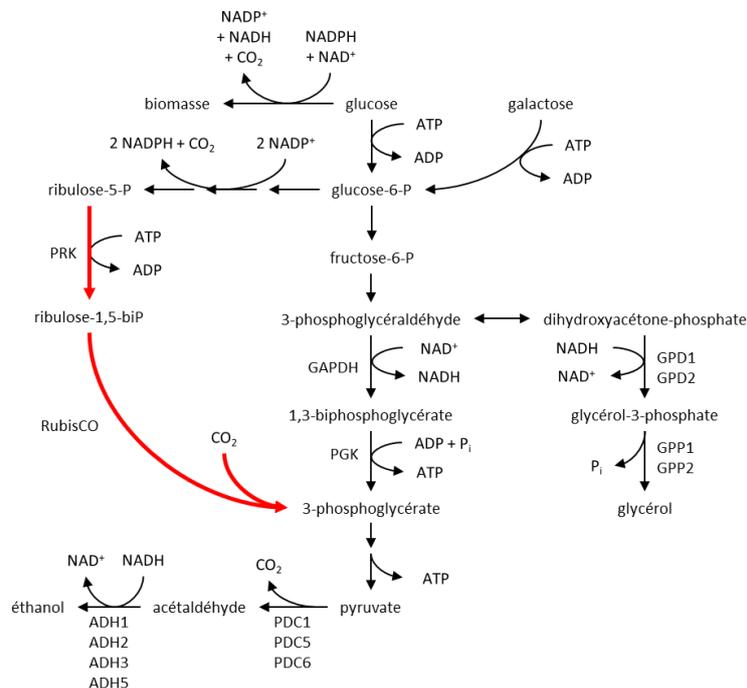
### 3.3.3. Diminution de l'ATP disponible

L'augmentation du rendement d'éthanol peut également passer par la limitation de l'ATP disponible pour la génération de biomasse et donc de cofacteurs réduits tels que NADH. Une méthode envisagée pour réduire la production d'ATP au cours de fermentations sur saccharose, qui est fréquemment utilisé comme substrat pour la production industrielle d'éthanol, consiste en la modification du gène *suc2*, qui code pour une invertase. L'invertase catalyse l'hydrolyse du saccharose en glucose et fructose. Des codons d'initiation alternatifs lui permettent d'être dirigée soit dans le milieu extracellulaire, soit dans le cytosol. C'est la forme extracellulaire qui est majoritairement produite: l'hydrolyse du saccharose a donc lieu dans le milieu et le fructose et le glucose produits entrent dans la cellule par diffusion facilitée sans consommation d'énergie. En revanche, lorsque l'invertase reste dans le cytosol, le saccharose doit être transporté avec des protons via un symport qui consomme de l'ATP.

La stratégie mise en place a permis de modifier le promoteur de sorte à obtenir une forme d'invertase majoritairement cytosolique, afin de consommer de l'ATP par le symport du saccharose. Cela a permis d'augmenter le rendement de production d'éthanol de 4% (Basso *et al.*, 2011). Cependant, le transport de saccharose n'était pas optimal. Une phase d'évolution dirigée a permis d'obtenir une souche arborant une capacité de transport du saccharose améliorée et affichant une augmentation du rendement de production d'éthanol de 11%, une diminution de 20% du rendement de glycérol et une diminution de 30% de la biomasse produite. L'analyse de la souche par ingénierie inverse a montré une augmentation de l'expression du gène *agt1*, impliqué dans le transport des disaccharides.

### 3.3.4. Recyclage du CO<sub>2</sub> par expression d'une RubisCO

Plus récemment, l'expression d'une RubisCO bactérienne chez *S. cerevisiae* pour la réoxydation de NADH en utilisant CO<sub>2</sub> comme accepteur d'électron a été proposée (Figure 37). La stratégie a consisté en l'expression de la RubisCO de la bactérie chémolithoautotrophe *Thiobacillus denitrificans* et de la phosphoribulokinase (PRK) de *Spinacia oleracea*. L'expression des protéines chaperonnes d'*E. coli* GroEL et GroES s'est révélée nécessaire pour parvenir à l'expression d'une RubisCO fonctionnelle, l'expression des protéines chaperonnes de *T. denitrificans* ne permettant pas d'obtenir d'enzyme active.



**Figure 37.** Schéma de la stratégie d'expression d'une RubisCO pour la réoxydation de NADH par fixation de CO<sub>2</sub> chez *S. cerevisiae* d'après Guadalupe-Medina *et al.*, 2013.

PRK: phosphoribulokinase; GAPDH: glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase; PGK: phosphoglycérate kinase; GPD: glycérol-3-phosphate déshydrogénase; GPP: glycérol-1-phosphatase; PDC: pyruvate décarboxylase; ADH: alcool déshydrogénase.

Les essais de fermentation de la souche ont d'abord été réalisés en chimostat en conditions anaérobies, avec ou sans apport de CO<sub>2</sub>, avec du glucose et du galactose comme source de carbone (les gènes de la PRK et des protéines chaperonnes étant sous le contrôle d'un promoteur galactose). Les résultats montrent une réduction du rendement de production de glycérol de 90% et une augmentation du rendement de production d'éthanol de 10% (Guadalupe-Medina *et al.*, 2013). La supplémentation en CO<sub>2</sub> a permis d'obtenir la baisse la plus importante de la production de glycérol. L'expression de la

RubisCO sans le gène de la PRK ne montre pas de baisse du titre en glycérol, ce qui indique que l'expression d'une PRK hétérologue est indispensable assurer la fixation de carbone par la RubisCO.

Des essais réalisés en batch sur galactose montrent une réduction du rendement de glycérol de 60% et une augmentation du rendement d'éthanol de 8% sans modification de la vitesse de croissance spécifique, mais la souche modifiée présente néanmoins une période de latence de 10 heures supplémentaires par rapport à la souche contrôle. Cette stratégie a fait l'objet d'un dépôt de brevet (Van Maris *et al.*, 2014) mais son utilisation dans des souches de levures industrielles va cependant demander une optimisation de l'expression des gènes de la PRK (qui est sous contrôle du promoteur *GAL*) et de la RubisCO, afin de pouvoir conserver une croissance rapide en présence de hautes concentrations de glucose.

## **4. Objectifs: implémentations de voies de fixation de CO<sub>2</sub> pour la production de molécules d'intérêt**

### **4.1. Organisme hôte**

#### **4.1.1. Développement des "cell factories"**

Les besoins industriels de production de multiples composés par voie biotechnologique requièrent l'utilisation d'usines cellulaires (*cell factories* en anglais). Il s'agit d'organismes bien caractérisés qui pourraient servir de plateformes pour la production de toutes sortes de molécules valorisables industriellement, telles que des alcools, des acides organiques, des acides aminés, des principes actifs de médicaments ou des polymères. Actuellement, les organismes les plus utilisés sont les bactéries *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum* et *Bacillus subtilis*; les champignons filamenteux *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* et *Penicillium chrysogenum* et la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Chen et Nielsen, 2013).

#### **4.1.2. Contexte particulier de la production d'acides organiques**

Les travaux sur la production d'acides organiques par biotechnologie blanche se portent à l'heure actuelle sur l'implémentation de conditions de fermentation à pH acide. En effet, les procédés actuels requièrent une neutralisation du milieu de fermentation par ajout d'une base pour préserver les cellules, les bactéries qui sont majoritairement utilisées supportant mal l'acidification du milieu consécutif à la production d'acide. Cependant, la neutralisation de l'acide produit a des conséquences négatives importantes sur le procédé aval "downstream processing", nécessaire pour récupérer l'acide sous forme moléculaire.

Dans le cadre de la production d'acide succinique par exemple, on peut estimer que le maintien d'un pH neutre pour la production d'une tonne de succinate requiert l'utilisation d'une demi-tonne de KOH. Le sel de succinate obtenu doit ensuite être purifié et acidifié pour obtenir l'acide sous forme moléculaire, ce qui consomme environ une tonne d'acide sulfurique. Le bilan de ces opérations est le rejet d'une tonne de sels inorganiques qui peuvent être utilisés pour d'autres utilisations, mais pas recyclés (Yuzbashevet *al.*, 2011). L'utilisation et la production des diverses bases et acides pour les étapes de fermentation et de purification présentent donc un coût et un impact environnemental énormes dans le procédé de production d'acides organiques à l'échelle industrielle.

### 4.1.3. Choix de *Saccharomyces cerevisiae* comme organisme hôte

La levure *S. cerevisiae* est un hôte de choix du fait de sa grande robustesse aux stress imposés par les procédés industriels, comme en témoigne son utilisation extensive pour la production de bioéthanol ainsi que dans l'industrie alimentaire et la brasserie. De plus, il s'agit d'un organisme modèle, non pathogène possédant le statut GRAS (Generally Recognized As Safe) très important pour les produits agroalimentaires. Un de ses avantages pour la production de molécules d'intérêt, et notamment d'acides organiques, réside dans sa bonne résistance aux pH acides et sa bonne osmotolérance (Raab and Lang, 2011). Par ailleurs, *S. cerevisiae* correspond à la définition de microorganisme polyvalent pour l'ingénierie métabolique dans la mesure où son génome a été entièrement séquencé, sa physiologie est connue, des outils génétiques et de modélisation utilisables à des fins de biologie synthétique sont disponibles (Nielsen *et al.*, 2013; Ostergaard *et al.*, 2000). D'autres levures peuvent également être utilisées, telles que *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia stipitis* et *Kluyveromyces lactis*. Cependant, bien que des outils génétiques soient disponibles pour certaines de ces levures comme *K. lactis* par exemple (Schaffrath et Breunig, 2000), *S. cerevisiae* reste un modèle de choix en tant que microorganisme plateforme.

## 4.2. Développement des stratégies d'ingénierie métabolique

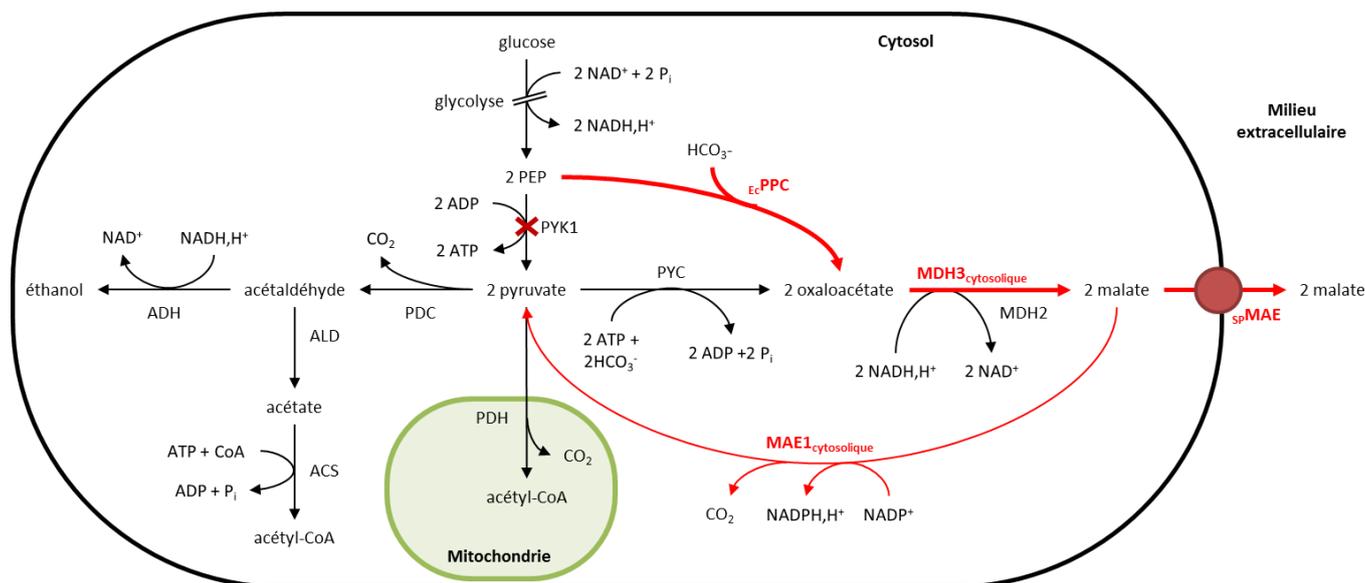
A partir de l'étude bibliographique réalisée sur les mécanismes de fixation de carbone inorganique et sur les travaux menés en hôtes procaryotes et eucaryotes, nous avons développé des approches d'ingénierie métabolique impliquant une fixation de carbone inorganique pour la production de composés d'intérêt chez *Saccharomyces cerevisiae*.

### 4.2.1. Production d'acide malique dans une souche $\Delta pyk1$

#### 4.2.1.1. Description de la stratégie

Cette stratégie repose sur l'utilisation d'une souche de *S. cerevisiae* ne produisant pas de pyruvate par délétion du gène *pyk1*, codant pour l'isoforme de la pyruvate kinase active en croissance sur glucose. La molécule d'intérêt produite est le malate. L'expression de la PEP carboxylase d'*E. coli* permet de produire de l'oxaloacétate directement à partir du PEP en court-circuitant le nœud métabolique du pyruvate. L'oxaloacétate est ensuite converti en malate par la malate déshydrogénase peroxysomale relocalisée dans le cytosol et exporté dans le milieu extracellulaire par le transporteur d'acide dicarboxylique de *S. pombe* sur le modèle de ce qui a déjà été fait pour la production de malate chez *S. cerevisiae* (Zelle *et al.*, 2008) (Figure 38). Les gènes de la PEP carboxylase, la malate déshydrogénase et du transporteur sont placés sous contrôle d'un promoteur fort *GPD*.

Un système de production de pyruvate à partir du malate par action de l'enzyme malique mitochondriale relocalisée dans le cytosol permettrait de pallier d'éventuels problèmes de croissance dus à l'absence de production directe de pyruvate en assurant un niveau minimal de pyruvate dans la cellule.

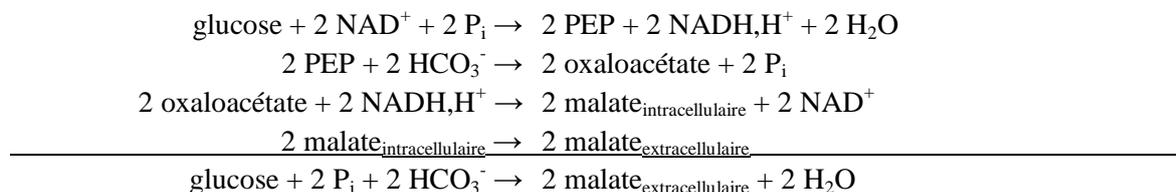


**Figure 38.** Schéma de principe de la stratégie d'ingénierie métabolique de production d'acide malique. Les flèches rouges indiquent les gènes utilisés pour la stratégie. Les flèches en gras indiquent les surexpressions. La croix indique la délétion. PYK1 : pyruvate kinase ; *EcPPC* : PEP carboxylase d'*Escherichia coli* ; PDC : pyruvate décarboxylase ; ADH : alcool déshydrogénase ; ALD : aldéhyde déshydrogénase ; ACS : acétyl-CoA synthétase ; PYC : pyruvate carboxylase ; PDH : complexe de la pyruvate déshydrogénase ; MDH2 : isoforme cytosolique de la malate déshydrogénase ; MDH3<sub>cytosolique</sub> : isoforme peroxysomale de la malate déshydrogénase relocalisée dans le cytosol ; *spMAE* : transporteur d'acides dicarboxyliques de *Schizosaccharomyces pombe* ; MAE1<sub>cytosolique</sub> : enzyme malique mitochondriale relocalisée dans le cytosol.

#### 4.2.1.2. Rendement théorique et bilan réactionnel

Le rendement théorique maximal de la voie métabolique mise en place est de 2 moles de malate produites et 2 moles de carbone inorganique fixées par mole de glucose consommée.

Bilan réactionnel ( $P_i$  représente le phosphate inorganique) :



#### 4.2.1.3. Limitations

Une limitation pour cette stratégie réside dans la complémentation de la délétion de *pyk1* par la PEP carboxylase en conditions de croissance sur glucose. La littérature montre que la délétion de *pyk1* empêche la croissance sur glucose (Sprague, 1977) et l'expression de la PEP carboxylase devrait permettre de restaurer cette croissance, mais cela n'a encore jamais été testé.

L'aspect énergétique peut également potentiellement poser problème: avec la voie de production du malate comprenant la PEP carboxylase, le bilan énergétique de la glycolyse devient nul. Il faudra donc probablement se placer en conditions (micro)aérobies pour que la cellule puisse produire de l'ATP en respiration. On peut également envisager l'expression de la PEP carboxykinase à la place de la PEP carboxylase: la PEP carboxykinase est en effet capable de carboxyler le PEP en oxaloacétate en produisant une molécule d'ATP. Cependant, c'est une enzyme qui a un fonctionnement réversible, et

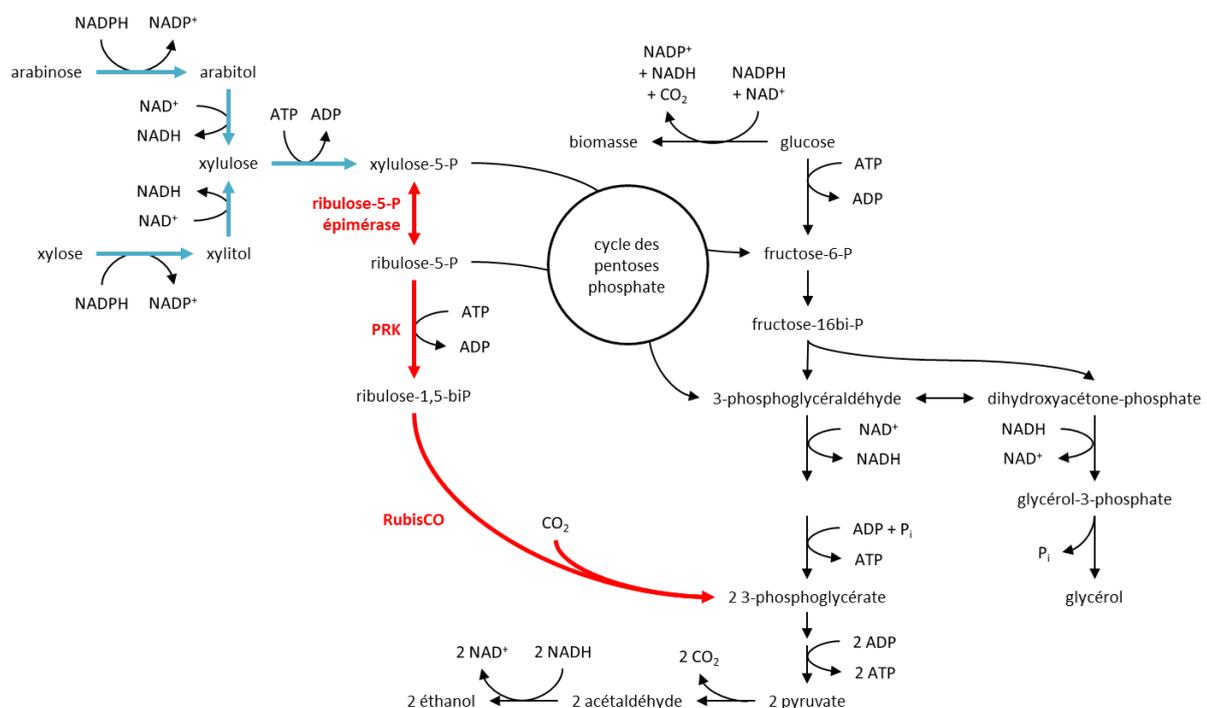
qui catalyse normalement la réaction de décarboxylation de l'oxaloacétate en PEP; son utilisation inclut donc potentiellement une phase d'évolution dirigée pour obtenir une enzyme fonctionnant dans le sens souhaité.

## 4.2.2. Production d'éthanol par expression de la RubisCO

### 4.2.2.1. Description de la stratégie

L'idée consiste ici à exprimer une ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygénase (RubisCO) afin de recycler le CO<sub>2</sub> résultant de la production d'éthanol par décarboxylation du pyruvate (Figure 39). Cette stratégie se positionne plus précisément dans le cadre de la production d'éthanol de deuxième génération: le substrat peut être constitué uniquement de pentoses, type xylose ou arabinose, ou d'un mélange pentoses/hexoses. Cette approche peut également fonctionner en croissance sur hexose uniquement (Guadalupe-Medina *et al.*, 2013), mais il s'agit alors de recycler le carbone issu de la décarboxylation du CO<sub>2</sub>, et pas de fixer du carbone inorganique supplémentaire.

Par ailleurs, en croissance sur pentoses, l'utilisation d'une souche de *Saccharomyces* capable de métaboliser les pentoses (le xylose et/ou l'arabinose) est donc indispensable. Le xylose ou l'arabinose sont métabolisés en xylulose-5-phosphate, qui est ensuite transformé en ribulose-1,5-biphosphate, le substrat de la RubisCO, par la ribulose-5 phosphate épimérase et la phosphoribulokinase. La RubisCO permet alors la fixation de carbone pour former du 3-phosphoglycérate, qui va entrer dans la voie de la glycolyse et former du pyruvate. Il faut par ailleurs noter qu'une partie du xylulose-5-phosphate et du ribulose-5-phosphate produits vont rejoindre la voie de la glycolyse sans passer par la RubisCO via la voie des pentoses phosphate.



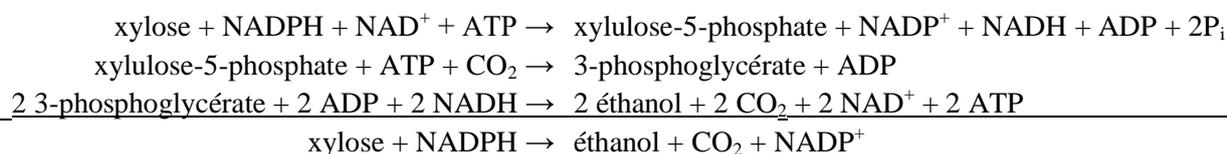
**Figure 39.** Stratégie de production d'éthanol de deuxième génération chez *Saccharomyces cerevisiae* reposant sur la co-fixation de carbone par la RubisCO.

En noir: voies métaboliques natives. En bleu: voies de métabolisation de l'arabinose et du xylose. En rouge: voie métabolique de conversion du xylulose-5-phosphate en 3-phosphoglycérate avec fixation de carbone.

#### 4.2.2.2. Rendement théorique et bilan réactionnel

Le rendement théorique maximal ne peut pas être calculé de façon simple car on ne connaît pas *a priori* la quantité de xylulose-5-phosphate qui va être métabolisée par la voie des pentoses phosphate et la quantité qui va emprunter la voie mise en place par expression de la RubisCO. On peut néanmoins calculer un bilan réactionnel pour le xylose en admettant qu'il est entièrement métabolisé par la voie métabolique ribulose-5-phosphate épimérase, phosphoribulokinase et RubisCO.

Bilan réactionnel ( $P_i$  représente le phosphate inorganique) :



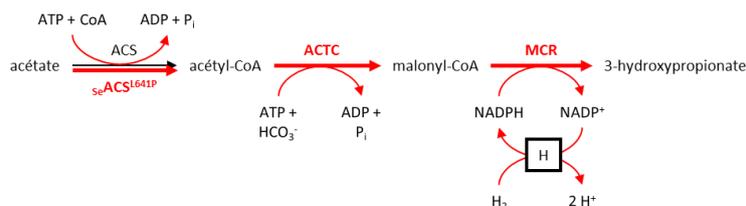
#### 4.2.2.3. Limitations

Cette stratégie est limitée par deux aspects: le premier est le dépôt d'un brevet (Dai *et al.*, 2008) sur une stratégie similaire (brevet qui n'a finalement pas été entretenu par les auteurs) et le second concerne la souche de *Saccharomyces cerevisiae* à utiliser pour mettre en place cette approche. En effet, comme cela a été mentionné dans la présentation de la stratégie, nous nous plaçons ici dans un contexte de production d'éthanol de deuxième génération: il faut donc que la souche utilisée soit capable de métaboliser les pentoses. Nous sommes donc limités par le fait que nous ne possédons pas une telle souche, et que nous ne pouvons pas envisager de la construire nous-mêmes, car les modifications génétiques à mettre en place pour permettre cette métabolisation sont assez lourdes.

#### 4.2.3. Production d'acide 3-hydroxypropionique à partir d'acétate

##### 4.2.3.1. Description de la stratégie

Pour cette stratégie, une voie cytosolique de production de 3-hydroxypropionate via le malonyl-CoA à partir d'acétate et de dihydrogène est mise en place (Figure 40). L'acétate est métabolisé en acétyl-CoA plus rapidement que dans une souche sauvage grâce à l'expression de l'acétyl-CoA synthétase d'un variant de *Salmonella enterica* (Starai *et al.*, 2005). L'acétyl-CoA est carboxylé en malonyl-CoA par une acétoacétyl-CoA carboxylase, et le malonyl-CoA est ensuite réduit en 3-hydroxypropionate par la malonyl-CoA réductase qui consomme du NADPH. Le NADPH oxydé par la malonyl-CoA réductase est régénéré par l'action d'une hydrogénase hétérologue.



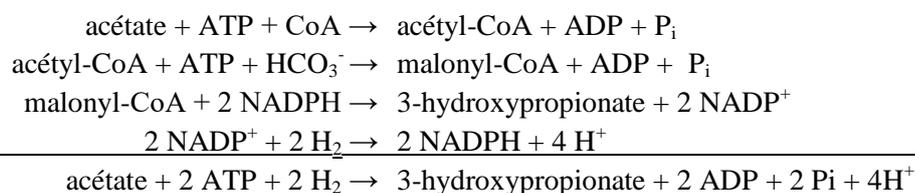
**Figure 40.** Schéma de principe pour la stratégie de production de 3-HP à partir d'acétate.

Les flèches rouges indiquent les gènes utilisés pour la stratégie. Les flèches en gras indiquent les surexpressions. La croix indique la délétion. ACS: acétyl-CoA synthétase native;  $\text{seACS}^{L641P}$ : acétyl-CoA carboxylase d'un variant de *Salmonella enterica* insensible à l'acétylation ; ACTC: acétoacétyl-CoA carboxylase; H: hydrogénase; MCR; malonyl-CoA réductase; H: hydrogénase.

### 4.2.3.2. Rendement théorique et bilan réactionnel

Le rendement maximal théorique de la voie mise en place est d'une mole de 3-hydroxypropionate produite et une mole de CO<sub>2</sub> fixée par mole d'acétate consommée.

Bilan réactionnel (P<sub>i</sub> représente le phosphate inorganique) :



### 4.2.3.3. Limitations

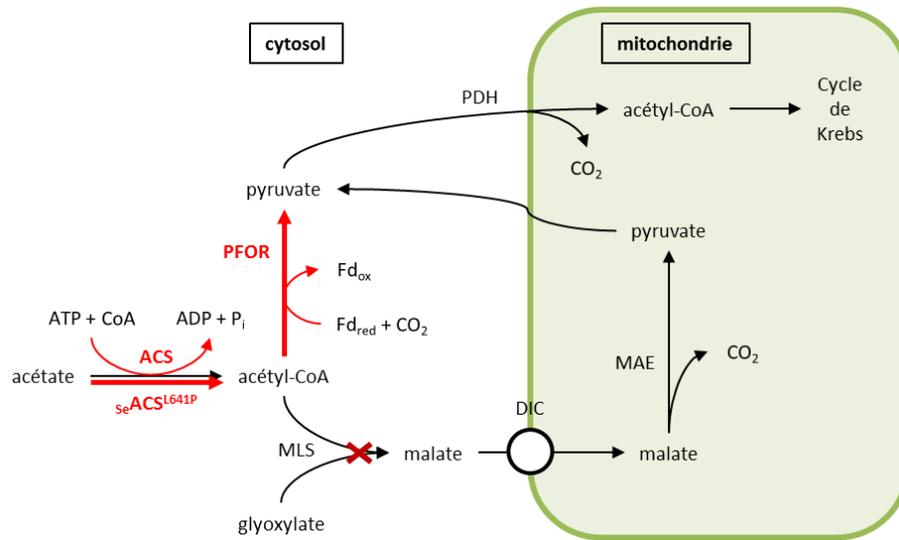
L'expression de l'acétoacétyl-CoA carboxylase, la malonyl-CoA réductase et l'hydrogénase n'est pas documentée chez *S. cerevisiae* et représente donc une limitation potentielle pour cette stratégie. L'utilisation d'hydrogène représente également un frein car c'est un gaz qui nécessite de grandes précautions d'utilisation, d'autant plus dans ce cas où la métabolisation de l'acétate nécessiterait de se placer en conditions aérobies, donc en présence d'oxygène, ce qui augmente les risques liés à la manipulation de l'hydrogène.

## 4.2.4. Mise en place d'une fixation de CO<sub>2</sub> avec croissance sur acétate

### 4.2.4.1. Description de la stratégie

Cette stratégie repose sur l'utilisation de la pyruvate:ferrédoxine oxydoréductase (PFOR) dans le sens pyruvate synthase, c'est-à-dire pour former du pyruvate à partir de l'acétyl-CoA et de CO<sub>2</sub> (Figure 41). Cette stratégie constituerait une preuve de concept pour l'expression d'une PFOR chez *S. cerevisiae*.

La croissance sur acétate permet de former de l'acétyl-CoA cytosolique par expression de l'acétyl-CoA synthétase d'un variant de *Salmonella enterica*. La PFOR permet ensuite de former du pyruvate dans le cytosol en fixant du CO<sub>2</sub>. Le pyruvate peut ensuite être utilisé pour la formation de biomasse. Afin d'éviter la formation de pyruvate par l'intermédiaire du malate, le gène de la malate synthase doit être délété. La formation de pyruvate par une autre voie n'est pas souhaitable car la PFOR a un fonctionnement bidirectionnel et serait susceptible de catalyser la décarboxylation du pyruvate en acétyl-CoA, ce qui n'est pas le sens souhaité.



**Figure 41.** Schéma de principe de la stratégie d'ingénierie métabolique pour la croissance sur acétate. Les flèches rouges indiquent les gènes utilisés pour la stratégie. Les flèches en gras indiquent les surexpressions. La croix indique la délétion. ACS: acétyl-CoA synthétase native; SeACSL641P: acétyl-CoA carboxylase d'un variant de *Salmonella enterica* insensible à l'acétylation ;PFOR: pyruvate-ferrédoxine oxydo-réductase; PDH: pyruvate déshydrogénase; MLS: malate synthase; DIC: transporteur de malate; MAE: enzyme malique mitochondriale.

#### 4.2.4.2. Rendement théorique et bilan réactionnel

Le rendement théorique maximal de la stratégie mise en place est d'une mole de pyruvate produite et une mole de CO<sub>2</sub> fixée par mole d'acétate consommée.

#### 4.2.4.3. Limitations

Des limitations sont cependant à émettre concernant les aspects d'oxydoréduction (régénération de la ferrédoxine réduite) et d'énergétique (consommation d'une mole d'ATP par mole d'acétate métabolisée). La régénération de la ferrédoxine réduite pourrait être effectuée par une hydrogénase qui oxyderait le dihydrogène (ce qui implique les mêmes limitations que pour la stratégie de production de 3-hydroxypropionate au niveau de la manipulation d'hydrogène), ou par une NADH:ferrédoxine transhydrogénase qui oxyderait le NADH. Pour générer l'ATP requis pour la métabolisation de l'acétate, il faudrait se placer en conditions aérobies: l'ATP serait alors généré par la mitochondrie. L'expression d'enzymes de ce type et leur bon fonctionnement dans la levure ne sont pas assurés.

### 4.3. Choix de la stratégie développée

Le choix de la stratégie a été effectué en analysant les contraintes inhérentes à chacune des approches proposées. Pour les deux stratégies reposant sur une croissance sur acétate (production de 3-hydroxypropionate et croissance par expression d'une PFOR), les limitations sont multiples: l'utilisation d'hydrogène en conditions aérées représente une limitation en termes de sécurité de manipulation. Par ailleurs, l'utilisation d'hydrogène pour la réduction de cofacteurs nécessite l'utilisation d'enzymes hydrogénases, qui nécessitent l'expression de plusieurs gènes car l'enzyme est constituée de plusieurs sous-unités codées par différents gènes et a besoin de l'intervention de protéines chaperonnes pour assurer son repliement. Les autres enzymes susceptibles d'être utilisées pour ces stratégies sont également des enzymes dont le fonctionnement n'est pas garanti chez

*Saccharomyces*. Ces deux approches sont certes originales mais semblent présenter un potentiel de risque assez important.

La stratégie d'expression de la RubisCO semble plus réalisable mais affiche des limitations très concrètes qui ont déjà été citées précédemment: le dépôt d'un brevet sur une stratégie semblable et le problème de l'obtention d'une souche de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante capable de métaboliser les pentoses. Ces deux limitations ne pouvant être contournées, cette stratégie n'a pas été retenue pour la phase de développement.

C'est donc l'approche de production de malate par expression de la PEP carboxylase. Il existe également des limitations pour cette stratégie mais elles semblent moins problématiques. La limitation pour l'aspect énergétique devrait être gérée par optimisation des conditions de culture, en optimisant l'aération de sorte à assurer une production d'ATP par respiration. Concernant la complémentation de la délétion de *pyk1* par l'expression de la PEP carboxylase, c'est ce point qui constitue l'originalité de la stratégie et doit être testé dans ce projet. En cas de problème de complémentation, l'expression de l'enzyme malique relocalisée dans le cytosol peut permettre de régénérer le pyruvate ; l'apport de pyruvate dans le milieu extérieur peut également être une solution.

# Chapitre 2 : Matériel et méthodes

## 1. Microorganismes et milieux de culture

### 1.1. Milieux de culture

#### 1.1.1. Bactéries

Pour la culture des bactéries nous avons utilisé un milieu LB contenant de la peptone et du chlorure de sodium (Sigma), à raison de 8 g de poudre pour 1 L de milieu. Pour la préparation de milieu solide, de l'agar a été ajouté à raison de 20 g/L. Le milieu a été stérilisé par autoclavage 20 min à 121°C. Pour la préparation des milieux sélectifs, les antibiotiques ont été ajoutés après autoclavage : juste avant inoculation dans le milieu liquide ou avant de couler les boîtes, lorsque la température était inférieure à 60°C, pour le milieu solide. Les concentrations de travail des antibiotiques sont détaillées dans le Tableau 1.

Antibiotique	Concentration finale (µg/mL)
Ampicilline	100
Kanamycine	50
Chloramphénicol	42

Tableau 1. Antibiotiques utilisés pour les milieux sélectifs de bactéries.

#### 1.1.2. Levures

Pour la culture des levures nous avons utilisé trois types de milieux: un milieu riche contenant de la peptone et de l'extrait de levure (YPD ou YPE, composition détaillée dans le Tableau 2), un milieu synthétique commercial Yeast Nitrogen Base (YNB) avec sulfate d'ammonium et sans acides aminés (Sigma) (Tableau 3) et un milieu synthétique reconstitué (Tableau 3). Le milieu riche a été stérilisé par autoclavage 20 min à 121°C. Le milieu YNB et le milieu reconstitué ont été préparés en solutions 10 fois concentrées et stérilisés sur unité de filtration Stericup avec membrane 0,22 µm (Millipore). Après filtration les milieux synthétiques ont été conservés à 4°C.

Milieu YPD	Quantité	Milieu YPE	Quantité
Peptone	20 g	Peptone	20 g
Extrait de levure	10 g	Extrait de levure	10 g
Glucose	20 g	Ethanol	20 g
Eau distillée qsp	1 L	Eau distillée qsp	1 L

Tableau 2. Composition détaillée des milieux YPD et YPE.

Composé	Concentration	
	dans le milieu YNB (mg/L)	dans le milieu reconstitué (mg/L)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5000	5000
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1000	3000
MgSO <sub>4</sub>	500	240
EDTA	0	15
CoCl <sub>2</sub>	0	0,16
MnCl <sub>2</sub>	0	0,64
MnSO <sub>4</sub>	0,4	0
ZnSO <sub>4</sub>	0,4	2,52
CuSO <sub>4</sub>	0,04	0,19
CaCl <sub>2</sub>	100	3,40
FeSO <sub>4</sub>	0	1,64
FeCl <sub>2</sub>	0,2	0
NaMoO <sub>4</sub>	0,2	0,34
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,5	1
KI	0,1	0,1
NaCl	100	0
Biotine	0,002	0,05
Calcium pantothénate	0,4	1
Acide folique	0,002	0
Inositol	2	25
Acide nicotinique	0,4	1
Acide p-aminobenzoïque	0,2	0,2
Pyridoxine HCl	0,4	1
Riboflavine	0,2	0
Thiamine HCl	0,4	1
Acide citrique	100	0

**Tableau 3.** Compositions comparatives du milieu synthétique commercial YNB et du milieu synthétique reconstitué.

Les deux types de milieux ont été utilisés avec pour source de carbone du glucose ou de l'éthanol. Pour la propagation des cellules pour les expériences de biologie moléculaire, les substrats carbonés ont été utilisés à une concentration de 2% (m/v); pour les essais de fermentation, le glucose a été utilisé à une concentration de 10% ou 5% (m/v). Dans le cas du milieu YNB, des acides aminés et/ou une base azotée ont été ajoutés lorsque cela était nécessaire aux concentrations indiquées dans le Tableau 4. Pour la préparation de milieu solide sélectif avec généticine (G418) utilisé pour la sélection des mutants *Δpyk1*, la généticine a été ajoutée après autoclavage dans le milieu, à une concentration de 200 mg/L.

Concentration (g/L)	Substrat utilisé	Glucose 2% (m/v)	Glucose 10% (m/v)
		Ethanol 2% (m/v)	
L-histidine		0,125	0,625
L-leucine		0,500	2,500
L-tryptophane		0,075	0,375
Uracile		0,150	0,750

**Tableau 4.** Concentrations en acides aminés et base azotée utilisées pour compléter les auxotrophies des souches de levures en fonction de la concentration en substrat carboné (d'après Flikweert *et al.*, 1999).

Pour les cultures liquides et les essais en fioles une solution de phosphate de potassium K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 M pH 5,5 a été ajoutée au milieu synthétique YNB.

## 1.2. Microorganismes

### 1.2.1. Bactéries

Les souches bactériennes utilisées pour le clonage des gènes d'intérêt sont des souches électrocompétentes *Escherichia coli* DH10 $\beta$  (Invitrogen) et MegaX (New England Biolabs) et chimiocompétentes DH5 $\alpha$  (Invitrogen). La souche bactérienne *E. coli* OneShot ccdB Survival (Invitrogen) a été utilisée pour la propagation du plasmide pDONR221. Les souches ont été cultivées sur milieu LB solide ou liquide. Les souches transformées avec les constructions plasmidiques sont conservées en milieu LB 15% glycérol à -80°C.

### 1.2.2. Levures

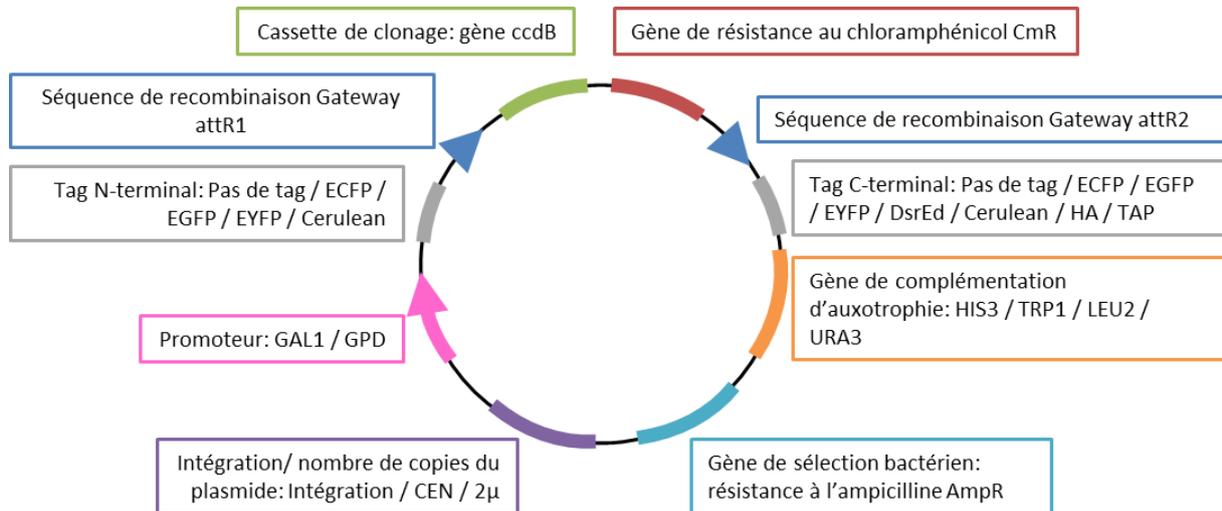
Les souches de levure ont été achetées auprès du groupement EUROSCARF (EUROpean Saccharomyces Cerevisiae ARchive for Functional analysis). La souche de levure utilisée pour l'extraction d'ADN génomique est la souche *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26108. La souche de levure utilisée comme base pour la construction des souches modifiée est la souche *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK2-1C *MATa; ura3-52; trp1-289; leu2-3,112; his3 $\Delta$  1; MAL2-8C; SUC2* (Entian and Kötter, 2007). La souche originelle et les souches modifiées ont été cultivées sur milieu YPD ou YPE (pour la souche avec les quatre auxotrophies) ou sur milieu YNB complété avec les acides aminés manquants (voir 1.1.2). Les souches ont été conservées dans le milieu adapté à leur génotype 15% glycérol à -80°C (un tableau récapitulatif des souches générées est disponible en annexe 1).

## 2. Biologie moléculaire

### A. Construction des souches de levures

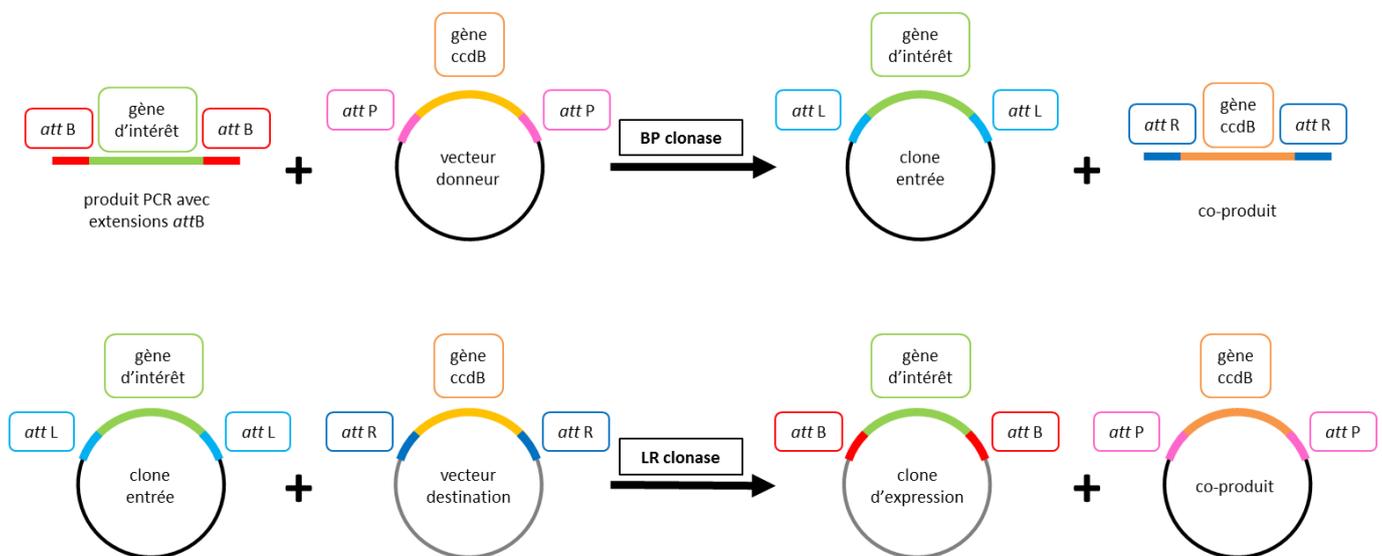
#### 2.1.1. Plasmides utilisés

Pour ce projet nous avons utilisé un set de plasmides Gateway (Susan Lindquist Yeast Expression Gateway plasmid kit) (Figure 42) destinés à l'expression chez la levure (Alberti *et al.*, 2007) commandé chez Addgene. Ce set permet l'utilisation de la technologie Gateway pour le clonage des gènes d'intérêt dans les plasmides receveurs avec une étape de clonage intermédiaire dans un vecteur donneur (Figure 43). Le vecteur intermédiaire utilisé pour le clonage des gènes d'intérêt et la multiplication des plasmides en bactéries était le pDONR221 (Invitrogen).



**Figure 42.** Set de plasmides Gateway commandé chez Addgene.

Ce set de plasmides inclut 220 plasmides issus des différentes combinaisons possibles des promoteur, tag, gène complémentant l'auxotrophie et origine de réplication mentionnés sur ce schéma.

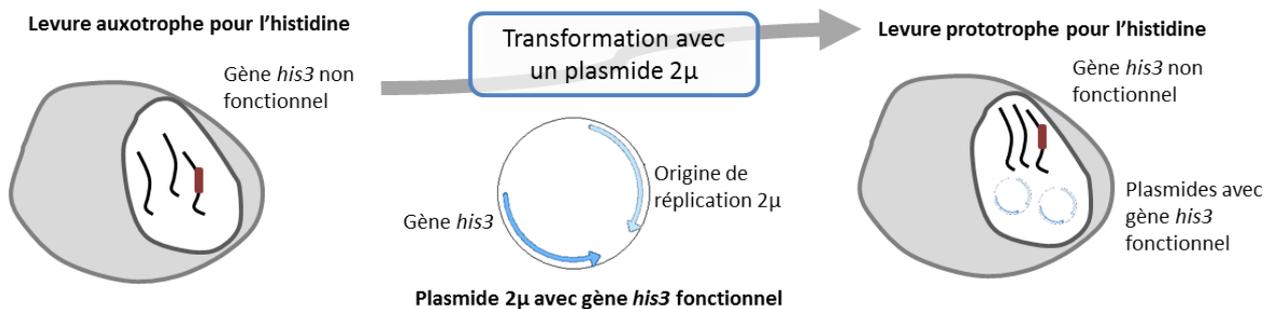


**Figure 43.** Schéma de principe du clonage avec la technologie Gateway.

La BP clonase permet une recombinaison entre un substrat présentant des extensions *attB* et un vecteur donneur possédant des sites *attP*. La LR clonase permet le transfert d'un gène d'intérêt introduit dans un vecteur donneur présentant des sites *attL* dans un vecteur de destination présentant des sites *attR* (d'après le livret "Gateway®Technology, a universal technology to clone DNA sequences for functional analysis and expression in multiple systems", version E, disponible sur le site internet de Life Technologies).

Le maintien des plasmides dans les levures repose sur le système de complémentation des auxotrophies (Figure 44): la souche CEN.PK2-1C que nous avons utilisée pour les clonages est incapable de synthétiser l'histidine, la leucine, le tryptophane et l'uracile du fait d'une délétion partielle ou d'une mutation ponctuelle dans la séquence des gènes d'une des protéines impliquées dans leur synthèse. Les plasmides du set Gateway possèdent des versions fonctionnelles des gènes en question et permettent, une fois introduits dans la levure, de restaurer la capacité de synthèse de l'acide aminé ou la base azotée correspondante. Cette complémentation des auxotrophies permet de maintenir la pression de sélection nécessaire au maintien de plasmides  $2\mu$  ou CEN sans avoir recours à des

antibiotiques. La complémentation peut également s'effectuer par intégration du plasmide au niveau du gène d'auxotrophie dans le génome de la levure lorsque c'est un plasmide intégratif qui est utilisé.



**Figure 44.** Principe de complémentation de l'auxotrophie pour l'histidine par un plasmide 2 $\mu$ .

Pour la délétion du gène de la pyruvate kinase nous avons eu recours à une méthode de délétion impliquant l'utilisation du plasmide pUG6 contenant le gène *KanMX* de résistance à la généticine (Carter and Delneri, 2010; Güldener *et al.*, 1996).

## 2.1.2. Amplification des gènes d'intérêt

### 2.1.2.1. Extraction d'ADN génomique

Les ADN génomiques d'*Escherichia coli* K12 substr. MG1655, de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26108 et de *Schizosaccharomyces pombe* ATCC 24843 ont été purifiés afin d'être utilisés comme matrices pour l'amplification des gènes d'intérêt. L'ADN génomique d'*E. coli* a été purifié par extraction phénol-chloroforme (David Moore and Dennis Dowhan, 2002) à partir d'une culture de 12 heures à 37°C. Les ADN génomiques de levures ont été purifiés à partir de 1,5 mL d'une culture d'absorbance à 600 nm comprise entre 8 et 10 avec un kit d'extraction d'ADN génomique (MasterPure Yeast DNA Purification Kit, Epicentre), suivi d'une digestion à la RNase et d'une extraction phénol-chloroforme.

### 2.1.2.2. Amplification des gènes d'intérêt par PCR haute fidélité

Les PCR d'amplification des gènes d'intérêt ont été réalisées avec la polymérase haute fidélité Q5 (New England Biolabs) selon les recommandations du fournisseur en utilisant 100 à 300 ng d'ADN génomique matrice pour une réaction de 50  $\mu$ L. Les amorces utilisées comportaient des extensions spécifiques pour le clonage Gateway (Tableau 5).

L'amplification correcte des gènes a été vérifiée par migration des produits de réactions de PCR sur gel d'agarose. Les gels contiennent 0,8% d'agarose dans du tampon TAE (Tris-HCl 40 mM; acide acétique 20 mM; EDTA 1mM) et SYBR Safe (Invitrogen) dilué à 1:10000<sup>e</sup>.

Nom	Séquence	Tm (°C)
PEPC - Amorcedirecte	5'- <b>GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTA</b> AAA ATG AAC GAA CAA TAT TCC GC -3'	52
PEPC - Amorce reverse	5'- <b>GGGG AC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTT</b> TTA GCC GGT ATT ACG CAT AC-3'	53
MDH3 - Amorcedirecte	5'- <b>GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TAA AAA</b> ATG GTC AAA GTC GCA ATT CTT G -3'	56
MDH3 - Amorce reverse	5'- <b>GGGG AC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTT</b> TCA AGA GTC TAG GAT GAA ACT CTT GC-3'	55
MAE1 - Amorcedirecte	5'- <b>GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTA</b> AAA ATG TGG CCT ATT CAG CAA TCG CG-3'	59
MAE1 - Amorce reverse	5'- <b>GGGG AC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTT</b> CTA CAA TTG GTT GGT GTG CAC-3'	56
SpMAE - Amorcedirecte	5'- <b>GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTA</b> AAA ATG GGT GAA CTC AAG G -3'	58
SpMAE - Amorce reverse	5'- <b>GGGG AC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTT</b> GCT TAA ACG CTT TCA TGT TCA C -3'	54

**Tableau 5.** Amorces utilisées pour l'amplification des gènes d'intérêt par PCR haute fidélité. En **gras** les extensions permettant le clonage Gateway.

### 2.1.2.3. Purification des amplicons

Après migration des produits PCR sur gel d'agarose, les bandes obtenues contenant les fragments d'ADN purifiés des gènes d'intérêt ont été découpés et les gènes ont été purifiés avec le kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) ou le kit QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen). La concentration en acides nucléiques et la pureté des échantillons ont ensuite été déterminées par spectrophotométrie en mesurant l'absorbance à 260 nm et les rapports d'absorbance A260/A280 et A260/A230.

## 2.1.3. Clonage dans le vecteur donneur

### 2.1.3.1. Purification du vecteur donneur

Une minipréparation plasmidique de pDONR221 a été réalisée à partir d'une culture de 12 heures d'*E. coli* ccdB résistantes contenant le pDONR 221 sur milieu sélectif liquide LB chloramphénicol kanamycine.

### 2.1.3.2. Clonage des gènes d'intérêt

Le clonage des gènes d'intérêt dans le plasmide pDONR221 a été réalisé par réaction BP dans un volume réactionnel total de 5 µL contenant 75 ng de pDONR221, 1 µL de mix enzymatique BP Clonase (Invitrogen) et une quantité d'insert correspondant à un ratio molaire de 1 par rapport au vecteur pDONR221. Les réactions BP ont été incubées 1 heure à 25°C ou une nuit à température ambiante. Une partie du mix réactionnel (entre 0,4 et 0,8 µL) a ensuite été utilisée pour transformer des cellules *E. coli* électro ou chimiocompétentes. Les cellules transformées ont été étalées sur milieu sélectif LB agar kanamycine 50 µg/mL.

### 2.1.3.3. Vérification des transformants

Les clones obtenus ont été vérifiés par PCR sur colonie: une pointe de colonie a été prélevée à l'aide d'un cône stérile et transférée dans 5 µL d'eau milliQ stérile. 1 µL de chacune de ces suspensions

bactériennes a ensuite été utilisé pour effectuer une réaction PCR avec la polymérase DreamTaq (ThermoFisher) selon les recommandations du fournisseur dans un volume réactionnel total de 25 µL. Les couples amorces utilisés comprenaient une amorce directe complémentaire d'une partie du plasmide pDONR221 et une amorce reverse complémentaire d'une partie se trouvant dans le gène d'intérêt (Tableau 6). Le programme utilisé comprenait une étape de lyse et de dénaturation initiale de 5 minutes à 95°C, 35 cycles d'amplification comprenant une étape de dénaturation de 30 s à 95°C, une étape d'hybridation de 30 s à 57 ou 58°C (selon les couples d'amorces utilisés) et une étape d'amplification de 1 min à 72°C et pour finir une étape d'amplification finale de 5 min à 72°C.

Nom	Séquence	Tm (°C)
pDONR221 - Amorce de vérification clonage directe	5'- TGATGCCTGGCAGTTTATGG -3'	57
PEPC - Amorce de vérification clonage reverse	5'- TGGTGTCTTCGCTCAGTTCC -3'	58
MDH3 - Amorce de vérification clonage reverse	5'- GCATTTGGTGCGAACTTCC -3'	56
MAE1 - Amorce de vérification clonage reverse	5'- GTCAAACGAGTGGCATGTGG -3'	58
SpMAE - Amorce de vérification clonage reverse	5'- AAACCAACACCACAGTTGC -3'	58

**Tableau 6.** Amorces utilisées pour la vérification des clonages des gènes d'intérêt dans le plasmide pDONR221.

L'amplification des séquences souhaitées a été vérifiée en déposant sur gel d'agarose 0,8% les produits de réactions PCR. Les clones positifs ont été repiqués en milieu liquide afin d'extraire le plasmide par mini ou midipréparation (Mini ou Midi Plasmid Extraction kit, Qiagen) en fonction de la quantité désirée. Les séquences des plasmides ont été vérifiées par séquençage (Beckman Coulter Genomics) et des cryotubes ont été constitués pour les bactéries contenant des plasmides satisfaisants.

## 2.1.4. Clonage dans les vecteurs receveurs

### 2.1.4.1. Purification des vecteurs receveurs

Des minipréparations plasmidiques (Plasmid Miniprep kit) des vecteurs receveurs ont été réalisées à partir de cultures de 12 heures des souches de *E. coli* transformées sur milieu sélectif liquide LB kanamycine.

### 2.1.4.2. Clonage des gènes d'intérêt dans les vecteurs receveurs

Les clonages des gènes d'intérêt dans les plasmides receveurs ont été réalisés par réaction LR dans un volume réactionnel total de 5 µL contenant 75 ng de plasmide receveur, 1 µL de mix enzymatique LR Clonase II (Invitrogen) et une quantité pDONR221-gène d'intérêt correspondant à un ratio molaire de 1 par rapport au vecteur pDONR221. Les réactions LR ont été incubées 1 heure à 25°C. Une partie du mix réactionnel (entre 0,4 et 0,8 µL) a ensuite été utilisée pour transformer des cellules *E. coli* électro ou chimiocompétentes. Les cellules transformées ont été étalées sur milieu sélectif LB agar ampicilline et incubées à 37°C jusqu'à l'apparition de transformants.

### 2.1.4.3. Vérification des transformants

Les clones obtenus ont été vérifiés par PCR sur colonie en utilisant les couples d'amorces qui comprennent une amorce dans le promoteur du plasmide et une amorce dans la séquence du gène d'intérêt (Tableau 7). Les clones positifs ont été repiqués en milieu liquide afin de constituer des cryotubes pour la conservation et d'extraire les plasmides par midipréparation (Midi Plasmid Extraction kit, Qiagen).

Nom	Séquence	Tm (°C)
GPD - Amorce de vérification clonage directe	5'- CGGTAGGTATTGATTGTAATTCTG -3'	53
PEPC - Amorce de vérification clonage reverse	5'- TGGTGTCTTCGCTCAGTTCC -3'	58
MDH3 - Amorce de vérification clonage reverse	5'- GCATTTGGTGCGAACCTTCC -3'	56
MAE1 - Amorce de vérification clonage reverse	5'- GTCAAACGAGTGGCATGTGG -3'	58
SpMAE - Amorce de vérification clonage reverse	5'- AAACCAACACCACAGTTGC -3'	58

**Tableau 7.** Amorces utilisées pour la vérification des clonages des gènes d'intérêts dans les vecteurs receveurs et pour la vérification de l'introduction des plasmides dans les levures.

## 2.1.5. Construction d'un plasmide pAG426-pyk1 antisens

### 2.1.5.1. Amplification de l'insert *pyk1* antisens

La PCR d'amplification de l'antisens de *pyk1* a été réalisée en utilisant une polymérase haute fidélité à partir d'ADN génomique de la souche CEN.PK2-1C purifié comme indiqué précédemment (2.1.2.1). Les amorces ont été dessinées de sorte à amplifier l'ORF et les 18 premières paires de bases de la séquences 5'UTR (Zhang and Dietrich, 2005). Le clonage a été prévu pour être effectué avec des enzymes de restriction: l'amorce directe comportait un site de restriction HindIII et l'amorce reverse un site de restriction NotI (Tableau 8).

Nom	Séquence	Tm (°C)
PYK1 antisens - amorce directe	ATCCA <b>AGCTT</b> AAATAAAACATCATCAATG	46
PYK1 antisens - amorce reverse	AATAG <b>CGGCGCCTT</b> AAACGGTAGAGACTTGCAAAG	55

**Tableau 8.** Amorces utilisées pour l'amplification de l'antisens de *pyk1*.

En **gras** sont indiqués les sites de restriction: HindIII pour l'amorce directe et NotI pour l'amorce reverse.

Le produit de réaction PCR a été déposé sur gel d'agarose et purifié comme mentionné précédemment (2.1.2.3).

### 2.1.5.2. Clonage dans le pAG426-GPD-ccbB

Le plasmide pAG426-GPD-ccbB et l'amplicon *pyk1* antisens purifié ont été digérés par HindIII et NotI (New England Biolabs) selon les recommandations du fournisseur à 37°C pendant 4 heures. Après arrêt des réactions enzymatiques par une incubation à 65°C pendant 20 minutes, le plasmide et l'insert digérés ont été purifiés en utilisant le kit QIAquick PCR purification kit (Qiagen). Le plasmide a ensuite été déphosphorylé par action d'une phosphatase antarctique (New England Biolabs) pendant 1 heure à 37°C, puis l'enzyme a été inactivée par incubation à 70°C pendant 20 minutes. Le plasmide déphosphorylé a ensuite été mis en contact avec l'insert digéré purifié pour procéder à la ligation en utilisant une T4 DNA ligase (New England Biolabs). La réaction a été incubée à 16°C sur la nuit, puis 0,5 µL du produit de ligation a été utilisé pour procéder à la transformation de cellules électrocompétentes *E. coli* comme mentionné précédemment (2.1.4.2). Après transformation les cellules ont été étalées sur LB agar ampicillineet incubées à 37°C jusqu'à l'apparition de transformants.

Les transformants obtenus ont été testés par PCR sur colonies (2.1.4.3) en utilisant un couple d'amorces comportant une amorce dans le promoteur GPD et une amorce dans l'antisens *pyk1* (Tableau 9). Les produits de réaction PCR ont été mis à migrer sur gel d'agarose 0,8%. Un clone positif a été sélectionné et passé en milieu liquide pour constituer des cryotubes et effectuer une midi-préparation de plasmide qui sera utilisée pour la transformation des levures.

Nom	Séquence	Tm (°C)
GPD - Amorce de vérification clonage directe	5'- CGGTAGGTATTGATTGTAATTCTG -3'	53
PYK1 antisens - Amorce de vérification reverse	5'- CGTACTTGTCATCGGTGGTG -3'	60

**Tableau 9.** Amorces utilisées pour la vérification du clonage de *pyk1* antisens dans le plasmide pAG426-GPD.

## 2.1.6. Introduction des plasmides d'intérêt dans les levures

### 2.1.6.1. Transformation des levures

Les levures ont été transformées chimiquement par la méthode de l'acétate de lithium (Daniel M. Becker and Victoria Lundblad, 1993; Gietz and Woods, 2001). Les cellules ont été récoltées par centrifugation (10 minutes, 5000 g, 4°C) à partir d'une culture d'absorbance à 600 nm supérieure ou égale à 0,3, de sorte à isoler au moins  $2,4 \cdot 10^9$  cellules. L'ADN à transformer (1 µg de chaque plasmide à introduire) a été ajouté à 200 µg d'ADN de sperme de saumon (Sigma-Aldrich), préalablement dénaturé par chauffage (10 minutes à 99°C puis 5 minutes sur glace). Les cellules centrifugées ont été resuspendues dans une solution de Tris-EDTA-acétate de lithium (TE 1X pH 7,5; LiAc100 mM) et ajoutées au mélange d'ADN. Pour un volume de mélange d'ADN supérieur à 21 µL, des quantités de TE 10X et de LiAc 1 M ont ensuite été ajoutés de sorte à ce que leur facteur de dilution ne dépasse pas 10. Les cellules mélangées à l'ADN ont ensuite été mises en présence d'un mélange TE-LiAc-PEG 4000 (Jena Bioscience) et incubées 30 minutes à 30°C. La transformation a été effectuée par choc thermique à 42°C pendant 40 minutes. Après le choc thermique, les cellules ont été centrifugées brièvement et resuspendues dans un volume de 400 µL à 1 mL de TE à pH 7,5 1x et remises à incuber pendant au moins 2 heures à 30°C sous agitation (400 rpm) dans un agitateur chauffant de paillasse (Thermomix, Eppendorf). Les cellules ont ensuite été étalées sur milieu solide sélectif à raison de 200 µL par boîte et mises à incuber à 30°C jusqu'à apparition de transformants.

### 2.1.6.2. Vérification des transformants

Après apparition de colonies sur les boîtes, les transformants ont été vérifiés par PCR. L'ADN génomique (ainsi que les plasmides qui sont de grande taille) des cellules a été purifié, soit par un protocole de purification rapide (Liu *et al.*, 2000) pour une qualité d'extraction de routine, soit par une extraction d'ADN génomique (MasterPure Yeast DNA Purification kit, Epicentre), suivie d'une digestion à la RNase et d'une extraction phénol-chloroforme pour obtenir des ADN plus purs. Les PCR de vérification ont été effectuées avec la polymérase DreamTaq (ThermoFisher) selon les recommandations du fournisseur en utilisant environ 100 ng d'ADN génomique purifié pour un volume réactionnel total de 25 µL. Les couples d'amorces utilisés étaient les mêmes que ceux utilisés en PCR sur colonie de bactéries pour vérifier le clonage des gènes d'intérêt dans les vecteurs receveurs (Tableau 7; Tableau 9) ou, pour les levures transformées avec les plasmides vides, un couple comprenant une amorce dans le plasmide et une amorce dans la séquence du gène d'auxotrophie (Tableau 10). Le programme utilisé comprenait une étape de dénaturation initiale de 3 minutes à 95°C, 35 cycles d'amplification comprenant une étape de dénaturation de 30 s à 95°C, une étape d'hybridation de 30 s à 57 ou 58°C (selon les couples d'amorces utilisés) et une étape d'amplification de 1 min à 72°C et pour finir une étape d'amplification finale de 5 min à 72°C.

L'amplification des séquences souhaitées a été vérifiée en déposant sur gel d'agarose 0,8% les produits de réactions PCR. Les clones positifs ont été passés en milieu liquide approprié pour constituer des cryotubes conservés à -80°C.

Nom	Séquence	Tm (°C)
Plasmide vide - Amorces de vérification directe	5'- ACTGGCCGTCGTTTTACA -3'	55
HIS - Amorces de vérification reverse	5'- TCCCTCCACCAAAGGTGTTC -3'	58
TRP - Amorces de vérification reverse	5'- AGGTGTGGAGACAAATGGTG -3'	56
LEU - Amorces de vérification reverse	5'- ACGATACCTGAGTATCCAC -3'	55
URA - Amorces de vérification reverse	5'- GGCTGGGAAGCATATTTGAG -3'	55

**Tableau 10.** Amorces utilisées pour la vérification de transformation des plasmides vides.

## 2.1.7. Délétion de la pyruvate kinase

### 2.1.7.1. Amplification de la cassette de délétion

La cassette de délétion utilisée pour la délétion de la pyruvate kinase a été amplifiée à partir de la séquence du gène *KanMX* de résistance à la généticine du plasmide pUG6. Les amorces utilisées présentaient des extensions de 45 nucléotides spécifiques des séquences d'ADN génomiques en amont et en aval de la séquence à déléter (Carter and Delneri, 2010; Güldener *et al.*, 1996). L'amplification a été réalisée par PCR avec une polymérase haute fidélité Q5 (New England Biolabs).

Nom	Séquence	Tm (°C)
Délétion PYK1 - directe	5'- <b>TTCTATTTACAAGACACCAATCAAAAACAAATAAAACATCATCACACGTACGCTGCAGG</b> TCGAC -3'	59
Délétion PYK1 - reverse	5'- CACTATAGGGAGACCGGCAGTATAATTCAAAAAATAATATCTTCATTCAATCATGATT <b>CTTTTT</b> -3'	57

**Tableau 11.** Amorces utilisées pour l'amplification de la cassette de délétion *KanMX* pour la délétion de *pyk1*. En **gras** les extensions spécifiques du gène *pyk1* qui serviront à la recombinaison homologue.

### 2.1.7.2. Délétion du gène *pyk1* chez les levures

La délétion du gène *pyk1* a été effectuée en transformant les levures avec la cassette de délétion *KanMX* comportant les extensions de 45 nucléotides homologues aux extrémités du gène *pyk1* selon le protocole de transformation chimique par acétate de lithium (2.1.6.1). Après transformations les levures ont été étalées sur milieu solide YPE ou YNB éthanol G418 et incubées à 30°C jusqu'à apparition des transformants.

### 2.1.7.3. Vérification de la délétion

Les transformants obtenus ont été vérifiés par PCR comme indiqué précédemment (2.1.6.2) en utilisant deux couples d'amorces comportant chacun une amorce dans l'ADN génomique proche du locus de *pyk1* et une amorce dans le gène *KanMX* (Tableau 12). Après vérification par PCR, des clones positifs ont été passés en milieu liquide pour effectuer une extraction d'ADN génomique (2.1.2.1) et une PCR haute fidélité a été réalisée sur les ADN génomiques extraits pour amplifier la zone délétée en utilisant les amorces de vérification 5' directe et 3' reverse. Les amplicons obtenus ont été déposés sur gel d'agarose 0,8% puis purifiés comme indiqué précédemment et envoyés pour séquençage (Beckman Coulter Genomics). Les clones effectivement délétés ont été utilisés pour constituer des cryotubes et conservés à -80°C.

Nom	Séquence	Tm (°C)
Délétion PYK1 - Amorçe de vérification 5' directe	5'- CCAGAAACTGGCACTTGACC -3'	57
Délétion PYK1 - Amorçe de vérification 5' reverse	5'- TATTCTGGGCTCCATGTGC -3'	57
Délétion PYK1 - Amorçe de vérification 3' directe	5'-ATACTAACGCCCATCCAG-3'	58
Délétion PYK1 - Amorçe de vérification 3' reverse	5'-AGGACGGAGTAGCACTTATCG-3'	57

**Tableau 12.** Amorces utilisées pour la vérification de la délétion de *pyk1*.

## 2.2. Evaluation de la transcription des transgènes

### 2.2.1. Extraction des ARN totaux et synthèse des ADNc

#### 2.2.1.1. Extraction des ARN totaux et élimination de l'ADN génomique

L'extraction des ARN totaux a été réalisée avec le kit MasterPure Yeast RNA Purification (Epicentre) à partir de 1 mL d'une culture de levures d'absorbance à 600 nm égale à 2. Le protocole suivi incluait une étape de digestion à la DNase. A la fin de la purification, les ARN extraits ont été resuspendus dans 35 µL d'eau mQ. 1 µL de RiboGuard (fourni dans le kit) a été ajouté aux ARN purifiés afin de limiter une potentielle dégradation par des RNases.

#### 2.2.1.2. Quantification et vérification de l'intégrité des ARN

Les ARN totaux extraits ont été quantifiés par spectrophotométrie en mesurant l'absorbance à 260 nm dans des cuves plastiques pour UV (Eppendorf). La pureté des ARN a également été estimée par mesure du ratio des absorbances A260/A280 et A260/A230.

L'intégrité des ARN a été vérifiée par migration sur gel d'agarose 0,8% (préparé à partir de TAE préalablement autoclavé) en déposant 1 µg d'ARN additionné de tampon de charge pour ARN 2X (ThermoFisher) contenant du formaldéhyde. Afin de vérifier la présence de deux bandes de 2 et 3,8 kb respectivement, correspondant aux formes d'ARN<sub>r</sub> majoritaires, nous avons utilisé un marqueur de poids moléculaire ARN (RiboRuler High Range, ThermoFisher). Les ARN purifiés ainsi validés ont été conservés à -80°C.

#### 2.2.1.3. Synthèse des ADN complémentaires

La synthèse des ADNc a été réalisée à partir de 500 ng d'ARN totaux purifiés avec un kit de rétrotranscription (Maxima First Strand cDNA Synthesis kit, ThermoFisher). La première étape consistait en une digestion à la DNase de l'ADN génomique résiduel: 500 ng d'ARN purifiés ont été ajoutés à 0,5 µL de DNase et 0,5 µL de tampon de DNase, et le volume a été complété à 5 µL avec de l'eau sans nucléase (fournie dans le kit). L'incubation pour la digestion a été réalisée à 37°C pendant 2 min. Après cette étape, la rétrotranscription a été réalisée en ajoutant au milieu réactionnel de digestion, 1 µL d'enzyme, 2 µL de tampon et de l'eau sans nucléase jusqu'à un volume total de 10 µL. Un contrôle "sans RT" ne comprenant pas d'enzyme a été réalisé pour chaque série de rétrotranscription afin d'estimer une éventuelle contamination par ADN génomique résiduel. La synthèse des ADNc a été réalisée par une première étape à 25°C pendant 10 minutes, une deuxième étape à 50°C pendant 15 minutes et une étape d'inactivation à 85°C pendant 10 minutes. Après rétrotranscription, les ADNc obtenus ont été conservés à -20°C.

## 2.2.2. Estimation du niveau de transcription des gènes par PCR quantitative

### 2.2.2.1. Construction et étalonnage des amorces

Les amorces présentées dans le Tableau 13 ont été dessinées à l'aide du logiciel eprimer3 de sorte à amplifier des fragments de 150 à 250 paires de bases, à une température d'hybridation de 60°C. Les gènes *alg9* et *taf10* sont des gènes constitutifs au niveau d'expression stable (Teste *et al.*, 2009) et ont été utilisés comme gènes de référence afin de normaliser le niveau de transcription des autres gènes.

Nom	Séquence	Tm (°C)
PEPC - Amorce qPCR directe	5'- TTGAGCTGACGTTGTTCCAC -3'	59,88
PEPC - Amorce qPCR reverse	5'- AGAATCGCCCCGGTATAAAG -3'	60,29
MDH3 - Amorce qPCR directe	5'- AGATGAACGCCGGTATTGTC -3'	59,96
MDH3 - Amorce qPCR reverse	5'- TCTGCACGTACCAGGTCAAG -3'	59,90
MAE1 - Amorce qPCR directe	5'- AAAAGCCATACAGCGACGAG -3'	60,41
MAE1 - Amorce qPCR reverse	5'- CGCTTCCCTTCTTCTTGTG -3'	59,99
SpMAE - Amorce qPCR directe	5'- GTGTGGGTCATTCGAATCCT -3'	59,79
SpMAE - Amorce qPCR reverse	5'- TTGATGAGCGGGTTGTGTAG -3'	59,72
PYK1 - Amorce qPCR directe	5'- TGCTTTGAGAAAGGCTGGTT -3'	59,99
PYK1 - Amorce qPCR reverse	5'- CGTACTTGTCATCGGTGGTG -3'	60,02
ALG9 - Amorce qPCR directe	5'- TGCATTTGCTGTGATTGTCA -3'	59,83
ALG9 - Amorce qPCR reverse	5'- CAGGCAGTGGGAAATTCAGT -3'	60,11
TAF10 - Amorce qPCR directe	5'- CCTATCATTCCCGATGCAGT -3'	59,92
TAF10 - Amorce qPCR reverse	5'- CCTTGCAATAGCTGCCTAGC -3'	60,14

**Tableau 13.** Amorces utilisées en qPCR.

Chaque couple d'amorce a été validé en réalisant une droite de calibration à partir de 4 à 5 dilutions d'ADN génomique (pour les gènes *alg9*, *taf10*, *pyk1*) ou d'ADN plasmidique (pour les gènes *ppc*, *mdh3*, *spmae*, *mae1*). Pour chaque couple d'amorce l'efficacité était comprise entre 69 et 101% et le coefficient de corrélation  $r^2$  était supérieur à 0,97.

### 2.2.2.2. Amplification par PCR quantitative

L'expression des gènes a été estimée en mesurant le nombre de copies d'ARNm par PCR quantitative avec la méthode du SYBR Green I. Cette méthode repose sur la mesure de la fluorescence émise par le SYBR Green I qui s'intercale dans l'ADN double brin au cours de la polymérisation, mesurée par un thermocycleur équipé d'un fluorimètre (CFX96 RealTime System, Bio-Rad). Les mesures d'expression sont basées sur le "threshold cycle", qui correspond au nombre de cycles à partir desquels la fluorescence émise par les produits de PCR est égale au seuil de détection du fluorimètre, le seuil de détection étant significativement plus élevé que le niveau de base de fluorescence. Le threshold cycle a été déterminé par la méthode de régression.

Les réactions de PCR ont été réalisées sur un réplicat biologique. A 5 µl de tampon 2X Sso Advanced SYBR Green Supermix (Bio-Rad) (comprenant la Taq polymerase, les dNTP, le SYBR Green I) ont été ajoutés 0,02µl de chaque amorce (0,2 µM), 2,5 µl de matrice d'ADNc à 10 ng/µl et le volume a été complété à 10 µl avec de l'eau sans nucléase (fournie dans le kit). Le programme utilisé comprenait une étape de dénaturation initiale à 95°C pendant 30 s, puis 40 cycles d'amplification comprenant 5 s de dénaturation à 95°C, 20 s d'hybridation à 60°C et 20 s d'extension à 72°C. La fluorescence a été mesurée à la fin de chaque étape d'élongation. Pour vérifier la spécificité de la réaction de PCR, des

courbes de fusion ont été obtenues: les amplicons formés ont été dénaturés pendant 10 s à 95°C, refroidis à 65°C pendant 5 s, et la courbe de fusion a été mesurée en augmentant la température de 65 à 95°C par palier de 0,5 s (0,2 s pour la validation des amorces). La fluorescence est mesurée à chaque palier.

### **2.2.2.3. Exploitation des données par la méthode $\Delta\Delta Cq$**

Les données brutes issues des RT-qPCR ont été exploitées avec le logiciel CFX Manager (Bio-Rad) et nous avons choisi la méthode  $\Delta\Delta C_t$  pour quantifier l'expression relative des gènes. Afin de normaliser nos résultats, nous avons utilisé les gènes *alg9* codant pour une mannosyltransférase et *taf10* codant pour une sous-unité des complexes TFIID et SAGA. La souche CEN.PK2-1C prototrophe (transformée avec les plasmides pour compléter les auxotrophies mais sans gènes d'intérêt) a été utilisée comme référence.

## **3. Fermentation**

### **3.1. Fermentation en fioles**

#### **3.1.1. Précultures**

Les précultures pour les essais en fioles ont été réalisées sur 48 heures (72 à 96 heures pour les précultures sur milieu avec éthanol) en une ou deux étapes, le but étant de générer suffisamment de biomasse pour pouvoir ensemer les fioles à une absorbance à 600 nm donnée.

Pour la procédure en deux étapes, utilisée lors des essais préliminaires, 100  $\mu$ L de cellules conservées en cryotube ont été inoculées dans 4 mL de milieu à 20 g/L de glucose et mises à incuber à 30°C sous une agitation de 110 rpm pendant 24 heures. Après cette première incubation, une deuxième préculture à 100 g/L de glucose a été ensemencée à partir de la première à raison de 1 mL de première préculture pour 100 mL de milieu frais et mise à incuber à 30°C sous 110 rpm pendant 24 heures.

Pour la procédure en une étape, 500  $\mu$ L à 1 mL de cellules conservées en cryotube ont été utilisées pour ensemer 100 mL de milieu à 50 ou 100 g/L de glucose (selon la concentration utilisée lors de l'essai) dans une fiole de 500 mL, qui a été mise à incuber 48 heures à 30°C sous une agitation de 200 rpm. Pour les souches *Δpyk1*, les précultures ont été réalisées sur milieu contenant 20 g/L d'éthanol et ont été incubées 72 à 96 heures à 30°C à 200 rpm.

#### **3.1.2. Protocole de fermentation en fioles**

##### **3.1.2.1. Préparation des milieux**

Les milieux ont été préparés extemporanément avant le démarrage de l'essai, par assemblage des différents composants requis (milieu synthétique, tampon phosphate, glucose, eau, acides aminés) à partir de solutions mères stérilisées individuellement. Le milieu a ensuite été réparti stérilement dans les fioles, préalablement autoclavées 20 min à 121°C, à la pipette à raison de 47 mL de milieu par fiole. Dans le cas des fioles contenant du  $\text{CaCO}_3$ , celui-ci a été ajouté dans chaque fiole avant autoclavage.

### 3.1.2.2. Ensemencement des fioles

Au moment de procéder à l'ensemencement des fioles, la biomasse des précultures a été évaluée par mesure de l'absorbance à 600 nm. Les cellules ont ensuite été collectées par centrifugation (10 min à 5000 g et à 4°C); le volume de cellules à centrifuger en fonction l'absorbance initiale désirée dans les fioles a été calculé de la façon suivante (avec les volumes en mL):

$$V_{\text{à centrifuger}} = \frac{\text{nombre de fioles à inoculer} \times \text{Abs}_{600 \text{ nm}} \text{ initiale souhaitée} \times V_{\text{fiole}}}{\text{Abs}_{600 \text{ nm}} \text{ préculture}}$$

Après centrifugation, le milieu de culture a été jeté et les cellules ont été resuspendues dans un volume d'eau milliQ stérile déterminé par le nombre de fioles à inoculer, le volume de suspension cellulaire à distribuer par fiole étant de 3 mL.

### 3.1.2.3. Mesures en point final

Pour les essais préliminaires de production de malate, le suivi a été réalisé en point final, en effectuant une analyse du milieu à l'instant initial et une analyse à l'instant final sans prélèvement intermédiaire. 4 fioles ont été préparées pour chaque condition à tester: une fiole a été sacrifiée à l'instant initial pour effectuer l'analyse des conditions initiales. Les autres fioles ont été analysées à la fin de l'essai, à raison de trois fioles par condition, ce qui permet d'avoir des triplicats pour chaque paramètre analysé.

### 3.1.2.4. Cinétique

Les autres essais ont été réalisés en cinétique, c'est-à-dire en effectuant plusieurs prélèvements entre le début et la fin de l'essai, c'est-à-dire un prélèvement à l'instant initial, puis un toutes les 24 heures (pour les jours ouvrés). Pour les essais de production d'éthanol, la durée totale des essais était d'environ 48 heures; pour les essais de production de malate, cette durée a été portée à 8 jours, avec des essais de 14 jours dans le cas de l'évaluation des souches *ΔpykI*.

### 3.1.2.5. Perte de masse et quantité de CO<sub>2</sub> produit

Un suivi de la masse des fioles a été réalisé pour chaque essai en fioles en point final. Cela permet de connaître, pour chaque point réalisé, la masse précise de milieu présente dans la fiole et d'évaluer ainsi les pertes ayant eu lieu par évaporation et dégazage du CO<sub>2</sub>. Dans les essais concernés le milieu est acide (pH inférieur ou égal à 5,5), donc le CO<sub>2</sub> est l'espèce majoritaire. Les fioles ont été pesées à vide, après inoculation et à chaque point de mesure avant prélèvement de l'échantillon. Une fiole contenant du milieu seul a servi de témoin d'évaporation pour chaque essai, de sorte à pouvoir quantifier la part de la perte de masse due à l'évaporation et celle due au dégazage de CO<sub>2</sub>.

## 3.2. Fermentation en bioréacteur

### 3.2.1. Précultures

Comme pour les essais en fioles les précultures ont été réalisées sur 48 h en une ou deux étapes.

Pour la procédure en deux étapes, utilisée lors des essais préliminaires, 100 μL de cellules conservées en cryotube ont été inoculées dans 4 mL de milieu à 20 g/L de glucose et mises à incuber à 30°C sous une agitation de 110 rpm pendant 24 heures. Après cette première incubation, une deuxième préculture

à 100 g/L de glucose a étéensemencée à partir de la première à raison de 1 mL de première préculture pour 100 mL de milieu frais et mise à incuber à 30°C à 110 rpm pendant 24 heures.

Pour la procédure en une étape, 1 mL de cellules conservées en cryotube a été utilisé pourensemencer 200 mL de milieu à 100 g/L de glucose dans une fiole de 1 L, qui a été mise à incuber 48 heures à 30°C à 130 rpm.

### **3.2.2. Protocole de fermentation en bioréacteur**

#### **3.2.2.1. Préparation du bioréacteur**

Les essais en bioréacteurs ont été réalisés dans des fermenteurs de volume utile 2 L ou 5 L (Sartorius), équipés d'une sonde pH pour le suivi et la régulation du pH en temps réel et d'une sonde pO<sub>2</sub> (Hamilton) pour le suivi de la concentration en oxygène dissous.

La sonde pH a été calibrée avant stérilisation. La sonde à oxygène a été polarisée en la laissant branchée à l'unité de fermentation pendant deux heures, puis a été vissée sur la platine. Les bouteilles nécessaires à l'alimentation en acide/base et à l'inoculation ont été reliées au fermenteur. Le milieu de culture ne pouvant pas être autoclavé, un mélange d'eau et de glucose a été préparé dans la cuve. Le fermenteur et les sondes ont été stérilisés par autoclavage à 121°C pendant 20 minutes. Après stérilisation, lorsque la température du milieu était encore supérieure à 80°C, nous avons procédé à la calibration du point 0% en oxygène de la sonde pO<sub>2</sub>. Le fermenteur a ensuite été alimenté en air (le débit utilisé est le débit maximal qui sera utilisé pendant la fermentation) pendant une nuit pour saturer le milieu en air, et le point 100% de la sonde pO<sub>2</sub> a été calibré après arrêt de l'alimentation en gaz.

#### **3.2.2.2. Ensemencement**

Au moment de procéder à l'ensemencement du fermenteur, la biomasse des précultures a été évaluée par mesure de l'absorbance à 600 nm. Les cellules ont ensuite été collectées par centrifugation (10 min à 5000 g et à 4°C); le volume de cellules à centrifuger en fonction de l'absorbance initiale désirée dans le fermenteur a été calculé de la façon suivante (avec les volumes en mL):

$$V_{\text{à centrifuger}} = \frac{\text{Abs}_{600 \text{ nm}} \text{ initiale souhaitée} \times V_{\text{milieu}}}{\text{Abs}_{600 \text{ nm}} \text{ préculture}}$$

L'Abs<sub>600 nm</sub> initiale visée était de 0,1. Après centrifugation, le milieu de culture a été éliminé et les cellules ont été resuspendues dans 250 mL d'eau milliQ stérile et transférées dans la bouteille stérile correspondante qui avait été préalablement connectée au fermenteur et autoclavée. L'inoculation des cellules dans le fermenteur a été effectuée par pompage de la suspension cellulaire dans la cuve.

#### **3.2.2.3. Culture et prélèvements**

Après inoculation, la température a été maintenue à 30°C et l'agitation à 500 rpm pour les fermentations réalisées pour la production d'acide malique et à 350 rpm pour les fermentations réalisées pour la production d'éthanol. Le pH a été maintenu à 5,5 par ajout de NaOH 2 M ou de KOH 1 M. Le premier prélèvement est réalisé juste après l'inoculation et le dernier prélèvement avant l'arrêt du fermenteur. L'état d'avancement de la fermentation a été contrôlé par la quantité de glucose résiduel: une fois le glucose entièrement consommé, la fermentation a été arrêtée.

### **3.3. Méthodes analytiques et exploitation des données**

#### **3.3.1. Méthodes de suivi**

##### **3.3.1.1. Suivi de la biomasse**

La biomasse a été suivie principalement par mesure de l'absorbance à 600 nm.

La concentration de biomasse sèche a également été mesurée pour certains essais. Pour la mesurer, un volume de culture a été pesé, puis centrifugé (10 min à 5000 g et à 4°C). Après élimination du milieu de culture, les cellules ont été rincées à l'eau milliQ et centrifugées à nouveau (10 min à 5000 g et à 4°C). Après élimination de l'eau, les cellules ont été resuspendues dans 5 mL d'eau mQ et transférées dans une coupelle de pesée en aluminium préalablement séchée et tarée. Après incubation à 105°C pendant 2 heures, les coupelles ont été refroidies dans un dessiccateur et la masse sèche a été mesurée.

Des comptages cellulaires sur cellule de Malassez ont été effectués pour certains essais. Les échantillons de culture utilisés ont été dilués de sorte à présenter une  $Abs_{600\text{ nm}}$  comprise entre 0,2 et 0,3 et les comptages ont été effectués sur 10 cases, de sorte à obtenir le nombre de cellules par mL de culture par la formule suivante (avec la concentration en cellules/mL):

$$[\text{cellules}] = \text{moyenne}(\text{nombre de cellules sur 10 rectangles}) \times \text{facteur de dilution} \times 10000$$

Le suivi de biomasse par ces trois méthodes réalisé sur certains essais a permis d'établir des droites de corrélation  $Abs_{600\text{ nm}}$ /concentration de masse sèche,  $Abs_{600\text{ nm}}$ /concentration cellulaire et concentration cellulaire/concentration de masse sèche.

##### **3.3.1.2. Suivi de la masse volumique du milieu**

La masse volumique a été déterminée en pesant un volume connu de milieu à chaque point effectué, pour les essais en fioles comme pour les essais en fermenteur. Pour ce faire, le pot de prélèvement a été taré avant utilisation, le volume d'échantillon destiné à la mesure a été prélevé avec une micropipette et la masse d'échantillon a été pesée sur une balance de précision. Cette mesure a été effectuée sur des échantillons de milieu contenant les cellules.

##### **3.3.1.3. Suivi du pH pendant les essais en fioles**

Pour certains essais en fioles, le pH a été mesuré directement dans les fioles au moyen d'une sonde pH autoclavable pour bioréacteur branchée sur un pH-mètre portatif. La sonde déconnectée a été autoclavée 20 minutes à 121°C dans une éprouvette contenant une solution de KCl 3 M fermée hermétiquement avec un film d'aluminium. Après autoclavage, la sonde a été connectée au pH-mètre et étalonnée avec des solutions tampons pH 4 et pH 7 stériles. Avant et après chaque prélèvement la sonde a été rincée à l'eau milliQ et éventuellement à l'éthanol 70% pour diminuer les risques de contamination des fioles. La mesure de pH a été effectuée sur une seule fiole par condition testée, afin de limiter les conséquences en cas de contamination.

##### **3.3.1.4. Autres paramètres suivis**

Le suivi de la concentration de dioxygène dissous a été réalisé à l'aide d'une sonde à oxygène (Hamilton) placée dans le bioréacteur.

### 3.3.2. Dosages par chromatographie liquide haute performance

Le dosage des métabolites a été effectué par chromatographie liquide haute performance (HPLC) sur une colonne cationique forte Aminex HPX-87H (Bio-Rad) fonctionnant en mode isocratique avec un éluant acide H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 mM à un débit de 0,5 mL/min et une température de colonne de 45°C. La détection a été assurée par un réfractomètre. Le volume d'injection était de 10 µL et le temps d'analyse par échantillon de 30 min. Les gammes d'étalonnage des métabolites ont été réalisées sur 5 à 6 points compris entre 0,2 et 6 g/kg en mélangeant les différents composés (glucose, malate, acétate, succinate, glycérol, éthanol). Les concentrations ont été exprimées en g/kg. Les coefficients de corrélation r<sup>2</sup> des droites d'étalonnage étaient supérieurs à 0,99 et les gammes ont été répétées toutes les deux semaines environ.

Les échantillons ont été préparés immédiatement après les prélèvements. Le milieu de culture contenant les cellules a été dilué avec de l'eau milliQ en dilution masse-masse: l'échantillon pur, puis l'échantillon dilué ont été pesés et le facteur de dilution a été calculé à partir de ces masses.

### 3.3.3. Dosages par chromatographie ionique

Le dosage de l'acide fumarique lors des essais en bioréacteurs effectués pour évaluer la production de malate en présence d'air ou d'air enrichi à 5% de CO<sub>2</sub> a été effectué par chromatographie ionique sur une colonne anionique IONPAC AS11HC (Bio-Rad) fonctionnant avec une élution en gradient de KOH (de 0 à 18 minutes: 1 mM de KOH; 18 à 28 minutes: 15 mM de KOH; 28 à 31 minutes: 30 mM de KOH; 31 à 38 minutes: 40 mM de KOH; 38 à 43 minutes: 57 mM de KOH; de 43 à 50 minutes: 1 mM de KOH). Le volume d'injection était de 2,5 µL et le temps d'analyse par échantillon de 50 min. La détection a été réalisée par un conductimètre. Les gammes d'étalonnage de l'acide fumarique ont été réalisées sur 5 points compris entre 0,0012 et 0,0235 g/kg. Les concentrations ont été exprimées en g/kg. Les coefficients de corrélation r<sup>2</sup> des droites d'étalonnage étaient supérieurs à 0,99. Les échantillons ont été préparés de la même façon que les échantillons HPLC.

### 3.3.4. Calcul des rendements de production des composés suivis

Les rendements ont été calculés de la façon suivante (avec les masses m en g et les concentrations en g/kg):

$$Y_{X/S} = \frac{[X]_{finale} \times m_{milieu, finale} - [X]_{initiale} \times m_{milieu, initiale}}{[S]_{finale} \times m_{milieu, finale} - [S]_{initiale} \times m_{milieu, initiale}}$$

avec X le métabolite pour lequel le rendement est calculé et S le substrat considéré ; les grandeurs entre crochets sont les concentrations.

Dans le cas de l'étude de la production d'éthanol, le rapport des concentrations d'éthanol et de glycérol à la fin de la fermentation a également été calculé.

### 3.3.5. Bilan carbone

Afin d'effectuer des bilans carbone, les quantités de carbone consommé et produit ont été estimées selon les formules suivantes (avec les quantités de matières n en moles, les concentrations en g/kg, les masses m en g, les masses molaires M en g/mol):

$$n_{\text{carbone consommé}} = \sum \frac{[S_i]_t \times m_t - [S_i]_0 \times m_0}{1000 \times M_{S_i}} \times \text{nombre d'atomes de carbone par mol de } S_i$$

avec  $S_i$  le ou les substrats consommés (généralement du glucose, mais il peut s'agir d'éthanol et de glycérol) ; les indices t et 0 se réfèrent à l'instant t et à l'instant initial respectivement.

$$n_{\text{carbone produit}} = \sum \frac{[X_i]_t \times m_t}{1000 \times M_{X_i}} \times \text{nombre d'atomes de carbone par mole de } X_i + \frac{m_{\text{CO}_2,t}}{M_{\text{CO}_2}}$$

avec  $X_i$  les métabolites produits par les cellules, hors  $\text{CO}_2$

La formule suivante exprime le différentiel entre les quantités de carbone consommée et produite (avec le différentiel en % et les quantités de matières n en moles):

$$\text{Différentiel carbone} = \frac{n_{\text{carbone consommé}} - n_{\text{carbone produit}}}{n_{\text{carbone consommé}}}$$

# Chapitre 3 : Construction de souches pour la production d'acide malique: caractérisations préliminaires

## 1. Construction des souches

La stratégie que nous avons choisi d'adopter pour la construction repose sur l'introduction des gènes à surexprimer suivie de la délétion du gène de la pyruvate kinase. La souche de levure CEN.PK2-1C que nous avons utilisée pour cette étude possède quatre marqueurs d'auxotrophie (histidine, leucine, tryptophane et uracile), ce qui permet d'introduire et d'exprimer jusqu'à quatre gènes différents.

Les gènes de la PEP carboxylase qui catalyse la carboxylation du PEP en oxaloacétate, de la malate déshydrogénase qui catalyse la conversion de l'oxaloacétate en malate et du transporteur de malate qui permet l'export du malate intracellulaire dans le milieu, ont été introduits de façon séquentielle. L'enzyme malique mitochondriale relocalisée dans le cytosol qui permet de former du pyruvate à partir de malate par décarboxylation, a été introduite en dernier lieu dans certaines souches. Les gènes ont été exprimés sur des plasmides 2 $\mu$  (multi-copies) ou CEN (une seule copie, pour l'enzyme malique). Le gène de la malate déshydrogénase a également été testé en version intégrée dans le génome.

Afin d'obtenir des souches prototrophes, c'est-à-dire capables de croître sans complémentation en acide aminé ou base azotée, nous avons introduit dans les souches exprimant moins de quatre gènes des plasmides "vides", n'exprimant aucun gène d'intérêt mais permettant de compléter les auxotrophies. La délétion du gène de la pyruvate kinase a été réalisée, après introduction des plasmides, par recombinaison homologue en remplaçant la séquence du gène *pyk1* dans le génome par une cassette de délétion contenant le gène de résistance à la généticine. Les différentes souches obtenues sont présentées sous forme d'un arbre généalogique en Figure 45; le descriptif détaillé des souches est disponible en annexe 1.

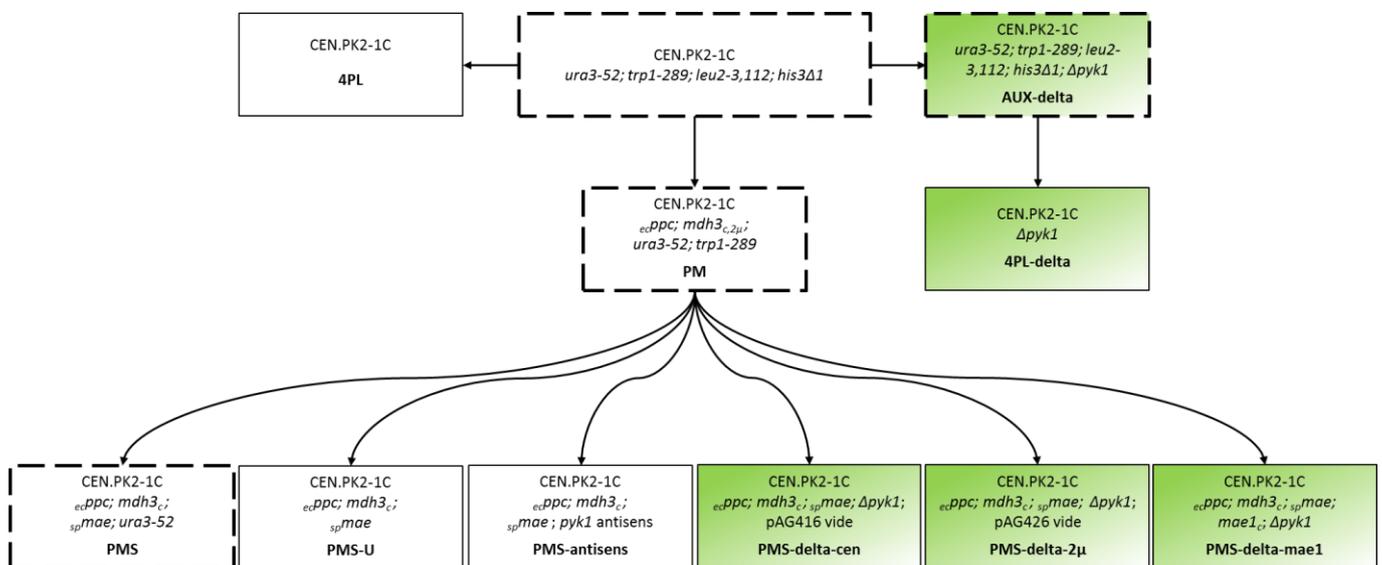


Figure 45. Arbre généalogique des souches construites pour la production de malate.

En encadré traits pointillés: souches auxotrophes; en encadré trait plein: souches prototrophes; en vert: souches  $\Delta pyk1$ .

Les souches auxotrophes et prototrophes obtenues après introduction des gènes d'intérêt ont été caractérisées pour la production de malate au cours d'essais en fioles en point final (prélèvement et analyse du milieu de culture après une incubation pendant une durée déterminée) ou en cinétique (plusieurs prélèvements et analyses réalisés en cours d'incubation).

## 2. Premières caractérisations de souches exprimant les gènes $ecppc$ , $mdh3_c$ et $spmae$

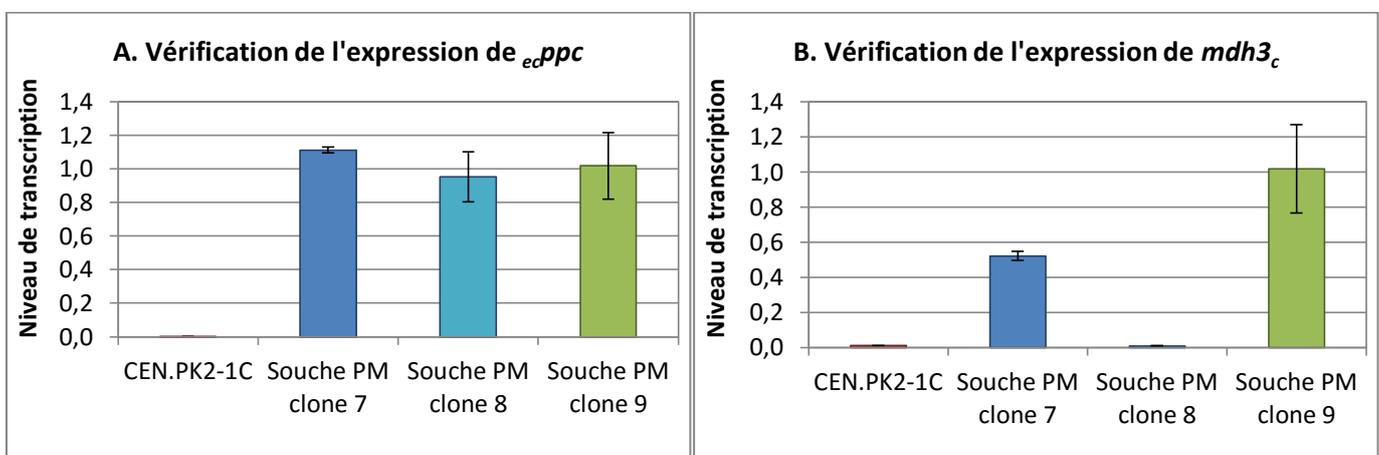
### 2.1. Souches auxotrophes exprimant $ecppc$ et $mdh3_c$

Une première caractérisation a été réalisée sur les souches obtenues par introduction des gènes  $ecppc$  et  $mdh3_c$  portés par des plasmides  $2\mu$  (souche PM).

#### 2.1.1. Vérification de la transcription des gènes $ecppc$ et $mdh3_c$

Des clones ont été sélectionnés après vérification de la présence des gènes introduits par PCR. Afin de confirmer ces résultats, nous avons procédé à une vérification de l'expression des transgènes par RT-qPCR sur les ARN totaux de la souche CEN.PK2-1C et de trois clones de la souche PM (Figure 46). Les résultats montrent que les deux gènes sont bien exprimés dans tous les clones, à l'exception du clone 8 qui n'exprime pas  $mdh3_c$ . La souche contrôle ne montre pas d'expression de  $ecppc$ , ce qui est logique puisque ce gène n'est pas exprimé chez *S. cerevisiae*. Elle montre également un niveau d'expression très faible de  $mdh3$ : cela est dû au fait que cette isoforme est celle qui est la plus faiblement exprimée (Steffan and McAlister-Henn, 1992) et qu'elle intervient dans le cycle du glyoxylate, qui est inactif en croissance sur glucose (Kornberg, 1965).

Les niveaux d'expression des gènes  $ecppc$  sont assez proches pour les trois clones, alors que pour le gène  $mdh3_c$  la disparité entre le clone 7 et le clone 9 est plus grande. L'écart-type pour l'expression du clone 9 est cependant assez élevé, ce qui réduit l'écart d'expression entre les deux clones.



**Figure 46.** Résultats du niveau de transcription normalisé des gènes  $ecppc$ (A) et  $mdh3_c$ (B) dans la souche contrôle CEN.PK2-1C auxotrophe et dans les clones de la souche PM obtenus par RT-qPCR sur les ARN totaux.

Les écart-types correspondent à trois répliquats de l'analyse qPCR réalisés à partir d'un même échantillon d'ADNc.

## 2.1.2. Essai en fioles en point final

Après vérification de l'expression des gènes introduits, les deux clones de la souche PM exprimant les gènes *ppc* et *mdh3* ont été comparés à la souche CEN.PK2-1C auxotrophe lors d'un essai en fioles sans prélèvement intermédiaire pour les évaluer en termes notamment de croissance, de production de malate et de production d'éthanol. L'essai a été réalisé sur milieu YNB contenant 100 g/L de glucose et 0,5 M de tampon phosphate à pH 5,5 complété en histidine, leucine, tryptophane et uracile pour la souche contrôle CEN.PK2-1C et en tryptophane et uracile pour les clones 7 et 9. L'analyse des milieux de culture a été réalisée après 48 heures d'incubation à 30°C sous une agitation de 110 rpm et a donné les résultats portés dans le Tableau 14.

Souche/clone	Absorbance finale	Masse sèche (g/L)	[glucose] (g/L)	[éthanol] (g/L)	[glycérol] (g/L)	[acétate] (g/L)	[malate] (g/L)
CEN.PK2-1C	6,97 ± 0,05	3,32 ± 0,01	0,00 ± 0,00	42,99 ± 0,71	11,30 ± 0,26	3,92 ± 0,08	0,01 ± 0,01
PM clone 7	7,86 ± 0,15	3,81 ± 0,04	0,09 ± 0,12	47,90 ± 0,66	9,31 ± 0,01	1,82 ± 0,02	0,52 ± 0,02
PM clone 9	7,74 ± 0,09	3,67 ± 0,08	0,24 ± 0,34	46,73 ± 1,19	9,85 ± 0,22	1,78 ± 0,02	0,51 ± 0,05

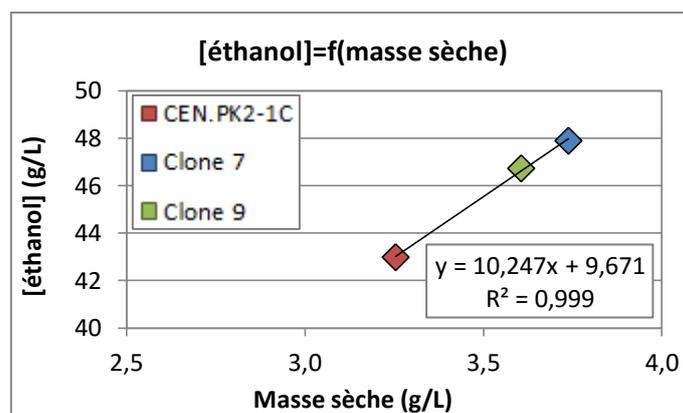
**Tableau 14.** Essai en fioles sur la souche CEN.PK2-1C et les clones 7 et 9 de la souche PM.

Valeurs d'absorbance, de concentrations de masse sèche et de solutés à la fin de l'essai pour la souche contrôle CEN.PK2-1C et les clones 7 et 9 de la souche PM. Les moyennes et écart-types ont été calculés sur 3 réplicats indépendants.

Les mesures d'absorbance et de masse sèche montrent une production de biomasse légèrement plus importante pour les clones de la souche PM (environ 7,8) que pour la souche contrôle CEN.PK2-1C (6,98). L'absorbance est proportionnelle à la concentration de masse sèche des cellules, avec un rapport "concentration de masse sèche sur absorbance" moyen de 0,47. Les mesures de concentrations en glucose montrent que tout le substrat a été consommé.

Les clones 7 et 9 sont les seuls à produire du malate. Ces concentrations sont assez faibles: environ 0,5 g/L, ce qui s'explique par l'absence de transporteur de malate chez la levure. Un tel phénotype (peu de production de malate malgré la mise en place d'une voie de production, sans expression d'un transporteur) a en effet déjà été observé chez *S. cerevisiae* (Zelle *et al.*, 2008).

Par ailleurs, les concentrations en éthanol des clones 7 et 9 sont supérieures à celle du contrôle. La production d'éthanol est corrélée à la production de biomasse: on observe en effet une relation linéaire entre ces deux paramètres (Figure 47).



**Figure 47.** Relation entre la concentration en éthanol et la concentration de masse sèche.

Les rendements massiques de production d'éthanol sont plus élevés pour les clones des souches PM que pour la souche contrôle (Tableau 15).

Les clones 7 et 9 montrent des concentrations en glycérol inférieures à celle de la souche contrôle (Tableau 14), et présentent également des rapports glycérol/éthanol inférieurs à celui de la souche CEN.PK2-1C (Tableau 15).

Souche/clone	Rendement éthanol (g/g glucose)	Glycérol/éthanol
CEN.PK2-1C	0,415 ± 0,008	0,263 ± 0,010
PM clone 7	0,451 ± 0,007	0,194 ± 0,002
PM clone 9	0,446 ± 0,010	0,211 ± 0,001

**Tableau 15.** Rendements massiques de production d'éthanol pour la souche contrôle CEN.PK2-1C et les clones 7 et 9 de la souche PM.

Les moyennes et les écart-types ont été calculés à partir de trois réplicats indépendants.

Cela n'était pas attendu, mais c'est une caractéristique intéressante si elle est confirmée. Ce phénotype peut s'expliquer par le fait que les réactions introduites produisent du malate (dans le cas des clones 7 et 9) qui est importé dans la mitochondrie et converti en pyruvate par l'enzyme malique mitochondriale. Cette enzyme peut utiliser comme cofacteur  $\text{NADP}^+$ , ce qui crée un effet transhydrogénase (conversion de  $\text{NADH}$  en  $\text{NADPH}$ ) et réduit le déséquilibre rédox cytosolique au niveau de  $\text{NADH}$ . En conséquence, la production de glycérol par la glycérol déshydrogénase  $\text{NADH}$  dépendante, qui remplit normalement cette fonction, est réduite, et cette économie de carbone se répercute positivement sur la production d'éthanol. Cependant, des études similaires décrites dans la littérature n'ont pas donné de tels résultats (Suga *et al.*, 2012). D'autres essais de production d'éthanol ont été effectués et sont détaillés dans le Chapitre 5.

Les clones des deux souches transformées montrent également une production d'acétate inférieure de 50% environ à celle du contrôle.

La réalisation d'un bilan carbone (Tableau 16) a permis d'évaluer la fiabilité des mesures effectuées lors de cet essai. Nous avons comparé le nombre de moles de carbone consommées (par différence entre les concentrations initiale et finale de glucose) et le nombre de moles de carbone produites, résultant de la contribution de l'éthanol, de la biomasse, du glycérol, de l'acétate, du malate et du gaz carbonique dégagé. Cette dernière quantité a été estimée par mesure de la perte de masse entre le début et la fin de l'essai, comme expliqué plus haut. Le différentiel calculé entre le carbone consommé et le

carbone produit représente l'erreur sur le bilan matière ; il est inférieur à 4%, ce qui montre une bonne fiabilité des analyses et confirme que les composés dosés sont bien suffisants pour effectuer le bilan carbone.

La comparaison du dégagement de CO<sub>2</sub> ne montre en revanche pas de différence significative entre les clones 7 et 9 et la souche contrôle; la fixation de carbone qui peut être réalisée par la carboxylation du PEP est probablement beaucoup trop faible comparée à la quantité de dioxyde de carbone dégagée par la respiration (les conditions ne sont pas ici strictement anaérobies).

Souche/clone	CO <sub>2</sub> dégazé (moles/fiole)	Moles de carbone en entrée	Moles de carbone en sortie	Différentiel
CEN.PK2-1C	0,051 ± 0,004	0,173 ± 0,000	0,176 ± 0,003	-2,22% ± 1,66%
PM clone 7	0,052 ± 0,003	0,177 ± 0,000	0,183 ± 0,002	-3,46% ± 0,80%
PM clone 9	0,050 ± 0,004	0,175 ± 0,000	0,179 ± 0,001	-2,21% ± 0,93%

**Tableau 16.** Bilan carbone réalisé sur l'essai en fioles des souches CEN.PK2-1C et PM: comparaison du nombre de moles de carbone en entrée et du nombre de moles de carbone produites.

Les moyennes et écart-types ont été calculés sur 3 réplicats indépendants.

### 2.1.3. Conclusion

Ce premier essai en fioles sur des souches auxotrophes exprimant les gènes *ecppc* et *mdh3<sub>c</sub>* a permis de mettre en évidence un effet physiologique de l'expression des transgènes sur la production de malate, visible après 48 heures pour les deux clones testés. Les gènes exprimés semblent par ailleurs avoir un effet sur la production d'éthanol et de glycérol, aspect qui sera développé dans le chapitre 5. Nous avons également pu confirmer la fiabilité des méthodes analytiques et l'expression des gènes d'intérêt. L'analyse de ces résultats et des données d'expression de gènes dans les clones testés a conduit à la sélection du clone 9 de la souche PM comme candidat pour procéder aux transformations suivantes.

## 2.2. Souche auxotrophe exprimant *ecppc*, *mdh3<sub>c</sub>* et *spmae*

La souche PMS auxotrophe pour l'uracile, exprimant les gènes *ecppc*, *mdh3<sub>c</sub>* et *spmae* sur des plasmides 2μ, a été générée à partir de la souche PM clone 9. Après vérification de la présence des plasmides d'intérêt par PCR, deux clones de cette souche ont été évalués, notamment pour la production de malate, lors d'un essai en fioles en point final, puis lors d'une étude cinétique.

### 2.2.1. Expérience en fioles sans prélèvement : évaluation de la production d'acide malique

L'essai a été réalisé sur milieu YNB contenant 100 g/L de glucose et 0,5 M de tampon phosphate à pH 5,5. Le milieu a été complété en tryptophane et uracile pour la souche PM et en uracile pour les clones 1 et 2 de la souche PMS. L'analyse des milieux de culture a été réalisée après 26 heures d'incubation à 30°C sous une agitation de 150 rpm. L'agitation a été augmentée par rapport aux essais précédents afin de favoriser la production d'énergie par respiration. Les résultats de concentrations de biomasse, de glucose, d'éthanol, de glycérol, d'acétate et de malate sont portés dans le Tableau 17, en comparaison de la souche contrôle 4PL.

Souche/ clone	Absorbance finale	pH initial	pH final	[glucose] (g/L)	[éthanol] (g/L)	[glycérol] (g/L)	[acétate] (g/L)	[malate] (g/L)
4PL	3,64 ± 0,11	5,6	5,1	54,37 ± 0,92	13,90 ± 0,08	5,52 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
PM	1,79 ± 0,16	5,5	5,3	73,77 ± 2,00	8,69 ± 0,34	3,05 ± 0,12	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
PMS clone 1	2,53 ± 0,13	5,5	4,8	61,77 ± 1,28	12,19 ± 0,79	4,17 ± 0,15	0,17 ± 0,30	2,97 ± 0,04
PMS clone 2	2,35 ± 0,80	5,6	4,8	58,48 ± 0,39	13,44 ± 0,32	4,62 ± 0,06	0,18 ± 0,31	2,96 ± 0,12

**Tableau 17.** Essai en fioles sans prélèvement: comparaison des souches 4PL, PM, PMS clone 1 et PMS clone 2.

Valeurs d'absorbance, de pH et de concentrations en glucose, éthanol, glycérol, acétate et malate en fin d'essai. Les moyennes et écart-types ont été calculés sur trois réplicats indépendants.

Les résultats d'absorbance pour le contrôle (souche 4PL) et les autres souches sont plus faibles que dans l'essai précédent car le temps d'incubation n'est que de 26 h au lieu de 48. Les valeurs pour les clones 1 et 2 et la souche PM sont nettement inférieures à celles de la souche contrôle 4PL: il semble que l'expression des transgènes ait un impact négatif sur la vitesse de croissance. Il est cependant difficile de faire une comparaison directe du fait des différences de milieu (ajout éventuel d'acides aminés/base azotée) entre les différentes souches testées. La concentration finale de glucose est d'autant plus réduite que la concentration de biomasse est importante: la souche contrôle montre une concentration résiduelle de 55 g/L de glucose au moment de l'analyse, contre 60 g/L environ pour les deux clones de la souche PMS et 74 g/L pour la souche PM.

La variation de pH entre le début et la fin de l'essai met en évidence une acidification liée à une production de CO<sub>2</sub> et probablement de composés acides. La variation de pH de la souche PM est inférieure à celle de la souche contrôle, ce qui est probablement dû à une croissance moindre. En revanche, malgré un taux de croissance inférieur à celui de la souche contrôle, les deux clones de la souche PMS présentent une variation de pH très supérieure à celle-ci. Cette variation de pH est probablement à rapprocher de la production de malate: en effet, le malate est exporté de la cellule *a priori* par co-transport de malate mono-anionique et d'un proton, ce qui contribue à acidifier le milieu.

On n'observe effectivement une production significative de malate que pour les deux clones de la souche PMS. Cette production est bien plus importante que celle observée dans l'essai précédent pour les clones 7 et 9 de la souche PM, puisqu'on atteint ici 3 g/L. Ceci montre l'importance de la présence du transporteur.

Contrairement à l'essai précédent, la souche PM, qui ne comporte pas le transporteur, ne semble pas produire de malate. Cela est probablement dû au fait que les analyses étant réalisées au bout de 26 heures contre 48 heures pour l'essai précédent, les solutés, dont le malate, sont produits en quantité moindre par rapport à l'essai précédent puisque la croissance est moins avancée. Comme cette souche ne possède pas de transporteur actif de malate, un certain seuil de malate intracellulaire est certainement requis avant que la diffusion vers le milieu extérieur ne puisse avoir lieu et que l'on n'y détecte du malate.

Les rendements massiques de production de malate (Tableau 18) pour les clones 1 et 2 de la souche PMS sont 0,095 et 0,079 g malate par g de glucose consommé respectivement; cela équivaut respectivement à 0,12 et 0,11 mole de malate par mole de glucose consommée. Ces rendements sont

inférieurs à ce qui a été obtenu précédemment chez *S. cerevisiae* en fioles (rendement molaire de 0,42 mole/mole glucose chez Zelle *et al.*, 2008) ; toutefois c'est un premier résultat positif et encourageant pour un essai conduit sans optimisation préalable et sans ajout de carbone inorganique.

Souche/clone	Rendement malate (g/g glucose)
4PL	0,000 ± 0,000
PM	0,000 ± 0,000
PMSclone 1	0,095 ± 0,006
PMSclone 2	0,079 ± 0,003

**Tableau 18.** Rendements massiques de production de malate calculés en g de malate par g de glucose consommé.

Les moyennes et écart-types ont été calculés sur trois réplicats indépendants.

Les concentrations finales en éthanol et en glycérol sont d'autant plus importantes que la biomasse est produite en grande quantité. La plus haute concentration en éthanol est obtenue pour la souche contrôle avec 13,9 g/L; les deux clones de la souche PMS montrent des concentrations en éthanol assez proches, 12,2 et 13,4 g/L. La souche PM présente une concentration inférieure à 9 g/L, probablement du fait de son retard de croissance marqué. Contrairement à l'essai précédent, cette dernière souche donne une concentration en éthanol très inférieure à celle de la souche contrôle de cet essai (4PL). Cependant, les rendements massiques de production d'éthanol des souches PM et PMS restent supérieurs à celui de la souche contrôle (Tableau 19).

Le profil des concentrations de glycérol est similaire à celui des concentrations en éthanol, avec 5,25 g/L pour la souche contrôle, environ 4,5 g/L pour les deux clones de PMS et seulement 3 g/L pour la souche PM. Cependant, la concentration de glycérol produit ne dépend pas que de la biomasse: elle dépend également de la complémentation en acides aminés. En effet, la synthèse d'acides aminés produit du NADH qui est réoxydé en produisant du glycérol. Or les souches testées dans cet essai ne sont pas toutes complémentées de la même manière, puisque la souche 4PL est capable de synthétiser tous ses acides aminés, et est donc susceptible de produire plus de glycérol, tandis que les autres souches sont complémentées dans le milieu en uracile et tryptophane (souche PM) ou en uracile seul (souches PMS). On constate que le rapport glycérol/éthanol (Tableau 19) est effectivement plus élevé pour la souche 4PL que pour les autres souches. Par ailleurs, chez les souches exprimant la malate déshydrogénase, la réaction catalysée par cette enzyme consomme NADH et produit du NAD<sup>+</sup>, ce qui peut partiellement remplacer la glycérol déshydrogénase pour réoxyder NADH.

Souche/clone	Rendement éthanol (g/g glucose)	Glycérol/éthanol
4PL	0,306 ± 0,005	0,397 ± 0,004
PM	0,367 ± 0,021	0,352 ± 0,009
PMSclone 1	0,328 ± 0,009	0,342 ± 0,009
PMSclone 2	0,328 ± 0,004	0,344 ± 0,005

**Tableau 19.** Rendements massiques de production d'éthanol en g d'éthanol par g de glucose consommé et rapport glycérol sur éthanol pour la souche contrôle 4PL, la souche PM et les deux clones de la souche PMS.

Les moyennes et écart-types ont été calculés sur trois réplicats indépendants.

Les concentrations en acétate mesurées en fin d'essai sont très faibles (inférieures à 0,2 g/L).

**Conclusion.** Ce premier essai en point final mettant en jeu deux clones de la souche PMS exprimant *ecppc*, *mdh3<sub>c</sub>* et *spmae* a permis d'obtenir une concentration de presque 3 g/L de malate en 26 heures

sans apport de carbone inorganique. Cette première caractérisation confirme donc l'effet physiologique de l'expression de la PEP-carboxylase et de la malate déshydrogénase sur la production de malate et met en évidence l'importance de l'expression du transporteur, ouvrant ainsi la voie pour un essai cinétique avec apport de carbone inorganique.

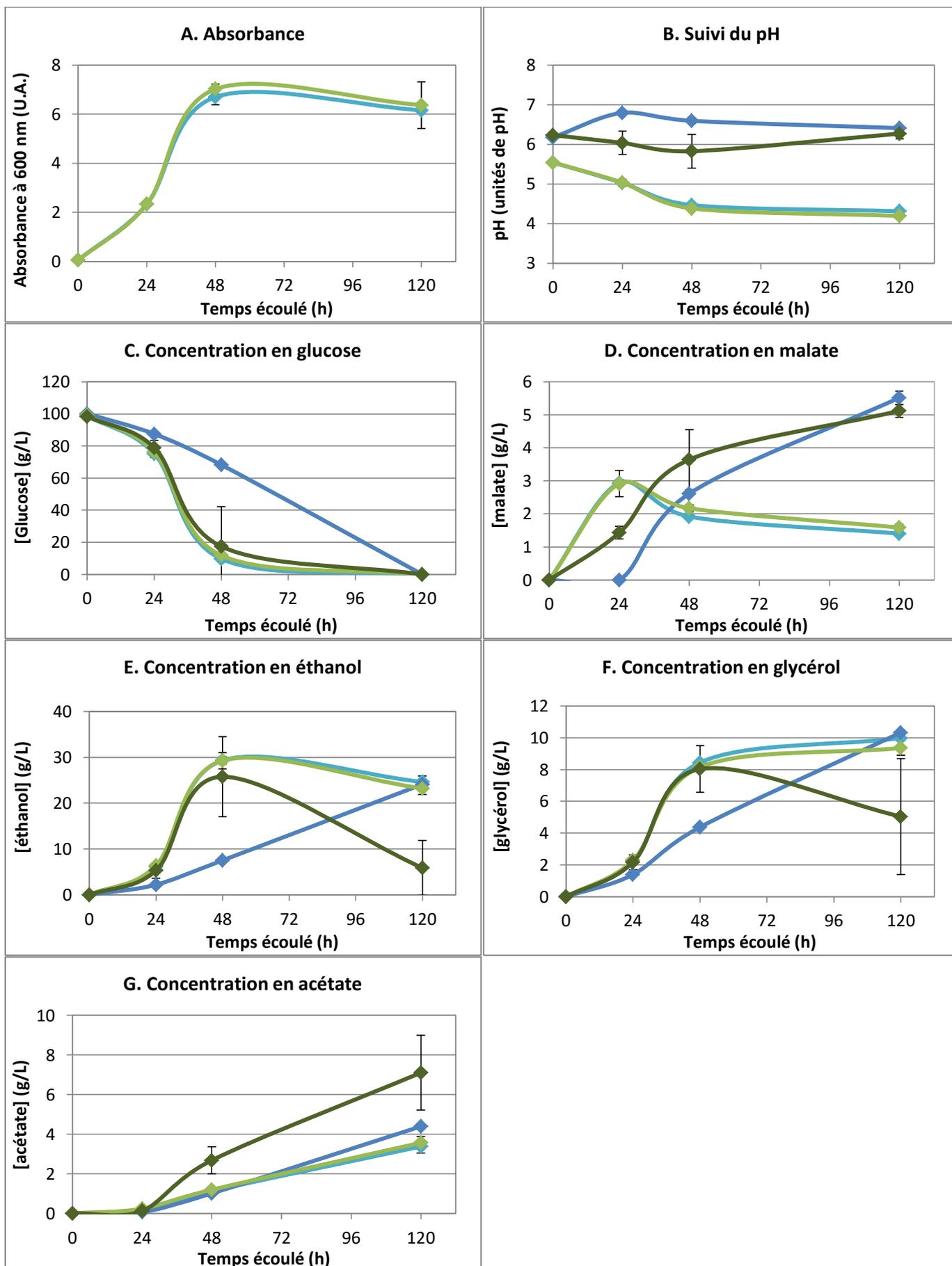
### 2.2.2. Cinétique en fioles : influences de l'ajout de carbonate de calcium et du niveau d'aération

Les deux clones de la souche PMS ont été utilisés pour réaliser une cinétique en fioles afin d'observer l'effet sur la production de malate, de l'apport de carbone inorganique sous forme de carbonate de calcium. L'essai a été réalisé avec le milieu habituel YNB contenant 100 g/L de glucose et 0,5 M de tampon phosphate à pH 5,5, complété en uracile, ou sur le milieu YNB contenant 100 g/L de glucose et 50 g/L de  $\text{CaCO}_3$  et complété en uracile. A noter que la majorité du carbonate de calcium reste insoluble, compte tenu de sa très faible solubilité dans l'eau ; il s'agit donc d'une réserve de carbonate disponible dans chaque essai. Le niveau d'aération a été également changé en incubant les levures dans des fioles avec baffles ou à fond lisse, celles à baffles permettant un meilleur mélange et donc un meilleur contact avec l'air. L'essai a été conduit sur une durée totale de 120 heures. Les fioles ont été incubées à 30°C et sous une agitation de 150 rpm.

L'absorbance, le pH, les concentrations de glucose, malate, éthanol et glycérol ont été portés en fonction du temps sur la Figure 48. Les deux clones présentant des résultats très similaires pour les différentes conditions testées, les moyennes et les écart-types ont été calculés sur les deux répliqués des deux clones afin de rendre les graphes plus lisibles et d'augmenter la significativité des résultats.

**Absorbance.** Les mesures d'absorbance (Figure 48A) n'ont pu être réalisées que pour les conditions sans  $\text{CaCO}_3$  puisque le carbonate de calcium n'est que très faiblement soluble en milieu aqueux et ce solide en suspension fausse les mesures d'absorbance. Les deux conditions pour lesquelles un suivi de l'absorbance a pu être réalisé sont donc les conditions de milieu sans  $\text{CaCO}_3$  en fioles à fond lisse ou à baffles. D'après les résultats obtenus, il n'y a pas d'influence de la présence des baffles sur la vitesse de croissance et l'absorbance maximale, donc pas d'influence du degré de contact entre la culture et l'air dans les deux conditions d'aération étudiées.

**pH.** Le suivi du pH (Figure 48B) montre une différence notable entre les conditions où le milieu contient le tampon phosphate sans  $\text{CaCO}_3$  (bleu et vert clairs) et les conditions où le milieu contient  $\text{CaCO}_3$  sans tampon phosphate (bleu et vert foncés). En présence de phosphate seul, le comportement des levures est le même dans les deux conditions d'aération: le pH de départ est de 5,5 et diminue au cours de l'essai jusqu'à une valeur de 4,2, montrant une apparition d'acide dans la solution, liée à la croissance ( $\text{CO}_2$ ). L'effet tampon ne se manifeste pas car on est loin du pKa du couple  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$  qui est de 7,2. L'espèce acide  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  est en grand excès par rapport à la base conjuguée  $\text{HPO}_4^{2-}$  ; le rapport  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$  est de 50 à pH 5,5 et l'acidification accroît encore ce rapport. En revanche, en présence de  $\text{CaCO}_3$ , la variation de pH dépend des conditions d'aération et d'agitation. Le pH de départ est de 6,3 environ, plus haut que dans le cas précédent; les variations de pH sont plus faibles à cause du pouvoir tampon du couple  $\text{CO}_2$  dissous/  $\text{HCO}_3^-$  dont le pKa est de 6,4. En effet,  $\text{CO}_3^{2-}$  réagit avec  $\text{CO}_2$  dégagé par les réactions biologiques comme expliqué dans l'annexe 2. Dans la condition "fiole à fond lisse" (aération et agitation réduites), le pH augmente jusqu'à 6,8 après 24 heures, alors que dans la condition "fiole à baffles" (aération et agitation plus importantes), il diminue. Mais au bout de 120 heures les deux conditions présentent le même pH.



**Figure 48.** Cinétiques des souches PMS clones 1 et 2 en présence ou en absence de carbonate de calcium dans des fioles à fond lisse ou à baffles.

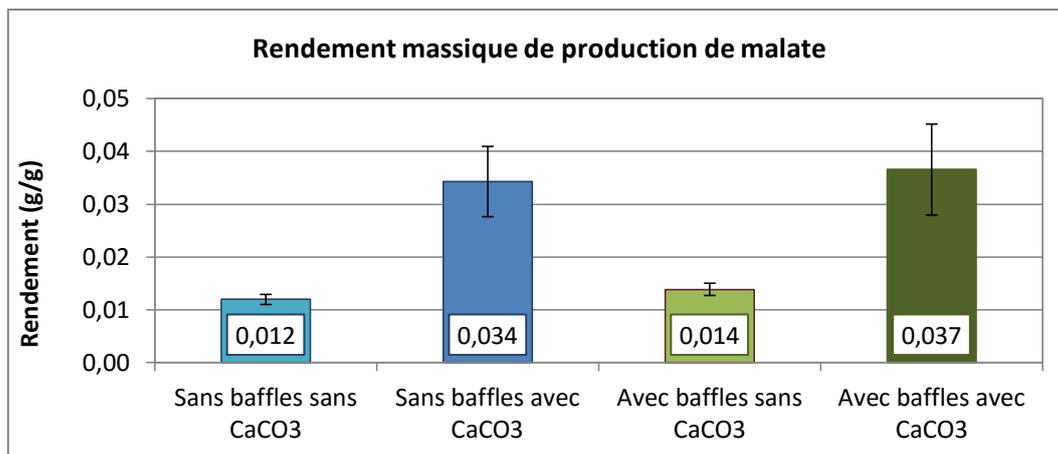
A. Suivi de l'absorbance à 600 nm dans les conditions sans CaCO<sub>3</sub>. B. Suivi du pH. C. Suivi de la concentration en glucose. D. Suivi de la concentration en malate. E. Suivi de la concentration en éthanol. F. Suivi de la concentration en glycérol. G. Suivi de la concentration en acétate. Milieu utilisé : YNB glucose 100 g/L tampon phosphate pH 5,5 0,5 M ou YNB glucose 100 g/L CaCO<sub>3</sub> 50 g/L. Fiole fond lisse sans CaCO<sub>3</sub>: ●; fiole fond lisse avec CaCO<sub>3</sub>: ●; avec baffles sans CaCO<sub>3</sub>: ●; avec baffles avec CaCO<sub>3</sub>: ●.

On peut supposer que dans la condition avec baffles, la meilleure aération permet un meilleur démarrage de la croissance, qui provoque une acidification du milieu. En l'absence de baffles, il y aurait une croissance plus lente qui se traduirait par une acidification quasi nulle au début et une augmentation du pH due à la dissolution progressive du carbonate.

**Glucose.** Le suivi de la concentration en glucose (Figure 48C) corrobore les résultats observés pour les variations de pH. On constate que la cinétique de consommation du glucose est la même pour les deux conditions sans CaCO<sub>3</sub> et pour la condition CaCO<sub>3</sub> avec baffles; seule la condition "présence de CaCO<sub>3</sub>/absence de baffles" montre une consommation de glucose significativement ralentie, avec encore 68 g/L de glucose après 48 heures, alors que les autres conditions présentent des concentrations résiduelles comprises entre 11 et 17 g/L. Toutefois, à la fin de l'essai (après 120 heures d'incubation), le glucose est épuisé dans toutes les conditions testées. L'activité biologique est donc plus lente dans la condition avec CaCO<sub>3</sub> en flacons à fond lisse, en liaison probable avec l'aération et/ou l'agitation moindre.

**Malate.** L'évolution de la concentration de malate (Figure 48D) montre une forte influence de la présence de CaCO<sub>3</sub>. De façon intéressante, après 24 heures, ce sont les deux conditions sans CaCO<sub>3</sub> qui donnent la concentration la plus haute en malate, avec presque 3 g/L contre 1,4 g/L pour la condition CaCO<sub>3</sub> avec baffles et 0 g/L pour la condition CaCO<sub>3</sub> sans baffles. Il est possible que cette différence soit due à une croissance moins rapide en début d'essai pour les souches en présence de CaCO<sub>3</sub> du fait du pH plus élevé, susceptible d'inhiber la croissance de façon plus ou moins marquée. La tendance s'inverse après 48 heures où on commence à voir un effet stimulant de CaCO<sub>3</sub> sur la production de malate. La concentration de malate décroît pour les conditions sans CaCO<sub>3</sub> alors qu'elle augmente en sa présence. En fin d'essai après 120 heures les deux conditions avec carbonate affichent des concentrations en malate supérieures à 5 g/L alors que les concentrations en présence de phosphate ne sont que de 1,5 g/L. Il est d'ailleurs intéressant de noter que l'augmentation de la concentration de malate entre les points à 48 et 120 heures pour la condition CaCO<sub>3</sub> avec baffles peut être due à la consommation du glucose restant, mais également à la consommation de l'éthanol, dont la concentration diminue, *via* le cycle du glyoxylate.

Les rendements de production de malate à la fin de l'essai lorsque tout le glucose est consommé (Figure 49) montrent les mêmes tendances, ils sont plus élevés (d'un facteur 3 environ) en présence de carbonate de calcium. Le niveau d'aération et/ou d'agitation (présence ou absence de baffles), ne semble par contre pas avoir d'influence. Cependant les rendements restent faibles: 0,012 et 0,014 g malate/g glucose consommé, pour les conditions sans CaCO<sub>3</sub> et de 0,034 et 0,037 g pour les conditions avec CaCO<sub>3</sub>. Les valeurs de l'ordre de 0,01 g/g obtenues pour les conditions avec tampon phosphate sont très inférieures à celles observées lors de l'essai précédent (0,079 g/g et 0,095 g/g). Cela s'explique par le fait que l'essai précédent était beaucoup plus court (26 heures). En effet on a pu constater qu'en présence de tampon phosphate, la concentration en malate passe par un maximum aux alentours de 24 heures de culture, alors que le glucose n'est pas entièrement consommé, et décroît ensuite, ce qui explique les différences de rendement observées. En effet au niveau du maximum les rendements de malate sont ici de l'ordre de 12%, donc du même ordre de grandeur que ceux observés dans l'essai précédent.



**Figure 49.** Rendements massiques de production de malate (g malate/g glucose consommé) en fonction du niveau d'aération et de la présence de carbonate de calcium sur deux clones de la souche PMS. Les moyennes et les écart-types ont été calculés sur les deux réplicats des deux clones.

On observe donc une meilleure production de malate en présence de carbonate de calcium à la fin de l'essai; toutefois à ce stade on ne peut encore conclure si c'est dû à l'apport de carbone inorganique ou aux variations de pH.

**Ethanol et glycérol.** Les concentrations d'éthanol (Figure 48E) et de glycérol (Figure 48F) évoluent de la même façon pour les deux conditions sans CaCO<sub>3</sub>: augmentation jusqu'à 48 h et très légère décroissance ensuite. Pour la condition CaCO<sub>3</sub> avec baffles, le profil de production est similaire jusqu'à 48 heures, puis l'éthanol et le glycérol sont consommés entre 48 et 120 heures et leurs concentrations diminuent notablement. Pour la condition CaCO<sub>3</sub> sans baffles, la production d'éthanol et de glycérol est décalée dans le temps, on n'observe que la partie croissante de la courbe, en liaison probable avec le retard de croissance relevé lors de l'analyse des autres graphes; cela se traduit par une production très faible d'éthanol et de glycérol après 24 heures. L'écart est encore plus marqué après 48 heures, où cette condition montre des productions de glycérol et d'éthanol respectivement 2 et 3 fois inférieures aux autres conditions. L'écart est cependant comblé en fin d'essai, où les concentrations mesurées sont similaires à celles obtenues pour les conditions sans CaCO<sub>3</sub>. Contrairement à la condition CaCO<sub>3</sub> avec baffles, il n'y a pas de consommation de l'éthanol et du glycérol après 120 heures, ce qui est dû au décalage de la cinétique de production.

**Acétate.** L'évolution de la concentration d'acétate (Figure 48G) est similaire pour les deux conditions sans CaCO<sub>3</sub> et la condition CaCO<sub>3</sub> sans baffles: la concentration en acétate augmente à partir de 24 heures jusqu'à atteindre environ 4 g/L en fin d'essai. Dans le cas de la condition CaCO<sub>3</sub> avec baffles, les concentrations sont plus élevées que dans les autres conditions à partir de 48 heures. A la fin de l'essai la concentration atteint 7 g/L, soit presque deux fois plus que pour les autres conditions. Ceci est à mettre en relation avec la consommation importante de l'éthanol par la souche dans cette condition, consommation qui génère de l'acétate.

**Conclusion.** Les études cinétiques en fioles ont montré un comportement similaire des deux clones, ce qui a permis d'effectuer une moyenne globale sur quatre valeurs (deux réplicats par clone par condition) et d'obtenir des valeurs plus significatives avec des écart-types plus réduits. Cet essai a mis en évidence une influence positive du carbonate de calcium sur la production de malate. Le niveau d'aération modifie la cinétique d'évolution du système, et donc probablement la croissance, mais uniquement en présence de CaCO<sub>3</sub>. Les écarts sont cependant comblés à la fin de l'essai et aucune influence du niveau d'aération n'est visible sur les rendements finaux de production de malate. Ces

rendements restent cependant faibles, notamment car, dans certains cas, la concentration de malate décroît après un maximum.

### 2.3. Discussion

Les premiers essais de caractérisation physiologique des souches obtenues par biologie moléculaire montrent que l'effet des transgènes introduits sur la production de malate est significatif. L'expression des transgènes a également été confirmée par PCR quantitative sur les transcrits extraits des clones testés.

Les essais en fioles montrent, comme cela était attendu d'après la littérature, l'importance de l'expression du transporteur d'acides dicarboxyliques de *S. pombe* pour l'accumulation extracellulaire de malate. La présence de carbonate de calcium a un effet positif sur la concentration de malate mesurée dans le milieu, bien qu'à ce stade de notre travail il soit difficile de déterminer si ce résultat est dû à l'apport de carbone inorganique ou à l'augmentation de pH du milieu grâce aux ions carbonate.

Le transporteur exprimé transporte le malate sous forme mono-anionique, probablement en symport avec un proton (Sousa *et al.*, 1992). Comme le milieu extracellulaire est plus acide que le cytosol, le gradient de protons ne peut pas être le moteur du transport du malate du cytosol vers le milieu. Le transport ne semble pas non plus pouvoir s'effectuer selon le gradient de malate, puisque le malate est présent majoritairement sous forme di-anionique dans le cytosol comme dans le milieu, et qu'il semble très improbable que la concentration cytosolique de malate reste supérieure à la concentration externe tout au long de l'essai. Il est donc possible que l'export du malate soit effectuée en symport avec un autre cation ou en antiport avec un anion, comme cela a déjà été suggéré dans la littérature lors de la caractérisation du transporteur chez *Saccharomyces cerevisiae* (Camarasa *et al.*, 2001).

Les rendements de production de malate obtenus avec les souches modifiées sont faibles, de l'ordre de 0,05 mole de malate par mole de glucose consommée, mais ces premiers essais permettent de valider le fonctionnement des gènes introduits pour la production de malate. La délétion du gène *pyk1* offre une piste attractive pour augmenter de façon significative les rendements de production.

Il existe également un biais lors du premier essai en point final qui compare les deux clones de la souche PMS à une souche contrôle 4PL prototrophe: les deux clones testés étant auxotrophes pour l'uracile, la composition du milieu n'est pas exactement la même pour toutes les souches et la complémentation de l'auxotrophie par apport du composé manquant dans le milieu peut avoir un effet difficile à évaluer sur la croissance. L'obtention de souches prototrophes exprimant les gènes d'intérêt est donc indispensable pour les essais ultérieurs.

## 3. Caractérisation de souches $\Delta pyk1$

Les souches  $\Delta pyk1$  ont été générées à partir de la souche PM par ajout du gène du transporteur *spmae* et d'un plasmide vide ou du gène de l'enzyme malique relocalisée dans le cytosol *mae1<sub>c</sub>* et délétion du gène *pyk1*. La délétion du gène *pyk1* qui code pour la pyruvate kinase doit permettre de rediriger le flux de carbone de la glycolyse vers la voie de production de malate constituée de la PEP carboxylase et la malate déshydrogénase. L'introduction du transporteur est, comme on l'a vu dans l'essai précédent, indispensable pour un export efficace du malate.

L'ajout d'un plasmide vide permet de compléter la dernière auxotrophie. Nous avons testé l'introduction d'un plasmide 2 $\mu$  (clones 33 et 34) ou d'un plasmide CEN (clones 27 et 28) avec l'idée

que l'expression d'un plasmide CEN (présent en une ou deux copies dans la cellule) serait susceptible de permettre une augmentation du nombre de copies des autres plasmides exprimant les gènes d'intérêt (qui possèdent une origine de répllication  $2\mu$ ), maximisant ainsi l'expression des transgènes.

L'ajout du gène *mae1<sub>c</sub>* est *a priori* optionnel et a été prévu pour permettre la synthèse d'un niveau minimal de pyruvate dans le cytosol après délétion de la pyruvate kinase; ce dernier gène est exprimé sur un plasmide CEN pour éviter un trop haut niveau d'expression et donc un détournement trop important de malate cytosolique vers la production de pyruvate.

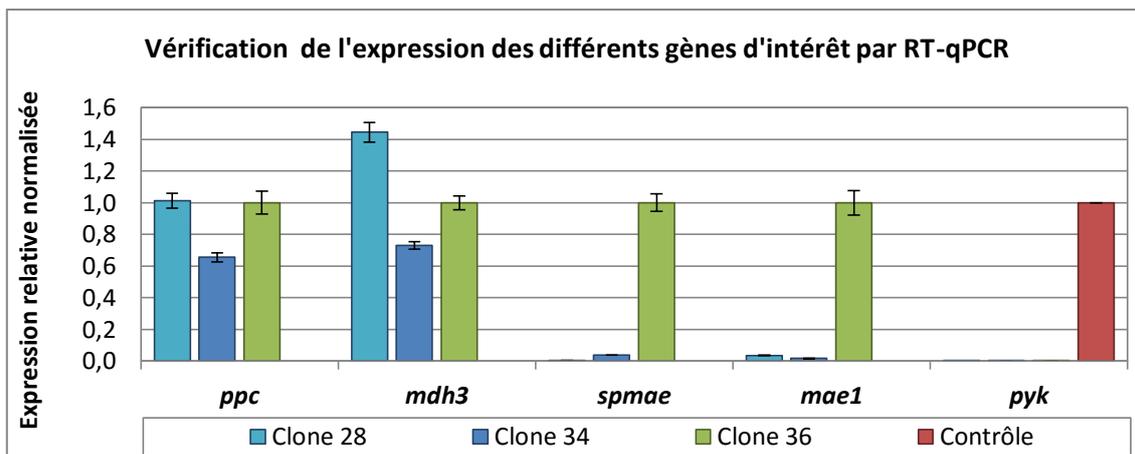
La délétion de *pyk1* dans un contexte sauvage empêche la croissance sur glucose (Sprague, 1977). Les clones générés ont donc été sélectionnés sur milieu minimal contenant de l'éthanol comme source de carbone, ce qui permet de contourner la délétion de *pyk1* au niveau métabolique au cas où les gènes ajoutés ne permettent pas de compléter la délétion. En effet, la métabolisation de l'éthanol permet la formation de malate par le cycle du glyoxylate, qui lui-même fournit du pyruvate par action de l'enzyme malique. L'acétyl-CoA peut être formé, soit par le cycle du glyoxylate, soit à partir de l'éthanol *via* l'acétate par l'acétyl-CoA synthétase. La croissance sur éthanol offre donc des voies de synthèse de pyruvate et d'acétyl-CoA, qui sont des molécules centrales pour le métabolisme cellulaire, sans passer par l'étape de formation du pyruvate à partir du PEP, catalysée par la pyruvate kinase que nous avons supprimée par délétion de *pyk1*.

Ces souches ont été utilisées pour réaliser deux essais de cinétique en fioles et ont fait l'objet de RT-qPCR sur les ARN totaux pour vérifier l'expression des transgènes.

### 3.1. Vérification de l'expression des gènes dans les souches testées

L'expression des gènes *ecppc*, *mdh3<sub>c</sub>*, *spmae*, *mae1<sub>c</sub>* et *pyk* a été vérifiée dans le clone 28 de la souche PMS-delta-2mu, le clone 34 de la souche PMS-delta-cen et le clone 36 de la souche PMS-delta-mae1 (Figure 50). Les quatre clones testés expriment bien la PEP-carboxylase et la malate déshydrogénase relocalisée. Seul le clone 36 présente un haut niveau d'expression du gène du transporteur: les autres clones présentent un problème d'expression de *spmae*. Le clone 36 est également le seul à surexprimer l'enzyme malique, ce qui est normal puisqu'il est le seul à posséder un plasmide portant le gène tronqué *mae1<sub>c</sub>*. Le niveau d'expression de *mae1* chez les autres clones est faible, mais pas nul car ils expriment l'enzyme malique mitochondriale native et l'expression des deux gènes est quantifiée avec le couple d'amorces utilisé.

Les gènes *pyk1* et *pyk2* présentent une homologie de séquence de l'ordre de 70%. Le couple d'amorces utilisé pour la quantification de *pyk1* par qPCR a été dessiné pour amplifier *pyk1* mais des vérifications par PCR et qPCR sur des amplicons PCR purifiés des deux gènes ont montré une amplification des deux isoformes avec le couple d'amorces utilisé. L'expression du gène *pyk2* étant réprimée en présence de glucose, la non-spécificité des amorces ne pose pas de problème pour la vérification de la délétion de *pyk1*. On observe ici que les clones 28, 34 et 36 n'expriment pas *pyk1*, ce qui confirme l'efficacité de la délétion. La souche contrôle 4PL qui exprime le gène *pyk1* normalement présente une expression normalisée à 1.



**Figure 50.** Expression normalisée relative des gènes *ppc*, *mdh3*, *spmae* et *mae1* dans les clones 28 (PMS-delta-cen), 34 (PMS-delta-2mu) et 36 (PMS-delta-mae1) et expression normalisée relative des gènes *pyk* dans les clones 28 (PMS-delta-cen), 34 (PMS-delta-2mu), 36 (PMS-delta-mae1) et la souche contrôle 4PL.

Résultats obtenus par RT-qPCR sur les ARN totaux. Les écart-types correspondent à trois réplicats de l'analyse qPCR réalisés à partir d'un même échantillon d'ADNc.

**Conclusion.** Les gènes de la PEP-carboxylase et de la malate déshydrogénase sont bien exprimés dans tous les clones testés. Le gène du transporteur n'est en revanche pas exprimé chez les clones 28 et 34 testés en fioles, alors qu'il est exprimé chez le clone 36.

Le clone 36 n'a cependant jamais présenté une croissance assez forte sur éthanol pour permettre de l'utiliser pour un essai en fioles (variation d'absorbance d'environ 0,2 unités après 100 heures d'incubation), et son incubation en présence de glucose n'a pas permis d'obtenir de croissance. Le fait que ce clone présente une croissance entravée même sur milieu éthanol est assez inattendu, puisque l'éthanol a été employé comme source de carbone pour contrebalancer des éventuels problèmes de croissance des souches délétées sur glucose. Il est possible qu'une contre-sélection s'opère sur le transporteur, en croissance sur milieu contenant de l'éthanol. En effet, la métabolisation de l'éthanol utilise comme intermédiaire le malate qui, dans un contexte d'expression constitutive du gène *spmae*, est susceptible d'être exporté en grandes quantités dans le milieu extracellulaire, entravant ainsi la croissance des levures.

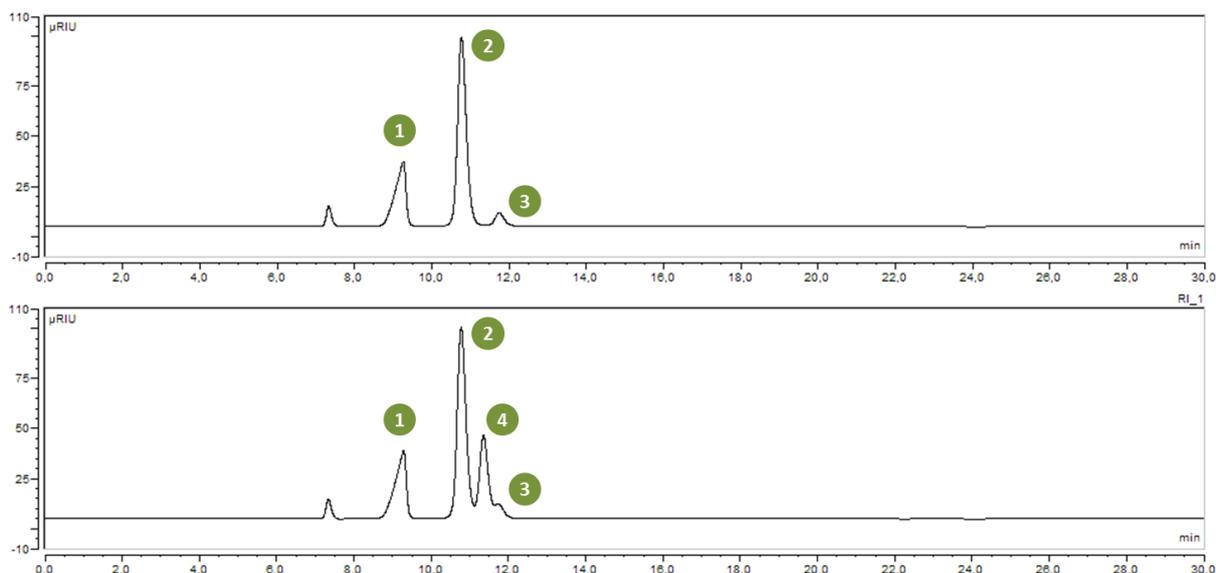
### 3.2. Mise en évidence de la production d'un composé non identifié

La caractérisation des souches  $\Delta pyk1$  en fioles a mené à l'obtention d'un composé détecté par la méthode d'analyse HPLC-RI, mais non identifié. Le composé en question présente un temps de rétention très proche de celui du malate (0,4 minutes de décalage sur le chromatogramme, comme montré en Figure 51), qui était le composé attendu lors de ces essais.

Un ajout dosé d'étalon de malate dans les échantillons obtenus a permis de montrer que ce composé produit n'était pas du malate (Figure 51). Des dosages enzymatiques de malate dans les milieux de culture ont également confirmé ce point.

Des hypothèses ont ensuite été formulées quant à la nature de ce composé inconnu ; des étalons de diverses molécules ont été analysés par HPLC-RI. Les premières molécules testées ont été des sels d'acides organiques: pyruvate, succinate,  $\alpha$ -cétoglutarate, oxaloacétate; les résultats ont montré que le composé inconnu n'était pas l'une d'entre elles. L'aspartate a également été envisagé, du fait de sa formule chimique proche de celle du malate, mais encore une fois le résultat a été négatif.

Des essais d'identification de la molécule inconnue par LC-MS ont été sous-traités à une plateforme extérieure qui devait réaliser une première phase de séparation des solutés par chromatographie ionique avant analyse par spectrométrie de masse. Les essais de séparation par chromatographie ionique n'ont pas permis de purifier les échantillons et l'identification n'a donc pas été possible.



**Figure 51.** Comparaison de deux chromatogrammes du même échantillon de culture avant et après ajout dosé d'étalon d'acide malique.

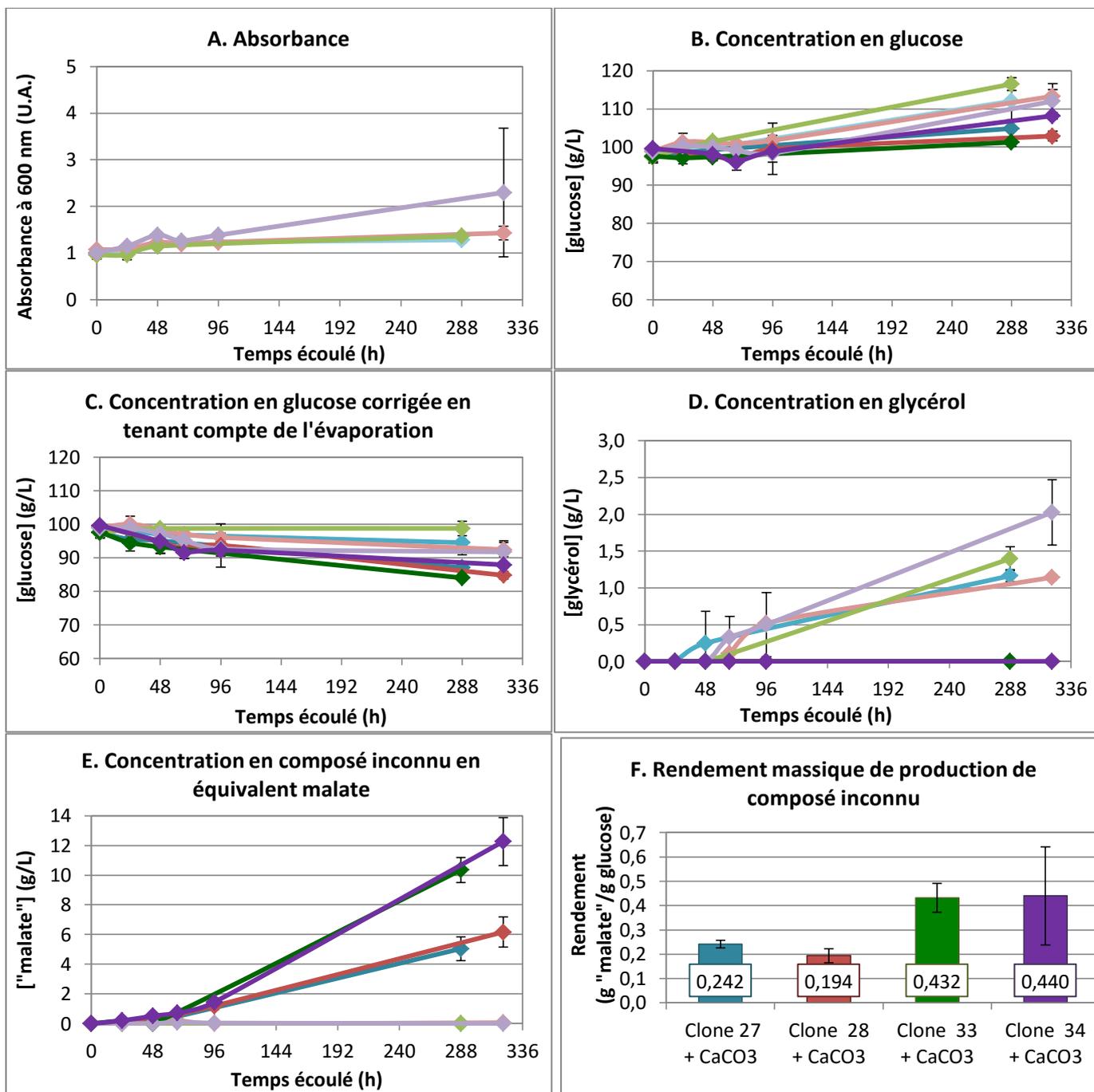
En haut: chromatogramme de l'échantillon de milieu de culture sans ajout d'acide malique; en bas: le même échantillon avec ajout d'acide malique. Attribution des pics: **1**: sels; **2**: glucose; **3**: composé inconnu; **4**: acide malique.

La production de ce composé non identifié semble due à un problème d'expression du transporteur d'acides dicarboxyliques. Pour les essais en fioles présentés ci-dessous, les concentrations du composé inconnu sont exprimées en équivalent malate, en utilisant la gamme d'étalonnage de celui-ci.

### 3.3. Essais en fioles

#### 3.3.1. Cinétique en fioles de deux clones de la souche PMS-delta-cen et de deux clones de la souche PMS-delta-2mu

Les clones 27 et 28 de la souche PMS-delta-cen (*ecppc mdh3<sub>csp</sub>mae Δpyk1* pAG416 vide) et les clones 33 et 34 de la souche PMS-delta-2mu (*ecppc mdh3<sub>csp</sub>mae Δpyk1* pAG426 vide) ont été utilisés pour réaliser un premier essai en fioles sur des souches *Δpyk1*. Les précultures ont été réalisées sur milieu YNB contenant de l'éthanol comme unique source de carbone, car les souches *Δpyk1* ne sont normalement pas entravées par la délétion du gène de la pyruvate kinase en croissance sur éthanol. L'essai a été réalisé sur milieu YNB contenant 100 g/L de glucose et 0,5 M de tampon phosphate à pH 5,5, avec un ajout de 50 g/L de CaCO<sub>3</sub> pour les conditions avec apport de carbone inorganique. Les fioles ont été incubées à 30°C sous agitation de 160 rpm pendant 288 heures pour les clones 27 et 33 et 321 heures pour les clones 28 et 34. Chaque condition a été réalisée en triplicat.



**Figure 52.** Essais en fioles: comparaison des souches PMS-delta-cen (clones 27 et 28) et PMS-delta-2mu (clones 33 et 34).

**A.** Suivi de l'absorbance à 600 nm dans les conditions sans CaCO<sub>3</sub>. **B.** Suivi de la concentration en glucose. **C.** Suivi de la concentration en glucose corrigée en tenant compte de l'évaporation. **D.** Suivi de la concentration en glycérol. **E.** Suivi de la concentration en composé inconnu en équivalent malate. **F.** Rendement massique de production de composé inconnu en équivalent malate pour les conditions en présence de CaCO<sub>3</sub>. Souche PMS-delta-cen clone 27 sur YNB glucose 100 g/L tampon phosphate 0,5 M pH 5,5: ● ; souche PMS-delta-cen clone 27 sur YNB glucose 100 g/L tampon phosphate 0,5 M pH 5,5 CaCO<sub>3</sub> 50 g/L: ● ; souche PMS-delta-cen clone 28 sur YNB glucose 100 g/L tampon phosphate 0,5 M pH 5,5: ● ; souche PMS-delta-cen clone 28 sur YNB glucose 100 g/L tampon phosphate 0,5 M pH 5,5 CaCO<sub>3</sub> 50 g/L: ● ; souche PMS-delta-2mu clone 33 sur YNB glucose 100 g/L tampon phosphate 0,5 M pH 5,5: ● ; souche PMS-delta-2mu clone 33 sur YNB glucose 100 g/L tampon phosphate 0,5 M pH 5,5 CaCO<sub>3</sub> 50 g/L: ● ; souche PMS-delta-2mu clone 34 sur YNB glucose 100 g/L tampon phosphate 0,5 M pH 5,5: ● ; souche PMS-delta-2mu clone 34 sur YNB glucose 100 g/L tampon phosphate 0,5 M pH 5,5 CaCO<sub>3</sub> 50 g/L: ● .

**Biomasse.** La mesure de l'absorbance dans les fioles sans CaCO<sub>3</sub> (Figure 52A) montre une croissance très faible pour tous les clones, puisqu'au bout de presque 300 heures d'incubation l'absorbance des clones 27, 28 et 33 n'atteint que 1,4 alors que l'absorbance initiale était de 1. La valeur d'absorbance

finale pour le clone 34 est un peu plus haute (2,3), mais l'écart-type est assez élevé, dénotant une certaine hétérogénéité entre les trois réplicats.

**Glucose.** La mesure directe de la concentration en glucose (Figure 52B) montre une augmentation de celle-ci au cours de l'essai après une centaine d'heures, pour toutes les conditions et tous les clones testés. En effet la croissance étant très faible, la consommation de glucose est réduite et l'évaporation du milieu, consécutive à la durée de l'essai, provoque une concentration progressive du glucose.

Nous avons donc procédé à la correction de la concentration en glucose en tenant compte de l'évaporation (Figure 52C) pour calculer la quantité de glucose réellement consommée par les levures au cours de l'essai. La concentration de glucose résiduelle corrigée décroît avec le temps comme attendu; les consommations totales de glucose sont assez hétérogènes, variant de 17 à moins de 2 g/L. Pour les différents clones testés, la présence de  $\text{CaCO}_3$  dans le milieu de culture semble accélérer la consommation de glucose.

**Glycérol.** La concentration en glycérol augmente uniquement en l'absence de  $\text{CaCO}_3$  (Figure 52D). Elle est comprise entre 1 et 2 g/L en fin d'essai. Il est possible que cette production de glycérol soit associée à la réoxydation de NADH, car il n'y a pas de production d'éthanol permettant de le faire. En présence de  $\text{CaCO}_3$ , où l'on observe la production de composé inconnu, il est possible que cette réoxydation soit prise en charge majoritairement par la malate déshydrogénase, qui consomme NADH sans produire de glycérol.

**Composé inconnu.** La production du composé inconnu (exprimé en équivalent malate) (Figure 52E) est liée de façon stricte à la présence de  $\text{CaCO}_3$  dans le milieu. Les concentrations produites sont de 5 et 6 g/L pour les clones 27 et 28, et de 10 et 12,3 g/L pour les clones 33 et 34. Ce sont donc les clones 33 et 34, qui possèdent le plasmide pAG426 vide  $2\mu$ , c'est-à-dire en multi-copies, qui produisent le composé inconnu en plus grande quantité.

Les rendements de production de ce composé (Figure 52F) montrent des rendements de 0,194 g d'équivalent malate par g de glucose consommé pour le clone 28 et de 0,242 g/g pour le clone 27. Le clone 33 montre un rendement très supérieur avec 0,432 g/g. Le clone 34 est celui qui affiche le meilleur rendement avec 0,440 g/g, mais avec un écart-type beaucoup plus important, ce qui montre une certaine hétérogénéité au sein des réplicats réalisés.

**Conclusion.** Ce premier essai en fioles des souches *Δpyk1* montre qu'elles sont capables de croître sur glucose malgré une cinétique de croissance fortement ralentie. Des problèmes d'expression du gène du transporteur *spmae* ont provoqué la sécrétion en quantité importante d'un composé non identifié.

On peut admettre que le composé inconnu est issu de la voie de production de malate introduite chez les levures, car sa production est stimulée de façon conséquente par la présence de  $\text{CaCO}_3$  dans le milieu, comme cela a été observé précédemment pour le malate. L'absence de transporteur force probablement les levures à limiter le malate intracellulaire, qui sinon pourrait s'accumuler à un niveau toxique, en le transformant en une autre molécule qu'elles peuvent excréter plus facilement. Dans cette optique, on peut interpréter l'absence de production de glycérol dans les milieux avec  $\text{CaCO}_3$  comme un signe d'activité accrue de la malate déshydrogénase, qui permet la réoxydation du NADH produit par les réactions de biosynthèse cellulaire, à la place de la glycérol déshydrogénase.

Une autre observation qui peut être faite ici est que les clones 33 et 34, qui possèdent le plasmide vide pAG426 multi-copies, produisent plus de composé inconnu que les clones 27 et 28, qui possèdent le plasmide vide pAG416 centromérique, donc présent en une seule copie. Contrairement à ce qui avait

été supposé, le fait d'introduire un plasmide vide centromérique n'a apparemment pas une influence positive sur l'expression des autres gènes. Nous avons en effet émis l'hypothèse que l'expression d'un plasmide CEN permettrait une augmentation du nombre de copies des autres plasmides (multi-copies) exprimant les gènes d'intérêt et donc une augmentation de l'expression des transgènes.

Ce premier essai de souches *Δpyk1* est positif car il montre que ces souches sont capables de croître sur glucose. Cependant, cette croissance reste très faible. Un nouvel essai comparant les clones 28 et 34 à un clone de la souche PMS-delta-mae1 exprimant l'enzyme malique a été mené afin de tester l'effet de l'expression de l'enzyme malique dans un contexte *Δpyk1*.

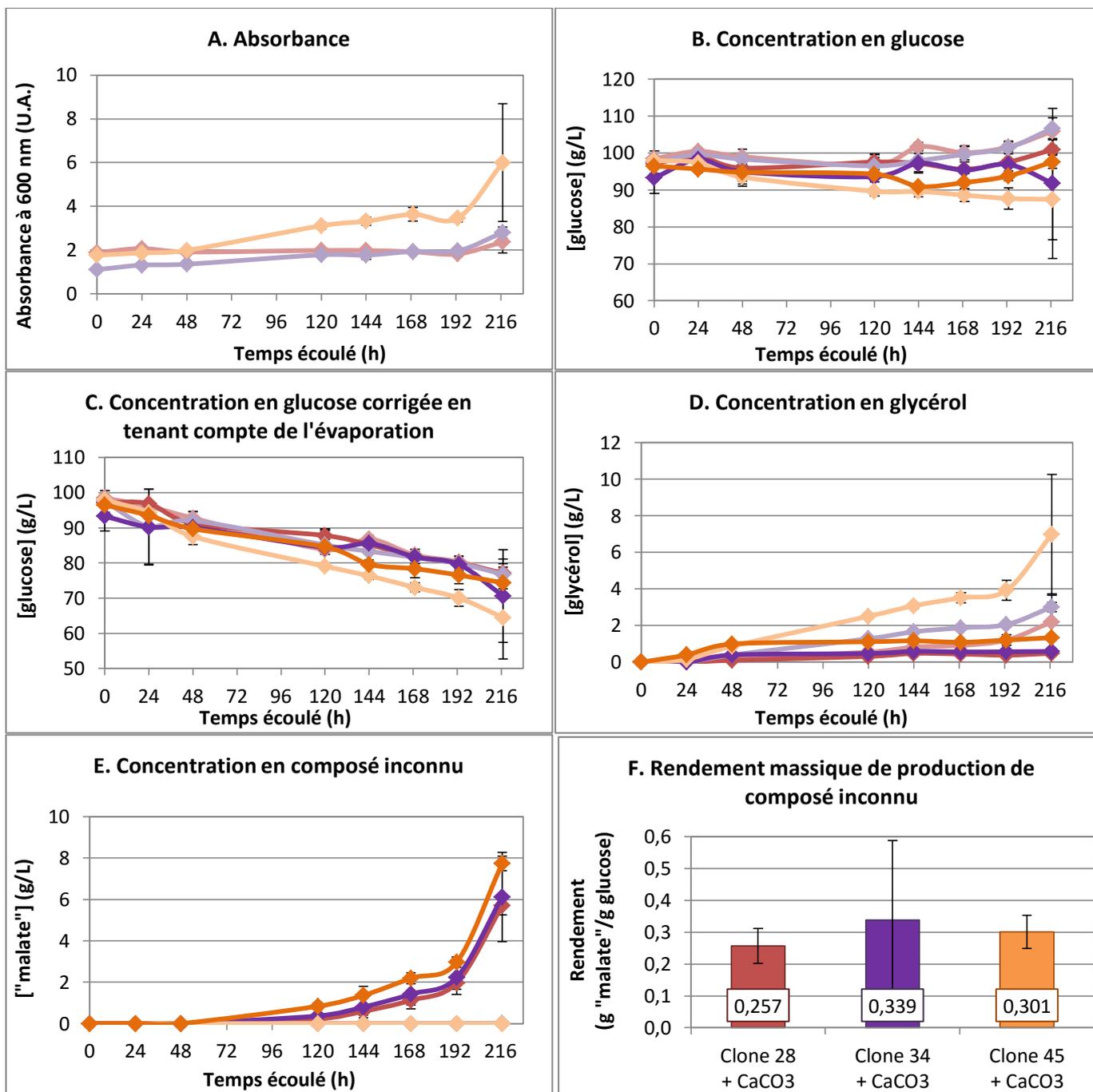
### 3.3.2. Cinétique en fioles d'un clone de la souche PMS-delta-cen, d'un clone de la souche PMS-delta-2mu et d'un clone de la souche PMS-delta-mae1

Le clone 28 de la souche PMS-delta-cen (*ecppc mdh3<sub>csp</sub>mae Δpyk1* pAG416 vide), le clone 34 de la souche PMS-delta-2mu (*ecppc mdh3<sub>csp</sub>mae Δpyk1* pAG426 vide) et le clone 45 de la souche PMS-delta-mae1 (*ecppc mdh3<sub>csp</sub>mae mae1<sub>c</sub> Δpyk1*) ont été utilisés pour réaliser un second essai en fioles. Le but de cet essai est de tester l'impact de l'expression du gène *mae1<sub>c</sub>*, qui permet de reformer le pyruvate à partir du malate dans le cytosol, dans une souche *Δpyk1*. Le gène *mae1<sub>c</sub>* est exprimé sur le plasmide centromérique pAG416 qui n'est présent qu'en une seule copie dans la cellule, car nous ne souhaitons pas que l'expression de *mae1<sub>c</sub>* soit trop forte, de sorte à ne pas trop dévier de carbone vers la production de pyruvate.

Les précultures ont été réalisées sur un milieu YNB contenant de l'éthanol comme unique source de carbone. L'essai a été réalisé en présence de 100 g/L de glucose et de 0,5 M de tampon phosphate pH 5,5 avec 50 g/L de CaCO<sub>3</sub> pour les conditions avec apport de carbone inorganique. Les fioles ont été incubées à 30°C sous une agitation de 160 rpm pendant 216 heures.

**Biomasse.** Cet essai a été réalisé avec une concentration d'inoculum un peu plus importante que l'essai précédent, de sorte à avoir une absorbance initiale de 2 (sauf pour le clone 34 où elle était de 1 environ). Le suivi de l'absorbance dans les conditions sans CaCO<sub>3</sub> (Figure 53A) montre comme précédemment une croissance faible pour le clone 28, qui passe de 2 à 2,37 en absorbance. Le clone 34 présente une variation de croissance un peu plus importante, passant de 1,1 à 2,8. C'est le clone 45 qui présente la meilleure croissance, avec une absorbance finale de 5,99. L'écart-type sur cette valeur finale est cependant assez important: ceci est dû au fait que l'un des réplicats a présenté une croissance plus forte que les autres, comme nous le verrons en détail avec les graphes spécifiques (Figure 54).

**Glucose.** La concentration en glucose (Figure 53B) augmente au-dessus de la valeur initiale pour plusieurs des clones testés, comme cela a déjà été observé pour l'essai précédent, par suite de l'évaporation. La correction de la concentration en glucose en tenant compte de l'évaporation (Figure 53C) montre une concentration finale comprise entre 64 et 78 g/L, correspondant donc à une consommation de glucose allant de 22 à 36 g/L. C'est le clone 45 en présence de tampon phosphate qui présente la plus grande consommation, ce qui est cohérent avec les observations faites au niveau du suivi de l'absorbance.



**Figure 53.** Essais en fioles: comparaison des souches PMS-delta-cen (clone 28), PMS-delta-2mu (clone 34) et PMS-delta-mae1 (clone 45).

**A.** Suivi de l'absorbance à 600 nm dans les conditions sans CaCO<sub>3</sub>. **B.** Suivi de la concentration en glucose. **C.** Suivi de la concentration en glucose corrigée en tenant compte de l'évaporation. **D.** Suivi de la concentration en glycérol. **E.** Suivi de la concentration en composé inconnu en équivalent malate. **F.** Rendement massique de production de composé inconnu exprimé en équivalent malate uniquement pour les conditions en présence de CaCO<sub>3</sub>. Souche PMS-delta-cen clone 28 sur YNB glucose 100 g/L tampon phosphate 0,5 M pH 5,5: ● ; souche PMS-delta-cen clone 28 sur YNB glucose 100 g/L tampon phosphate 0,5 M pH 5,5 CaCO<sub>3</sub> 50 g/L: ● ; souche PMS-delta-2mu clone 34 sur YNB glucose 100 g/L tampon phosphate 0,5 M pH 5,5: ● ; souche PMS-delta-2mu clone 34 sur YNB glucose 100 g/L tampon phosphate 0,5 M pH 5,5 CaCO<sub>3</sub> 50 g/L: ● ; souche PMS-delta-mae1 clone 45 sur YNB glucose 100 g/L tampon phosphate 0,5 M pH 5,5: ● ; souche PMS-delta-mae1 clone 45 sur YNB glucose 100 g/L tampon phosphate 0,5 M pH 5,5 CaCO<sub>3</sub> 50 g/L: ●.

**Glycérol.** Une augmentation de la concentration en glycérol (Figure 53D) est observée chez tous les clones, avec des valeurs plus élevées en présence de tampon phosphate. Comme observé précédemment, la production de glycérol semble directement liée à la production de biomasse,

mesurée par suivi de l'absorbance à 600 nm: le clone 45 en présence de tampon, qui montrait une absorbance finale d'environ 6, présente ainsi la plus haute concentration finale en glycérol avec 7 g/L. Le clone 28 avec tampon présente une concentration finale de 2,2 g/L et le clone 34 de 3 g/L. En présence de CaCO<sub>3</sub> on observe des concentrations en glycérol plus basses, inférieures à 1,5 g/L en fin d'essai.

**Composé inconnu.** La production du composé inconnu (Figure 53E) dépend de la présence de carbonate dans le milieu. Les concentrations finales obtenues sont de 8 g/L pour le clone 45 et d'environ 6 g/L pour les clones 28 et 34 (en équivalent malate). On remarque que, contrairement à ce qui a été observé dans l'essai précédent, les concentrations obtenues avec les clones 28 et 34 sont très proches: cela peut être dû au fait que les fioles du clone 34 ont été inoculées avec une quantité inférieure de biomasse. Comme cet essai est plus court que le précédent (216 heures contre plus de 280 heures pour le premier essai), il est également possible que l'écart que nous avons constaté entre les clones 28 et 34 n'apparaisse que tardivement: les résultats du premier essai n'apportent en effet pas d'indication sur le comportement des clones entre 96 et 288 heures.

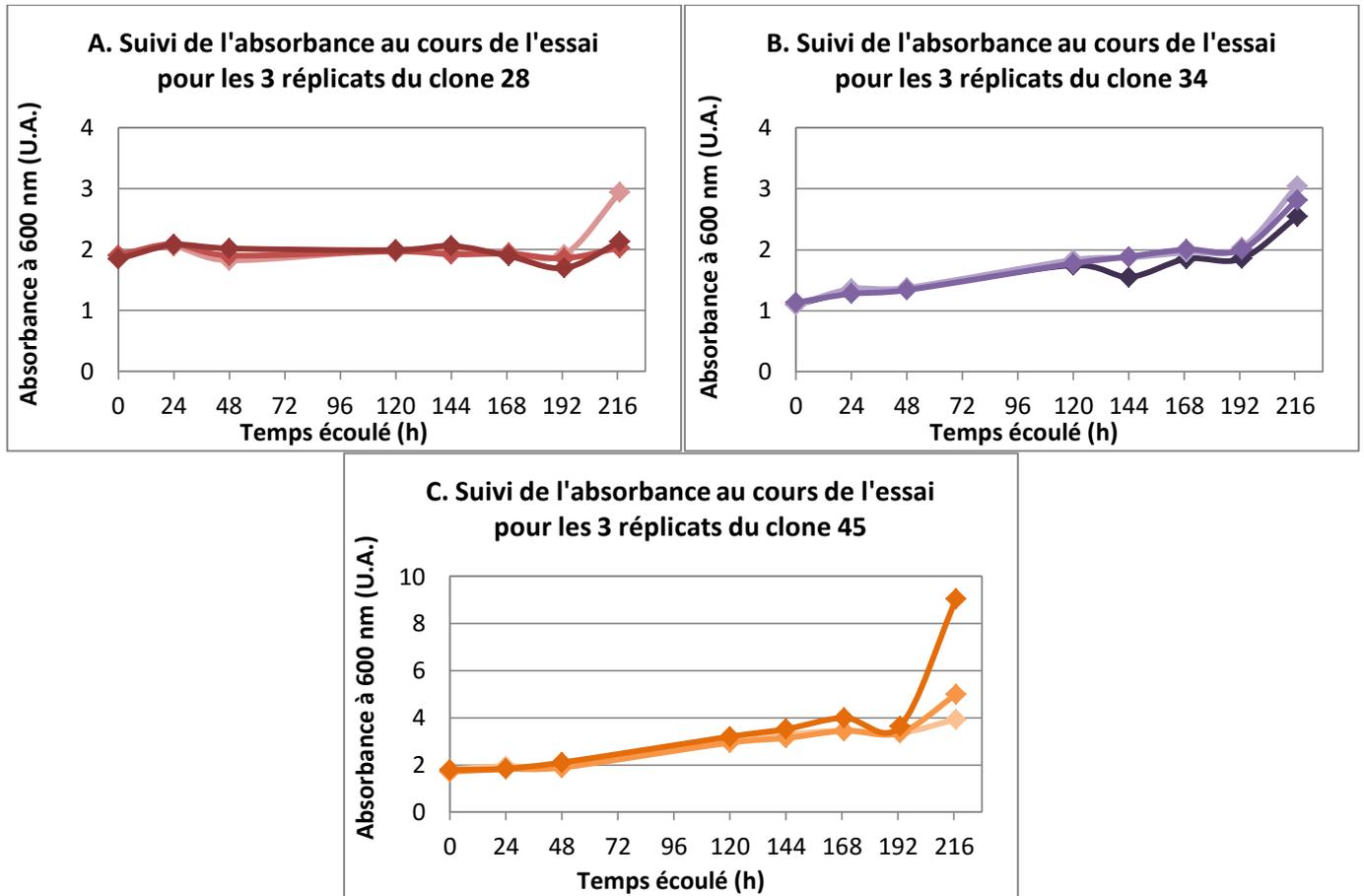
Le rendement de production du composé inconnu (Figure 53F) reste cependant un peu plus élevé pour le clone 34 (0,339 g/g glucose) que pour le clone 45 (0,301 g/g), mais l'écart-type est très important. Cet écart-type élevé est dû au fait que les trois réplicats présentent des concentrations en composé inconnu assez différentes. Ce phénomène, qui avait déjà été observé lors de l'essai précédent, peut s'expliquer par le fait qu'en l'absence du transporteur la croissance sur glucose est très difficile, ce qui provoque une certaine hétérogénéité entre les réplicats selon l'adaptation des levures au milieu. Contrairement au clone 34 pour lequel le rendement est plus faible que dans le premier essai, le clone 28 montre un rendement plus élevé (0,257 g/g) que précédemment (0,194 g/g).

**Conclusion.** Ce second essai impliquant un clone de la souche PMS-delta-mae1 exprimant *mae1<sub>c</sub>* montre une amélioration de la croissance avec l'expression de l'enzyme malique. La croissance obtenue reste cependant beaucoup plus faible que ce que l'on pourrait obtenir avec la souche *pyk<sup>+</sup>*, puisque la meilleure consommation de glucose obtenue n'excède pas 35% en plus de 200 heures.

Le composé non identifié est toujours produit en présence de carbonate de calcium, même pour la souche PMS-delta-mae1. C'est d'ailleurs cette souche qui en produit le plus, ce qui semble logique étant donné qu'elle présente la meilleure croissance. Le clone 34 de la souche PMS-delta-2mu montre cependant une moyenne de rendement un peu plus élevée. Les écart-types obtenus pour ce clone et dans une moindre mesure également pour les clones 28 et 45 dénotent cependant une certaine hétérogénéité entre les réplicats. Cette hétérogénéité est également visible dans les conditions sans CaCO<sub>3</sub> au niveau du suivi de l'absorbance, comme cela va être détaillé ci-dessous.

### 3.4. Essai d'évolution

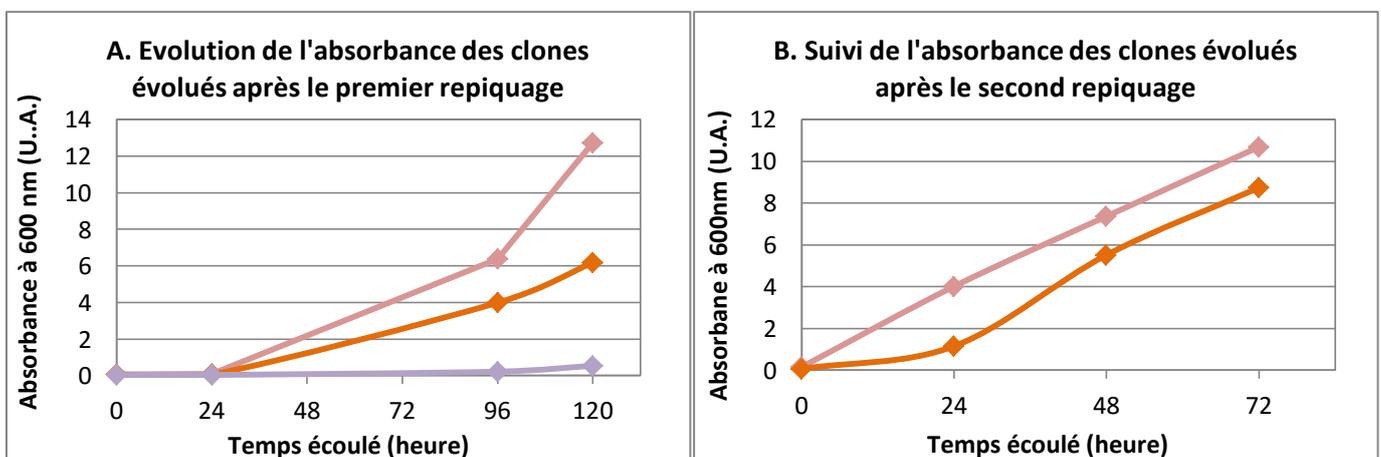
Les graphes de suivi d'absorbance des trois réplicats des différents clones testés lors du second essai montrent pour les clones 28 et 45 un réplicat dont la valeur finale est très supérieure (environ 50%) à celles des autres réplicats (Figure 54).



**Figure 54.** Suivi d'absorbance des réplicats du clone 28 (A), du clone 34 (B) et du clone 45 (C) au cours du deuxième essai en fioles des souches *Δpyk1*.

Clone 28: réplicat 1: ● ; réplicat 2: ● ; réplicat 3: ●. Clone 34: réplicat 1: ● ; réplicat 2: ● ; réplicat 3: ●. Clone 45: réplicat 1: ● ; réplicat 2: ● ; réplicat 3: ●.

Les clones ont été sélectionnés sur milieu YNB contenant de l'éthanol comme seule source de carbone afin de contourner la délétion de *pyk1*. Il est possible que le fait de cultiver ces clones sur un milieu contenant du glucose pendant les essais en fioles applique une pression de sélection qui induit une évolution au cours de l'essai. Les réplicats des clones 28, 34 et 45 obtenus après le second essai et présentant l'absorbance la plus haute ont donc été utilisés pour réaliser une nouvelle inoculation dans du milieu frais afin de vérifier cette hypothèse d'évolution spontanée (Figure 55).



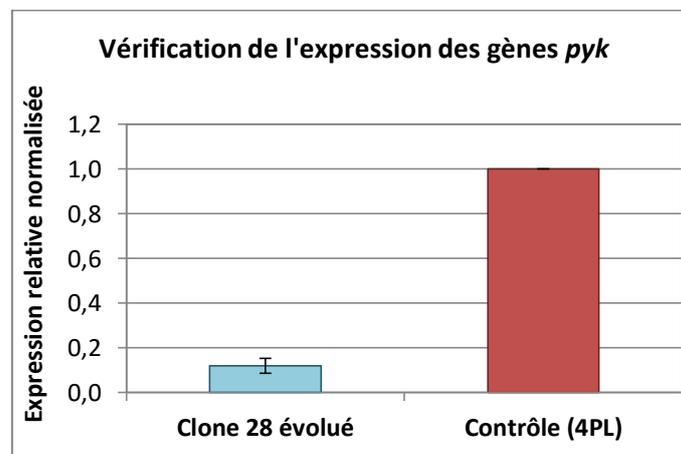
**Figure 55.** Suivi d'absorbance du clone 28 réplicat 1, du clone 34 réplicat 1 et du clone 45 réplicat 3 après un premier repiquage (A), puis du clone 28 réplicat 1 et du clone 45 réplicat 3 après un second repiquage (B) sur milieu YNB glucose 100 g/L tampon phosphate 0,5 M pH 5,5.

Clone 28 réplicat 1: ● ; clone 34 réplicat 1: ● ; clone 45 réplicat 3: ● .

Après une nouvelle inoculation sur milieu frais (Figure 55A), le réplicat 1 du clone 28 et le réplicat 3 du clone 45 semblent effectivement avoir évolué spontanément, puisqu'ils atteignent respectivement des valeurs d'absorbance de 6,2 et 12,7 en 120 heures. Le réplicat 1 du clone 34 semble par contre ne pas avoir cette faculté de croissance, puisqu'il présente une absorbance de 0,5 après 120 heures.

Un deuxième repiquage des clones 28 et 45 évolués a été effectué (Figure 55B), montrant une croissance encore plus forte, avec des absorbances supérieures à 8 atteintes par les deux clones en 72 heures. Cette restauration d'une vitesse de croissance forte s'est accompagnée d'une reprise de la production d'éthanol chez les clones considérés. Nous pouvons donc penser qu'une modification de l'expression de *pyk2* s'est opérée afin de compenser la délétion de *pyk1*, ce qui expliquerait notamment que l'on observe à nouveau une production d'éthanol.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons procédé à une vérification de l'expression des gènes *pyk* par RT-qPCR chez le clone 28 évolué par rapport à la souche contrôle 4PL (Figure 50). Le clone 28 évolué montre une modification de l'expression des gènes *pyk1/pyk2* alors qu'il provient du clone 28, qui présentait une expression nulle des gènes *pyk* lors de la vérification par RT-qPCR (Figure 56). Comme il paraît extrêmement improbable que la délétion se soit spontanément inversée, et que le niveau d'expression mesurée reste 10 fois inférieur au niveau d'expression de *pyk1* mesuré dans la souche contrôle 4PL, l'hypothèse la plus plausible serait celle de la modification spontanée de l'expression de *pyk2* en présence de glucose de façon à compenser la délétion, ce qui explique la restauration de la croissance et de la production d'éthanol chez ce clone.



**Figure 56.** Expression normalisée relative des gènes *pyk* dans le clone 28 évolué et dans la souche contrôle 4PL. Résultats obtenus par RT-qPCR sur les ARN totaux.

Les écart-types correspondent à trois réplicats de l'analyse qPCR réalisés à partir d'un même échantillon d'ADNc.

### 3.5. Discussion

L'obtention et la caractérisation en fioles des souches *ecppc mdh3<sub>esp</sub>mae (mae1<sub>Δ</sub>) Δpyk1* étaient très attendues afin de mesurer l'impact de la délétion sur la production de malate qui, comme nous l'avons vu dans les premiers essais, restait modeste dans un contexte non délété.

La vérification de l'expression des gènes d'intérêt par RT-qPCR a montré un problème d'expression du transporteur sur la majorité des clones testés. Le clone 36 de la souche PMS-delta-mae1 semblait exprimer tous les gènes d'intérêt introduits mais a montré une croissance très faible sur éthanol, ce qui ne nous a pas permis de le tester lors d'essais en fioles. Compte tenu des difficultés que nous avons

rencontrées pour générer les souches *Δpyk1*, nous avons décidé de procéder à des caractérisations en fioles malgré le problème d'expression de *spmae*.

La croissance des souches *Δpyk1* sur un milieu contenant du glucose et du carbonate de calcium a conduit à l'obtention d'un composé inconnu qui a, dans un premier temps, été identifié comme du malate du fait des temps de rétention extrêmement proches obtenus avec la méthode HPLC-RI: 11,3 minutes pour le malate et 11,7 minutes pour le composé inconnu. L'ajout dosé d'étalon malate dans les échantillons ainsi que des dosages enzymatiques du malate ont permis de confirmer la production par les cellules d'un composé non identifié en présence de CaCO<sub>3</sub>. Etant donné que ce produit n'apparaît qu'en présence de CaCO<sub>3</sub>, nous avons supposé qu'il devait être issu de la voie de production du malate que nous avons introduite. Ainsi, chez des souches *ecppc mdh3<sub>c</sub>Δpyk1*, la voie de production de malate est la seule façon de croître sur glucose puisque la voie de la pyruvate kinase est coupée. L'accumulation intracellulaire de malate est vraisemblablement nocive, et le malate ne peut probablement pas être pris en charge en très grandes quantités par le métabolisme cellulaire, ce qui conduit la cellule à le transformer en une autre molécule qu'elle peut excréter plus facilement. L'obtention inattendue de ce composé non identifié pose la question du problème de l'expression du transporteur.

La sélection de ces souches sur milieu YNB-éthanol après transformation semble avoir opéré une contre-sélection sur le gène du transporteur *spmae*. Le choix de l'éthanol comme unique source de carbone comportait l'avantage d'anticiper des problèmes de croissance des souches *Δpyk1* sur glucose. Cependant, la métabolisation de l'éthanol utilise comme intermédiaire le malate qui, dans un contexte d'expression constitutive du gène *spmae*, est susceptible d'être exporté en grandes quantités dans le milieu extracellulaire, entravant ainsi la croissance des levures. Il semblerait que cette contre-sélection ait eu lieu au moment de la transformation et des repiquages sur milieu solide des levures. La sélection des clones positifs repose sur des vérifications de la présence du gène du transporteur par PCR, mais il est possible que la vérification ait été positive malgré la présence de cellules contre-sélectionnées dans la colonie, qui sont devenues majoritaires car favorisées du point de vue de la croissance. Ce scénario est d'autant plus probable que les vérifications par PCR, puis le passage en culture liquide pour la constitution de cryotubes a nécessité deux, voire trois repiquages et plusieurs semaines d'incubation sur milieu solide éthanol afin d'avoir suffisamment de biomasse pour procéder aux mesures PCR et inoculations de milieu. La manière dont les cellules auraient perdu le gène *spmae* reste floue, mais la cause la plus probable serait une recombinaison homologue au niveau du gène d'auxotrophie du plasmide, permettant à la cellule de conserver sa prototrophie, mais de se débarrasser du gène du transporteur. Cette hypothèse est corroborée par la vérification par PCR effectuée sur les clones 27, 28, 34 et 45 après les essais en fioles, qui a montré la présence du gène d'auxotrophie, mais pas celle du gène du transporteur.

Compte tenu du manque de résultats concernant l'identification de la molécule produite par les souches *Δpyk1* en présence de CaCO<sub>3</sub> et de l'incertitude à propos de leur génotype (absence du gène *spmae* mais présence du gène d'auxotrophie), il a été décidé de reconstruire des souches *Δpyk1*. Une souche *Δpyk1* exprimant les gènes *ecppc* et *mdh3<sub>c</sub>* a pu être reconstruite à partir de la souche *Δpyk1* auxotrophe AUX-delta. Cependant, les tentatives d'introduction des gènes *spmae* et/ou *maeI<sub>c</sub>* dans cette souche n'ont permis d'obtenir que quelques clones, malgré des mises au point importantes du protocole de transformation (purification de la cassette de délétion, quantité de cassette, durée du choc thermique, temps de récupération des cellules) et des sélections sur des milieux contenant différentes sources de carbone: glucose, glucose complétement en pyruvate, éthanol, acétate. D'autres essais de transformation avec étalement des transformants sur des milieux complétement en pyruvate notamment pourraient permettre d'obtenir les souches souhaitées.

Devant la difficulté à obtenir des souches  $\Delta pyk1$ , il a été décidé de poursuivre d'une part en caractérisant la souche prototrophe PMS-U exprimant les gènes  $ecppc$ ,  $mdh3_c$  et  $spmae$  et d'autre part en construisant une souche exprimant ces trois gènes et un antisens du gène  $pyk1$ . L'expression d'un antisens du gène  $pyk1$  permet théoriquement de réduire l'expression de ce gène mais sans l'annuler totalement, puisque d'après la littérature la diminution d'expression maximale est de 50% (Bonoli *et al.*, 2006; Scalcinati *et al.*, 2012), ce qui laisse une activité enzymatique basale assez importante pour éviter les problèmes liés à la délétion totale du gène.

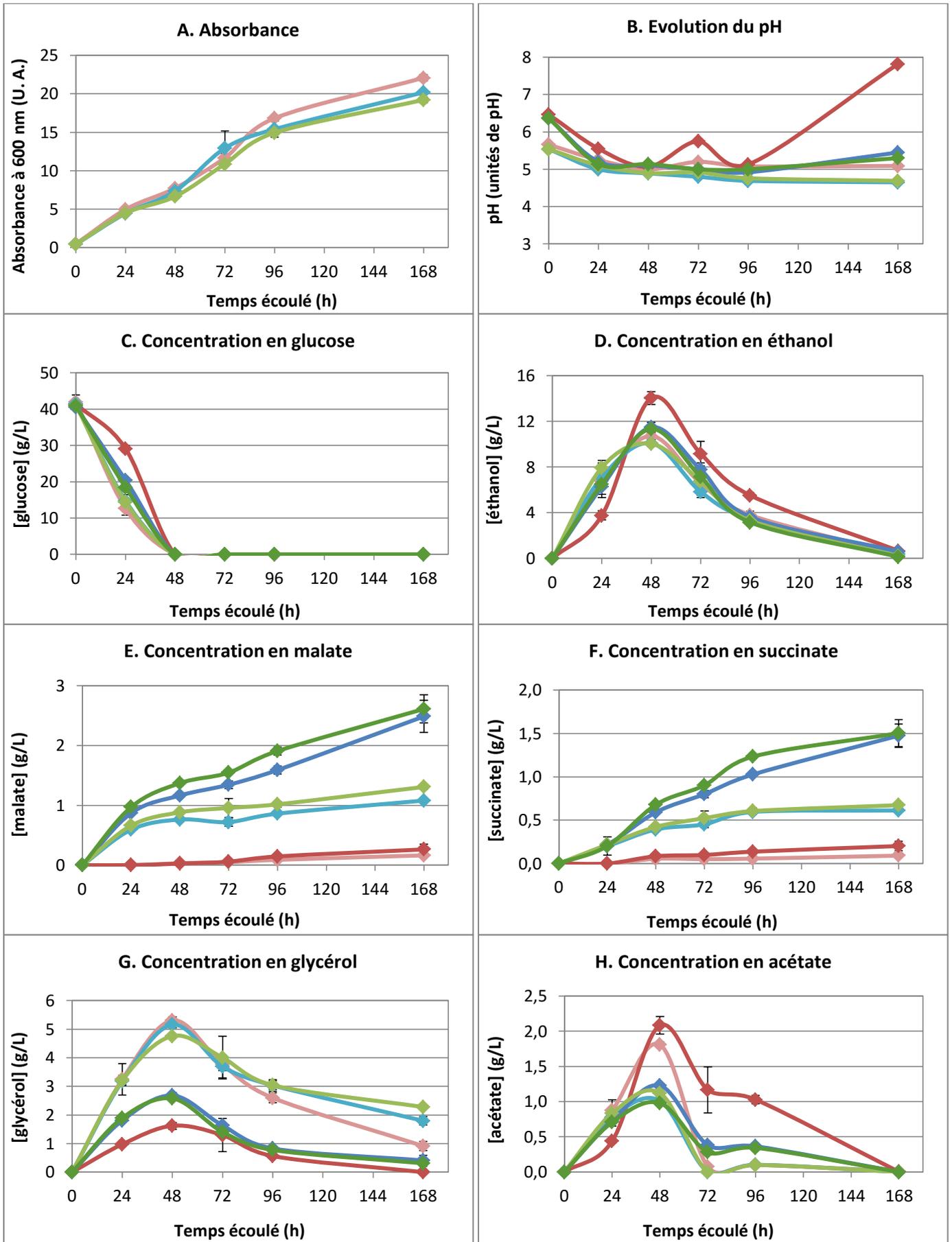
## 4. Caractérisation des souches prototrophes PMS-U et PMS-antisens

Une souche non délétée prototrophe exprimant les gènes  $ecppc$ ,  $mdh3_c$  et  $spmae$  a été obtenue à partir de la souche PM. Une souche prototrophe similaire, exprimant les gènes  $ecppc$ ,  $mdh3_c$  et  $spmae$  ainsi qu'un antisens du gène  $pyk1$ , a également été construite suite aux difficultés rencontrées pour générer des souches  $\Delta pyk1$ . Le principe n'est pas de supprimer le gène pour empêcher son expression, mais d'exprimer un antisens, c'est-à-dire le gène plus quelques paires de bases en amont de la séquence codante à l'envers, de sorte à produire un ARN messenger complémentaire de la séquence du gène cible. Le gène et son antisens sont transcrits tous les deux et vont s'apparier, ce qui va former des ARN double brin, entraver la traduction et donc réduire le niveau d'expression de la protéine jusqu'à 50% (Bonoli *et al.*, 2006; Scalcinati *et al.*, 2012). Dans notre cas, la séquence utilisée comprend 18 bases en amont du codon initiateur en plus de la séquence codante (Zhang and Dietrich, 2005).

### 4.1. Essais en fioles

Ces deux souches ont été comparées à la souche contrôle prototrophe 4PL lors d'un essai en fioles sur milieu YNB contenant 50 g/L de glucose ainsi que 0,5 M de tampon phosphate à pH 5,5 ou 6 g/L de  $\text{CaCO}_3$ . La concentration en glucose a été réduite de sorte à diminuer la durée totale de l'essai. La concentration en carbonate de calcium a également été réduite car il n'est *a priori* que peu consommé et une trop grande concentration en  $\text{CaCO}_3$  sur une durée d'essai longue peut nuire à la croissance en provoquant une hausse graduelle du pH jusqu'à des valeurs supérieures à 8 ou 9 unités de pH. Les souches ont été incubées pendant 168h à 30°C et 200 rpm.

**Biomasse.** Le suivi de la biomasse par mesure de l'absorbance à 600 nm (Figure 57A) a été réalisé dans la condition sans  $\text{CaCO}_3$  des différentes souches testées. Les trois souches suivent le même profil de croissance. La souche 4PL montre une valeur finale d'absorbance (22) légèrement supérieure à la souche PMS-U (20,2) et à la souche PMS-antisens (19,2). Il semble donc que le génotype n'ait qu'une influence négligeable sur la croissance.



**Figure 57.** Essai en fioles: comparaison des souches 4PL, PMS-U et PMS-antisens sur milieu contenant du tampon phosphate ou du  $\text{CaCO}_3$ .

**A.** Suivi de l'absorbance à 600 nm dans les conditions sans CaCO<sub>3</sub>. **B.** Suivi du pH. **C.** Suivi de la concentration en glucose. **D.** Suivi de la concentration en éthanol. **E.** Suivi de la concentration en malate. **F.** Suivi de la concentration en succinate. **G.** Suivi de la concentration en glycérol. **H.** Suivi de la concentration en acétate. Souche 4PL YNB glucose 50 g/L tampon phosphate 0,5 M pH 5,5 : ● ; souche 4PL YNB glucose 50 g/L CaCO<sub>3</sub> 6 g/L : ● ; souche PMS-U YNB glucose 50 g/L tampon phosphate 0,5 M pH 5,5 : ● ; souche PMS-U YNB glucose 50 g/L CaCO<sub>3</sub> 6 g/L : ● ; souche PMS-antisens YNB glucose 50 g/L tampon phosphate 0,5 M pH 5,5 : ● ; souche PMS-antisens YNB glucose 50 g/L CaCO<sub>3</sub> 6 g/L : ●.

**pH.** La mesure du pH dans les fioles (Figure 57B) montre une différence de pH initial entre les conditions avec tampon phosphate, qui affichent un pH de 5,5, et les conditions avec CaCO<sub>3</sub>, qui présentent un pH proche de 6,3. Ces comportements sont similaires à ceux observés au paragraphe 2.2.2.

Pour les différentes souches et conditions testées, le pH diminue après 24 heures à des valeurs inférieures à 5,5, suite à l'acidification liée à l'activité biologique. L'évolution du pH au cours de l'essai est la même pour toutes les conditions, avec des valeurs finales comprises entre 4,7 et 5,3. Seule la souche 4PL en présence de carbonate de calcium présente un comportement différent : le pH diminue pendant les 48 premières heures par suite de la croissance, remonte ensuite à une valeur de 5,75 après 72 heures, diminue à 5 après 96 heures et affiche une valeur finale de 7,82.

Ces variations sont dues à la présence de CaCO<sub>3</sub> qui se dissout graduellement et tend à rendre le milieu plus basique, ce qui est plus ou moins compensé par la production d'acides liée à l'activité cellulaire (principalement CO<sub>2</sub> pour la souche 4PL qui ne produit presque pas de malate ni de succinate). Ainsi, lorsque l'activité cellulaire décroît, c'est-à-dire lorsque le glucose est épuisé et que les cellules doivent s'adapter à consommer l'éthanol (autour de 72 heures), ou lorsque l'éthanol est épuisé (en fin d'essai), le pH augmente. Ce phénomène est probablement beaucoup moins marqué pour les autres souches en présence de CaCO<sub>3</sub> du fait de leur production plus importante d'acides organiques.

**Glucose.** Le graphe d'évolution de la concentration en glucose (Figure 57C) montre une consommation du glucose semblable pour les différentes souches et conditions testées, à l'exception de la souche 4PL en présence de CaCO<sub>3</sub>. Après 24 heures d'incubation, cette condition présente encore 29 g/L de glucose tandis que pour les autres conditions, les concentrations résiduelles varient entre 14 et 18 g/L. Il s'agit d'un effet de la présence de CaCO<sub>3</sub>, puisque cette même souche ne présente pas ce retard de consommation de glucose en présence de tampon phosphate. Le pH initial relativement haut est probablement un facteur défavorable à la croissance, et comme cette souche produit moins de composés susceptibles d'acidifier le milieu que les deux autres, cette condition défavorable est maintenue pendant un temps plus long, ce qui est visible au niveau du glucose consommé à 24 heures. En concordance avec cette explication, on peut remarquer pour les autres souches testées que la condition CaCO<sub>3</sub> présente également une concentration de glucose restant dans le milieu plus haute (environ 18,5 g/L) que la condition tampon phosphate (environ 14 g/L).

**Ethanol et glycérol.** Le suivi de la concentration en éthanol (Figure 57C) montre les mêmes comportements que ceux observés précédemment pour le pH et le glucose : toutes les conditions testées présentent des évolutions de concentration similaires, à l'exception de la souche 4PL en présence de CaCO<sub>3</sub> : dans cette condition on mesure à 48 heures une concentration en éthanol de 14,1 g/L, alors que les concentrations relatives aux autres conditions sont comprises entre 10 et 11,3 g/L. Par ailleurs, bien qu'assez proches les concentrations obtenues dans les conditions CaCO<sub>3</sub> sont plus élevées que celles relatives aux conditions tampon phosphate.

Ces différences peuvent s'expliquer en les mettant en relation avec le glycérol produit (Figure 57G). Les trois souches présentent une plus grande production de glycérol en présence de tampon phosphate qu'en présence de CaCO<sub>3</sub>. De plus, la souche 4PL montre en présence de CaCO<sub>3</sub> une production de

glycérol moins importante que les deux autres souches dans la même condition. Cette production moindre de glycérol peut expliquer les concentrations plus élevées en éthanol observées pour ces conditions, puisque le flux de carbone qui n'est pas dévié pour produire le glycérol peut être utilisé pour produire de l'éthanol. Il est bien connu par ailleurs qu'un stress osmotique peut engendrer la production de glycérol, ce qui pourrait expliquer le comportement des cellules en présence de tampon phosphate qui est en très grande concentration. A l'inverse, en présence de  $\text{CaCO}_3$  seul, le stress osmotique est beaucoup plus réduit.

**Malate.** La concentration en malate (Figure 57E) dépend de la souche et de la présence de  $\text{CaCO}_3$ . La souche 4PL montre une faible production de malate, que ce soit en présence de tampon (0,28 g/L en fin d'essai) ou en présence de  $\text{CaCO}_3$  (0,16 g/L en fin d'essai). Les souches PMS-U et PMS-antisens se comportent de la même façon: la production de malate est plus forte en présence de  $\text{CaCO}_3$  qu'en présence de tampon phosphate. Par contre les différences de concentrations sont très faibles entre les deux souches: la souche PMS-U affiche en fin d'essai une concentration en malate de 2,48 g/L en présence de  $\text{CaCO}_3$  et 1,1 g/L en présence de tampon phosphate, contre 2,6 g/L et 1,3 g/L pour la souche PMS-antisens.

**Succinate.** Le profil de production de succinate (Figure 57F) est sensiblement le même que celui de malate, à ceci près que l'effet de la présence de carbonate sur la production de succinate chez les souches PMS-U et PMS-antisens n'est visible qu'après 48 heures. La souche 4PL produit peu de succinate, que ce soit en présence de tampon (0,1 g/L) ou de  $\text{CaCO}_3$  (0,2 g/L).

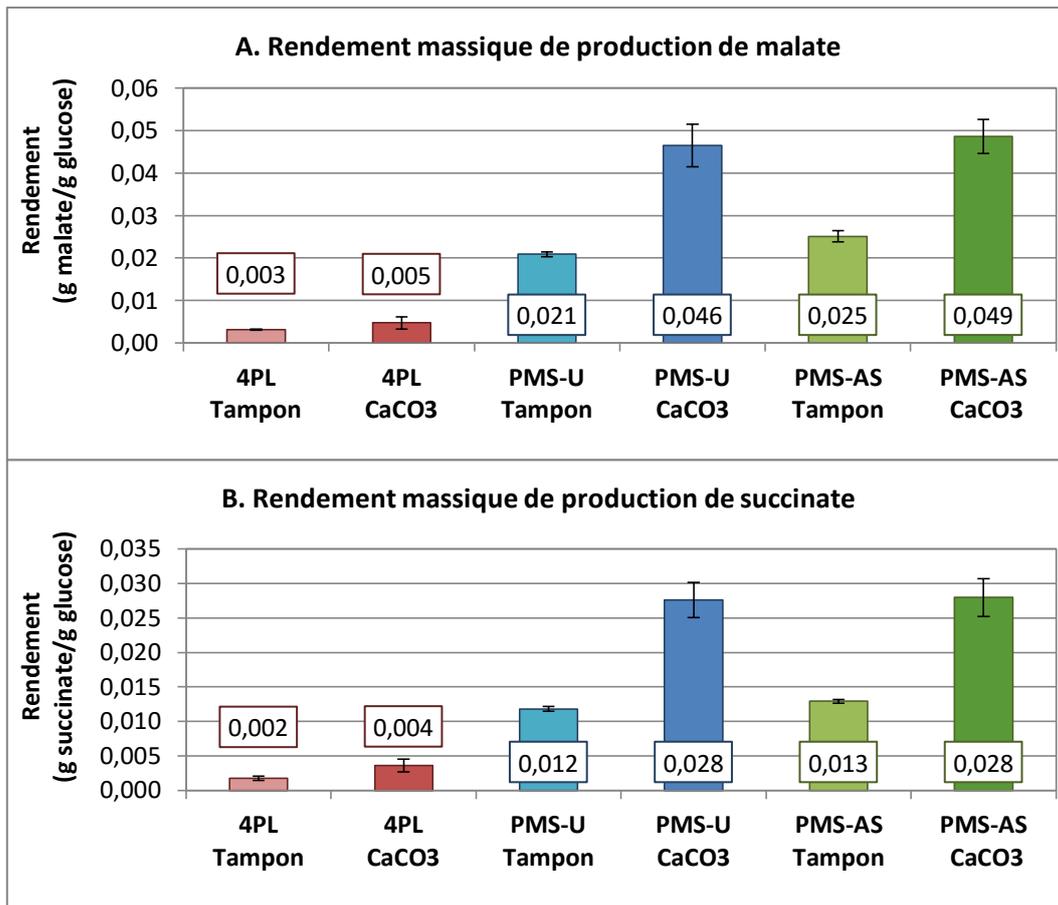
La production de succinate chez les deux autres souches est la même après 24 heures d'incubation pour le tampon phosphate et le carbonate de calcium, puis semble ensuite favorisée par la présence de carbonate. En fin d'essai, les deux souches présentent des concentrations de succinate assez proches, avec 1,5 g/L en présence de carbonate et 0,7 g/L en présence de tampon.

**Acétate.** La production d'acétate présente le même profil (Figure 57H) pour les différentes conditions testées, avec une concentration maximale aux alentours de 48 heures suivie d'une diminution liée à la consommation de l'acétate ; sa concentration finale est nulle. Les souches produisant du malate, qui est exporté en grandes quantités par rapport à la souche sauvage, draineraient plus d'acétate vers la formation d'acétyl-CoA pour alimenter le cycle du glyoxylate et reformer des acides dicarboxyliques cytosoliques. La souche 4PL montre une production d'acétate supérieure à celle des autres souches, mais en présence de  $\text{CaCO}_3$  elle consomme l'acétate plus lentement.

**Rendements massiques de production de malate et de succinate.** Les rendements massiques de production de malate (Figure 58A) pour les souches PMS-U et PMS-antisens sont d'environ 5% (soit 0,067 mole par mole de glucose) en présence de  $\text{CaCO}_3$  et d'environ 2,2% (soit 0,029 mole par mole de glucose) en présence de tampon phosphate.

Les rendements massiques de production de succinate (Figure 58B) pour les souches PMS-U et PMS-antisens sont plus bas: environ 3% (soit 0,046 mole par mole de glucose) en présence de  $\text{CaCO}_3$  et environ 1,3% (soit 0,020 mole par mole de glucose) en présence de tampon phosphate.

Ces rendements sont donc modestes mais restent bien supérieurs aux rendements obtenus avec la souche 4PL, qui sont inférieurs à 1%. On n'observe pas de différence significative entre la souche PMS-U et la souche PMS-antisens; il semble que l'expression de l'antisens de *pyk1* n'ait pas d'effet important de réduction d'expression de la protéine PYK.



**Figure 58.** A. Rendements massiques de production de malate. B. Rendements massiques de production de succinate. PMS-AS: souche PMS-antisens.

**Conclusion.** Les souches prototrophes PMS-U et PMS-antisens présentent une croissance similaire à la souche contrôle 4PL. Les deux souches affichent une production de malate supérieure à celle de la souche contrôle. Cependant, aucune différence significative n'est visible entre la souche PMS-U et la souche PMS-antisens qui exprime l'antisens de *pyk1*. Il semble donc que l'expression de l'antisens ne permette pas une réduction significative de l'expression de PYK1. Il peut s'agir d'un problème d'expression de l'antisens, que nous ne pouvons pas vérifier puisque les séquences de *pyk1* et de son antisens sont complémentaires et donc non différenciables par qPCR. De plus, même si l'antisens est exprimé, son niveau d'expression peut avoir un impact important sur son efficacité (Bonoli *et al.*, 2006). Cela peut également être dû à un problème de design de la séquence de l'antisens, qui a été basé sur des recherches bibliographiques et pas sur une validation expérimentale à partir de plusieurs séquences.

## 4.2. Discussion

L'évaluation des souches PMS-U et PMS-antisens lors d'un essai en fioles a montré que la production de malate était augmentée en présence de CaCO<sub>3</sub>. Le pH en présence de carbonate de calcium étant légèrement plus élevé qu'en présence de tampon phosphate, il est possible que l'augmentation de la production de malate soit partiellement due à un effet pH sur le transporteur, même si, comme cela a été discuté précédemment, un gradient de proton favorable ne peut s'établir que pour un pH externe très haut (supérieur à celui du cytosol) (voir 2.3). Comme lors des essais précédents, il n'est pas possible de conclure à une réelle incorporation de carbone inorganique dans le malate produit, bien que la présence de carbonate ait un effet stimulant avéré sur la production de cet acide organique. Ceci

est d'autant plus vrai que l'on observe une cinétique de production en deux temps, avec une première phase de production de malate en croissance sur glucose et une seconde phase de production de malate et de succinate lorsque l'éthanol produit est consommé. La production conjointe de malate et de succinate montre qu'ils sont probablement formés par métabolisation de l'éthanol par le cycle du glyoxylate. Les souches PMS-U et PMS-antisens ne présentant donc pas de différence significative au niveau de la croissance ou de la production de malate, nous avons choisi de caractériser de façon plus précise la souche PMS-U lors d'essais en fioles, puis en fermenteur.

## 5. Conclusion

La construction de souches pour produire du malate a montré des débuts prometteurs avec des souches exprimant les gènes *ecppc*, *mdh3<sub>c</sub>* et *spmae* fonctionnels. Les premiers essais et les vérifications d'expression sur les souches PM et PMS ont validé l'expression des gènes et la production de malate. La construction de souches *Δpyk1* n'a cependant pas permis d'augmenter la production de malate comme il était attendu: un problème d'expression du transporteur *spmae* a mené à l'obtention d'un composé non identifié lors des essais en fioles. L'impossibilité d'identifier la molécule produite, ainsi que les vérifications moléculaires qui ont confirmé l'absence du gène du transporteur malgré la présence du gène de sélection dans les souches, nous ont poussés à entreprendre la construction de nouvelles souches *Δpyk1*. Le clone 36 qui avait été mis en évidence lors des essais de vérification d'expression des gènes d'intérêt n'a pas pu être testé lors d'essais en fioles du fait de sa croissance trop faible. Il pourrait être utilisé sur des milieux complétés en pyruvate dans l'optique d'obtenir une croissance significative et de pouvoir procéder à une caractérisation plus complète.

La reconstruction des souches n'a pas permis d'obtenir de levures exprimant à la fois les trois gènes d'intérêt *ecppc*, *mdh3<sub>c</sub>* et *spmae*, additionnés ou non de l'enzyme malique mitochondriale relocalisée dans le cytosol *mae1<sub>c</sub>*. Deux autres souches prototrophes ont donc fait l'objet d'une caractérisation préliminaire en fioles: la souche PMS-U, exprimant les gènes *ecppc*, *mdh3<sub>c</sub>* et *spmae* et la souche PMS-antisens, exprimant les mêmes gènes et l'antisens de *pyk1*. Elles ont été comparées à la souche contrôle prototrophe 4PL. Aucune différence significative n'a été notée entre les souches PMS-U et PMS-antisens pour la production de malate, mettant ainsi en évidence l'inefficacité apparente de l'antisens de *pyk1* à réduire le niveau d'expression de la pyruvate kinase.

Il est difficile de déterminer la cause de l'inefficacité de l'antisens: en effet, la quantification de son expression par qPCR semble compliquée, car il faudrait pouvoir différencier les séquences du gène cible de l'antisens et du gène direct, qui sont complémentaires. Or la vérification par qPCR implique de générer des ADN complémentaires double-brins, ce qui rend la différenciation de séquences complémentaires impossible. Une piste envisageable pour déterminer l'efficacité de l'antisens consisterait à effectuer un test d'activité enzymatique de la pyruvate kinase. Des alternatives à l'utilisation d'un antisens peuvent également être mises au point: mutation dans le promoteur ou le codon d'initiation pour réduire l'expression du gène, ou remplacement du promoteur par un promoteur inductible (galactose par exemple), qui permettrait d'avoir un phénotype *pyk<sup>+</sup>* pour la sélection et le maintien des cellules, et un phénotype *pyk<sup>-</sup>* pour la production de l'acide malique.

Les difficultés rencontrées lors de la construction des souches *Δpyk1* peuvent être dues au fait que les gènes que nous avons introduits ne complètent pas totalement la délétion de la pyruvate kinase. Lors des essais en fioles sur milieu contenant uniquement du glucose avec les souches *pyk1*, nous avons obtenu une croissance qui, bien que très faible, démontre la capacité des gènes introduits à compléter la délétion, puisque la délétion de *pyk1* empêche la croissance avec le glucose comme seule source de carbone. Cependant, ce très faible niveau de croissance est également la preuve du fait

que le contournement métabolique que nous avons mis en place n'est pas optimal. En effet, l'expression de la PEP carboxylase permet de générer l'oxaloacétate à partir de PEP mais sans formation d'ATP. Cela provoque un déséquilibre énergétique dans le bilan de la glycolyse: la création d'ATP qui a normalement lieu lors de la transformation du PEP en pyruvate est supprimée. Une alternative à l'expression de la PEP carboxylase pourrait être possible: il s'agit de l'expression de la PEP carboxykinase, qui catalyse la carboxylation du PEP en oxaloacétate avec une co-génération d'ATP. La principale limitation de cette enzyme est qu'elle est bidirectionnelle, et que le sens physiologiquement privilégié est celui de la décarboxylation de l'oxaloacétate pour former du pyruvate lors de la néoglucogénèse. Cette approche reste toutefois envisageable puisque des travaux utilisant la PEP carboxykinase comme seule enzyme anaplérotique dans le sens de la carboxylation ont été réalisés récemment chez *Saccharomyces cerevisiae* (Zelle *et al.*, 2010). Ces travaux ont cependant été réalisés dans une souche  $\Delta pyk$  et ont nécessité une phase d'évolution dirigée pour obtenir une souche capable de croître sur glucose; l'utilisation de la PEP carboxykinase pour la carboxylation n'est donc pas triviale.

Etant donné la difficulté à générer des souches  $\Delta pyk$  et compte tenu de la complexité des alternatives évoquées ci-dessus, nous avons donc choisi d'utiliser la souche PMS-U pour d'autres essais en fioles, bien qu'elle ne produise que des titres relativement modestes de malate (de l'ordre de quelques grammes par litre à partir de 50 g/L de glucose). Ces essais pourront compléter la caractérisation de la souche et permettront de réaliser une mise au point du milieu, au niveau de la quantité de carbonate apportée notamment. Cette caractérisation en fioles sera suivie d'un essai en bioréacteur en présence d'air ou d'air enrichi en  $\text{CO}_2$  afin de comparer l'effet de l'apport de carbone inorganique sous forme gazeuse sur la souche.

# Chapitre 4 : Etude physiologique de la souche PMS-U exprimant les gènes *ecppc*, *mdh3<sub>c</sub>* et *spmae* en fioles et en bioréacteurs

---

Devant les difficultés à générer une souche *Δpyk1* exprimant les gènes *ecppc*, *mdh3<sub>c</sub>* et *spmae*, nous avons décidé de caractériser la souche prototrophe PMS-U exprimant *ecppc*, *mdh3<sub>c</sub>* et *spmae*. Ce chapitre présente la caractérisation de cette souche lors d'essais en fioles en présence de carbonate de calcium, puis lors d'un essai en bioréacteur en présence d'air ou d'air enrichi en CO<sub>2</sub>.

## 1. Etude physiologique en fioles

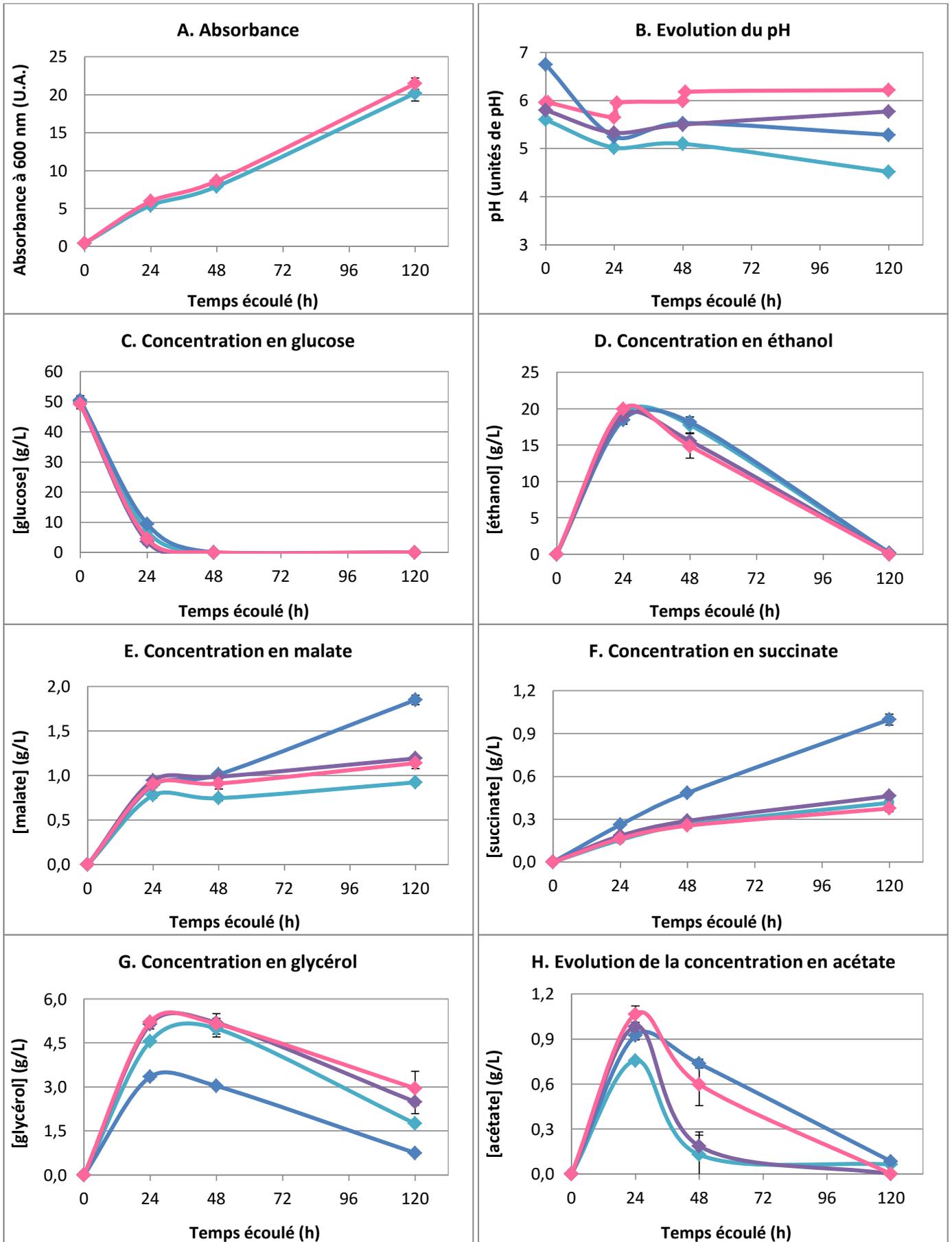
La caractérisation de la souche lors d'essais en fioles comporte deux objectifs. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'influence de l'apport de carbone inorganique sous forme de sels de carbonate sur la production de malate. L'étude de ce paramètre a porté notamment sur la comparaison des effets du carbonate de calcium, qui est très faiblement soluble et du carbonate de sodium très soluble, en présence ou en l'absence de tampon phosphate. Nous avons également testé différentes concentrations de carbonate de calcium. Le deuxième aspect de la caractérisation a porté sur l'utilisation d'éthanol comme substrat à la place du glucose. Ce remplacement a été envisagé suite à l'observation, lors des premiers essais en fioles, d'une deuxième phase de production de malate par consommation de l'éthanol formé à partir du glucose.

### 1.1. Caractérisation de la souche PMS-U : cinétiques en fioles

#### 1.1.1. Influence du sel de carbonate et de la présence de tampon phosphate

Le premier essai en fioles a permis de tester l'influence de plusieurs paramètres sur la production de malate : la présence de tampon phosphate et le type de sel de carbonate utilisé. Des réactions chimiques entre le tampon phosphate et le sel de carbonate se produisent, jouant sur les espèces présentes en solution et pouvant ainsi avoir un effet sur la production de malate; ces réactions sont présentées en annexe 2. D'autre part, le carbonate de calcium n'est que très peu soluble dans le milieu simple ou même additionné de tampon phosphate; l'excès solide présent au cours des cultures est une réserve de carbonate intéressante, mais il empêche de procéder à des mesures de concentrations de biomasse par absorbance. Il était donc intéressant de tester l'effet d'un sel de carbonate totalement soluble, en l'occurrence, le carbonate de sodium ; ceci permettait aussi de vérifier l'influence du cation accompagnant le carbonate.

Le milieu utilisé est YNB contenant 50 g/L de glucose, additionné de tampon phosphate 0,5 M à pH 5,5 et/ou de CaCO<sub>3</sub> 6 g/L (0,06 M). Dans la dernière condition testée, le carbonate de calcium est remplacé par le carbonate de sodium, en présence de tampon phosphate et ajouté en trois fois, au début de l'essai, à 24 et 48 h, de sorte que sa concentration molaire finale soit égale celle du carbonate de calcium (0,06M). Le carbonate de sodium a été ajouté de façon séquentielle afin de ne pas augmenter le pH trop brusquement. Les fioles ont été incubées pendant 120 heures à 30°C sous une agitation de 200 rpm.



**Figure 59.** Essais en fioles de la souche PMS-U pour comparer CaCO<sub>3</sub> avec et sans tampon phosphate et Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

**A.** Suivi de l'absorbance à 600 nm dans les conditions sans CaCO<sub>3</sub>. **B.** Suivi du pH. **C.** Suivi de la concentration en glucose. **D.** Suivi de la concentration en éthanol. **E.** Suivi de la concentration en malate. **F.** Suivi de la concentration en succinate. **G.** Suivi de la

concentration en glycérol. **H.** Suivi de la concentration en acétate. YNB glucose 50 g/L tampon phosphate 0,5 M pH 5,5 : ●; YNB glucose 50 g/L CaCO<sub>3</sub> 6 g/L : ●; YNB glucose 50 g/L tampon phosphate 0,5 M pH 5,5 CaCO<sub>3</sub> 6 g/L : ●; YNB glucose 50 g/L tampon phosphate 0,5 M pH 5,5 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,06 mol/L (ajouté en 3 fois) : ●.

**Absorbance.** Le suivi de croissance par mesure de l'absorbance à 600 nm (Figure 59A), effectué uniquement dans les conditions sans CaCO<sub>3</sub>, ne montre pas d'influence de la présence de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> sur la croissance. Les deux courbes sont similaires, avec une absorbance en fin d'essai de 20 pour la condition "tampon seul" et de 21 pour la condition "tampon et Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>".

**pH.** Le suivi du pH est représenté sur la Figure 59B. On trouve des valeurs quasi-identiques de pH initial pour les conditions avec tampon phosphate sans carbonate de calcium (5,6) et avec carbonate de calcium (5,8) ; ceci est lié au fait que le carbonate de calcium étant très peu soluble, il y a une réaction très limitée entre H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> et CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> (voir annexe 2). Par contre la condition "tampon phosphate + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>" présente un pH un peu plus haut (6,0), lié au fait que le carbonate de sodium se dissout en totalité (premier ajout de 0,02 M). La condition "CaCO<sub>3</sub> seul" affiche un pH initial de 6,7 du fait de l'absence de phosphate, le pH étant plutôt contrôlé par le pKa du couple CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> égal à 6,3.

L'évolution du pH pour la condition "tampon phosphate" et la condition "CaCO<sub>3</sub> seul" est similaire, avec une baisse entre 0 et 24 heures liée à l'acidification provoquée par les mécanismes biologiques (production de CO<sub>2</sub> notamment), une légère augmentation entre 24 et 48 heures et une nouvelle diminution jusqu'à la fin de l'essai. L'augmentation du pH après 24 heures correspond au moment où le glucose du milieu est épuisé ; on a alors un changement de métabolisme qui permet aux levures de continuer à croître en consommant l'éthanol produit lors de la croissance sur glucose. La valeur finale de pH est de 4,52 pour la condition "tampon phosphate seul", relativement acide; en effet le couple HPO<sub>4</sub><sup>-</sup>/H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> n'a pu contrebalancer l'acidification, la forme acide H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> étant déjà très majoritaire à pH 5,5. Par contre le pH final est de 5,29 pour la condition "CaCO<sub>3</sub> seul", la solubilisation graduelle du carbonate a pu, au moins en partie, contrebalancer l'acidification, CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> réagissant avec CO<sub>2</sub> produit pour former des ions hydrogénocarbonates.

Pour la condition "tampon phosphate + CaCO<sub>3</sub>", l'évolution du pH est similaire sur la plus grande partie de l'essai, mais le pH augmente à la fin pour atteindre une valeur de 5,77. En plus des réactions citées dans le cas de CaCO<sub>3</sub> seul, on a une réaction acide-base entre les ions carbonate ajoutés (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) et H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, l'espèce prépondérante du tampon phosphate, pour donner HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> et HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. Cette réaction augmente donc la solubilisation des ions carbonate sous forme hydrogénocarbonate et par suite le pH, notamment à la fin de l'essai où l'activité cellulaire et l'acidification associée diminuent. Il est à noter que pour des pH inférieurs à 6,3, l'espèce CO<sub>2</sub> dissous est aussi présente, d'autant que la production de CO<sub>2</sub> par les réactions biologiques contribue à saturer le milieu avec ce composé.

La condition "tampon phosphate + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>" montre deux sauts de pH qui correspondent aux moments où le carbonate de sodium a été ajouté, à 24 et 48 heures. Après l'ajout initial, le pH diminue par suite de l'acidification liée à l'activité biologique, puis augmente suite aux deux ajouts. Après le dernier ajout, le pH présente une valeur de 6,2, caractéristique du tampon acide carbonique/ bicarbonate et reste stable jusqu'à la fin de l'essai. Le fait que le pH ne diminue pas après le deuxième et le troisième ajout montre l'effet marqué du tampon bicarbonate grâce à la disponibilité de bicarbonates et de CO<sub>2</sub> dissous en concentrations significatives, contrairement au cas du carbonate de calcium.

**Glucose.** Les mesures de concentration en glucose (Figure 59C) montrent une évolution de sa consommation, similaire pour toutes les conditions testées. Après 24 heures, on observe cependant une différence de concentration résiduelle en glucose entre les conditions "tampon phosphate seul" et "CaCO<sub>3</sub> seul", pour lesquelles il reste 7 et 9 g/L respectivement et les conditions "tampon phosphate + carbonate de calcium et sodium", pour lesquelles les concentrations résiduelles sont 3,6 et 4,5 g/L.

**Ethanol et glycérol.** L'évolution de la concentration en éthanol (Figure 59D) montre le même type de différences, mais seulement après 48 heures, lorsque l'éthanol commence à être consommé. A 24 heures, les quatre conditions présentent des concentrations en éthanol très proches, comprises entre 18,4 et 20 g/L. A 48 heures on peut voir une légère différence entre les conditions "tampon phosphate seul" et "CaCO<sub>3</sub> seul" d'une part, pour lesquelles on dose 17,7 et 18,2 g/L d'éthanol, et les conditions "tampon phosphate + carbonate" d'autre part, pour lesquelles on trouve 15,6 et 14,9 g/L d'éthanol.

Cette différence de comportement entre les conditions n'est toutefois pas liée à un stress biologique car le suivi de la concentration en glycérol (Figure 59G) ne montre pas les mêmes différences. Pour le glycérol le facteur stimulant est clairement le tampon phosphate: dans les trois conditions où il est présent, la concentration de glycérol atteint environ 5 g/L après 24 heures. En revanche, pour la condition "CaCO<sub>3</sub> seul", sa concentration ne dépasse pas 3,5 g/L. Comme cela a déjà été observé lors des essais précédents, le tampon phosphate semble exercer un stress osmotique provoquant une production accrue de glycérol.

**Malate.** La mesure des concentrations en malate (Figure 59E) montre une évolution similaire dans toutes les conditions pendant les 48 premières heures. Seule la mesure effectuée en fin d'essai permet de mettre en évidence une différence importante, avec une production de malate nettement supérieure pour la condition "CaCO<sub>3</sub> seul". En ce qui concerne les trois autres conditions, après 24 heures, la condition "tampon phosphate seul" montre une concentration en malate de 0,78 g/L alors que les conditions "tampon phosphate + carbonate" sont au-dessus de 0,89 g/L. Après 48 heures, la différence est un peu plus marquée: 0,75 g/L pour la condition "tampon seul" contre 0,91 g/L ou plus pour les conditions avec carbonate.

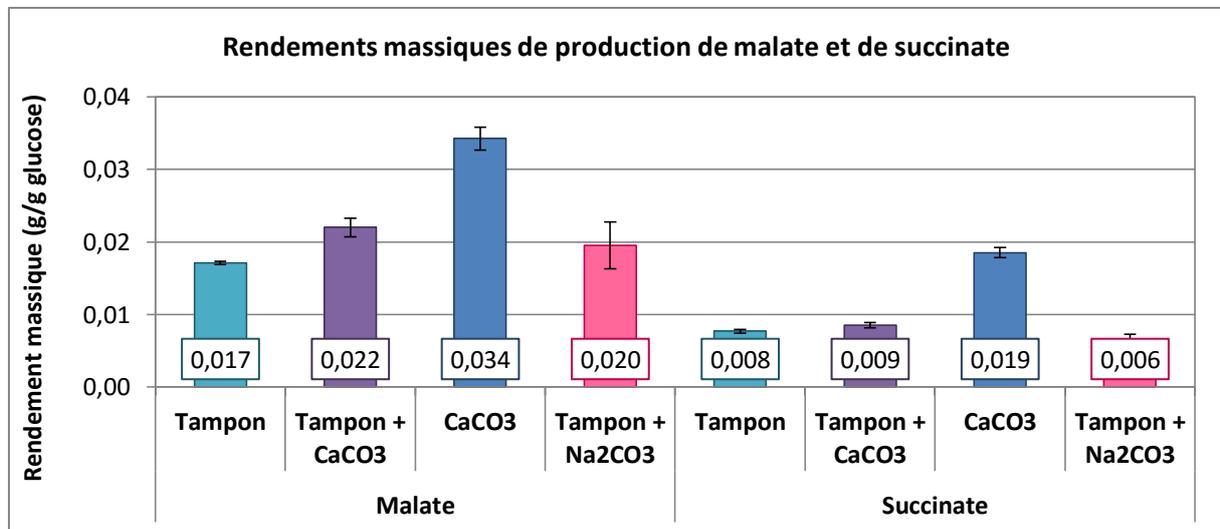
A la fin de l'essai la différenciation est plus claire: on obtient 1,85 g/L pour la condition "CaCO<sub>3</sub> seul" ; 1,14 et 1,19 g/L pour les conditions "tampon phosphate + carbonate", et 0,93 g/L pour la condition "tampon phosphate seul". Il semble donc que le tampon phosphate limite l'effet positif du carbonate sur la production de malate: il est possible que ce soit en jouant sur la solubilisation des ions carbonate et sur les équilibres entre HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> et CO<sub>2</sub> (voir annexe 2), ou plus simplement que la production accrue de glycérol liée au stress osmotique détourne du carbone de la voie de production de malate.

En revanche, le sel de carbonate utilisé n'a visiblement pas d'influence sur la quantité de malate produite, puisque l'on obtient les mêmes concentrations avec CaCO<sub>3</sub> ou Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en présence de tampon phosphate.

**Succinate.** L'évolution de la concentration en succinate (Figure 59F) présente les mêmes tendances que celle relative au malate, mais les concentrations sont beaucoup plus faibles ; on a une production supérieure pour la condition "CaCO<sub>3</sub> seul" par rapport aux trois autres conditions. Cependant, à la différence du malate, cette différence est marquée dès 24 heures, où la condition "CaCO<sub>3</sub> seul" affiche une concentration de 0,26 g/L alors que les autres conditions présentent des concentrations comprises entre 0,15 et 0,18 g/L. A la fin de l'essai, l'écart est encore beaucoup plus important, avec une concentration de 1 g/L pour "CaCO<sub>3</sub> seul", contre moins de 0,46 g/L pour les autres conditions.

**Rendements de malate et succinate.** Le calcul des rendements massiques de malate et de succinate (en g de malate ou succinate par g de glucose consommé) (Figure 60) montre des valeurs un peu inférieures à celles obtenues lors du premier essai en fioles, avec par exemple 0,034 g de malate produit par g de glucose consommé pour la condition "CaCO<sub>3</sub> seul" contre 0,048 précédemment. Cette variation est vraisemblablement due au fait que le présent essai est plus court (120 heures) que le précédent (168 heures). Les rendements de malate sont toujours supérieurs à ceux de succinate.

Les rendements de malate et de succinate présentent la même tendance : les meilleures valeurs sont obtenues dans la condition "CaCO<sub>3</sub> seul" avec 3,4% en masse de malate, soit 0,046 mole par mole de glucose. Les conditions "tampon phosphate + CaCO<sub>3</sub>" ou "tampon phosphate + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>" présentent des rendements similaires pour le malate (environ 2%), tandis que pour le succinate le rendement est augmenté de 50% pour la condition "tampon + CaCO<sub>3</sub>". La condition avec le tampon phosphate seul présente les rendements les plus faibles. Ceci montre l'effet positif des carbonates ; cet effet est cependant réduit en présence de tampon phosphate. Le sel de carbonate utilisé, calcium ou sodium, ne semble pas avoir d'influence sur la production de malate.



**Figure 60.** Rendements massiques de production de malate et de succinate de la souche PMS-U pour les différentes conditions testées.

**Acétate.** La concentration en acétate maximale est mesurée à 24 heures (Figure 59H). Elle est similaire pour toutes les conditions en présence de carbonate et égale à environ 1 g/L ; seule la condition "tampon phosphate seul" présente une concentration plus basse (0,76 g/L). La concentration en acétate diminue ensuite plus ou moins vite : à 48 heures il reste 0,73 g/L d'acétate dans la condition "CaCO<sub>3</sub> seul", 0,6 g/L pour "tampon et carbonate de sodium", 0,19 g/L pour "tampon seul" et 0,16 g/L pour "tampon + CaCO<sub>3</sub>". Cependant ces différences dans la consommation d'acétate ne semblent liées à aucun des autres paramètres mesurés; il est donc difficile de les expliquer. A la fin de l'essai, l'acétate est épuisé dans toutes les conditions (concentrations inférieures à 0,08 g/L).

**Conclusion.** Cet essai sur la souche PMS-U montre un effet inhibiteur de la présence de tampon phosphate sur l'augmentation de la production d'acides organiques (malate et succinate) obtenue en présence de carbonate. L'ajout de carbonate de calcium sans tampon phosphate permet d'obtenir les meilleurs rendements de production de malate et de succinate; le tampon exerce en effet un impact négatif sur la production de malate et de succinate, dû au détournement du carbone vers la production de glycérol et/ou à l'interaction des ions carbonate CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> avec les espèces du tampon phosphate (voir annexe 2).

Par ailleurs, nous n'observons pas de différence de rendement de production de malate significative entre les conditions "tampon + CaCO<sub>3</sub>" et "tampon + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>", ce qui signifie que les ions Ca<sup>2+</sup> n'ont pas d'impact sur la production de malate, bien que des éléments de littérature rapportent un effet stimulant des ions calcium sur la production d'acides organiques (Zelle *et al.*, 2008).

Cet essai montre donc que le meilleur rendement de malate est obtenu en présence de CaCO<sub>3</sub> sans tampon phosphate; l'utilisation d'un sel de carbonate soluble comme Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> semble compliquée car

un apport faible provoque une forte augmentation du pH, même en présence de tampon. Nous avons donc décidé de réaliser d'autres essais en fioles, afin d'optimiser la quantité de CaCO<sub>3</sub> utilisée.

### 1.1.2. Influence de la concentration en carbonate de calcium

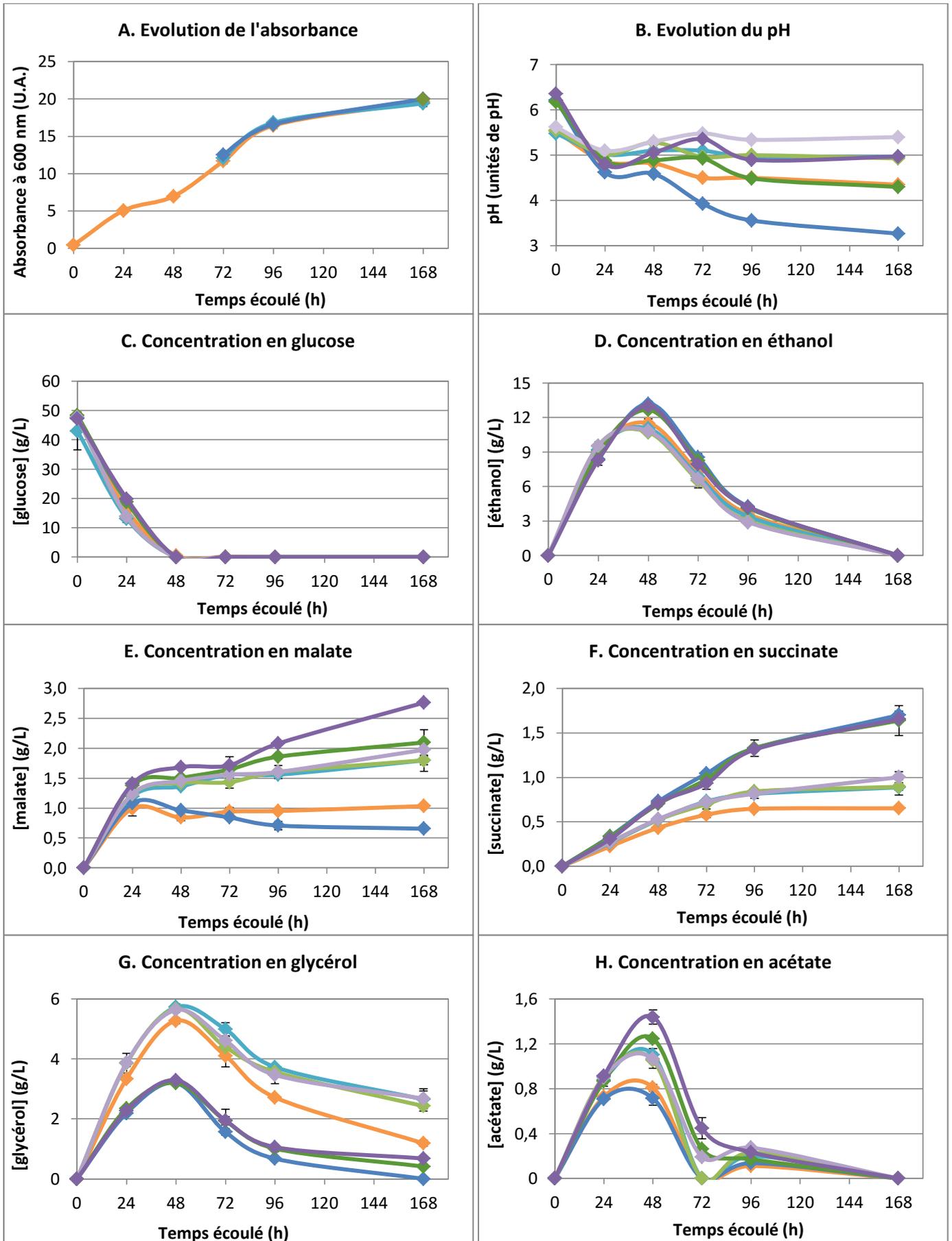
L'apport de carbone inorganique sous forme de carbonate de calcium comporte l'inconvénient, comme cela a été mentionné précédemment, d'empêcher les mesures de biomasse par absorbance ou par pesée de la masse sèche. Nous n'avons donc pas de résultats sur l'effet direct de ce composé sur la croissance de la biomasse.

Nous avons décidé d'étudier l'effet de concentrations plus élevées que précédemment, afin de vérifier si les ions carbonate pouvaient être limitants, et de concentrations plus faibles, permettant une dissolution totale du carbonate à la fin de l'essai.

Un premier essai a donc été réalisé avec des concentrations supérieures en carbonate de calcium afin de vérifier s'il y avait un déficit de carbonate dans les essais précédents. Pour les essais des souches *Apykl*, des concentrations de 50 g/L de CaCO<sub>3</sub> pour 100 g/L de glucose avaient été utilisées en se basant sur d'autres travaux publiés (Zelle *et al.*, 2008). Pour la caractérisation de la souche PMS-U, nous avons décidé de diminuer la concentration en CaCO<sub>3</sub> à 6 g/L, d'une part parce que cette souche ne pouvait logiquement pas consommer plus de CaCO<sub>3</sub> que les souches délétées et qu'une grande quantité de CaCO<sub>3</sub> risquait d'augmenter fortement le pH en fin d'essai, et d'autre part parce que nous avons également diminué la concentration de glucose à 50 g/L.

Les concentrations testées ont donc été échelonnées entre 6,25 et 25 g/L par pas de 6,25 g/L. L'essai a été réalisé sur le milieu YNB contenant 50 g/L glucose et 0,5 M de tampon phosphate à pH 5,5 pendant 48 heures, afin d'analyser l'influence de CaCO<sub>3</sub> uniquement pendant la phase de consommation du glucose. Les fioles ont été incubées à 30°C sous une agitation de 200 rpm. Cet essai n'a montré aucune différence au niveau de la consommation de glucose, de l'évolution du pH, de la production d'éthanol, de glycérol, de malate et de succinate entre les différentes concentrations testées. Il semble que le facteur limitant soit la solubilité du carbonate de calcium dans le milieu: dans toutes les conditions testées on avait un excès de carbonate solide dans le système, la solution étant saturée en carbonate de calcium. Ainsi les concentrations en carbonate, hydrogénocarbonate et acide carbonique dissous étaient en réalité les mêmes pour toute la gamme de concentrations, puisque le pH était le même, d'où une absence d'effet sur la production d'acides organiques.

Nous avons mis en place un autre essai pour tester des concentrations plus faibles, comprises entre 0 et 6 g/L, par pas de 2 g/L. Comme mentionné précédemment, avec des concentrations de CaCO<sub>3</sub> plus faibles, il est possible de solubiliser tout le carbonate de calcium, ce qui permettrait de mesurer la biomasse finale, mais on a alors le risque d'une acidification du milieu par suite de l'épuisement de la réserve de tampon carbonate ; la croissance cellulaire pourrait en être impactée. Toutes les conditions testées ont été dédoublées, pour tester chaque concentration avec et sans tampon phosphate. Cet essai a été réalisé dans le milieu YNB contenant 50 g/L glucose, pendant 168 heures, à 30°C et sous une agitation de 200 rpm.



**Figure 61.** Essai en fioles sur la souche PMS-U: influence de concentrations en carbonate de calcium comprises entre 2 et 6 g/L. **A.** Suivi de la croissance cellulaire par mesure de l'absorbance à 600 nm sur les réplicats ne contenant pas de carbonate de calcium ou dans lesquels le carbonate de calcium semblait entièrement dissous (appréciation visuelle). **B.** Suivi du pH. **C.** Suivi de

la concentration en glucose. **D.** Suivi de la concentration en éthanol. **E.** Suivi de la concentration en glycérol. **F.** Suivi de la concentration en acétate. **G.** Suivi de la concentration en succinate. **H.** Suivi de la concentration en malate. YNB glucose 50 g/L tampon phosphate 0,5 M pH 5,5: ● ; YNB glucose 50 g/L tampon phosphate 0,5 M pH 5,5 CaCO<sub>3</sub> 2 g/L: ● ; YNB glucose 50 g/L CaCO<sub>3</sub> 2 g/L: ● ; YNB glucose 50 g/L tampon phosphate 0,5 M pH 5,5 CaCO<sub>3</sub> 4 g/L: ● ; YNB glucose 50 g/L CaCO<sub>3</sub> 4 g/L: ● ; YNB glucose 50 g/L tampon phosphate 0,5 M pH 5,5 CaCO<sub>3</sub> 6 g/L: ● ; YNB glucose 50 g/L CaCO<sub>3</sub> 6 g/L: ●.

**Biomasse.** Le suivi de croissance par mesure de l'absorbance à 600 nm (Figure 61A) a été effectué pendant toute la durée de l'essai sur la condition sans CaCO<sub>3</sub>. Des mesures ont également été effectuées pour d'autres conditions à partir du moment où CaCO<sub>3</sub> semblait entièrement dissous: conditions "CaCO<sub>3</sub> 2 g/L sans tampon" et "tampon + CaCO<sub>3</sub> 2 g/L" à partir de 72h et condition "CaCO<sub>3</sub> 4 g/L" à la fin de l'essai à 168h. La condition "tampon + CaCO<sub>3</sub> 4 g/L" semblait encore présenter des traces de carbonate de calcium à la fin de l'essai. Le profil de croissance est similaire pour les différentes conditions qui ont pu être suivies, malgré la forte acidification observée (figure 20B) lorsque le carbonate est complètement dissous en absence de tampon phosphate. Cela indique qu'il n'y a pas d'inhibition de la croissance par suite de cette acidification.

**pH.** L'évolution du pH (Figure 61B) montre que dans certaines conditions la baisse du pH au cours de l'essai est assez importante, notamment pour la condition CaCO<sub>3</sub> 2 g/L sans tampon: le carbonate de calcium est entièrement dissous au cours des 72 premières heures, le milieu se retrouve rapidement sans tampon car il n'y a plus de réserve de carbonate et que le milieu seul a un pouvoir tampon quasi inexistant ; le CO<sub>2</sub> produit ne peut plus être neutralisé. Le pH final est donc assez bas (3,27): c'est le plus bas mesuré à la fin de l'essai.

La condition CaCO<sub>3</sub> 4 g/L sans tampon montre une baisse de pH équivalente à celle de la condition contrôle (sans CaCO<sub>3</sub> mais avec tampon phosphate): le pH final est inférieur à 4,5, plus élevé que précédemment grâce à la réserve de carbonate plus importante.

Le pH le plus haut est atteint dans la condition tampon + CaCO<sub>3</sub> 6 g/L. Cela a déjà été observé précédemment et est dû au fait que les ions CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> interagissent avec les ions H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> du tampon formant des ions hydrogénocarbonates. Par ailleurs le CO<sub>2</sub> produit est neutralisé par les ions carbonate. Compte tenu de la forte concentration des phosphates, le pH se maintient à 5,5 tout au long de l'essai. Les autres conditions (tampon + CaCO<sub>3</sub> 2 g/L, tampon + CaCO<sub>3</sub> 4 g/L et CaCO<sub>3</sub> seul à 6 g/L) montrent également un pH stable autour de 5.

**Glucose.** La consommation du glucose (Figure 61C) montre les mêmes tendances pour les différentes conditions testées, le glucose étant épuisé à 48 heures. Il existe cependant une différence de cinétique légère, visible à 24 heures: il reste environ 13 g/L de glucose dans les conditions tampon + CaCO<sub>3</sub>, 16 g/L dans la condition tampon seul et au-dessus de 18,8 g/L dans les conditions CaCO<sub>3</sub> seul.

**Ethanol.** Les concentrations mesurées en éthanol après 48 heures, au maximum de la courbe, (Figure 61D) sont plus élevées dans les conditions avec CaCO<sub>3</sub> (entre 12,7 et 13,2 g/L) que dans les autres conditions (entre 10,7 et 11,5 g/L). Dans un premier temps l'éthanol est produit lors de la phase de croissance sur glucose, il est ensuite consommé comme source de carbone lorsque le glucose est épuisé.

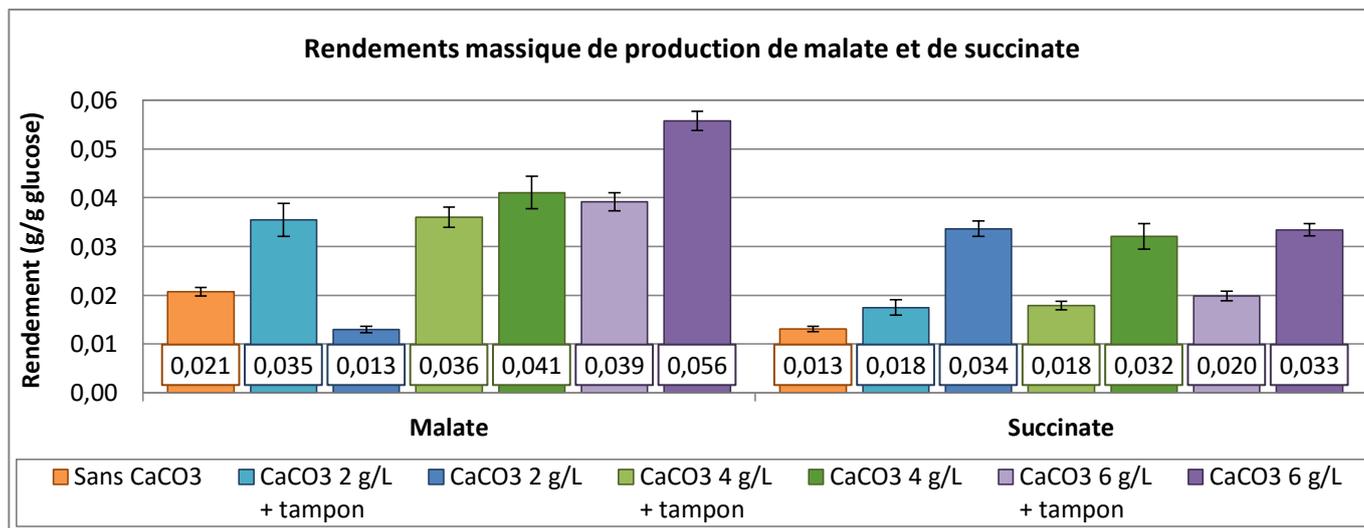
**Malate.** L'évolution de la concentration en malate et ses valeurs finales (Figure 61E) dépendent à la fois de la présence de CaCO<sub>3</sub> et/ou de la présence de tampon, et donc de l'évolution du pH dans la fiole. La meilleure condition est celle où la concentration en CaCO<sub>3</sub> est la plus élevée, sans tampon avec plus de 2,5 g/L de malate en fin d'essai. La condition "CaCO<sub>3</sub> 4 g/L seul" et toutes les conditions "tampon + CaCO<sub>3</sub>" montrent des profils de production similaires, atteignant seulement 1,8 à 2,1 g/L de malate en fin d'essai. La condition contrôle et la condition "CaCO<sub>3</sub> 2 g/L" sont celles qui produisent le moins de malate. Dans la condition "CaCO<sub>3</sub> 2 g/L", on observe même une diminution de la

concentration en malate après 24 heures, ce qui correspond au moment où le pH commence à baisser en dessous de 4,5 et où le malate mono-anionique devient l'espèce majoritaire: le transport de malate pourrait s'inverser et s'effectuer dans le sens du gradient de proton, c'est-à-dire vers l'intérieur de la cellule. Cependant, lorsque le pH passe en dessous de 3,46, la forme majoritaire devient l'acide malique, ce qui provoque une stabilisation de la concentration en acide malique extracellulaire car la forme moléculaire est moins propice au transport par le transporteur que la forme mono-anionique.

**Succinate.** La production de succinate (Figure 61F) semble corrélée à la présence de  $\text{CaCO}_3$  et l'absence de tampon: pour les trois conditions " $\text{CaCO}_3$  sans tampon phosphate", même pour 2 g/L, le profil de production et la concentration sont les mêmes. Pour toutes les conditions " $\text{CaCO}_3$  + tampon", les concentrations sont 30% moins élevées. Pour la condition contrôle sans  $\text{CaCO}_3$ , la concentration est la plus basse, environ 50% de moins que pour la condition " $\text{CaCO}_3$  sans tampon". Il semble donc que la production de succinate soit moins sensible aux variations de pH que la production de malate. Cela peut être lié aux différences de pKa des deux acides, notamment pour les deuxièmes acidités, qui sont de 5,1 pour l'acide malique et 5,6 pour le succinique. Aux pH observés (inférieurs à 5,5), il n'y a pas de succinate dianionique, alors qu'il existe du malate dianionique au-dessus de pH 5,1 ; ceci peut donner des différences de transport des espèces et donc pourrait expliquer des différences de sensibilité par rapport au pH.

**Rendements de production de malate et de succinate.** Les rendements de production massique de malate et de succinate (Figure 62) (en g de malate ou succinate par g de glucose consommé) reflètent les tendances observées par les suivis de concentrations de ces deux sels d'acides organiques. Le rendement de malate dépend à la fois de la présence et de la quantité de carbonate, ainsi que du maintien du pH dans la solution. La condition " $\text{CaCO}_3$  2 g/L" est celle qui donne le rendement le plus faible, avec 0,013 g/g. Pour les deux autres concentrations de carbonate de calcium testées, les rendements sont meilleurs en l'absence de tampon. On atteint 0,056 g de malate par g de glucose dans la condition  $\text{CaCO}_3$  6 g/L, ce qui est le meilleur rendement obtenu jusqu'à présent. Il est intéressant de constater qu'en l'absence de tampon, l'effet du changement de la concentration de  $\text{CaCO}_3$  sur la production de malate est plus marqué. Ce n'est pas le cas en présence de tampon, où les rendements sont très proches quelle que soit la concentration en  $\text{CaCO}_3$  (entre 0,035 et 0,039 g/g) ; c'est probablement lié aux variations de pH, plus marquées sans phosphate.

Le rendement de succinate semble dépendre de la présence de carbonate et de tampon, mais peu de la concentration en carbonate de calcium et par suite du pH. Il est toujours significativement plus faible que celui du malate, sauf pour la condition " $\text{CaCO}_3$  2 g/L", où on est en défaut de carbonate et où le pH devient très bas en fin d'essai. On obtient le rendement le plus bas pour la condition "avec tampon sans  $\text{CaCO}_3$ " (0,013). Pour les conditions avec " $\text{CaCO}_3$  et tampon" on obtient des rendements de 0,018 à 0,02 g/g, tandis que pour les conditions " $\text{CaCO}_3$  seul" les rendements sont compris entre 0,032 et 0,034 g/g.



**Figure 62.** Rendements massiques de malate et de succinate de la souche PMS-U pour les différentes conditions testées.

**Glycérol.** La concentration en glycérol (Figure 61G) montre la même allure à maximum que celle observée dans les essais précédents: les conditions avec tampon présentent comme précédemment des concentrations plus élevées, comprises entre 5,3 et 5,7 g/L, tandis que les conditions avec CaCO<sub>3</sub> seul affichent des concentrations d'environ 3,3 g/L. Les conditions les plus propices à la formation de glycérol semblent défavoriser la formation de malate et succinate, comme observé précédemment, confirmant que le glycérol se forme au détriment des autres composés carbonés.

**Acétate.** L'évolution de la concentration en acétate (Figure 61H) semble liée au pH. Dans toutes les conditions le profil de production est similaire pendant les 48 premières heures: l'acétate est produit puis consommé. Les concentrations les plus faibles en acétate sont obtenues dans les conditions où la baisse de pH est la plus importante. Dans ces conditions plus acides, l'acétate est entièrement consommé à 72 heures, puis à nouveau produit et finalement reconsommé puisqu'il n'est plus détecté en fin d'essai.

La première augmentation de la concentration d'acétate correspond à la phase de croissance sur glucose, le maximum de la courbe étant atteint lors de l'épuisement du glucose. Ensuite le glucose étant épuisé, l'acétate est consommé, parfois totalement, les conditions acides semblant encourager cette consommation. Une nouvelle production est observée, concomitante à la phase de croissance sur éthanol. En fin d'essai, l'acétate est entièrement reconsommé quand l'éthanol est épuisé.

**Conclusion.** Cet essai avec différentes concentrations de CaCO<sub>3</sub> montre une dissolution totale du carbonate de calcium pour les conditions "CaCO<sub>3</sub> 2 g/L", "tampon + CaCO<sub>3</sub> 2 g/L" et "tampon + CaCO<sub>3</sub> 4 g/L". La consommation totale du carbonate de calcium dans la condition "CaCO<sub>3</sub> 2 g/L" a provoqué une importante baisse du pH et a mené à l'obtention d'un rendement de production de malate très faible, ce qui montre l'importance du maintien du pH pour l'export du malate. La condition "tampon + CaCO<sub>3</sub> 6 g/L", qui présente le plus haut pH en fin d'essai, n'est cependant pas celle qui permet d'obtenir le meilleur rendement, car l'interaction des ions carbonate et des ions phosphate semble diminuer l'effet stimulant du carbonate sur la production de malate. C'est la condition "CaCO<sub>3</sub> 6 g/L" qui permet d'obtenir les concentrations les plus hautes en malate et donc les meilleurs rendements.

Jusqu'à présent, nous avons observé une co-production de succinate associée à la production de malate. Cet essai met en évidence des différences nettes de concentration entre les deux composés

selon les conditions, liées vraisemblablement au transport des molécules et à leur état (acide ou mono-anionique) dans le milieu extérieur. Alors que la concentration en malate dans le milieu dépend non seulement de la présence et de la concentration de carbonate, mais aussi du pH, la production de succinate dépend uniquement de la présence de carbonate, modulée par la présence de tampon phosphate, ce qui peut être lié aux différences de pKa des deux acides.

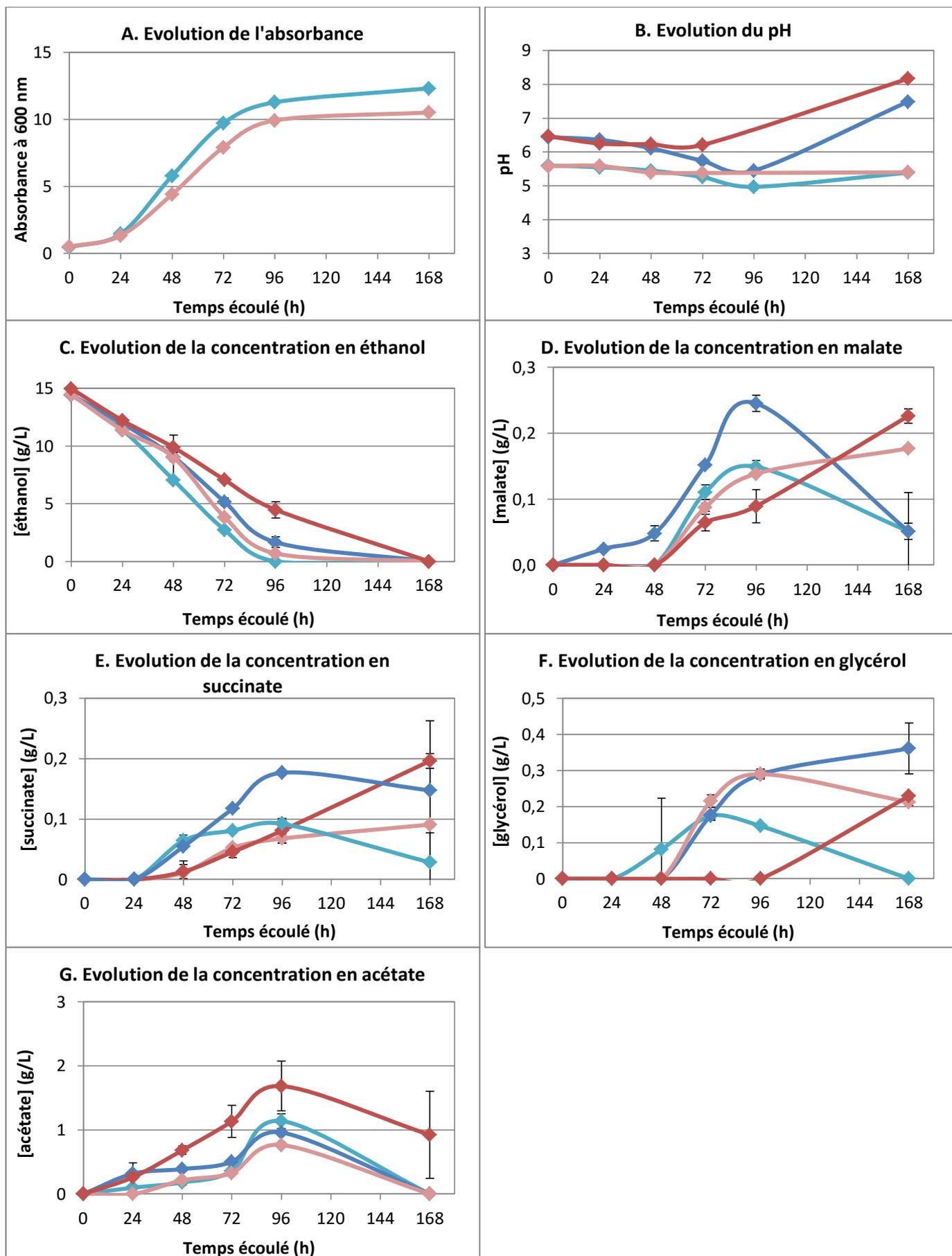
### 1.1.3. Influence du substrat: essais en fioles utilisant de l'éthanol

Les essais précédents montrent une cinétique de croissance en deux temps: une première phase de consommation du glucose, pendant laquelle sont produits de l'éthanol, du glycérol, du malate, du succinate et de l'acétate; et une seconde phase, pendant laquelle l'éthanol et le glycérol sont consommés et où la production de succinate et de malate continue.

Afin d'étudier la production de malate et de succinate en croissance sur éthanol, nous avons mené un essai utilisant la souche PMS-U en comparaison avec la souche contrôle 4PL dont les résultats sont présentés en Figure 63. Le milieu utilisé est YNB contenant 15 g/L d'éthanol, additionné de tampon phosphate 0,5 M pH 5,5 ou de CaCO<sub>3</sub> 6 g/L. Les fioles ont été incubées pendant 168 heures à 30°C sous une agitation de 200 rpm.

**Biomasse.** Le suivi de l'absorbance dans les conditions sans CaCO<sub>3</sub> (Figure 63A) montre une différence entre la souche PMS-U et la souche 4PL: la souche PMS-U présente après 24 heures une meilleure croissance que la souche contrôle. La différence est d'environ 2 unités d'absorbance en fin d'essai, ce qui correspond à 0,8 g de matière sèche par litre environ.

**pH.** Le suivi de pH (Figure 63B) montre que le pH a été stable aux alentours de 5,5 tout au long de l'essai pour la souche 4PL en présence de tampon phosphate. Il a également assez peu varié pour la souche PMS-U en présence de phosphate. En présence de CaCO<sub>3</sub>, les comportements sont légèrement différents. Le pH reste stable aux alentours de 6,3 dans un premier temps, puis augmente après 72h de culture pour la souche 4PL, alors que pour PMS-U, il diminue entre 48 et 96 h avant d'augmenter de nouveau. La hausse de pH observée après 72-96h pour les deux souches en présence de CaCO<sub>3</sub> est due au fait que la croissance cellulaire doit ralentir et ne contrebalance plus l'augmentation du pH du milieu consécutive à la dissolution de CaCO<sub>3</sub>. La diminution observée pour la souche PMS entre 48 et 96h serait à relier à une activité biologique plus importante que celle de la souche contrôle dans cet intervalle de temps (consommation d'éthanol plus rapide).



**Figure 63.** Essais en fioles de comparaison de la souche 4PL et de la souche PMS-U en croissance sur éthanol.

**A.** Suivi de l'absorbance à 600 nm dans les conditions sans CaCO<sub>3</sub>. **B.** Suivi du pH. **C.** Suivi de la concentration en éthanol. **D.** Suivi de la concentration en malate. **E.** Suivi de la concentration en succinate. **F.** Suivi de la concentration en glycérol. **G.** Suivi de la

concentration en acétate. Souche 4PL sur milieu YNB 15 g/L éthanol tampon phosphate 0,5 M pH 5,5: ● ; souche 4PL sur milieu YNB 15 g/L éthanol CaCO<sub>3</sub> 6 g/L: ● ; souche PMS-U sur milieu YNB 15 g/L éthanol tampon phosphate 0,5 M pH 5,5: ● ; souche PMS-U sur milieu YNB 15 g/L éthanol CaCO<sub>3</sub> 6 g/L: ●.

**Ethanol.**Le suivi de la concentration en éthanol (Figure 63C) montre que la souche PMS-U dans les deux conditions et la souche 4PL avec tampon phosphate consomment l'éthanol à la même vitesse. Par contre, la souche 4PL en présence de CaCO<sub>3</sub> le consomme plus lentement: ceci est conforté par la variation de pH dans ces dernières conditions ; la consommation plus lente du substrat acidifie en effet le milieu plus lentement et le pH ne diminue pas contrairement aux autres conditions.

**Malate.**La production de malate (Figure 63D) est différente pour les deux souches. La souche PMS-U, qui croît plus rapidement et possède un transporteur de malate, montre une production de malate significative dès 24 heures en présence de CaCO<sub>3</sub>. A 96h elle présente un pic de concentration de malate, que ce soit en présence de CaCO<sub>3</sub> ou de tampon phosphate, puis la concentration diminue en fin d'essai. L'allure est la même en présence de phosphate, mais la production ne débute qu'après 48 h ; de plus la concentration maximale est plus importante en présence de CaCO<sub>3</sub> (0,25 g/L) qu'en présence de tampon phosphate (0,15 g/L). La souche 4PL ne produit pas de malate avant 48h, puis montre une nette augmentation de sa concentration jusqu'à atteindre 0,23 g/L en présence de CaCO<sub>3</sub> et 0,18 g/L en présence de tampon phosphate ; on n'observe pas de décroissance de cette concentration dans la durée des essais.

Il y a un effet stimulant de la présence de CaCO<sub>3</sub> sur la production de malate par la souche PMS-U; la présence du transporteur dans cette souche permet une accumulation de malate dans le milieu, visible dès 48 heures en présence de carbonate. Cependant, après 96h, l'éthanol est épuisé et il est probable que le malate soit réimporté dans la cellule pour continuer la croissance. Pour la souche 4PL, l'accumulation du malate est plus tardive, probablement du fait de l'absence de transporteur; il existe également un effet stimulant de CaCO<sub>3</sub>, mais il est moins marqué que dans le cas de la souche PMS-U.

Les concentrations en malate obtenues pour la souche PMS-U restent cependant plus faibles que celles obtenues sur la phase de consommation de l'éthanol en croissance sur glucose. Cela n'est *a priori* pas dû au fait que l'éthanol est ici la seule source de carbone utilisée pour produire de la biomasse, puisqu'en croissance sur glucose la biomasse produite équivaut à 12-13 unités d'absorbance, équivalente à celle obtenue ici. La différence observée pourrait plutôt tenir à l'absence de glycérol, qui est présent à hauteur de 3 à 6 g/L en croissance sur glucose et est également consommé (au moins partiellement) après épuisement du glucose dans le milieu. La consommation de glycérol constitue en effet un apport énergétique important, notamment du fait de son pouvoir réducteur supérieur à celui du glucose.

**Succinate.**Le suivi de la concentration en succinate (Figure 63E) montre qu'avant 24 heures il n'y a aucune production. Pour la souche PMS-U, la concentration de succinate passe par un maximum à 96 h et il semble y avoir un effet stimulant de CaCO<sub>3</sub>. Pour la souche 4PL, la concentration en succinate montre le même profil que celle de malate: augmentation continue à partir de 48h jusqu'à la fin de l'essai. Les concentrations de succinate sont très faibles.

**Glycérol.** Les concentrations en glycérol (Figure 63F) sont également très faibles. Pour la souche 4PL en présence de CaCO<sub>3</sub> le glycérol n'est détecté dans le milieu qu'en fin d'essai au dernier point de prélèvement. Pour la souche PMS-U en présence de CaCO<sub>3</sub> et la souche 4PL en présence de tampon, le glycérol est détecté à partir de 48h et augmente jusqu'à 96h à des niveaux similaires, puis il diminue en fin d'essai pour la souche 4PL et continue à augmenter pour la souche PMS-U. Pour la souche PMS-U en présence de tampon, le glycérol apparaît à 24h; la plus haute concentration mesurée est à 72h, puis la concentration de glycérol diminue jusqu'à 0 en fin d'essai.

**Acétate.** En ce qui concerne la concentration en acétate (Figure 63G), la souche PMS-U en présence de  $\text{CaCO}_3$  ou de tampon et la souche 4PL en présence de tampon présentent le même profil: la concentration augmente pendant les 96 premières heures, puis diminue en fin d'essai. Étant donné que l'acétate est un des intermédiaires de la métabolisation de l'éthanol, il est logique que sa concentration augmente lorsque l'éthanol est consommé, puis diminue lorsque l'éthanol est épuisé. La souche 4PL présente le même profil, mais décalé vers des concentrations plus hautes en acétate. Cela peut être dû au fait que cette condition est celle qui présente le pH le plus haut, ce qui favorise l'accumulation de l'acétate dans le milieu.

**Conclusion.** L'essai de croissance sur éthanol montre que l'on obtient une production de malate comparable pour les deux souches en termes de concentration, bien que les cinétiques de production soient différentes: le malate apparaît plus tôt pour la souche modifiée. Il semble donc que les productions de malate dans la souche 4PL et dans la souche PMS-U soient sensiblement les mêmes. Cela peut être dû à la différence de niveau d'expression contrôlé par le promoteur GPD, utilisé pour l'expression de la PEPC, de la MDH et du transporteur de malate, entre les métabolismes sur glucose et sur éthanol. En effet, bien que ce promoteur soit considéré comme constitutif, les niveaux d'expression des protéines placées sous son contrôle peuvent être fortement diminués en croissance sur éthanol par rapport aux niveaux obtenus en croissance sur glucose (Peng *et al.*, 2015). Les levures ayant été cultivées sur glucose et mises en présence d'éthanol seulement au lancement de l'essai, il est possible que la différence de cinétique constatée dans la métabolisation de l'éthanol et la production de malate soit due à l'action de protéines synthétisées pendant la phase de préculture sur glucose et toujours actives pendant le début de l'essai sur éthanol.

Cependant, les concentrations obtenues en malate restent plus faibles que celles observées à partir de la même concentration d'éthanol en fin de croissance sur milieu glucose. Il est très probable que le glycérol, qui est produit à partir du glucose et est consommé en même temps que l'éthanol après épuisement du glucose, possède un fort pouvoir réducteur et est donc susceptible d'accroître la quantité de malate produite. En effet, pour une molécule de glycérol on peut potentiellement produire une molécule de malate *via* la glycolyse tandis que pour produire une molécule de malate par le cycle du glyoxylate il faut consommer trois molécules d'éthanol.

#### 1.1.4. Répétabilité

Les différents essais qui ont été menés en fioles ont posé la question de leur répétabilité, car les concentrations finales en malate obtenues avec la souche PMS-U présentent une certaine variabilité. Par ailleurs, des modifications de la production de malate ont été constatées en fonction du mode de conservation des cryotubes. Ainsi, des levures provenant de cryotubes conservés trois semaines à  $-20^\circ\text{C}$  et utilisées pour démarrer des essais ont montré d'importantes modifications dans les concentrations de malate produites, avec des valeurs de 0,5 g/L ou moins après 24 heures de culture, alors que la majorité des essais ont montré des concentrations d'environ 1 g/L. Les résultats de ces essais n'ont pas été exploités.

Afin d'analyser les phénomènes observés en termes de répétabilité, un tableau comparant les rendements de production massique de malate et de succinate ont été réalisés pour la souche PMS-U et la souche 4PL. Ils sont présentés en Tableau 20.

Souche	Essai	Tampon		CaCO <sub>3</sub>	
		Rendement de malate (g/g glucose)	Rendement de succinate (g/g glucose)	Rendement de malate (g/g glucose)	Rendement de succinate (g/g glucose)
PMS-U	1	0,021 ± 0,001	0,012 ± 0,001	0,048 ± 0,005	0,028 ± 0,003
	2	0,021 ± 0,001	0,013 ± 0,001	0,056 ± 0,002	0,033 ± 0,001
	3	0,012 ± 0,006	0,007 ± 0,002	0,033 ± 0,006	0,022 ± 0,004
4PL	1	0,003 ± 0,000	0,002 ± 0,000	0,005 ± 0,001	0,004 ± 0,001
	2	0,003 ± 0,000	0,004 ± 0,000	0,005 ± 0,000	0,007 ± 0,000

**Tableau 20.** Répétabilité des rendements massiques de malate et de succinate chez les souches PMS-U et 4PL au cours des essais d'une durée de 168 heures sur milieu YNB glucose 50 g/L tampon phosphate 0,5 m pH 5,5 ou YNB glucose 50 g/L CaCO<sub>3</sub> 6 g/L.

La comparaison des rendements de production massique de malate et de succinate montre une variabilité d'un essai à l'autre pour la souche PMS-U, plus marquée entre l'essai 3 et les autres essais, ce qui correspond à l'utilisation d'un nouveau stock de cellules cryoconservées. Cependant, bien qu'il existe visiblement une variabilité dans les valeurs de rendement calculées, qui reflètent des différences de concentrations mesurées, on constate que l'effet du carbonate de calcium sur le rendement est toujours le même pour la souche PMS-U: la présence de CaCO<sub>3</sub> permet de multiplier les rendements de malate et de succinate par environ 2,5.

Les valeurs de rendement obtenues pour la souche 4PL sont stables pour le malate mais pas pour le succinate, pour lequel les rendements sont augmentés d'environ 50% lors du second essai.

Cette variabilité peut être due à l'expression des gènes d'intérêt sur des plasmides 2μ, qui présentent une certaine instabilité et une variabilité dans la répartition du nombre de copies de plasmides de chaque type (Futcher and Cox, 1984; Parent *et al.*, 1985; Romanos *et al.*, 1992). Il semble que de nombreux paramètres, comme par exemple le gène de sélection utilisé pour la sélection et le maintien des plasmides, soient susceptibles d'exercer une charge métabolique sur la cellule et de faire varier leur nombre de copies de sorte à avoir un impact important sur le niveau d'expression des gènes introduits (Karim *et al.*, 2013).

## 1.2. Discussion

La caractérisation physiologique de la souche PMS-U par des essais en fioles a permis de mettre en évidence l'influence de la présence de tampon phosphate et de carbonate de calcium sur la production de malate et de succinate. Le carbonate de calcium exerce un effet stimulant sur la production des deux éléments, avec une multiplication par deux du titre de malate dans un milieu YNB contenant glucose et CaCO<sub>3</sub> par rapport à un milieu contenant glucose et tampon phosphate. La présence de tampon phosphate avec CaCO<sub>3</sub> limite son effet stimulant en provoquant une augmentation de la production de glycérol, qui détourne du carbone de la glycolyse et donc de la voie de production du malate. L'augmentation de la production de malate en présence d'un apport extérieur en carbone inorganique suggère que le CO<sub>2</sub> produit par la décarboxylation du pyruvate pour la production d'éthanol n'est pas suffisant pour obtenir une production optimale. Par ailleurs, au pH de travail dans les fioles (entre 4,5 et 6), les espèces carbonate issues de la solubilisation de CaCO<sub>3</sub> solide se trouvent majoritairement sous forme CO<sub>2</sub> dissous. C'est un élément important car bien que la forme HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> soit

celle utilisée par la PEPC, qui est la carboxylase introduite pour la voie de production de malate, il semble qu'elle ne soit pas capable de traverser la membrane des cellules, contrairement à  $\text{CO}_2$  (Gutknecht *et al.*, 1977) et la levure ne semble pas posséder de transporteur d'hydrogénocarbonate (Jennings *et al.*, 2007). Ainsi, la présence de fortes concentrations d'hydrogénocarbonate dans le milieu n'est pas forcément garante d'une activité augmentée de l'enzyme, mais une augmentation de la concentration en  $\text{CO}_2$  dissous pourrait par contre avoir un effet positif. Cela reste à confirmer puisqu'il semble que l'augmentation de la teneur en  $\text{CO}_2$  dissous dans le milieu diminue l'expression de l'anhydrase carbonique, l'enzyme qui catalyse l'interconversion entre  $\text{CO}_2$  et  $\text{HCO}_3^-$  dans la cellule (Amoroso *et al.*, 2005).

L'optimisation de la concentration en  $\text{CaCO}_3$  en présence ou en l'absence de tampon phosphate a montré que pour 50 g/L de glucose et une durée d'essai de 168 heures, la meilleure condition était 6 g/L de carbonate de calcium sans tampon phosphate. En outre, les essais de comparaison entre les carbonates de calcium et de sodium ont prouvé qu'il n'y avait pas d'influence de  $\text{Ca}^{2+}$  sur la production des acides organiques. Ces essais en fioles ne permettent en revanche pas de conclure quant à la cause réelle de l'effet observé du carbonate de calcium. En effet, celui-ci joue un rôle d'apport de carbone inorganique, mais participe également au maintien du pH, paramètre qui a un impact non négligeable sur l'export du malate, comme l'a montré l'expérience comparant des concentrations de  $\text{CaCO}_3$  comprises entre 0 et 6 g/L.

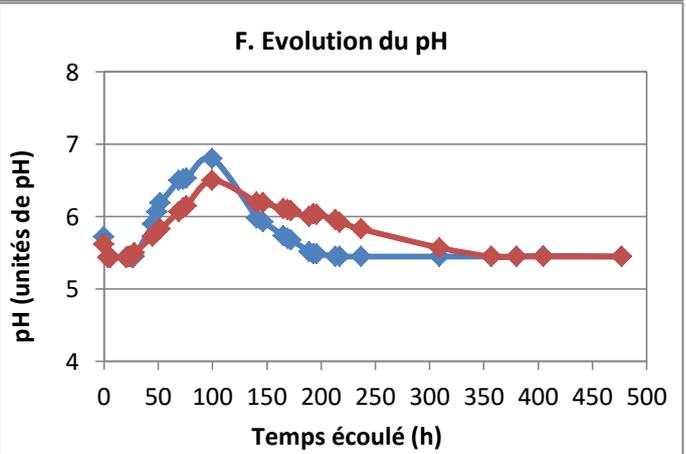
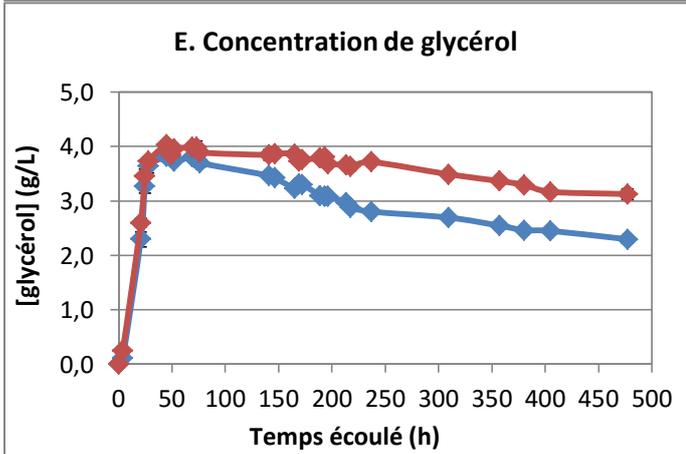
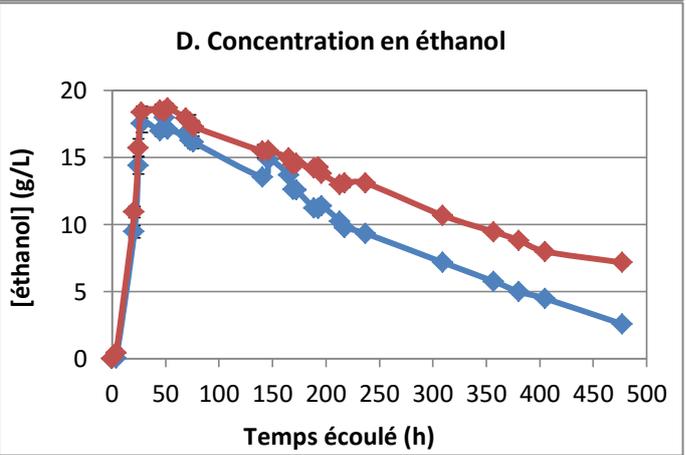
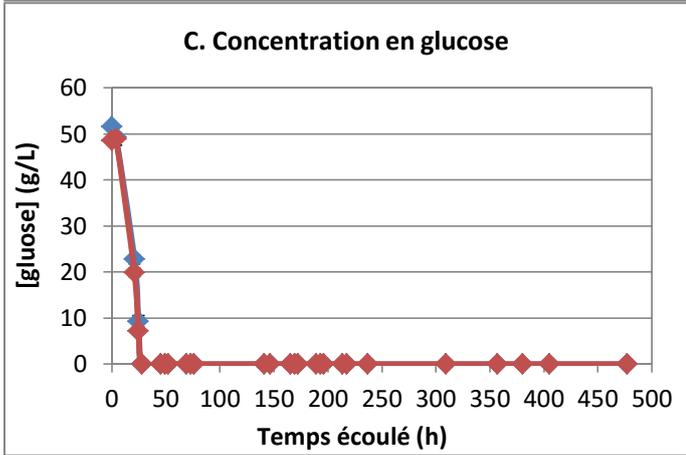
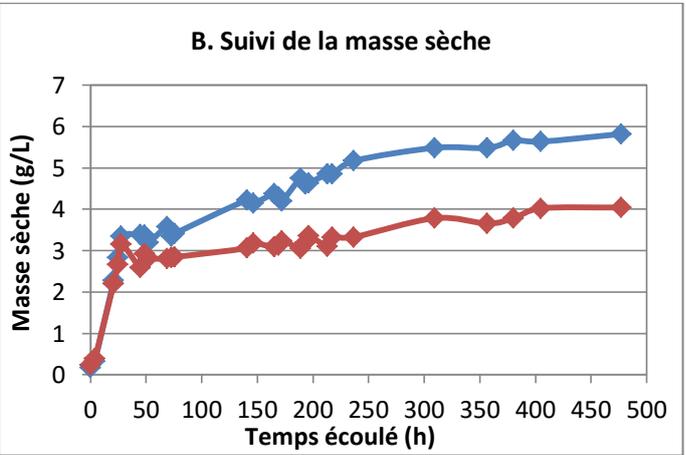
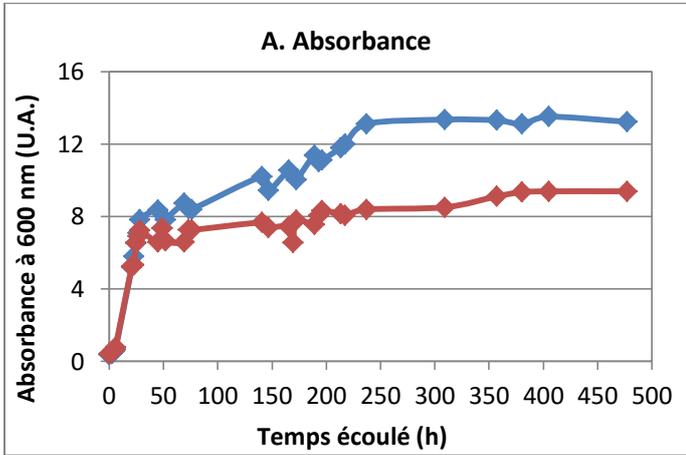
Afin de déterminer l'effet d'un apport en carbone inorganique sur la production de malate par la souche PMS-U, il est donc nécessaire de procéder à des essais où le pH sera stable, avec un apport en carbone inorganique, par une autre source que le carbonate de calcium. Un essai en fermenteur semble le meilleur moyen de pouvoir maîtriser ces conditions, puisqu'il permet de réguler le pH et d'assurer un apport en carbone inorganique par l'intermédiaire d'air enrichi en  $\text{CO}_2$ .

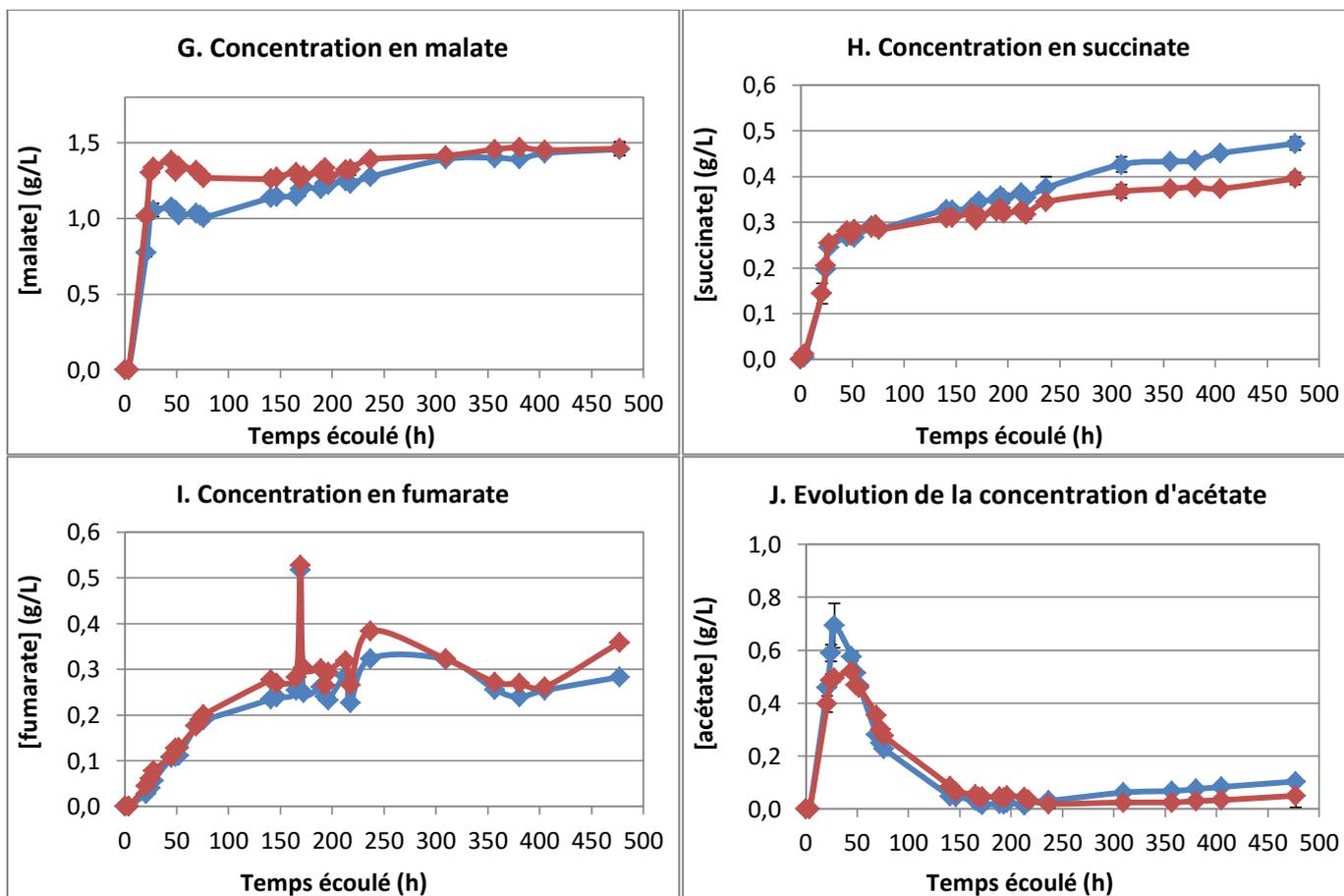
## **2. Caractérisation en bioréacteur en présence d'air ou d'air enrichi en $\text{CO}_2$**

Des essais en fermenteur ont été menés afin d'analyser le comportement de la souche PMS-U en présence d'air enrichi en  $\text{CO}_2$ . Deux conditions ont été testées: une condition avec de l'air naturel (0,035% de  $\text{CO}_2$ ) et une condition avec de l'air enrichi à 5% de  $\text{CO}_2$ . Les essais ont été réalisés dans des fermenteurs contenant trois litres de milieu avec un débit d'aération de 160 mL/min. L'essai a été réalisé à une température de 30°C, sous une agitation de 500 rpm avec un pH maintenu à 5,5 par ajout de KOH.

### **2.1. Suivi des paramètres mesurés**

Le suivi a été réalisé par analyse de prélèvement du milieu de culture pendant 477 heures. Les graphes donnant l'évolution des différents paramètres suivis sont présentés en Figure 64.

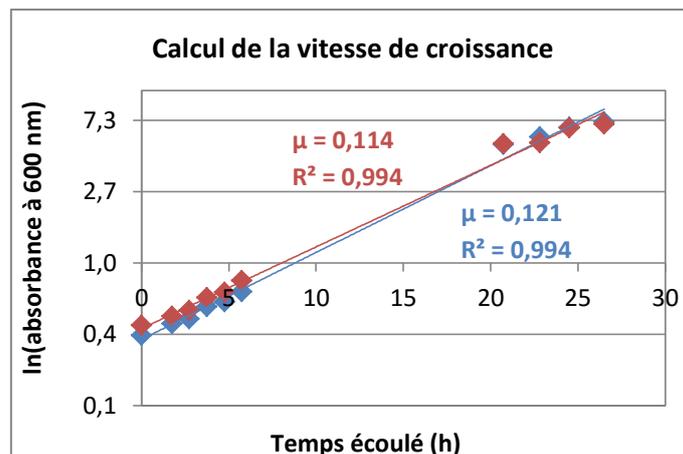




**Figure 64.** Essai en fermenteur de la souche PMS-U: effet de la teneur en CO<sub>2</sub> de l'air introduit.

A. Suivi de l'absorbance à 600 nm. B. Suivi de la masse sèche. C. Suivi de la concentration en glucose. D. Suivi de la concentration en éthanol. E. Suivi de la concentration en glycérol. F. Evolution du pH. G. Suivi de la concentration en malate. H. Suivi de la concentration en succinate. I. Suivi de la concentration en fumarate. J. Suivi de la concentration en acétate. Condition air: ● ; condition air enrichi à 5% de CO<sub>2</sub>: ●.

Le suivi de l'absorbance à 600 nm (Figure 64A) et de la concentration de masse sèche (Figure 64B) montre une croissance équivalente pour les deux conditions testées pendant les 26 premières heures, qui correspondent à la phase de consommation du glucose (Figure 64C). En portant le logarithme de l'absorbance en fonction du temps pour les 26 premières heures de culture (Figure 65) on obtient des droites montrant que les cultures sont en phase exponentielle pendant cette période. Les pentes donnent les valeurs de la vitesse spécifique de croissance  $\mu$  ; elles sont équivalentes pour les deux conditions :  $0,121 \text{ h}^{-1}$  pour la condition air et  $0,114 \text{ h}^{-1}$  pour la condition 5% CO<sub>2</sub>.



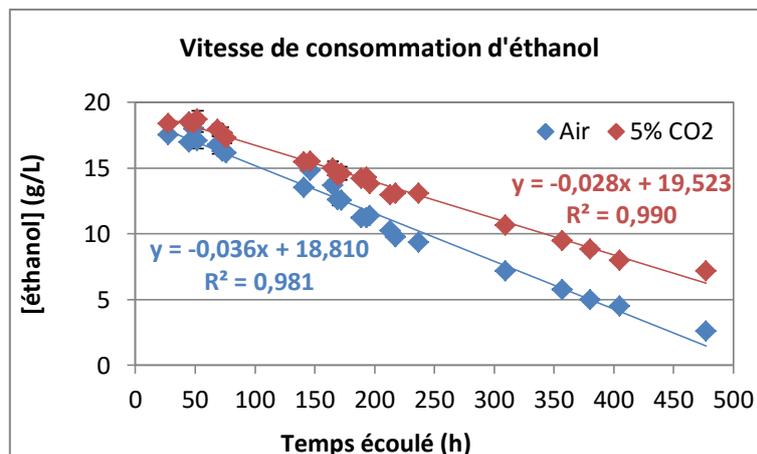
**Figure 65.** Calcul de la vitesse de croissance spécifique  $\mu$  de la souche PMS-U en présence d'air ou d'air enrichi en CO<sub>2</sub>.

Après la phase de croissance sur glucose, la biomasse continue à croître, mais de façon plus limitée, surtout pour la condition "air enrichi en CO<sub>2</sub>". L'absorbance maximale est en effet plus faible pour cette condition : 9,4 contre 13,5 pour la condition en air naturel. Il semble donc que la souche a plus de mal à métaboliser l'éthanol en présence d'air enrichi, comme le confirme la consommation de l'éthanol plus lente dans ce cas (Figure 64D).

En présence de CO<sub>2</sub>, la souche atteint une concentration maximale d'éthanol légèrement plus haute (18,71 g/L à 52 heures) que celle obtenue avec l'air naturel (17,99 g/L à 49 heures) (Figure 64C). Ensuite la concentration d'éthanol diminue.

Le même type de comportement est observé pour le glycérol (Figure 64E) ; sa production est légèrement plus importante pour la condition air enrichi en CO<sub>2</sub> après 45 heures et il est consommé ensuite plus lentement.

La vitesse de consommation de l'éthanol a été calculée pour les deux conditions ; on voit qu'elle est constante tout au long de la deuxième phase de croissance (Figure 66) et on confirme qu'elle est significativement plus faible en présence d'air enrichi : 0,028 g éthanol L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> contre 0,036 en présence d'air naturel. Ces vitesses restent faibles en comparaison de celles mesurées en fioles et c'est aussi le cas pour le glycérol. Ceci pourrait être dû à un débit d'aération assez faible pour le volume de culture: 0,160 mL/min pour environ 3 litres de milieu, soit 0,05 vvm. Le fait que l'éthanol et le glycérol soient consommés moins rapidement en présence de 5% de CO<sub>2</sub> est vraisemblablement dû à l'inhibition exercée par la plus haute teneur en CO<sub>2</sub> sur le métabolisme respiratoire (Aguilera *et al.*, 2005).



**Figure 66.** Evolution de la concentration en éthanol dans la deuxième phase de croissance (à partir de 27 heures) pour la souche PMS-U en présence d'air ou d'air enrichi en CO<sub>2</sub>.

Si l'on compare les productions d'éthanol et de glycérol en termes de rendement (en g par g de glucose consommé) pendant la phase de croissance sur glucose (Tableau 21), on constate que les rendements massiques de la condition 5% CO<sub>2</sub> sont un peu plus élevés que ceux de la condition air naturel : 38 contre 34% pour le rendement en éthanol et 7,7 contre 7,1% pour le rendement en glycérol. Les productions d'éthanol et de glycérol à la fin de la phase de croissance sur glucose sont donc favorisées en présence d'air enrichi, malgré des teneurs en biomasse équivalentes pour les deux conditions: il est possible qu'il s'agisse d'un effet inhibiteur de l'augmentation de la teneur en CO<sub>2</sub> sur les capacités respiratoires de la cellule (Aguilera *et al.*, 2005), qui favorise l'augmentation du métabolisme fermentaire (production d'éthanol et de glycérol).

	Ethanol		Glycérol		Acétate		Malate		Succinate		Masse sèche	
	(g/g glucose)		(g/g glucose)		(g/g glucose)		(g/g glucose)		(g/g glucose)		(g/g glucose)	
	Air	5% CO2										
<b>A 27,5 heures</b>	0,341	0,379	0,071	0,077	0,013	0,010	0,021	0,028	0,005	0,005	0,058	0,054
<b>En fin d'essai</b>	0,048	0,141	0,042	0,061	0,002	0,001	0,027	0,029	0,009	0,008	0,105	0,065

**Tableau 21.** Rendements massiques de production d'éthanol, de glycérol, d'acétate, de malate, de succinate et de masse sèche calculés à 27,5 heures à la fin de la phase de consommation du glucose et en fin d'essai.

Le suivi du pH (Figure 64F) montre des allures similaires pour les deux conditions : une augmentation du pH à partir de 27 heures (épuisement du glucose dans le milieu de culture) et jusqu'à 100 h, suivie d'une décroissance. La réduction de vitesse de croissance consécutive à la fin de la phase de croissance du glucose provoque une augmentation du pH jusqu'à des valeurs de 6,8 (en présence d'air) et 6,5 (en présence d'air enrichi en CO<sub>2</sub>) ; la régulation n'étant opérée que par ajout de base ne peut maintenir le pH aux alentours de 5,5. Dans le cas de la condition air naturel, le retour à des valeurs de pH proches de 5,5, lié au redémarrage de la croissance, est beaucoup plus rapide (environ 180 heures) que pour la condition 5% de CO<sub>2</sub>, où les valeurs de pH ne redescendent en-dessous de 5,8 qu'après 300 heures. Cette différence résulte d'un redémarrage de croissance plus lent pour les levures en présence de 5% de CO<sub>2</sub>, comme on peut le voir sur la Figure 64A.

La concentration en malate (Figure 64G) est plus importante pour la condition air enrichi en CO<sub>2</sub>, bien que l'écart entre les deux conditions tende à se resserrer au cours de l'essai, jusqu'à obtenir des concentrations égales à partir de 400 heures. Néanmoins, le rendement massique de production de malate reste un peu plus élevé sur la phase de croissance sur glucose (Tableau 21), il est de 2,8% (0,036 mole de malate par mole de glucose consommée) pour la condition 5% CO<sub>2</sub> contre 2,1% pour

la condition air. En fin d'essai, les rendements des deux conditions sont très proches : 2,9% (0,039 mole de malate par mole de glucose) pour l'air enrichi contre 2,7% pour l'air naturel.

De plus, si l'on ramène la production de malate à la biomasse, on constate un net avantage pour la condition avec air enrichi (Figure 67A). La productivité en g de malate par litre et par heure (Figure 67B) et la productivité spécifique en g de malate par g de biomasse et par heure (Figure 67C) montrent également des valeurs plus hautes pour la condition avec CO<sub>2</sub>, en tout cas sur les 140 premières heures. Le pic de productivité est obtenu à 24 heures en fin de phase de consommation du glucose. Contrairement aux essais en fioles, le profil de production de malate ne connaît pas ici de deuxième augmentation, puisque l'éthanol n'est que lentement consommé du fait du débit d'aération assez faible et de la teneur augmentée en CO<sub>2</sub> pour la condition air 5% CO<sub>2</sub>.

Contrairement à ce qui avait été observé en fioles, où la production de succinate était augmentée en présence de CaCO<sub>3</sub>, la concentration en succinate (Figure 64H) est ici plus faible dans la condition CO<sub>2</sub> que dans la condition air. C'est probablement lié au fait que la teneur augmentée en CO<sub>2</sub> limite le métabolisme respiratoire, donc la consommation de l'éthanol et la formation de succinate.

Le fumarate (Figure 64I), qui a été dosé pour la première fois au cours de cet essai, montre des concentrations du même ordre de grandeur que celles du succinate, et similaires dans les deux conditions.

La production d'acétate (Figure 64J) a lieu pendant la phase de consommation du glucose et atteint une valeur maximale vers 27 heures, assez faible toutefois (de l'ordre de 0,7 g/L). Ensuite, l'acétate est consommé et s'épuise vers 200 heures. Lorsque la croissance sur éthanol s'amorce, on observe une nouvelle production d'acétate, mais très limitée (inférieure à 0,1 g/L). Les valeurs mesurées pour la condition air sont légèrement supérieures à celles mesurées pour la condition CO<sub>2</sub>, surtout lors de la phase de consommation de l'éthanol, ce qui est lié au fait que la souche consomme l'éthanol plus rapidement dans la condition air que dans la condition CO<sub>2</sub>.

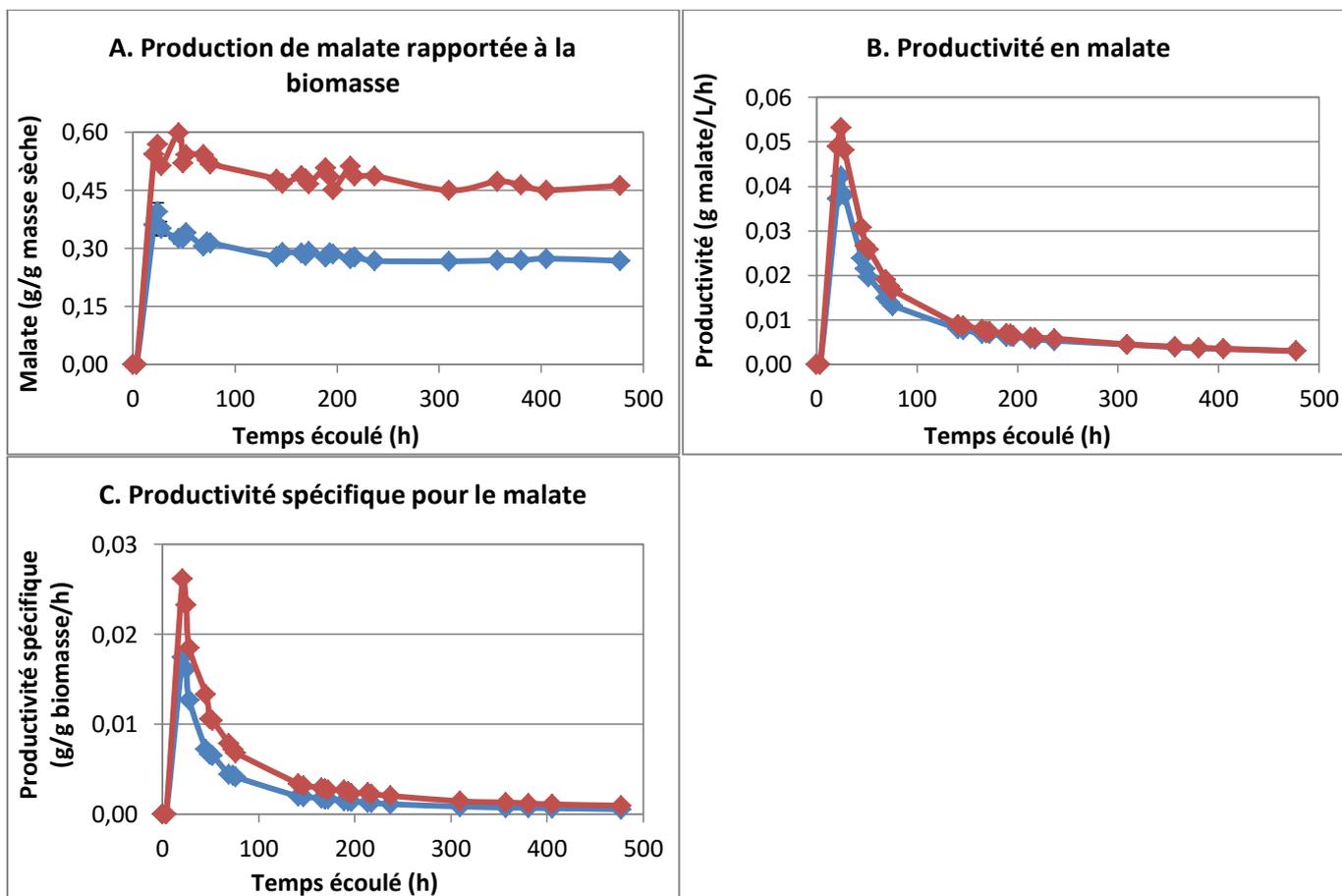


Figure 67. Graphes de la production rapportée à la biomasse (A), de la productivité (B) et de la productivité spécifique (C) pour le malate.

Condition air: ● ; condition air enrichi à 5% de CO<sub>2</sub>: ●.

## 2.2. Discussion

La réalisation d'un essai en fermenteur sur la souche PMS-U, pour évaluer l'influence de l'apport d'air enrichi en CO<sub>2</sub> sur la production de malate, confirme les observations réalisées en fioles avec le carbonate de calcium: l'apport en carbone inorganique permet d'augmenter la production de malate. La différence est visible pendant la phase de consommation du glucose, ce qui signifie que la voie métabolique de production de malate introduite fonctionne correctement et est effectivement stimulée par l'apport en carbone inorganique. La condition air enrichi en CO<sub>2</sub>, bien qu'elle présente une concentration de malate ainsi que des productivités supérieures à la condition air naturel, subit un impact négatif de la présence de CO<sub>2</sub> sur sa croissance. L'effet n'est pas significatif en début d'essai puisque les vitesses de croissance sont similaires, mais il est visible sur la consommation ultérieure de l'éthanol. Ce n'est pas surprenant puisque l'augmentation de la teneur en CO<sub>2</sub> engendre une inhibition plus forte sur le métabolisme respiratoire que sur le métabolisme fermentaire; par ailleurs, elle est également susceptible de provoquer une baisse de production de biomasse, une diminution de la capacité de fermentation ainsi qu'une inhibition de la division cellulaire (Aguilera *et al.*, 2005). Cet impact négatif n'est cependant pas très gênant pour cet essai puisque c'est la stimulation par CO<sub>2</sub> dans la phase de consommation du glucose qui nous intéresse : nous avons donc confirmé l'effet positif de l'apport de carbone inorganique sur la production de malate par la voie métabolique exprimée dans la souche PMS-U. Par ailleurs, nous confirmons dans cet essai que c'est bien l'apport de carbone inorganique qui exerce un effet stimulant sur la production de malate et non l'augmentation du pH, notamment parce que, dans la phase de croissance sur éthanol, il n'y pas d'augmentation de la production de malate pour la condition 5% CO<sub>2</sub> alors qu'il y a une augmentation du pH.

Cet essai en fermenteur ne constitue toutefois pas une preuve directe de la réelle incorporation de carbone issu de CO<sub>2</sub> dans le malate produit par les cellules. Pour vérifier cela, il faudrait effectuer un essai utilisant du dioxyde de carbone marqué par <sup>13</sup>C et réaliser des analyses par RMN du malate produit. La présence de carbone marqué dans les molécules de malate confirmerait l'incorporation de carbone inorganique dans la molécule via la voie métabolique mise en place. Des essais utilisant du CO<sub>2</sub> marqué permettraient également de quantifier les flux qui passent par la voie métabolique introduite. Il y a en effet une concurrence au niveau du PEP entre la voie métabolique native de la glycolyse et l'utilisation du PEP par la pyruvate kinase, et la voie métabolique introduite avec la PEPC. Il serait intéressant de pouvoir déterminer quelle fraction du flux de carbone emprunte la voie mise en place.

## 1. Conclusion

La caractérisation physiologique de la souche PMS-U a permis de démontrer l'effet de l'apport de carbonate sur la production de malate et d'optimiser les concentrations et, dans une moindre mesure, la composition du milieu en ce qui concerne la présence de tampon phosphate. Ces essais en fioles ont montré une production de malate par la souche PMS-U en deux temps, avec une production initiale à partir du glucose et une seconde phase de production par consommation de l'éthanol produit. Les titres de malate les plus hauts ont atteint 2,76 g/L, pour un rendement massique maximal de 5,6%, soit 0,075 mole de malate par mole de glucose consommée. Ces titres et rendements sont à relativiser par rapport à ce qui a déjà été publié concernant la production de malate chez *S. cerevisiae*: des titres de 59 g/L de malate pour un rendement molaire de 0,42 mole par mole de glucose ont été rapportés dans une souche *Apdc*, c'est-à-dire ne produisant pas d'éthanol (Zelle *et al.*, 2008).

Le passage de la souche en fermenteur a permis de confirmer l'effet de l'apport de carbone inorganique en comparant un apport d'air avec un apport d'air enrichi à 5% en CO<sub>2</sub>. La croissance et la consommation de l'éthanol ont été impactées négativement par l'apport de CO<sub>2</sub>, mais cet apport a permis d'obtenir une meilleure productivité et une meilleure productivité spécifique du malate: le rendement massique reste légèrement supérieur pour la condition 5% CO<sub>2</sub>, avec 2,9% (soit 0,039 mole de malate par mole de glucose) contre 2,7% pour la condition air. Contrairement aux essais en fioles, la faible aération n'a pas permis une consommation rapide de l'éthanol, accompagnée d'une production d'acides organiques: la production de malate s'est effectuée majoritairement sur la phase de consommation du glucose, surtout pour la condition "air enrichi en CO<sub>2</sub>". Cela explique que les titres obtenus (1,46 g/L) soient équivalents à ceux obtenus lors des essais en fioles à 48 heures, sur la phase de consommation du glucose.

Nous avons donc caractérisé la souche PMS-U qui, grâce à la voie métabolique que nous avons introduite, est capable de produire du malate. Cette production est stimulée par l'apport de carbone inorganique sous forme de carbonate de calcium ou de dioxyde de carbone. Les essais en fermenteur ont montré que c'est bien l'apport de carbone qui a un effet sur la production de malate. L'incorporation de carbone provenant du CO<sub>2</sub> dans les molécules de malate produites reste une hypothèse très probable, mais pas totalement confirmée; seule l'utilisation de <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> suivie d'une analyse des composés produits par RMN pourrait permettre de confirmer l'intégration du carbone inorganique dans les molécules de malate.

Des travaux d'optimisation pourraient par ailleurs être envisagés. Le débit de gaz et la concentration en CO<sub>2</sub> pourraient être optimisés; en effet, des travaux montrent que l'expression de l'anhydrase carbonique de *Saccharomyces*, qui catalyse l'interconversion de CO<sub>2</sub> en HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, est inhibée en présence d'air enrichi à 5% de CO<sub>2</sub> (Amoroso *et al.*, 2005). Cela peut avoir un effet sur les réactions

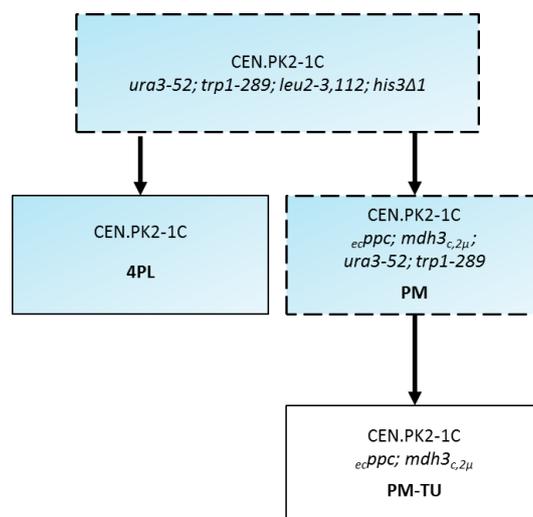
considérées puisque la PEPC, qui catalyse la carboxylation du PEP en oxaloacétate, utilise l'hydrogénocarbonate et non CO<sub>2</sub>. On peut également envisager de régler le débit d'air et l'agitation, afin d'optimiser l'oxygénation, qui semble ici insuffisante; pour des essais ultérieurs d'une durée similaire ; il semble également important d'inclure une régulation acide pour le pH, pour éviter une augmentation trop importante du pH après épuisement du glucose dans le milieu.

Par ailleurs, nous utilisons un milieu minimal synthétique; l'apport de nutriments tels que des facteurs de croissance (biotine, acides gras) ou des acides aminés pourrait permettre d'améliorer la croissance de la souche et potentiellement la production de malate. Dans le cas de notre souche, un milieu complexe ne pourrait pas être utilisé du fait de l'expression des gènes d'intérêt sur des plasmides 2μ nécessitant le maintien de la pression de sélection, c'est-à-dire l'absence d'histidine, de tryptophane, de leucine et d'uracile dans le milieu. La construction d'une souche possédant les gènes d'intérêt intégrés dans son génome pourrait permettre l'utilisation de milieu complexe permettant une meilleure croissance, et pourrait également pallier les problèmes d'expression de certains gènes liés au nombre de copies de chaque plasmide qui n'est pas maîtrisé.

# Chapitre 5 : Utilisation de souches exprimant les gènes *ecppc* et *mdh3<sub>c</sub>* pour la production d'éthanol 1G

Les souches intermédiaires auxotrophes générées pour la stratégie de production d'acide malique ont fait l'objet d'une caractérisation spécifique concernant la production d'éthanol. En effet, une expérience préliminaire présentée dans le chapitre 3 II a mis en évidence une augmentation du rendement de production d'éthanol pour les souches exprimant les gènes de la PEP-carboxylase et de la malate déshydrogénase.

L'étude présentée dans ce chapitre a porté sur ces souches ainsi que sur des souches prototrophes exprimant les gènes *ecppc* et *mdh3<sub>c</sub>*. Les souches utilisées sont présentées en Figure 68.



**Figure 68.** Arbre généalogique des souches utilisées pour l'étude de la production d'éthanol.

Sur fond bleu: souches ayant été caractérisées également pour l'étude de la production d'acide malique.  
Encadré trait plein: souches prototrophes; encadré trait pointillé: souches auxotrophes.

## 1. Caractérisation préliminaire en fioles: souches auxotrophes exprimant les gènes *ecppc* et *mdh3<sub>c</sub>*

Les clones de la souche PM ont été générés à partir de la souche CEN.PK2-1C par introduction du gène *ecppc* et du gène *mdh3<sub>c</sub>* sur des plasmides 2μ. Après vérification de l'expression des gènes d'intérêt, ces clones ont fait l'objet d'un essai en fioles en comparaison avec la souche CEN.PK2-1C afin de tester la production de malate par ces souches. Cet essai a été présenté en chapitre 3 II. Nous allons reprendre les résultats de cet essai afin d'analyser de façon plus détaillée la production d'éthanol et de glycérol.

Les concentrations finales en glucose et éthanol portées en Tableau 22 montrent un titre en éthanol supérieur pour les deux clones de la souche PM par rapport à la souche CEN.PK2-1C, à consommation de glucose égale puisque la concentration finale en glucose pour ces trois souches est

nulle. Les deux souches recombinantes montrent également des concentrations finales en glycérol et en acétate plus faibles que la souche CEN.PK2-1C.

Souche/clone	Absorbance finale	Masse sèche (g/L)	[glucose] (g/L)	[éthanol] (g/L)	[glycérol] (g/L)	[acétate] (g/L)	[malate] (g/L)
CEN.PK2-1C	6,97 ± 0,05	3,32 ± 0,01	0,00 ± 0,00	42,99 ± 0,71	11,30 ± 0,26	3,92 ± 0,08	0,01 ± 0,01
PM clone 7	7,86 ± 0,15	3,81 ± 0,04	0,09 ± 0,12	47,90 ± 0,66	9,31 ± 0,01	1,82 ± 0,02	0,52 ± 0,02
PM clone 9	7,74 ± 0,09	3,67 ± 0,08	0,24 ± 0,34	46,73 ± 1,19	9,85 ± 0,22	1,78 ± 0,02	0,51 ± 0,05

**Tableau 22.** Essai en fioles sur la souche CEN.PK2-1C et les clones 7 et 9 de la souche PM.

Valeurs d'absorbance, de concentrations de masse sèche et de solutés à la fin de l'essai pour la souche contrôle CEN.PK2-1C et les clones 7 et 9 de la souche PM. Les moyennes et écart-types ont été calculés sur 3 réplicats indépendants.

Le calcul des rendements massiques de production de masse sèche (Tableau 23) montre que la production de biomasse est similaire pour les différentes souches testées. Les clones 7 et 9 présentent des valeurs légèrement supérieures à la souche contrôle.

Pour ces clones les rendements de production d'éthanol sont plus élevés que pour la souche CEN.PK2-1C: le gain de rendement par rapport à la souche contrôle CEN.PK2-1C est de l'ordre de 8,5%. Ces valeurs sont à considérer avec précaution car il peut y avoir un décalage de l'état physiologique des souches: il est possible que la souche contrôle ait consommé la totalité du glucose plus rapidement que les souches recombinantes et ait déjà commencé à consommer une partie de l'éthanol produit au moment des analyses, ce qui est susceptible de réduire les rendements de production d'éthanol.

La productivité d'éthanol est plus élevée pour les clones de la souche PM (0,974 à 0,998 g/L/h) par rapport à la souche contrôle (0,896 g/L/h).

Souche/clone	Rendement masse sèche (g/g glucose)	Rendement éthanol (g/g glucose)	Rendement glycérol (g/g glucose)	Glycérol/éthanol	Productivité éthanol (g/L/h)	Productivité spécifique éthanol (g/g biomasse/h)
CEN.PK2-1C	0,032 ± 0,000	0,415 ± 0,008	0,109 ± 0,002	0,263 ± 0,010	0,896 ± 0,015	0,275 ± 0,005
PM clone 7	0,036 ± 0,001	0,451 ± 0,007	0,088 ± 0,000	0,194 ± 0,002	0,998 ± 0,014	0,267 ± 0,003
PM clone 9	0,035 ± 0,001	0,446 ± 0,010	0,094 ± 0,002	0,211 ± 0,001	0,974 ± 0,025	0,270 ± 0,006

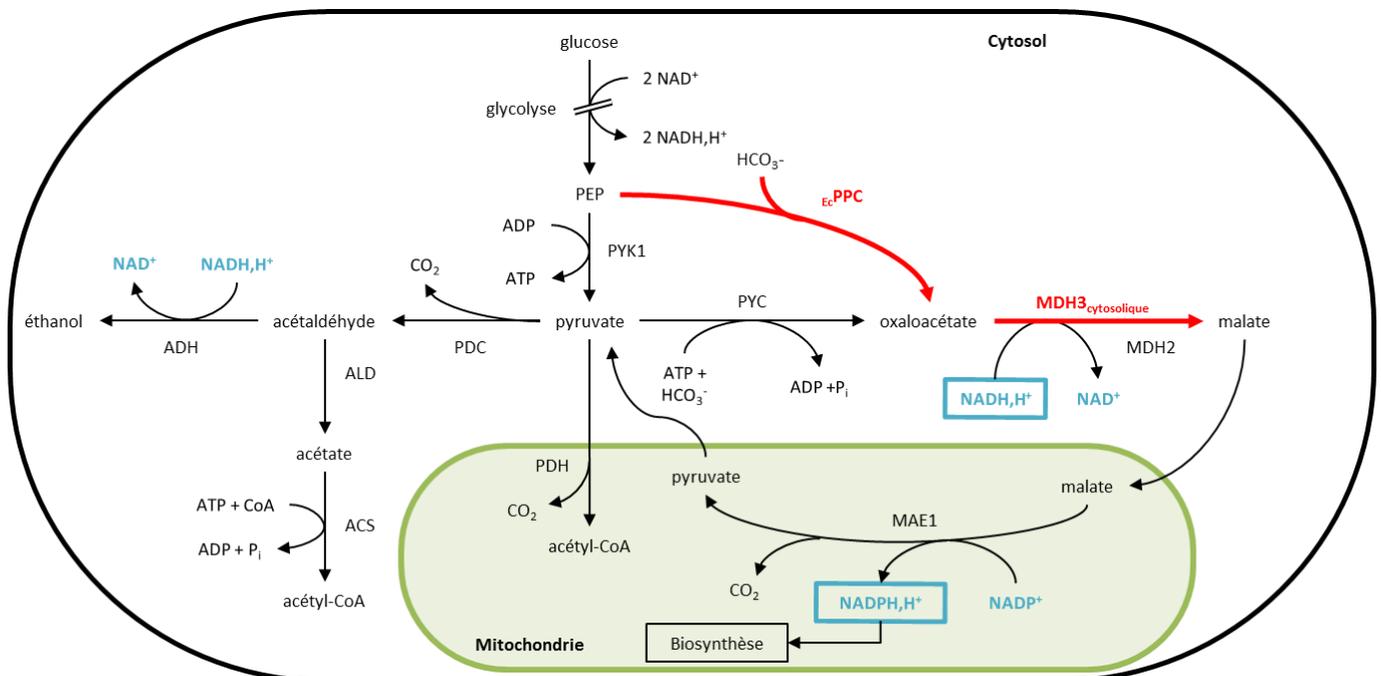
**Tableau 23.** Tableau récapitulatif des rendements massiques de production de masse sèche, d'éthanol et de glycérol et des productivités d'éthanol pour la souche contrôle CEN.PK2-1C et les clones 7 et 9 de la souche PM.

Les valeurs sont calculées pour trois réplicats indépendants, sauf pour le clone 5 (un seul réplicat).

Les résultats révèlent également un effet du génotype sur le rendement de glycérol: les deux clones de la souche PM présentent un rendement de production de glycérol abaissé d'environ 17% par rapport à la souche CEN.PK2-1C. La production de glycérol est un facteur ayant une influence importante sur la production d'éthanol, puisque la synthèse de glycérol utilise du carbone en amont de la glycolyse pour la réoxydation du NADH au détriment de la production d'éthanol.

Le calcul du rapport glycérol/éthanol permet donc d'avoir un aperçu plus précis de la proportion de glycérol produite pour une concentration donnée d'éthanol. Ce rapport est plus bas pour tous les clones testés, avec jusqu'à 26% de baisse pour le clone 7 de la souche PM. Il semble donc bien que les gènes exprimés aient un effet sur la production d'éthanol et de glycérol.

L'augmentation du rendement d'éthanol et la diminution de la production de glycérol peuvent être expliquées par la mise en place d'un effet transhydrogénase (Figure 69). L'expression de la malate déshydrogénase dans le cytosol permet de réduire NADH en NAD<sup>+</sup> en produisant du malate; ce malate entre ensuite dans la mitochondrie, où il est converti en pyruvate par l'enzyme malique qui consomme NADP<sup>+</sup> et produit NADPH, qui peut être utilisé pour les réactions de biosynthèse cellulaire. Le bilan en cofacteurs de la chaîne réactionnelle consiste en la consommation de NADH et la production de NADPH, ce qui revient au transfert d'un proton de NAD vers NADP.



**Figure 69.** Schéma de l'effet transhydrogénase tel qu'il peut se produire dans les souches exprimant la PEP carboxylase et la malate déshydrogénase.

Les flèches rouges indiquent les gènes utilisés pour la stratégie. PYK1 : pyruvate kinase ; *EcPPC* : PEP carboxylase d'*Escherichia coli* ; PDC : pyruvate décarboxylase ; ADH : alcool déshydrogénase ; ALD : aldéhyde déshydrogénase ; ACS : acétyl-CoA synthétase ; PYC : pyruvate carboxylase ; PDH : complexe de la pyruvate déshydrogénase ; MDH2 : isoforme cytosolique de la malate déshydrogénase ; MDH3<sub>cytosolique</sub> : isoforme peroxysomale de la malate déshydrogénase relocalisée dans le cytosol ; MAE1 : enzyme malique mitochondriale.

Les souches testées lors de cet essai sont auxotrophes. La souche-mère CEN.PK2-1C est auxotrophe pour les acides aminés histidine, leucine, tryptophane ainsi que pour la base azotée uracile. Afin de limiter les biais dus à l'ajout d'acides aminés et base azotée dans le milieu, des souches prototrophes,

c'est-à-dire capables de synthétiser l'histidine, la leucine, l'uracile et le tryptophane, ont été construites par ajout de plasmides lorsqu'ils n'étaient pas déjà présents. Par exemple, les clones de la souche PM possèdent deux plasmides 2 $\mu$  leur permettant de synthétiser l'histidine et la leucine; nous leur avons donc ajouté les plasmides leur permettant de synthétiser le tryptophane et l'uracile.

Les nouvelles souches obtenues ont également été caractérisées pour la production d'éthanol.

## 2. Caractérisation des souches prototrophes exprimant *ecppc* et *mdh3<sub>c</sub>*

### 2.1. Essai en fioles

Nous avons construit les souches prototrophes 4PL et PM-TU, qui sont issues respectivement des souches CEN.PK2-1C et PM clone 9. Nous avons comparé ces souches prototrophes lors d'un essai en fioles sur milieu commercial YNB et sur milieu minéral reconstitué (Verduyn *et al.*, 1992), contenant 100 g/L de glucose et 0,5 M de tampon phosphate à pH 5,5. Nous avons choisi de comparer le milieu YNB à un milieu reconstitué car le milieu YNB n'est pas forcément adapté à des conditions de culture anaérobies requises pour la production d'éthanol: il contient par exemple peu d'inositol (2 mg/L), un composé important pour la croissance, mais qui ne peut être synthétisé en l'absence d'oxygène.

Les concentrations finales de glucose (Tableau 24) montrent que le glucose n'a pas été entièrement consommé pour les deux conditions YNB, ce qui n'est pas le cas pour le milieu reconstitué. Les levures cultivées sur le milieu reconstitué ont produit plus d'éthanol et moins de glycérol que celles cultivées sur le milieu YNB: ceci confirme l'hypothèse d'un effet négatif du milieu YNB. Par ailleurs, sur le milieu reconstitué, la souche PM-TU montre des titres en éthanol inférieurs à la souche 4PL.

Milieu	Souche	Absorbance finale	[glucose] finale (g/L)	[éthanol] finale (g/L)	[glycérol] finale (g/L)
YNB	4PL	8,63 $\pm$ 0,01	3,94 $\pm$ 0,39	34,72 $\pm$ 0,83	11,27 $\pm$ 0,50
	PM-TU	7,64 $\pm$ 0,20	9,47 $\pm$ 0,54	33,82 $\pm$ 1,01	10,50 $\pm$ 0,56
Reconstitué	4PL	18,16 $\pm$ 0,12	0,00 $\pm$ 0,00	40,16 $\pm$ 0,76	6,02 $\pm$ 0,48
	PM-TU	15,38 $\pm$ 0,15	0,00 $\pm$ 0,00	38,75 $\pm$ 0,80	8,12 $\pm$ 0,47

**Tableau 24.** Essai en fioles sur milieu YNB ou sur milieu minéral reconstitué avec la souche 4PL et la souche PM-TU.

Absorbance et concentrations en glucose, éthanol et glycérol en fin d'essai. Les moyennes et écart-types ont été calculés sur deux réplicats indépendants.

Les valeurs d'absorbance obtenues en fin d'essai montrent une production de biomasse beaucoup plus importante sur milieu reconstitué que sur milieu YNB, et les rendements de production de biomasse (Tableau 25) sont presque 2 fois supérieurs sur milieu reconstitué. Ces observations abondent également dans le sens de carences en certains oligo-éléments dans le milieu YNB.

L'impact est également visible sur les rendements de production d'éthanol (Tableau 25), qui sont supérieurs sur milieu reconstitué, tandis que les rendements de production de glycérol sont presque deux fois inférieurs à ceux obtenus sur milieu YNB. Les valeurs de productivités sont également inférieures sur milieu YNB; les productivités spécifiques sont toutefois plus élevées, ce qui est dû au fait que les concentrations en éthanol obtenues sont assez hautes sur milieu YNB malgré une production de biomasse inférieure. L'augmentation de la concentration en éthanol et la diminution de

la concentration en glycérol sur milieu reconstitué par rapport au milieu YNB engendrent une diminution de moitié du rapport glycérol/éthanol pour le nouveau milieu.

En outre, bien que sur milieu YNB la souche PM-TU montre un rendement de production d'éthanol (0,358 g d'éthanol par g de glucose) légèrement supérieur à celui de la souche 4PL (0,347 g/g), nous n'observons pas cet effet sur milieu reconstitué: la souche 4PL montre même un rendement légèrement augmenté (0,384 g/) par rapport à la souche PM-TU (0,373 g/g). Toutefois ces rendements sont très proches.

Milieu	Souche	Rendement masse sèche (g/g glucose)	Rendement éthanol (g/g glucose)	Rendement glycérol (g/g glucose)	Glycérol/éthanol	Productivité éthanol (g/L/h)	Productivité spécifique éthanol (g/g biomasse/h)
YNB	4PL	0,035 ± 0,000	0,347 ± 0,001	0,113 ± 0,000	0,324 ± 0,000	0,723 ± 0,007	0,205 ± 0,000
	PM-TU	0,032 ± 0,001	0,358 ± 0,009	0,111 ± 0,002	0,310 ± 0,001	0,703 ± 0,023	0,226 ± 0,000
Recon-stitué	4PL	0,069 ± 0,001	0,384 ± 0,000	0,057 ± 0,001	0,150 ± 0,002	0,832 ± 0,011	0,113 ± 0,002
	PM-TU	0,059 ± 0,001	0,373 ± 0,004	0,078 ± 0,001	0,209 ± 0,001	0,800 ± 0,021	0,129 ± 0,003

**Tableau 25.** Tableau récapitulatif des rendements massiques de production de masse sèche, d'éthanol et de glycérol et des productivités d'éthanol pour la souche contrôle 4PL et la souche PM-TU sur milieu YNB ou sur milieu minéral reconstitué. Les moyennes et écart-types sont calculés pour deux répliquats indépendants. La productivité spécifique a été calculée à partir des mesures de biomasse par absorbance à 600 nm en prenant un rapport absorbance/masse sèche de 0,4.

Cet essai met donc en lumière une influence importante de la composition du milieu YNB sur le métabolisme de la levure. La biomasse est impactée très négativement par l'utilisation du milieu YNB, ce qui met en évidence le fait qu'il n'est pas forcément adapté pour nos applications. Il est possible qu'en plus de l'inositol évoqué précédemment, le citrate, qui est absent du milieu reconstitué, joue un rôle dans les phénomènes observés (voir comparaison des milieux dans le chapitre Matériel et méthodes).

Enfin, cet essai montre que l'on ne retrouve pas les effets attendus du génotype *ecppc/mdh3c* sur le rendement de production d'éthanol en milieu reconstitué. Les différences observées entre les essais en fioles, notamment au niveau des titres atteints en éthanol, peuvent venir entre autres du fait qu'il est difficile de se placer en conditions purement anaérobies en fioles. Bien que les fioles soient fermées, les bouchons en mousse sont prévus pour permettre les échanges gazeux avec l'extérieur et semblent permettre un équilibrage des pressions partielles en O<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub> entre la phase gazeuse des fioles et l'atmosphère extérieure. En effet, les essais effectués pour la production de malate ont montré que même à des vitesses d'agitation relativement faibles (110 rpm) l'éthanol produit par les levures était consommé après épuisement du glucose, ce qui montre qu'un métabolisme aérobie peut tout à fait se mettre en place dans les fioles.

Afin de confirmer les observations faites sur les derniers essais, nous avons réalisé des expériences de fermentation en bioréacteur sur le milieu reconstitué, qui semble moins stressant pour les cellules et plus adapté à des fermentations anaérobies.

## 2.2. Essais en bioréacteur

Les essais ont été réalisés en conditions anaérobies en bioréacteurs de 5 litres ou 2 litres sur milieu reconstitué contenant 100 g/L de glucose. Trois essais ont été réalisés avec la souche 4PL et deux

essais avec la souche PM-TU. Les essais ont été menés à une température de 30°C avec une régulation du pH à 5,5 par ajout de KOH. Les fermentations ont été arrêtées lorsque le glucose du milieu était entièrement épuisé.

Les rendements de production d'éthanol et de glycérol (Tableau 26) confirment la tendance observée lors de l'essai en fioles: la souche PM-TU produit moins d'éthanol et plus de glycérol que la souche 4PL. Bien que les concentrations d'éthanol dosées restent très proches si l'on tient compte des écarts-types, la différence pour la production de glycérol est significative: le rapport glycérol/éthanol est de la même façon significativement plus élevé pour la souche PM-TU (0,201) que pour la souche 4PL (0,138). La productivité d'éthanol est très élevée pour la souche 4PL (1,2 g/L/h), et sa productivité spécifique est presque deux fois supérieure à celle de la souche PM-TU. La production de biomasse (masse sèche et absorbance) et les rendements de masse sèche sont semblables pour les deux souches.

Souche	[éthanol] finale (g/L)	[glycérol] finale (g/L)	Variation de masse sèche (g/L)	Variation d'absorbance	Glycérol/éthanol
4PL	38,74 ± 3,23	5,33 ± 0,52	5,704 ± 0,597	14,26 ± 1,49	0,138 ± 0,012
PM-TU	36,70 ± 3,31	7,37 ± 0,65	5,986 ± 0,138	14,97 ± 0,34	0,201 ± 0,000

Souche	Rendement masse sèche (g/g glucose)	Rendement éthanol (g/g glucose)	Rendement glycérol (g/g glucose)	Productivité éthanol (g/L/h)	Productivité spécifique éthanol (g/g biomasse/h)
4PL	0,064 ± 0,008	0,422 ± 0,010	0,058 ± 0,004	1,201 ± 0,283	0,213 ± 0,058
PM-TU	0,062 ± 0,007	0,382 ± 0,006	0,077 ± 0,001	0,795 ± 0,079	0,133 ± 0,016

**Tableau 26.** Tableau récapitulatif des concentrations finales en éthanol et glycérol, des rendements massiques de production de masse sèche, d'éthanol et de glycérol et des productivités d'éthanol pour la souche contrôle 4PL et la souche PM-TU en bioréacteur sur milieu minéral reconstitué.

Les valeurs sont calculées pour au moins deux réplicats indépendants. La productivité spécifique a été calculée à partir des mesures de biomasse par absorbance à 600 nm en prenant un rapport absorbance/masse sèche de 0,4.

Les essais effectués sur milieu reconstitué en fermenteur sur les souches 4P et PM-TU confirment les conclusions tirées de l'expérience en fioles: il n'y a pas d'effet d'amélioration du rendement de production d'éthanol ou de diminution du rendement de glycérol dans les souches exprimant la PEP carboxylase et la malate déshydrogénase.

## 2.3. Discussion

Le premier essai en fioles sur deux clones de la souche auxotrophe PM semblait mettre en évidence une augmentation du rendement de production d'éthanol et une diminution du rendement de glycérol dans ces clones par rapport à la souche mère CEN.PK2-1C. La génération de souches prototrophes exprimant ou non la PEP carboxylase et la malate déshydrogénase ont permis de tester l'influence des gènes introduits sur la production d'éthanol et de glycérol sans avoir à introduire dans le milieu des composés pour compléter les auxotrophies, ce qui était susceptible d'introduire un biais dans la comparaison des souches.

La comparaison de ces deux souches prototrophes sur milieu YNB et sur un milieu minéral reconstitué, plus adapté pour la production d'éthanol (Verduyn *et al.*, 1992), a mis en évidence le fait que le milieu YNB n'est pas adapté à des essais en conditions anaérobies, ce qui se traduit par une réduction du titre et du rendement en éthanol, une augmentation du rendement de production de glycérol et une baisse importante de la biomasse produite par rapport au milieu reconstitué. Par ailleurs, les résultats des rendements d'éthanol et de glycérol obtenus sur milieu reconstitué sont opposés à ceux du premier essai qui avait été réalisé avec les souches auxotrophes sur YNB: la souche exprimant la PEP carboxylase et la malate déshydrogénase présente un rendement d'éthanol inférieur à la souche contrôle 4PL et produit plus de glycérol; cet effet a également été observé lors d'essais en bioréacteurs.

Pour la souche contrôle comme pour la souche PM-TU, le bilan de la glycolyse en termes de cofacteurs d'oxydoréduction est le même. En revanche, dans le cas de la souche PM-TU, une partie du flux de carbone de la glycolyse est détourné par l'action de la PEP carboxylase et de la malate déshydrogénase. Ainsi, bien que la malate déshydrogénase puisse remplacer partiellement la glycérol déshydrogénase pour réoxyder le NADH issu des réactions de biosynthèse, elle participe également à la dissimilation d'une partie du carbone qui aurait pu former du pyruvate et donc de l'éthanol. En effet, le malate produit par la malate déshydrogénase doit, pour pouvoir former de l'éthanol, être converti en pyruvate par action de l'enzyme malique mitochondriale. Or le passage du malate dans la mitochondrie n'implique pas forcément qu'il soit entièrement redirigé vers la production de pyruvate: il peut être utilisé pour reformer d'autres intermédiaires du cycle de Krebs utilisés par la cellule. Cet aspect peut expliquer les titres moins importants en éthanol observés pour la souche PM-TU en fioles et en bioréacteurs. De plus, comme moins d'éthanol est produit par unité de glucose consommée, le NADH issu de la glycolyse qui ne peut pas être réoxydé par la production d'éthanol du fait du manque de pyruvate peut être réoxydé soit par la malate déshydrogénase, soit par la glycérol déshydrogénase, ce qui peut expliquer les concentrations et rendements de glycérol légèrement plus élevés que nous avons observés chez la souche PM-TU par rapport à la souche 4PL.

Par ailleurs, la synthèse d'oxaloacétate à partir de PEP par la PEP carboxylase, qui ne produit pas d'ATP, crée un déséquilibre du bilan de la glycolyse, puisque la dernière étape (transformation du PEP en pyruvate) permet normalement la production d'une mole d'ATP par mole de PEP. C'est un déséquilibre partiel, puisque seule une partie du flux de carbone est détournée pour passer par la voie PEP carboxylase-malate déshydrogénase introduite. Ce manque à gagner dans la production énergétique de la glycolyse est susceptible d'avoir des effets sur le métabolisme cellulaire, peut être en favorisant la production d'ATP par la respiration lorsque c'est possible (nous avons vu qu'en fioles les conditions étaient suffisamment aérées pour permettre un métabolisme aérobie). Les effets précis de cette modification de la balance énergétique restent cependant très difficiles à évaluer.

Suite aux essais en fioles et en bioréacteurs sur le milieu reconstitué, il apparaît donc impossible de reproduire l'augmentation de rendement de production observé lors des expériences préliminaires sur les souches auxotrophes. Une piste envisageable pour favoriser l'effet transhydrogénase consiste à surexprimer l'enzyme malique dans le cytosol, de sorte à pouvoir réaliser la totalité des réactions de l'effet transhydrogénase dans le même compartiment cellulaire. De plus, les conversions  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  ont lieu majoritairement dans le cytosol, et il a été montré que la surexpression de l'enzyme malique dans le cytosol avait un effet positif sur la production de  $\text{NADP}^+$  (Moreira dos Santos *et al.*, 2004).

### 3. Conclusion

La souche préliminaire construite pour la production de malate a été caractérisée pour la production d'éthanol car elle semblait présenter une augmentation du rendement d'éthanol et une diminution du rendement de glycérol, ce qui suggérait la mise en place d'un effet transhydrogénase dû à l'expression de la malate déshydrogénase peroxysomale dans le cytosol. Les essais effectués sur la souche prototrophe sur milieu YNB et sur un milieu minéral reconstitué en fioles et en bioréacteurs, n'ont pas permis de confirmer les effets du génotype sur l'éthanol et le glycérol.

Plusieurs pistes peuvent être envisagées pour comprendre l'effet des gènes introduits et les conséquences sur l'effet transhydrogénase. D'une part, bien que l'expression des gènes ait été confirmée par PCR, l'activité des enzymes dans les cellules n'a jamais été validée: il serait intéressant d'effectuer des tests d'activité pour confirmer le fonctionnement efficace des enzymes.

La référence bibliographique rapportant la mise en place d'un effet transhydrogénase par une voie métabolique a été rapporté, mais en croissance sur xylose, et il ne semblait pas effectif en croissance sur glucose (Suga *et al.*, 2012). Cela peut être dû à la dégradation de la malate déshydrogénase cytosolique MDH2 en présence de glucose. Dans notre étude, l'expression de la malate déshydrogénase peroxysomale relocalisée dans le cytosol a mené à une diminution de la production d'éthanol dans la souche prototrophe. Cela peut-être dû au fait que le malate produit doit ensuite entrer dans la mitochondrie pour être reconverti en pyruvate; il peut alors être détourné vers la production d'autres composés au lieu de former du pyruvate, ce qui diminue la production d'éthanol. Une approche envisageable pour favoriser la réalisation de l'effet transhydrogénase consisterait donc à exprimer l'enzyme malique MAE1 relocalisée dans le cytosol afin de favoriser la reconversion du malate produit en pyruvate, sans avoir à passer par la mitochondrie. Une telle relocalisation a déjà été rapportée et montre une influence sur les cofacteurs  $\text{NADP}^+$  et  $\text{NADPH}$  (Moreira dos Santos *et al.*, 2004).

## Conclusion générale et perspectives

---

Le domaine des biotechnologies blanches a vu ces dernières années le développement des recherches sur le thème de la fixation de carbone inorganique pour la production de molécules d'intérêt, avec la perspective d'un gain de rendement de production par apport de carbone inorganique et l'idée de mettre au point des procédés plus écologiques, rejetant moins de gaz à effet de serre. C'est dans ce contexte que ce travail de thèse a été réalisé: après une étude bibliographique des mécanismes de fixation naturels du carbone inorganique, nous avons développé des stratégies d'ingénierie métabolique pour la production d'une molécule d'intérêt industriel chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Cette levure a été choisie car c'est un organisme modèle adapté aux procédés industriels et disposant de nombreux outils génétiques. L'objectif des stratégies d'ingénierie métabolique proposées était de produire un composé d'intérêt valorisable industriellement par mise en place d'une voie métabolique permettant la fixation de carbone inorganique. Après évaluation des différentes approches proposées, nous avons choisi de développer une voie de production d'acide malique reposant sur l'expression de la PEP carboxylase d'*Escherichia coli* pour l'incorporation de carbone, dans une souche de *S. cerevisiae* possédant une délétion du gène de la pyruvate kinase *pyk1*.

Le travail réalisé au cours de cette thèse a permis de construire une souche de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante surexprimant la PEP carboxylase d'*E. coli*, la malate déshydrogénase peroxysomale native relocalisée dans le cytosol et le transporteur d'acides dicarboxyliques de *Schizosaccharomyces pombe* (un tableau récapitulatif des essais et principaux résultats obtenus est disponible en annexe 5). La souche est capable de produire de l'acide malique et cette production est augmentée par l'apport de carbone inorganique dans le milieu sous forme de carbonate ou de dioxyde de carbone, ce qui suggère que la production de carbone inorganique des levures, notamment par la pyruvate décarboxylase, n'est pas suffisante pour assurer une production de malate optimale. L'augmentation de la production de malate en présence d'un apport en carbone inorganique est par ailleurs visible non seulement sur la phase de consommation du glucose, mais également lors de la consommation du glycérol et de l'éthanol après épuisement du glucose dans le milieu de culture. La vérification de l'expression des gènes introduits, la production d'acide malique augmentée par rapport à la souche mère et l'influence positive de l'apport de carbone inorganique sur cette production constituent des preuves solides, bien qu'indirectes, de l'incorporation du carbone inorganique par les cellules pour la production d'acide malique. L'incorporation de carbone inorganique dans le malate produit pourrait être démontrée de façon directe par l'utilisation de substrat marqué ( $^{13}\text{CO}_2$ ) suivi de l'analyse des molécules produites par RMN.

La stratégie d'ingénierie métabolique mise au point pour la production d'acide malique comportait initialement une délétion du gène de la pyruvate kinase *pyk1* qui visait à rediriger la totalité du flux de carbone issu de la glycolyse vers la voie de production d'acide malique hétérologue. L'obtention de souches  $\Delta pyk1$  s'est révélée extrêmement complexe: il ne nous a pas été possible de générer des souches exprimant les trois gènes de la voie de production d'acide malique qui contiennent la délétion et soient capables de croître sur glucose ou sur éthanol. Nous avons obtenu un clone exprimant les gènes *ecppc*, *mdh3c*, *spmae* et *mae1* dans un contexte  $\Delta pyk1$  (le clone 36), pour lequel l'expression des différents transgènes a été confirmée par RT-qPCR. Cependant, ce clone n'a pas pu être caractérisé plus avant car il présentait une croissance extrêmement faible sur milieu YNB-éthanol et pas de croissance sur milieu YNB-glucose. Toutefois, les autres souches  $\Delta pyk1$  qui ont pu être générées montraient une croissance faible sur glucose, alors que la délétion de *pyk1* dans un contexte sauvage empêche la croissance sur glucose (Sprague, 1977), ce qui prouve une complémentarité partielle de la

délétion par les gènes introduits. De plus, ces souches n'exprimaient pas le gène du transporteur *spmae* et ont produit lors des essais en fioles un composé que nous n'avons pas pu identifier, mais uniquement en présence de carbonate, ce qui suggère que notre stratégie fonctionne. Par ailleurs, nous avons obtenu des mutants spontanés, présentant vraisemblablement une expression modifiée de l'isoforme *pyk2* ; ces mutants ont été obtenus uniquement en l'absence de carbonate, ce qui suggère que notre stratégie est susceptible de fonctionner (si nous arrivons à exprimer un transporteur pour exporter le malate produit).

Les difficultés rencontrées dans la construction de ces souches ont mis en lumière une incompatibilité entre l'expression du transporteur et la délétion de la pyruvate kinase. Cette incompatibilité semble trouver son origine dans la sélection des transformants sur un milieu contenant de l'éthanol comme source de carbone, puisque la métabolisation de l'éthanol passe par la formation de malate qui est ensuite susceptible d'être exporté par le transporteur. L'ajout du gène tronqué de l'enzyme malique, qui permet sa relocalisation dans le cytosol et était prévu pour pallier les effets négatifs de la délétion de la pyruvate kinase, n'a pas été suffisant pour nous permettre d'obtenir des souches  $\Delta pyk1$  viables et exprimant également le transporteur. Des essais de sélection des transformants sur des milieux alternatifs (glucose, acétate, glucose additionné de pyruvate) n'ont pas abouti mais pourraient permettre l'obtention de clones. Il est possible que de nouveaux essais de transformations permettent l'obtention d'une souche possédant le génotype désiré; l'intégration des gènes d'intérêt dans le génome, plutôt que l'introduction de plasmides 2 $\mu$ , pourrait permettre de s'affranchir de l'instabilité liée à la présence de plasmides.

Les difficultés que nous avons rencontrées pour obtenir des souches  $\Delta pyk1$  sont en partie liées au fait que les gènes que nous avons introduits doivent être capables de compléter la délétion de la pyruvate kinase, qui est une enzyme essentielle. L'expression de la PEP carboxylase, qui permet de générer l'oxaloacétate à partir de PEP, mais sans former d'ATP, induit un déséquilibre énergétique important dans le bilan de la glycolyse puisqu'elle supprime la génération d'ATP qui a normalement lieu lors de la transformation du PEP en pyruvate. Une piste, qui a été envisagée lors de la mise au point de la stratégie d'ingénierie métabolique pour pallier un problème énergétique lié à l'expression de la PEP carboxylase, réside dans le remplacement de cette dernière par la PEP carboxykinase; cette alternative n'a pu être mise en œuvre par manque de temps. La PEP carboxykinase est une enzyme qui catalyse la carboxylation du PEP en oxaloacétate avec une co-génération d'ATP. La principale limitation de cette enzyme est qu'elle est capable de catalyser cette réaction dans les deux sens, et que le sens physiologiquement privilégié est celui de la décarboxylation de l'oxaloacétate pour former du pyruvate lors de la néoglucogénèse. Cette approche reste malgré tout réaliste puisque des travaux utilisant la PEP carboxykinase comme seule enzyme anaplerotique (donc dans le sens de la réaction de carboxylation) ont été réalisés récemment chez *Saccharomyces cerevisiae* (Zelle *et al.*, 2010); ils ont cependant nécessité une phase d'évolution dirigée pour obtenir une souche capable de croître sur glucose. Il existe également d'autres travaux utilisant des PEP-carboxykinases dans le sens de la carboxylation pour la production d'acide succinique en modèle champignon filamenteux ou levure (Jansen *et al.*, 2012; Verwaal *et al.*, 2008).

La délétion de la pyruvate kinase semblait être une étape particulièrement intéressante dans notre stratégie initiale puisqu'elle permet de rediriger le flux de carbone vers la voie de production de malate, avec un rendement maximal théorique de deux moles de malate produites par mole de glucose consommée et la fixation de deux moles de dioxyde de carbone. Une alternative que nous avons testée consiste en l'expression d'un antisens du gène cible qui a pour but de réduire l'expression en créant des ARN double-brins empêchant la traduction de l'ARN messager en protéine. Ce système, qui a déjà été testé chez *S. cerevisiae* (Bonoli *et al.*, 2006; Scalcinati *et al.*, 2012), permet *a priori* d'obtenir une

diminution de 50% de l'expression au maximum. La souche exprimant un antisens du gène *pyk1* que nous avons générée ne semblait pas donner de meilleurs résultats en termes de production de malate que la souche n'exprimant pas l'antisens. La quantification de l'expression de l'antisens par qPCR étant impossible pour des raisons techniques, nous n'avons pas pu vérifier son niveau d'expression ni évaluer la réduction d'expression de PYK1. La seule méthode permettant de déterminer l'efficacité de l'expression de l'antisens serait un test d'activité enzymatique de la pyruvate kinase. Des pistes alternatives visant à réduire l'expression de la pyruvate kinase consisteraient à effectuer des mutations dans le promoteur ou le codon d'initiation du gène.

Un travail de mise au point serait également intéressant pour optimiser l'expression des gènes. Le système d'expression dans des plasmides 2 $\mu$  présente l'avantage théorique d'un nombre de copies de gènes plus important par rapport à une mono-intégration dans le génome, ce qui signifie un niveau d'expression potentiellement plus important, mais des travaux récents (Chen *et al.*, 2012; Karim *et al.*, 2013; Peng *et al.*, 2015) montrent que le gène de sélection présent sur le plasmide, le promoteur et la longueur du gène d'intérêt peuvent impacter de façon importante le niveau d'expression. Une alternative réside par ailleurs dans le passage à un système d'intégration des gènes d'intérêt dans le génome. Ce système présente l'avantage de pouvoir utiliser un milieu de culture complexe, contrairement à un système d'expression en plasmides avec complémentation des auxotrophies, où les acides aminés servant à la sélection ne doivent pas être présents dans le milieu afin de ne pas risquer de perdre les plasmides introduits.

Un autre aspect développé dans ce travail de thèse s'est basé sur l'évaluation pour la production d'éthanol de clones d'une souche intermédiaire obtenue initialement pour la stratégie de production de malate. Les premiers résultats obtenus semblaient indiquer une amélioration du rendement d'éthanol associée à une diminution de la production de glycérol, vraisemblablement dues à la mise en place d'un effet transhydrogénase par expression de la malate déshydrogénase. Le milieu minimal YNB utilisé pour les premiers essais semblait peu adapté à des conditions de culture anaérobies; nous avons donc poursuivi l'évaluation avec des souches prototrophes exprimant la PEP carboxylase et la malate déshydrogénase sur un milieu minéral reconstitué, mieux adapté à la production d'éthanol en anaérobiose. Ces essais en fioles, puis en bioréacteurs, n'ont pas permis de confirmer l'amélioration du rendement de production d'éthanol. L'effet transhydrogénase par mise en place d'une voie métabolique et non par expression d'une enzyme transhydrogénase a déjà été rapporté en croissance sur xylose, mais ne semblait pas effectif en croissance sur glucose (Suga *et al.*, 2012). En effet, sur glucose, la malate déshydrogénase native, encodée par le gène *mdh2*, est dégradée. Dans notre cas, la surexpression de la malate déshydrogénase peroxysomale dans le cytosol a conduit à l'effet inverse à celui recherché et nous avons constaté une augmentation de la production de glycérol dans le milieu. Il est possible que cela soit dû au détournement du flux de carbone vers la production de malate, qui permet de réoxyder du NADH par action de la malate déshydrogénase mais provoque une déviation du flux de carbone vers la mitochondrie pour reconvertir le malate en pyruvate, ce qui entraîne probablement une perte de carbone et donc une baisse de la production d'éthanol. Une perspective envisageable consisterait à surexprimer l'enzyme malique mitochondriale dans le cytosol, afin de favoriser l'effet transhydrogénase; la relocalisation de l'enzyme malique dans le cytosol a en effet déjà été testée et montre une influence sur les cofacteurs NADP<sup>+</sup> et NADPH (Moreira dos Santos *et al.*, 2004).

Ce travail de thèse ouvre donc la voie pour la production de malate chez *Saccharomyces cerevisiae* par expression d'une carboxylase. Les résultats obtenus montrent une augmentation de la production de malate par rapport à la souche sauvage et un effet de l'apport de carbone inorganique sur cette production. Une des principales perspectives dans la continuité de ces résultats est la caractérisation du

clone 36, qui d'après les résultats de RT-qPCR exprime effectivement les différents gènes d'intérêt dans un contexte de délétion du gène *pyk1*, mais qui présente des problèmes de croissance. Il serait également intéressant de remplacer la PEP carboxylase par la PEP carboxykinase, qui permettrait de rééquilibrer le bilan énergétique dans un contexte  $\Delta$ *pyk1*. L'intégration des plasmides portant les gènes d'intérêt dans le génome constitue une autre piste intéressante, puisque l'intégration permet de s'affranchir des problèmes de stabilité liés à l'utilisation de plasmides.

Durant la réalisation de cette thèse, des travaux ont été publiés dans le domaine de la production de molécules d'intérêt avec incorporation de carbone inorganique, comme par exemple la production de malate par surexpression notamment de la pyruvate carboxylase chez *Aspergillus oryzae* (Brown *et al.*, 2014, 2013). Une stratégie d'expression d'une RubisCO de cyanobactérie chez *Saccharomyces cerevisiae* dans un contexte de production d'éthanol 2G pour recycler le CO<sub>2</sub> produit par la décarboxylation du pyruvate a également fait l'objet d'une publication et d'un brevet (Guadalupe-Medina *et al.*, 2013; Van Maris *et al.*, 2014). Un projet similaire mettant en jeu l'expression d'une RubisCO bactérienne chez *S. cerevisiae* est actuellement en cours et a déjà fait l'objet d'un dépôt de brevet (Pompon *et al.*, 2015). L'utilisation des réactions de fixation de carbone inorganique pour la production de composés d'intérêt chez des organismes hétérotrophes est donc un domaine en plein essor qui va probablement continuer à se développer dans le futur.

# Références bibliographiques

---

Aguilera, J., Petit, T., Dewinde, J., and Pronk, J. (2005). Physiological and genome-wide transcriptional responses of to high carbon dioxide concentrations. *FEMS Yeast Res.* *5*, 579–593.

Alber, B., Olinger, M., Rieder, A., Kockelkorn, D., Jobst, B., Hugler, M., and Fuchs, G. (2006). Malonyl-Coenzyme A Reductase in the Modified 3-Hydroxypropionate Cycle for Autotrophic Carbon Fixation in Archaeal Metallosphaera and Sulfolobus spp. *J. Bacteriol.* *188*, 8551–8559.

Albers, E., Larsson, C., Lidén, G., Niklasson, C., and Gustafsson, L. (1996). Influence of the nitrogen source on *Saccharomyces cerevisiae* anaerobic growth and product formation. *Appl. Environ. Microbiol.* *62*, 3187–3195.

Alberti, S., Gitler, A.D., and Lindquist, S. (2007). A suite of Gateway cloning vectors for high-throughput genetic analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* *24*, 913–919.

Amoroso, G., Morell-Avrahov, L., Müller, D., Klug, K., and Sültemeyer, D. (2005). The gene NCE103 (YNL036w) from *Saccharomyces cerevisiae* encodes a functional carbonic anhydrase and its transcription is regulated by the concentration of inorganic carbon in the medium. *Mol. Microbiol.* *56*, 549–558.

Anderlund, M., Nissen, T.L., Nielsen, J., Villadsen, J., Rydström, J., Hahn-Hägerdal, B., and Kielland-Brandt, M.C. (1999). Expression of the *Escherichia coli* *pntA* and *pntB* Genes, Encoding Nicotinamide Nucleotide Transhydrogenase, in *Saccharomyces cerevisiae* and Its Effect on Product Formation during Anaerobic Glucose Fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* *65*, 2333–2340.

Ansell, R., Granath, K., Hohmann, S., Thevelein, J.M., and Adler, L. (1997). The two isoenzymes for yeast NAD<sup>+</sup>-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by GPD1 and GPD2 have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. *EMBO J.* *16*, 2179–2187.

Anthony, C. (1982). *The biochemistry of methylotrophs* (London; New York: Academic Press).

Badger, M.R. (2003). CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. *J. Exp. Bot.* *54*, 609–622.

Badger, M.R., and Bek, E.J. (2007). Multiple Rubisco forms in proteobacteria: their functional significance in relation to CO<sub>2</sub> acquisition by the CBB cycle. *J. Exp. Bot.* *59*, 1525–1541.

Bar-Even, A., Noor, E., Lewis, N.E., and Milo, R. (2010). Design and analysis of synthetic carbon fixation pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 8889–8894.

Basen, M., Sun, J., and Adams, M.W. (2012). Engineering a hyperthermophilic archaeon for temperature-dependent product formation. *MBio* *3*, e00053–12.

- Bassham, J.A., Benson, A.A., and Calvin, M. (1950). The path of carbon in photosynthesis. *J. Biol. Chem.* *185*, 781–787.
- Basso, T.O., de Kok, S., Dario, M., do Espirito-Santo, J.C.A., Müller, G., Schlögl, P.S., Silva, C.P., Tonso, A., Daran, J.-M., Gombert, A.K., et al. (2011). Engineering topology and kinetics of sucrose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* for improved ethanol yield. *Metab. Eng.* *13*, 694–703.
- Battat, E., Peleg, Y., Bercovitz, A., Rokem, J.S., and Goldberg, I. (1991). Optimization of L-malic acid production by *Aspergillus flavus* in a stirred fermentor. *Biotechnol. Bioeng.* *37*, 1108–1116.
- Berg, I.A. (2011). Ecological Aspects of the Distribution of Different Autotrophic CO<sub>2</sub> Fixation Pathways. *Appl. Environ. Microbiol.* *77*, 1925–1936.
- Berg, I.A., Kockelkorn, D., Buckel, W., and Fuchs, G. (2007). A 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate autotrophic carbon dioxide assimilation pathway in Archaea. *Science* *318*, 1782–1786.
- Berg, I.A., Kockelkorn, D., Ramos-Vera, W.H., Say, R.F., Zarzycki, J., Hügler, M., Alber, B.E., and Fuchs, G. (2010). Autotrophic carbon fixation in archaea. *Nat. Rev. Microbiol.* *8*, 447–460.
- Boles, E., de Jong-Gubbels, P., and Pronk, J.T. (1998). Identification and Characterization of MAE1, the *Saccharomyces cerevisiae* Structural Gene Encoding Mitochondrial Malic Enzyme. *J. Bacteriol.* *180*, 2875–2882.
- Bonoli, M., Graziola, M., Poggi, V., and Hochkoepler, A. (2006). RNA complementary to the 5' UTR of mRNA triggers effective silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *339*, 1224–1231.
- Borodina, I., Kildegaard, K.R., Jensen, N.B., Blicher, T.H., Maury, J., Sherstyk, S., Schneider, K., Lamosa, P., Herrgård, M.J., Rosenstand, I., et al. (2015). Establishing a synthetic pathway for high-level production of 3-hydroxypropionic acid in *Saccharomyces cerevisiae* via  $\beta$ -alanine. *Metab. Eng.* *27*, 57–64.
- Bro, C., Regenber, B., Forster, J., and Nielsen, J. (2006). In silico aided metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved bioethanol production. *Metab. Eng.* *8*, 102–111.
- Brown, S., Luttringer, S., Yaver, D., and Berry, A. (2014). Methods for improving malic acid production in filamentous fungi.
- Brown, S.H., Bashkirova, L., Berka, R., Chandler, T., Doty, T., McCall, K., McCulloch, M., McFarland, S., Thompson, S., Yaver, D., et al. (2013). Metabolic engineering of *Aspergillus oryzae* NRRL 3488 for increased production of L-malic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *97*, 8903–8912.
- Brunk, E., Neri, M., Tavernelli, I., Hatzimanikatis, V., and Rothlisberger, U. (2011). Integrating computational methods to retrofit enzymes to synthetic pathways. *Biotechnol. Bioeng.* *109*, 572–582.

- Burk, M.J., and Osterhout, R.E. (2010). Methods and organisms for production of 3-hydroxypropionic acid.
- Camarasa, C., Bidard, F., Bony, M., Barre, P., and Dequin, S. (2001). Characterization of Schizosaccharomyces pombe Malate Permease by Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* *67*, 4144–4151.
- Cao, Y., Cao, Y., and Lin, X. (2010). Metabolically engineered *Escherichia coli* for biotechnological production of four-carbon 1,4-dicarboxylic acids. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* *38*, 649–656.
- Carter, Z., and Delneri, D. (2010). New generation of loxP-mutated deletion cassettes for the genetic manipulation of yeast natural isolates. *Yeast* *27*, 765–775.
- Caspeta, L., Buijs, N.A.A., and Nielsen, J. (2013). The role of biofuels in the future energy supply. *Energy Environ. Sci.* *6*, 1077.
- Chatterjee, R., Millard, C.S., Champion, K., Clark, D.P., and Donnelly, M.I. (2001). Mutation of the *ptsG* Gene Results in Increased Production of Succinate in Fermentation of Glucose by *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* *67*, 148–154.
- Chen, Y., and Nielsen, J. (2013). Advances in metabolic pathway and strain engineering paving the way for sustainable production of chemical building blocks. *Curr. Opin. Biotechnol.* *24*, 965–972.
- Chen, X., Xu, G., Xu, N., Zou, W., Zhu, P., Liu, L., and Chen, J. (2013). Metabolic engineering of *Torulopsis glabrata* for malate production. *Metab. Eng.* *19*, 10–16.
- Chen, Y., Partow, S., Scalcinati, G., Siewers, V., and Nielsen, J. (2012). Enhancing the copy number of episomal plasmids in *Saccharomyces cerevisiae* for improved protein production. *FEMS Yeast Res.* *12*, 598–607.
- Chen, Y., Bao, J., Kim, I.-K., Siewers, V., and Nielsen, J. (2014). Coupled incremental precursor and co-factor supply improves 3-hydroxypropionic acid production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab. Eng.* *22*, 104–109.
- Cheng, K.-K., Zhao, X.-B., Zeng, J., and Zhang, J.-A. (2012). Biotechnological production of succinic acid: current state and perspectives. *Biofuels Bioprod. Biorefining* *6*, 302–318.
- Chi, Z., Wang, Z.-P., Wang, G.-Y., Khan, I., and Chi, Z.-M. (2014). Microbial biosynthesis and secretion of L-malic acid and its applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* 1–9.
- Chistoserdova, L., Kalyuzhnaya, M.G., and Lidstrom, M.E. (2009). The Expanding World of Methylotrophic Metabolism. *Annu. Rev. Microbiol.* *63*, 477–499.
- Cho, A., Yun, H., Park, J.H., Lee, S.Y., and Park, S. (2010). Prediction of novel synthetic pathways for the production of desired chemicals. *BMC Syst. Biol.* *4*, 35.
- Dai, Z., Lasure, L., Baker, S., and Magnuson, J. (2008). Methods and microorganisms for forming fermentation products and fixing carbon dioxide.

- Daniel M. Becker, and Victoria Lundblad (1993). Manipulation of yeast genes. In *Current Protocols in Molecular Biology*, pp. 13.7.1–13.7.10.
- David Moore, and Dennis Dowhan (2002). Manipulation of DNA. In *Current Protocols in Molecular Biology*, pp. 2.1.1–2.1.10.
- van Dijken, J.P., and Scheffers, W.A. (1986). Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. *FEMS Microbiol Rev* 32, 199–224.
- Ducat, D.C., and Silver, P.A. (2012). Improving carbon fixation pathways. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 16, 337–344.
- Dürre, P., and Eikmanns, B.J. (2015). C1-carbon sources for chemical and fuel production by microbial gas fermentation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 35, 63–72.
- Entian, K.-D., and Kötter, P. (2007). 25 Yeast Genetic Strain and Plasmid Collections. In *Methods in Microbiology*, (Elsevier), pp. 629–666.
- Erb, T.J. (2011). Carboxylases in Natural and Synthetic Microbial Pathways. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 8466–8477.
- Erb, T.J., Berg, I.A., Brecht, V., Müller, M., Fuchs, G., and Alber, B.E. (2007). Synthesis of C5-dicarboxylic acids from C2-units involving crotonyl-CoA carboxylase/reductase: the ethylmalonyl-CoA pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 10631–10636.
- Evans, M.C., Buchanan, B.B., and Arnon, D.I. (1966). A new ferredoxin-dependent carbon reduction cycle in a photosynthetic bacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 55, 928.
- Finn, M.W., and Tabita, F.R. (2003). Synthesis of Catalytically Active Form III Ribulose 1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase in Archaea. *J. Bacteriol.* 185, 3049–3059.
- Flikweert, M.T., van der Zanden, L., Janssen, W.M., Steensma, H.Y., van Dijken, J.P., and Pronk, J.T. (1996). Pyruvate decarboxylase: an indispensable enzyme for growth of *Saccharomyces cerevisiae* on glucose. *Yeast* 12 3 247-257.
- Flikweert, M.T., Van Dijken, J.P., and Pronk, J.T. (1997). Metabolic responses of pyruvate decarboxylase-negative *Saccharomyces cerevisiae* to glucose excess. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3399–3404.
- Flikweert, M.T., de Swaaf, M., van Dijken, J.P., and Pronk, J.T. (1999). Growth requirements of pyruvate-decarboxylase-negative *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 174, 73–79.
- Flores, C.-L., and Gancedo, C. (1997). Expression of PEP carboxylase from *Escherichia coli* complements the phenotypic effects of pyruvate carboxylase mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 412, 531–534.
- Futcher, A.B., and Cox, B.S. (1984). Copy number and the stability of 2-micron circle-based artificial plasmids of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 157, 283–290.
- Gietz, R.D., and Woods, R.A. (2001). Genetic transformation of yeast. *Biotechniques* 30, 816–831.

- Glassner, D.A., and Datta, R. (1992). Process for the production and purification of succinic acid.
- Gokarn, R.R., Eiteman, M.A., and Altman, E. (1998). Expression of Pyruvate Carboxylase Enhances Succinate Production in *Escherichia coli* without Affecting Glucose Uptake. *Biotechnol. Lett.* *20*, 795–798.
- Gokarn, R.R., Selifonova, O.V., Jessen, H., Gort, S.J., Selmer, T., and Buckel, W. (2003). 3-hydroxypropionic acid and other organic compounds.
- Goldberg, I., Rokem, J.S., and Pines, O. (2006). Organic acids: old metabolites, new themes. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* *81*, 1601–1611.
- Gong, F., Liu, G., Zhai, X., Zhou, J., Cai, Z., and Li, Y. (2015). Quantitative analysis of an engineered CO<sub>2</sub>-fixing *Escherichia coli* reveals great potential of heterotrophic CO<sub>2</sub> fixation. *Biotechnol. Biofuels* *8*, 86.
- Grobler, J., Bauer, F., Subden, R.E., and Van Vuuren, H.J. (1995). The *mae1* gene of *Schizosaccharomyces pombe* encodes a permease for malate and other C<sub>4</sub> dicarboxylic acids. *Yeast Chichester Engl.* *11*, 1485–1491.
- Guadalupe-Medina, V., Wisselink, H.W., Luttik, M.A., de Hulster, E., Daran, J.-M., Pronk, J.T., and van Maris, A.J. (2013). Carbon dioxide fixation by Calvin-Cycle enzymes improves ethanol yield in yeast. *Biotechnol. Biofuels* *6*, 125.
- Guettler, M.V., Jain, M.K., and Rumler, D. (1996). Method for making succinic acid, bacterial variants for use in the process, and methods for obtaining variants.
- Güldener, U., Heck, S., Fiedler, T., Beinhauer, J., and Hegemann, J.H. (1996). A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res.* *24*, 2519–2524.
- Guo, Z., Zhang, L., Ding, Z., Wang, Z.-X., and Shi, G.-Y. (2011). Improving ethanol productivity by modification of glycolytic redox factor generation in glycerol-3-phosphate dehydrogenase mutants of an industrial ethanol yeast. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* *38*, 935–943.
- Gutknecht, J., Bisson, M.A., and Tosteson, F.C. (1977). Diffusion of carbon dioxide through lipid bilayer membranes. Effects of carbonic anhydrase, bicarbonate, and unstirred layers. *J. Gen. Physiol.* *69*, 779.
- Hallenbeck, P.L., Lerchen, R., Hessler, P., and Kaplan, S. (1990). Roles of *CfxA*, *CfxB*, and external electron acceptors in regulation of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase expression in *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* *172*, 1736–1748.
- Henry, C.S., Broadbelt, L.J., and Hatzimanikatis, V. (2010). Discovery and analysis of novel metabolic pathways for the biosynthesis of industrial chemicals: 3-hydroxypropanoate. *Biotechnol. Bioeng.*
- Henstra, A.M., Sipma, J., Rinzema, A., and Stams, A.J. (2007). Microbiology of synthesis gas fermentation for biofuel production. *Curr. Opin. Biotechnol.* *18*, 200–206.

- Heux, S., Cachon, R., and Dequin, S. (2006). Cofactor engineering in *Saccharomyces cerevisiae*: Expression of a H<sub>2</sub>O-forming NADH oxidase and impact on redox metabolism. *Metab. Eng.* 8, 303–314.
- Hohmann, S. (1991). Characterization of PDC6, a third structural gene for pyruvate decarboxylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 173, 7963–7969.
- Holo, H. (1989). *Chloroflexus aurantiacus* secretes 3-hydroxypropionate, a possible intermediate in the assimilation of CO<sub>2</sub> and acetate. *Arch. Microbiol.* 151, 252–256.
- Hong, K.-K., and Nielsen, J. (2012). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*: a key cell factory platform for future biorefineries. *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 2671–2690.
- Hou, J., Lages, N.F., Oldiges, M., and Vemuri, G.N. (2009a). Metabolic impact of redox cofactor perturbations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab. Eng.* 11, 253–261.
- Hou, J., Vemuri, G.N., Bao, X., and Olsson, L. (2009b). Impact of overexpressing NADH kinase on glucose and xylose metabolism in recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82, 909–919.
- Huber, H., Gallenberger, M., Jahn, U., Eylert, E., Berg, I.A., Kockelkorn, D., Eisenreich, W., and Fuchs, G. (2008). A dicarboxylate/4-hydroxybutyrate autotrophic carbon assimilation cycle in the hyperthermophilic Archaeum *Ignicoccus hospitalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 7851–7856.
- Hubmann, G., Guillouet, S., and Nevoigt, E. (2011). *Gpd1* and *Gpd2* Fine-Tuning for Sustainable Reduction of Glycerol Formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 5857–5867.
- Hügler, M., and Sievert, S.M. (2011). Beyond the Calvin Cycle: Autotrophic Carbon Fixation in the Ocean. *Annu. Rev. Mar. Sci.* 3, 261–289.
- Hugler, M., Menendez, C., Schagger, H., and Fuchs, G. (2002). Malonyl-Coenzyme A Reductase from *Chloroflexus aurantiacus*, a Key Enzyme of the 3-Hydroxypropionate Cycle for Autotrophic CO<sub>2</sub> Fixation. *J. Bacteriol.* 184, 2404–2410.
- Hügler, M., Huber, H., Stetter, K.O., and Fuchs, G. (2003a). Autotrophic CO<sub>2</sub> fixation pathways in archaea (Crenarchaeota). *Arch. Microbiol.* 179, 160–173.
- Hügler, M., Krieger, R.S., Jahn, M., and Fuchs, G. (2003b). Characterization of acetyl-CoA/propionyl-CoA carboxylase in *Metallosphaera sedula*: Carboxylating enzyme in the 3-hydroxypropionate cycle for autotrophic carbon fixation. *Eur. J. Biochem.* 270, 736–744.
- Hügler, M., Wirsen, C.O., Fuchs, G., Taylor, C.D., and Sievert, S.M. (2005). Evidence for Autotrophic CO<sub>2</sub> Fixation via the Reductive Tricarboxylic Acid Cycle by Members of the Subdivision of Proteobacteria. *J. Bacteriol.* 187, 3020–3027.
- Jansen, M.L.A., DeGraaf, M., and Verwaal, R. (2012). US 2012/0040422 A1.
- Jantama, K., Haupt, M.J., Svoronos, S.A., Zhang, X., Moore, J.C., Shanmugam, K.T., and Ingram, L.O. (2008a). Combining metabolic engineering and metabolic evolution to develop

non recombinant strains of *Escherichia coli* that produce succinate and malate. *Biotechnol. Bioeng.* *99*, 1140–1153.

Jantama, K., Zhang, X., Moore, J.C., Shanmugam, K.T., Svoronos, S.A., and Ingram, L.O. (2008b). Eliminating side products and increasing succinate yields in engineered strains of *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* *101*, 881–893.

Jennings, M.L., Howren, T.R., Cui, J., Winters, M., and Hannigan, R. (2007). Transport and regulatory characteristics of the yeast bicarbonate transporter homolog Bor1p. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* *293*, C468–C476.

Jitrapakdee, S., Maurice, M.S., Rayment, I., Cleland, W.W., Wallace, J.C., and Attwood, P.V. (2008). Structure, Mechanism and Regulation of Pyruvate Carboxylase. *Biochem. J.* *413*, 369–387.

Kang, Z., Gao, C., Wang, Q., Liu, H., and Qi, Q. (2010). A novel strategy for succinate and polyhydroxybutyrate co-production in *Escherichia coli*. *Bioresour. Technol.* *101*, 7675–7678.

Karim, A.S., Curran, K.A., and Alper, H.S. (2013). Characterization of plasmid burden and copy number in *Saccharomyces cerevisiae* for optimization of metabolic engineering applications. *FEMS Yeast Res.* *13*, 107–116.

Keller, M.W., Schut, G.J., Lipscomb, G.L., Menon, A.L., Iwuchukwu, I.J., Leuko, T.T., Thorgersen, M.P., Nixon, W.J., Hawkins, A.S., Kelly, R.M., et al. (2013). Exploiting microbial hyperthermophilicity to produce an industrial chemical, using hydrogen and carbon dioxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 5840–5845.

Khan, I., Nazir, K., Wang, Z.-P., Liu, G.-L., and Chi, Z.-M. (2014). Calcium malate overproduction by *Penicillium viticola* 152 using the medium containing corn steep liquor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *98*, 1539–1546.

Knuf, C., Nookaew, I., Brown, S.H., McCulloch, M., Berry, A., and Nielsen, J. (2013). Investigation of Malic Acid Production in *Aspergillus oryzae* under Nitrogen Starvation Conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* *79*, 6050–6058.

Knuf, C., Nookaew, I., Remmers, I., Khoomrung, S., Brown, S., Berry, A., and Nielsen, J. (2014). Physiological characterization of the high malic acid-producing *Aspergillus oryzae* strain 2103a-68. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *98*, 3517–3527.

Kornberg, H.L. (1965). Anaplerotic sequences in microbial metabolism. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* *4*, 558–565.

KORNBERG, H.L., and KREBS, H.A. (1957). Synthesis of cell constituents from C2-units by a modified tricarboxylic acid cycle. *Nature* *179*, 988–991.

Kumar, V., Ashok, S., and Park, S. (2013). Recent advances in biological production of 3-hydroxypropionic acid. *Biotechnol. Adv.* *31*, 945–961.

Laguna, R., Tabita, F.R., and Alber, B.E. (2011). Acetate-dependent photoheterotrophic growth and the differential requirement for the Calvin-Benson-Bassham reductive pentose phosphate cycle in *Rhodobacter sphaeroides* and *Rhodospseudomonas palustris*. *Arch. Microbiol.* *193*, 151–154.

- Latif, H., Zeidan, A.A., Nielsen, A.T., and Zengler, K. (2014). Trash to treasure: production of biofuels and commodity chemicals via syngas fermenting microorganisms. *Curr. Opin. Biotechnol.* *27*, 79–87.
- Li, Y.-H., Ou-Yang, F.-Y., Yang, C.-H., and Li, S.-Y. (2015). The coupling of glycolysis and the Rubisco-based pathway through the non-oxidative pentose phosphate pathway to achieve low carbon dioxide emission fermentation. *Bioresour. Technol.* *187*, 189–197.
- Lipscomb, G.L., Stirrett, K., Schut, G.J., Yang, F., Jenney, F.E., Scott, R.A., Adams, M.W.W., and Westpheling, J. (2011). Natural Competence in the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus* Facilitates Genetic Manipulation: Construction of Markerless Deletions of Genes Encoding the Two Cytoplasmic Hydrogenases. *Appl. Environ. Microbiol.* *77*, 2232–2238.
- Litsanov, B., Brocker, M., and Bott, M. (2012). Toward Homosuccinate Fermentation: Metabolic Engineering of *Corynebacterium glutamicum* for Anaerobic Production of Succinate from Glucose and Formate. *Appl. Environ. Microbiol.* *78*, 3325–3337.
- Liu, D., Coloe, S., Baird, R., and Pedersen, J. (2000). Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. *J. Clin. Microbiol.* *38*, 471–471.
- Lynch, M.D. (2011). Compositions and methods for 3-hydroxypropionate bio-production from biomass.
- Van Maris, A.J.A., Luttik, M.A.H., Winkler, A.A., van Dijken, J.P., and Pronk, J.T. (2003). Overproduction of Threonine Aldolase Circumvents the Biosynthetic Role of Pyruvate Decarboxylase in Glucose-Limited Chemostat Cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* *69*, 2094–2099.
- Van Maris, A.J.A., Geertman, J.-M.A., Vermeulen, A., Groothuizen, M.K., Winkler, A.A., Piper, M.D.W., van Dijken, J.P., and Pronk, J.T. (2004). Directed Evolution of Pyruvate Decarboxylase-Negative *Saccharomyces cerevisiae*, Yielding a C2-Independent, Glucose-Tolerant, and Pyruvate-Hyperproducing Yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* *70*, 159–166.
- Mata, T.M., Martins, A.A., and Caetano, N.S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* *14*, 217–232.
- McKinlay, J.B., and Harwood, C.S. (2010). Carbon dioxide fixation as a central redox cofactor recycling mechanism in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 11669–11675.
- Medina, V.G., Almering, M.J.H., van Maris, A.J.A., and Pronk, J.T. (2010). Elimination of Glycerol Production in Anaerobic Cultures of a *Saccharomyces cerevisiae* Strain Engineered To Use Acetic Acid as an Electron Acceptor. *Appl. Environ. Microbiol.* *76*, 190–195.
- Millard, C.S., Chao, Y.P., Liao, J.C., and Donnelly, M.I. (1996). Enhanced production of succinic acid by overexpression of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* *62*, 1808–1810.
- Minard, K.I., and McAlister-Henn, L. (1992). Glucose-induced degradation of the MDH2 isozyme of malate dehydrogenase in yeast. *J. Biol. Chem.* *267*, 17458–17464.

- Moon, S.Y., Hong, S.H., Kim, T.Y., and Lee, S.Y. (2008). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of malic acid. *Biochem. Eng. J.* *40*, 312–320.
- Moreira dos Santos, M., Raghevendran, V., Kötter, P., Olsson, L., and Nielsen, J. (2004). Manipulation of malic enzyme in *Saccharomyces cerevisiae* for increasing NADPH production capacity aerobically in different cellular compartments. *Metab. Eng.* *6*, 352–363.
- Mu, L., and Wen, J. (2013). Engineered *Bacillus subtilis* 168 produces l-malate by heterologous biosynthesis pathway construction and lactate dehydrogenase deletion. *World J. Microbiol. Biotechnol.* *29*, 33–41.
- Munasinghe, P.C., and Khanal, S.K. (2010). Biomass-derived syngas fermentation into biofuels: Opportunities and challenges. *Bioresour. Technol.* *101*, 5013–5022.
- Nakamura, C.E., and Whited, G.M. (2003). Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol. *Curr. Opin. Biotechnol.* *14*, 454–459.
- Nielsen, J., Larsson, C., van Maris, A., and Pronk, J. (2013). Metabolic engineering of yeast for production of fuels and chemicals. *Curr. Opin. Biotechnol.* *24*, 398–404.
- Nielsen, J., Fussenegger, M., Keasling, J., Lee, S.Y., Liao, J.C., Prather, K., and Palsson, B. (2014). Engineering synergy in biotechnology. *Nat. Chem. Biol.* *10*, 319–322.
- Nissen, T.L., Hamann, C.W., Kielland-Brandt, M.C., Nielsen, J., and Villadsen, J. (2000a). Anaerobic and aerobic batch cultivations of *Saccharomyces cerevisiae* mutants impaired in glycerol synthesis. *Yeast* *16*, 463–474.
- Nissen, T.L., Kielland-Brandt, M.C., Nielsen, J., and Villadsen, J. (2000b). Optimization of Ethanol Production in *Saccharomyces cerevisiae* by Metabolic Engineering of the Ammonium Assimilation. *Metab. Eng.* *2*, 69–77.
- Nissen, T.L., Anderlund, M., Nielsen, J., Villadsen, J., and Kielland-Brandt, M.C. (2001). Expression of a cytoplasmic transhydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae* results in formation of 2-oxoglutarate due to depletion of the NADPH pool. *Yeast* *18*, 19–32.
- Nobel, P.S. (1991). Achievable productivities of certain CAM plants: basis for high values compared with C3 and C4 plants. *New Phytol.* *119*, 183–205.
- Okino, S., Inui, M., and Yukawa, H. (2005). Production of organic acids by *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *68*, 475–480.
- Okino, S., Noburyu, R., Suda, M., Jojima, T., Inui, M., and Yukawa, H. (2008). An efficient succinic acid production process in a metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *81*, 459–464.
- O’Leary, M.H. (1982). Phosphoenolpyruvate carboxylase: an enzymologist’s view. *Annu. Rev. Plant Physiol.* *33*, 297–315.
- Ostergaard, S., Olsson, L., and Nielsen, J. (2000). Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *64*, 34–50.

- Paddon, C.J., Westfall, P.J., Pitera, D.J., Benjamin, K., Fisher, K., McPhee, D., Leavell, M.D., Tai, A., Main, A., Eng, D., et al. (2013). High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature* 496, 528–532.
- Parent, S.A., Fenimore, C.M., and Bostian, K.A. (1985). Vector systems for the expression, analysis and cloning of DNA sequence in *S. cerevisiae*. *Yeast* 1, 83–138.
- Parikh, M.R., Greene, D.N., Woods, K.K., and Matsumura, I. (2006). Directed evolution of RuBisCO hypermorphs through genetic selection in engineered *E.coli*. *Protein Eng. Des. Sel.* 19, 113–119.
- Parry, M.A.J., Keys, A.J., Madgwick, P.J., Carmo-Silva, A.E., and Andralojc, P.J. (2007). Rubisco regulation: a role for inhibitors. *J. Exp. Bot.* 59, 1569–1580.
- Patel, M.K., Crank, M., Dornburg, V., Hermann, B., Roes, L., and Hüsing, B. (2006). Medium and long-term opportunities and risks of the biotechnological production of bulk chemicals from renewable resources-the potential of white biotechnology.
- Pearce, F.G. (2006). Catalytic by-product formation and ligand binding by ribulose biphosphate carboxylases from different phylogenies. *Biochem. J.* 399, 525.
- Peleg, Y., Stieglitz, B., and Goldberg, I. (1988). Malic acid accumulation by *Aspergillus flavus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28, 69–75.
- Peng, B., Williams, T.C., Henry, M., Nielsen, L.K., and Vickers, C.E. (2015). Controlling heterologous gene expression in yeast cell factories on different carbon substrates and across the diauxic shift: a comparison of yeast promoter activities. *Microb. Cell Factories* 14.
- Peterhansel, C., Niessen, M., and Kebeish, R.M. (2008). Metabolic Engineering Towards the Enhancement of Photosynthesis. *Photochem. Photobiol.* 84, 1317–1323.
- Pines, O., Shemesh, S., Battat, E., and Goldberg, I. (1997). Overexpression of cytosolic malate dehydrogenase (MDH2) causes overproduction of specific organic acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48, 248–255.
- Pompon, D., PÂQUES, F., LESAGE, J., GUILLOUET, S., BONNOT, F., MARC, J., GORRET, N., Bideaux, C., and Boutonnet, C. (2015). Levures modifiées pour utiliser le dioxyde de carbone.
- Portis, A.R., and Parry, M.A.J. (2007). Discoveries in Rubisco (Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase): a historical perspective. *Photosynth. Res.* 94, 121–143.
- Portis, A.R., Li, C., Wang, D., and Salvucci, M.E. (2007). Regulation of Rubisco activase and its interaction with Rubisco. *J. Exp. Bot.* 59, 1597–1604.
- Presečki, A.V., and Vasić-Rački, Đ. (2005). Production of L-Malic Acid by Permeabilized Cells of Commercial *Saccharomyces* Sp. Strains. *Biotechnol. Lett.* 27, 1835–1839.
- Pronk, J.T., Steensma, H.Y., and Van Dijken, J.P. (1996). Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 12, 1607–1633.

- Queiros, O., Casal, M., Althoff, S., Moradas-Ferreira, P., and Leao, C. (1998). Isolation and characterization of *Kluyveromyces marxianus* mutants deficient in malate transport. *Yeast Chichester Engl.* 14, 401–407.
- Raab, A.M., and Lang, C. (2011). Oxidative versus reductive succinic acid production in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioeng. Bugs* 2, 120–123.
- Ragsdale, S.W. (2004). Life with Carbon Monoxide. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 39, 165–195.
- Ragsdale, S.W. (2008). Enzymology of the Wood-Ljungdahl Pathway of Acetogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1125, 129–136.
- Ragsdale, S.W., and Pierce, E. (2008). Acetogenesis and the Wood–Ljungdahl pathway of CO<sub>2</sub> fixation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* 1784, 1873–1898.
- Ragsdale, S.W., and Wood, H.G. (1991). Enzymology of the acetyl-CoA pathway of CO<sub>2</sub> fixation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 26, 261–300.
- Rathnasingh, C., Raj, S.M., Lee, Y., Catherine, C., Ashok, S., and Park, S. (2012). Production of 3-hydroxypropionic acid via malonyl-CoA pathway using recombinant *Escherichia coli* strains. *J. Biotechnol.* 157, 633–640.
- Raven, J.A., Giordano, M., Beardall, J., and Maberly, S.C. (2012). Algal evolution in relation to atmospheric CO<sub>2</sub>: carboxylases, carbon-concentrating mechanisms and carbon oxidation cycles. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 367, 493–507.
- Rock, C.O., and Jackowski, S. (2002). Forty Years of Bacterial Fatty Acid Synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 292, 1155–1166.
- Romanos, M.A., Scorer, C.A., and Clare, J.J. (1992). Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast* 8, 423–488.
- Rosgaard, L., de Porcellinis, A.J., Jacobsen, J.H., Frigaard, N.-U., and Sakuragi, Y. (2012). Bioengineering of carbon fixation, biofuels, and biochemicals in cyanobacteria and plants. *J. Biotechnol.* 162, 134–147.
- Samuelov, N.S., Lamed, R., Lowe, S., and Zeikus, J.G. (1991). Influence of CO<sub>2</sub>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> levels and pH on growth, succinate production, and enzyme activities of *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 3013–3019.
- Sánchez, A.M., Bennett, G.N., and San, K.-Y. (2005). Novel pathway engineering design of the anaerobic central metabolic pathway in *Escherichia coli* to increase succinate yield and productivity. *Metab. Eng.* 7, 229–239.
- Sato, T., Atomi, H., and Imanaka, T. (2007). Archaeal Type III RuBisCOs Function in a Pathway for AMP Metabolism. *Science* 315, 1003–1006.
- Scalcinati, G., Knuf, C., Partow, S., Chen, Y., Maury, J., Schalk, M., Daviet, L., Nielsen, J., and Siewers, V. (2012). Dynamic control of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* engineered for the production of plant sesquiterpene  $\alpha$ -santalene in a fed-batch mode. *Metab. Eng.* 14, 91–103.

- Schaffrath, R., and Breunig, K.D. (2000). Genetics and molecular physiology of the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Fungal Genet. Biol. FG B* 30, 173–190.
- Sineoky, S.P., Yuzbashev, T.V., Yuzbasheva, E.Y., Sobolevskaya, T.I., Laptev, I.A., and Vibornaya, T.V. (2011). A method for producing succinic acid using a yeast belonging to the genus *yarrowia*.
- Smidt, M. (2011). A sustainable supply of succinic acid. *EuroBiotechNews* 10.
- Socol, C.R., Vandenberghe, L.P., Rodrigues, C., and Pandey, A. (2006). New perspectives for citric acid production and application. *Food Technol. Biotechnol.* 44, 141.
- Soellner, S., Rahnert, M., Siemann-Herzberg, M., Takors, R., and Altenbuchner, J. (2013). Evolution of pyruvate kinase-deficient *Escherichia coli* mutants enables glycerol-based cell growth and succinate production. *J. Appl. Microbiol.* 115, 1368–1378.
- Sousa, M.J., Mota, M., and Leão, C. (1992). Transport of malic acid in the yeast *Schizosaccharomyces pombe*: Evidence for proton-dicarboxylate symport. *Yeast* 8, 1025–1031.
- Sprague, G.F. (1977). Isolation and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* mutant deficient in pyruvate kinase activity. *J. Bacteriol.* 130, 232–241.
- Starai, V.J., Gardner, J.G., and Escalante-Semerena, J.C. (2005). Residue Leu-641 of Acetyl-CoA Synthetase is Critical for the Acetylation of Residue Lys-609 by the Protein Acetyltransferase Enzyme of *Salmonella enterica*. *J. Biol. Chem.* 280, 26200–26205.
- Steffan, J.S., and McAlister-Henn, L. (1992). Isolation and characterization of the yeast gene encoding the MDH3 isozyme of malate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 267, 24708–24715.
- Strauss, G., and Fuchs, G. (1993). Enzymes of a novel autotrophic CO<sub>2</sub> fixation pathway in the phototrophic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*, the 3-hydroxypropionate cycle. *Eur. J. Biochem.* 215, 633–643.
- Suga, H., Matsuda, F., Hasunuma, T., Ishii, J., and Kondo, A. (2012). Implementation of a transhydrogenase-like shunt to counter redox imbalance during xylose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 1669–1678.
- Teste, M.-A., Duquenne, M., François, J.M., and Parrou, J.-L. (2009). Validation of reference genes for quantitative expression analysis by real-time RT-PCR in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Mol. Biol.* 10, 99.
- Thauer, R.K. (2007). Microbiology. A fifth pathway of carbon fixation. *Science* 318, 1732–1733.
- Tong, L. (2012). Structure and function of biotin-dependent carboxylases. *Cell. Mol. Life Sci.* 70, 863–891.
- Tsao, G.T., Cao, N.J., Du, J., and Gong, C.S. (1999). Production of multifunctional organic acids from renewable resources. In *Recent Progress in Bioconversion of Lignocellulosics*, (Springer), pp. 243–280.

- Valadi, H., Larsson, C., and Gustafsson, L. (1998). Improved ethanol production by glycerol-3-phosphate dehydrogenase mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *50*, 434–439.
- Valdehuesa, K.N.G., Liu, H., Nisola, G.M., Chung, W.-J., Lee, S.H., and Park, S.J. (2013). Recent advances in the metabolic engineering of microorganisms for the production of 3-hydroxypropionic acid as C3 platform chemical. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *97*, 3309–3321.
- Van Maris, A.J.A., Abbott, D.A., Bellissimi, E., Brink, J., Kuyper, M., Luttik, M.A.H., Wisselink, H.W., Scheffers, W.A., Dijken, J.P., and Pronk, J.T. (2006). Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. *Antonie Van Leeuwenhoek* *90*, 391–418.
- Van Maris, A.J.A., Pronk, J.T., Guadalupe, M.V.G., and Wisselink, H.W. (2014). Recombinant micro-organism for use in method with increased product yield.
- Van Vleet, J., and Jeffries, T. (2009). Yeast metabolic engineering for hemicellulosic ethanol production. *Curr. Opin. Biotechnol.* *20*, 300–306.
- Vemuri, G.N., Eiteman, M.A., and Altman, E. (2002). Succinate production in dual-phase *Escherichia coli* fermentations depends on the time of transition from aerobic to anaerobic conditions. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* *28*, 325–332.
- Vemuri, G.N., Eiteman, M.A., McEwen, J.E., Olsson, L., and Nielsen, J. (2007). Increasing NADH oxidation reduces overflow metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 2402–2407.
- Verduyn, C., Postma, E., Scheffers, W.A., and Van Dijken, J.P. (1992). Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. *Yeast* *8*, 501–517.
- Verwaal, R., Wu, L., Damweld, R.A., and Sagt, C. (2008). Succinic acid production in a eukaryotic cell.
- Wang, Z.-P., Wang, G.-Y., Khan, I., and Chi, Z.-M. (2013). High-level production of calcium malate from glucose by *Penicillium sclerotiorum* K302. *Bioresour. Technol.* *143*, 674–677.
- Werpy, and Petersen (2004). *Top Value Added Chemicals from Biomass Volume I—Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas.*
- West, T.P. (2011). Malic acid production from thin stillage by *Aspergillus* species. *Biotechnol. Lett.* *33*, 2463–2467.
- Whitney, S.M., Houtz, R.L., and Alonso, H. (2010). Advancing Our Understanding and Capacity to Engineer Nature’s CO<sub>2</sub>-Sequestering Enzyme, Rubisco. *PLANT Physiol.* *155*, 27–35.
- Wood, H.G., and Barden, R.E. (1977). Biotin Enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* *46*, 385–413.
- Yim, H., Haselbeck, R., Niu, W., Pujol-Baxley, C., Burgard, A., Boldt, J., Khandurina, J., Trawick, J.D., Osterhout, R.E., Stephen, R., et al. (2011). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for direct production of 1,4-butanediol. *Nat. Chem. Biol.* *7*, 445–452.

- Yuzbashev, T.V., Yuzbasheva, E.Y., Sobolevskaya, T.I., Laptev, I.A., Vybornaya, T.V., Larina, A.S., Matsui, K., Fukui, K., and Sineoky, S.P. (2010). Production of succinic acid at low pH by a recombinant strain of the aerobic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol. Bioeng.* *107*, 673–682.
- Yuzbashev, T.V., Yuzbasheva, E.Y., Laptev, I.A., Sobolevskaya, T.I., Vybornaya, T.V., Larina, A.S., Gvilava, I.T., Antonova, S.V., and Sineoky, S.P. (2011). Is it possible to produce succinic acid at a low pH? *Bioeng. Bugs* *2*, 115–119.
- Zarzycki, J., Brecht, V., Müller, M., and Fuchs, G. (2009). Identifying the missing steps of the autotrophic 3-hydroxypropionate CO<sub>2</sub> fixation cycle in *Chloroflexus aurantiacus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 21317–21322.
- Zeikus, J.G., Jain, M.K., and Elankovan, P. (1999). Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *51*, 545–552.
- Zelle, R.M., de Hulster, E., van Winden, W.A., de Waard, P., Dijkema, C., Winkler, A.A., Geertman, J.-M.A., van Dijken, J.P., Pronk, J.T., and van Maris, A.J.A. (2008). Malic Acid Production by *Saccharomyces cerevisiae*: Engineering of Pyruvate Carboxylation, Oxaloacetate Reduction, and Malate Export. *Appl. Environ. Microbiol.* *74*, 2766–2777.
- Zelle, R.M., de Hulster, E., Kloezen, W., Pronk, J.T., and van Maris, A.J.A. (2009). Key Process Conditions for Production of C4 Dicarboxylic Acids in Bioreactor Batch Cultures of an Engineered *Saccharomyces cerevisiae* Strain. *Appl. Environ. Microbiol.* *76*, 744–750.
- Zelle, R.M., Trueheart, J., Harrison, J.C., Pronk, J.T., and van Maris, A.J.A. (2010). Phosphoenolpyruvate Carboxykinase as the Sole Anaplerotic Enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* *76*, 5383–5389.
- Zhang, Z., and Dietrich, F.S. (2005). Mapping of transcription start sites in *Saccharomyces cerevisiae* using 5' SAGE. *Nucleic Acids Res.* *33*, 2838–2851.
- Zhang, L., Tang, Y., Guo, Z., Ding, Z., and Shi, G. (2011). Improving the ethanol yield by reducing glycerol formation using cofactor regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* *33*, 1375–1380.
- Zhang, X., Wang, X., Shanmugam, K.T., and Ingram, L.O. (2010). L-Malate Production by Metabolically Engineered *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* *77*, 427–434.
- Zhuang, Z.-Y., and Li, S.-Y. (2013). Rubisco-based engineered *Escherichia coli* for in situ carbon dioxide recycling. *Bioresour. Technol.* *150*, 79–88.

# Annexes

---

Stratégie	Nom	Emplacement 1				Emplacement 2				Emplacement 3				Emplacement 4				Délétion <i>pyk1</i>
		Gène d'intérêt	Gène de sélection	Origine de répllication	Nombre de copies	Gène d'intérêt	Gène de sélection	Origine de répllication	Nombre de copies	Gène d'intérêt	Gène de sélection	Origine de répllication	Nombre de copies	Gène d'intérêt	Gène de sélection	Origine de répllication	Nombre de copies	
Souches contrôles	CEN.PK2-1C																	Non
	4PL	aucun	<i>his</i>	2μ	Multi copies	aucun	<i>leu</i>	2μ	Multi copies	aucun	<i>trp</i>	2μ	Multi copies	aucun	<i>ura</i>	2μ	Multi copies	Non
	AUX-delta																	Oui
	4PL-delta	aucun	<i>his</i>	2μ	Multi copies	aucun	<i>leu</i>	2μ	Multi copies	aucun	<i>trp</i>	2μ	Multi copies	aucun	<i>ura</i>	2μ	Multi copies	Oui
Production de malate	PM	<i>ecppc</i>	<i>his</i>	2μ	Multi copies	<i>mdh3<sub>c</sub></i>	<i>leu</i>	2μ	Multi copies									Non
	PMS	<i>ecppc</i>	<i>his</i>	2μ	Multi copies	<i>mdh3<sub>c</sub></i>	<i>leu</i>	2μ	Multi copies	<i>spmae</i>	<i>trp</i>	2μ	Multi copies					Non
	PMS-U	<i>ecppc</i>	<i>his</i>	2μ	Multi copies	<i>mdh3<sub>c</sub></i>	<i>leu</i>	2μ	Multi copies	<i>spmae</i>	<i>trp</i>	2μ	Multi copies	aucun	<i>ura</i>	2μ	Multi copies	Non
	PMS-antisens	<i>ecppc</i>	<i>his</i>	2μ	Multi copies	<i>mdh3<sub>c</sub></i>	<i>leu</i>	2μ	Multi copies	<i>spmae</i>	<i>trp</i>	2μ	Multi copies	<i>pyk1</i> antisens	<i>ura</i>	2μ	Multi copies	Non
	PMS-delta-cen	<i>ecppc</i>	<i>his</i>	2μ	Multi copies	<i>mdh3<sub>c</sub></i>	<i>leu</i>	2μ	Multi copies	<i>spmae</i> (*)	<i>trp</i>	2μ	Multi copies	aucun	<i>ura</i>	CEN	Multi copies	Oui
	PMS-delta-2μ	<i>ecppc</i>	<i>his</i>	2μ	Multi copies	<i>mdh3<sub>c</sub></i>	<i>leu</i>	2μ	Multi copies	<i>spmae</i> (*)	<i>trp</i>	2μ	Multi copies	aucun	<i>ura</i>	2μ	Multi copies	Oui
	PMS-delta-mae1	<i>ecppc</i>	<i>his</i>	2μ	Multi copies	<i>mdh3<sub>c</sub></i>	<i>leu</i>	2μ	Multi copies	<i>spmae</i> (*)	<i>trp</i>	2μ	Multi copies	<i>mae1<sub>c</sub></i>	<i>ura</i>	CEN	Multi copies	Oui
Production d'éthanol	PM-TU	<i>ecppc</i>	<i>his</i>	2μ	Multi copies	<i>mdh3<sub>c</sub></i>	<i>leu</i>	2μ	Multi copies	aucun	<i>trp</i>	2μ	Multi copies	aucun	<i>ura</i>	2μ	Multi copies	Non

#### Légende

*ecppc* PEP carboxylase d'*Escherichia coli*

*mdh3<sub>c</sub>* Malate déshydrogénase peroxysomale de *Saccharomyces cerevisiae* relocalisée dans le cytosol

*spmae* Transporteur d'acides dicarboxyliques de *Schizosaccharomyces pombe*

*mae1<sub>c</sub>* Enzyme malique mitochondriale de *Saccharomyces cerevisiae* relocalisée dans le cytosol

*pyk1* Pyruvate kinase isoforme 1

*his* Gène de complémentation de l'auxotrophie à l'histidine

*leu* Gène de complémentation de l'auxotrophie à la leucine

*trp* Gène de complémentation de l'auxotrophie au tryptophane

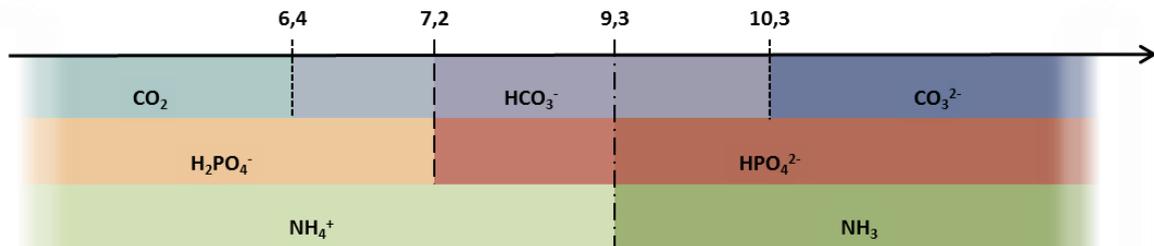
*ura* Gène de complémentation de l'auxotrophie à l'uracile

(\*) Gène introduit mais non confirmé lors de la vérification d'expression par qPCR

#### Annexe 1. Récapitulatif des souches utilisées.

**Annexe 2.** Chimie des solutions pour les milieux contenant du tampon phosphate à pH 5,5 et/ou du carbonate de calcium.

Echelle de pKa:



- (1)  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$  pKa = 6,4
- (2)  $\text{H}_2\text{PO}_4^- \leftrightarrow \text{HPO}_4^{2-} + \text{H}^+$  pKa = 7,2
- (3)  $\text{HCO}_3^- \leftrightarrow \text{CO}_3^{2-} + \text{H}^+$  pKa = 10,3
- (4)  $\text{Ca}^{2+} + \text{CO}_3^{2-} \leftrightarrow \text{CaCO}_3(\text{s})$  pKs = 8 à 9
- (5)  $\text{NH}_3 + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{NH}_4^+$  pKa = 9,3

La réaction (4) est une réaction de précipitation dont le produit de solubilité  $K_s$  est faible: entre  $10^{-8}$  et  $10^{-9}$  selon les auteurs.

- Cas 1 : phosphate seul

- *Avant ajout des levures*

Le pH initial mesuré est de 5,5, ce qui est cohérent car le YNB a un pH de 5,4 et la solution de phosphate est à pH 5,5. Le rapport  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$  est de 50,1 à pH 5,5.

- *Après démarrage de la croissance*

Le pH est peu élevé puisqu'on forme de l'acide. Le  $\text{CO}_2$  produit par l'activité biologique réagit avec les ions hydrogénophosphate selon la réaction (6), mais ne peut pas être neutralisé en grandes quantités du fait de la faible concentration en ions  $\text{HPO}_4^{2-}$  à pH 5,5 ( $10^{-2}$  M): le milieu s'acidifie et  $\text{CO}_2$  dégaze.



- Cas 2 :  $\text{CaCO}_3$  seul

- *Avant ajout des levures*

Le pH mesuré est de 6,3 environ, ce qui correspond au pKa du couple  $\text{CO}_2$  dissous/ $\text{HCO}_3^-$ : le  $\text{CaCO}_3$  se dissout faiblement selon l'équation (4) et les ions  $\text{CO}_3^{2-}$  peuvent réagir en solution avec les ions ammonium du milieu YNB (qui contient du sulfate d'ammonium) selon l'équation (7). Cette réaction provoque une basification du milieu, et comme le pH initial du milieu YNB est de 5,4, le pH initial mesuré du mélange YNB+ $\text{CaCO}_3$  se stabilise au pKa du couple  $\text{CO}_2$  dissous/ $\text{HCO}_3^-$ .



○ *Après démarrage de la croissance*

Le  $\text{CO}_2$  dégagé par la croissance réagit avec les ions carbonate pour former des ions hydrogénocarbonate selon l'équation (8), créant ainsi une réserve de  $\text{HCO}_3^-$ .



• Cas 3 : phosphate +  $\text{CaCO}_3$

○ *Avant ajout des levures*

Le pH initial mesuré est de 5,5: l'interaction du carbonate avec le phosphate forme de l'hydrogénocarbonate selon la réaction (9). Cependant, la concentration en  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  est très haute (0,5 M) et la solubilisation du carbonate étant limitée, le pH reste à une valeur proche de 5,5.

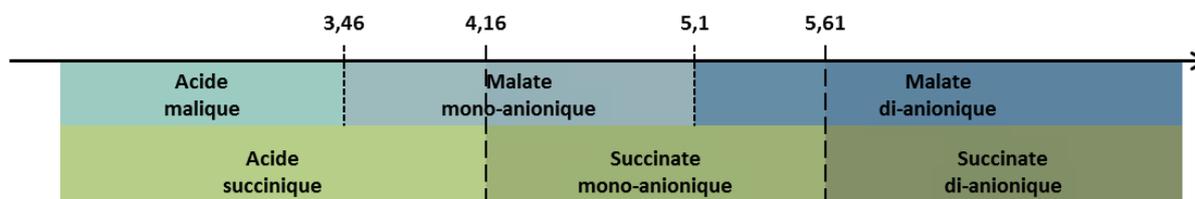


○ *Après démarrage de la croissance*

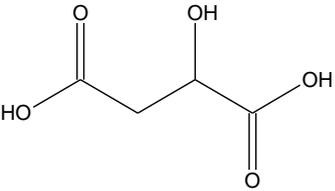
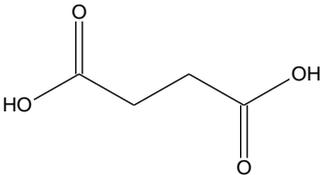
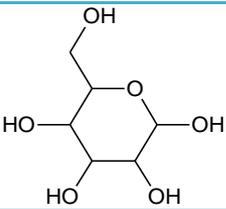
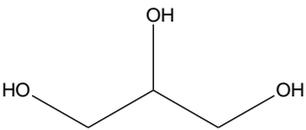
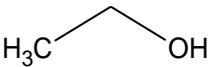
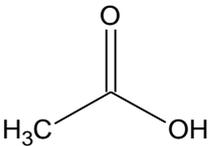
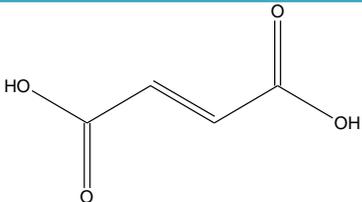
Les ions carbonate vont réagir prioritairement avec le  $\text{CO}_2$  issu de la croissance selon l'équation (8) du fait de la constante réactionnelle plus élevée.

**NB:** Dans les conditions impliquant du carbonate de calcium en faibles quantités (2 g/L et 4 g/L), les ions carbonate issus de la solubilisation du  $\text{CaCO}_3$  réagissent avec le  $\text{CO}_2$  produit par la croissance jusqu'à épuisement du  $\text{CaCO}_3$ , ce qui conduit à une acidification du milieu, qui arrive très rapidement pour la condition  $\text{CaCO}_3$  2 g/L sans phosphate.

**Annexe 3.** Echelle de pKa de l'acide malique et de l'acide succinique.



**Annexe 4.** Formules et masses molaires des principales molécules analysées lors des essais en fioles et en bioréacteurs.

Molécule	Formule topologique	Masse molaire moléculaire (g/mol)	pKa
Acide malique		134,087	3,46 ; 5,10
Acide succinique		118,088	4,16 ; 5,61
Glucose		180,16	-
Glycérol		92,09	-
Ethanol		46,07	-
Acide acétique		60,05	4,76
Acide fumarique		116,07	3,03 ; 4,44

**Annexe 5 (double page suivante).** Tableau récapitulatif des essais et principaux résultats obtenus.

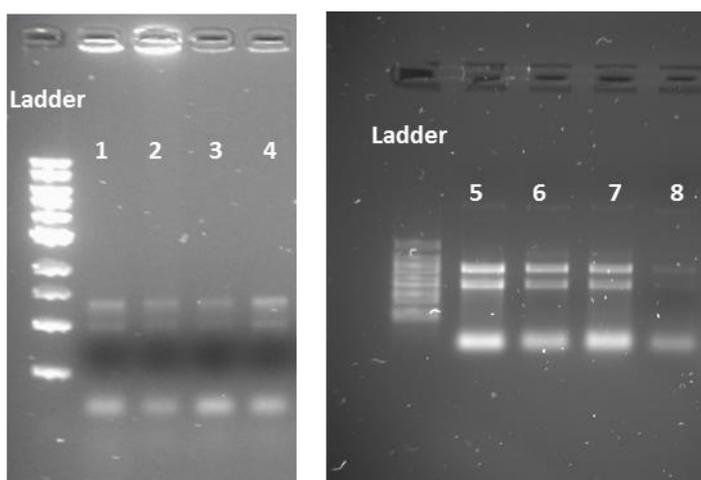
Référence	Souche	Gènes surexprimés/délétés	Milieu
Chapitre 3 2.1.	CEN.PK2-1C PM clone 7 PM clone 9	PEPC MDH3c PEPC MDH3c	YNB tampon phosphate glucose 100 g/L URA TRP LEU HIS YNB tampon phosphate glucose 100 g/L URA TRP YNB tampon phosphate glucose 100 g/L URA TRP
Chapitre 3 2.2.1	4PL PM PMS clone 1 PMS clone 2	PEPC MDH3c spMAE PEPC MDH3c spMAE	YNB tampon phosphate glucose 100 g/L YNB tampon phosphate glucose 100 g/L URA TRP YNB tampon phosphate glucose 100 g/L URA YNB tampon phosphate glucose 100 g/L URA
Chapitre 3 2.2.2	PMS clone 1 PMS clone 2 PMS clone 1 PMS clone 2 PMS clone 1 PMS clone 2 PMS clone 1 PMS clone 2	PEPC MDH3c spMAE PEPC MDH3c spMAE	YNB glucose 100 g/L URA YNB glucose 100 g/L URA YNB glucose 100 g/L URA YNB glucose 100 g/L URA YNB glucose 100 g/L CaCO3 50g/L URA
Chapitre 3 3.3.1	PMS-delta-cen clone 27 PMS-delta-cen clone 28 PMS-delta-2mu clone 33 PMS-delta-2mu clone 34	PEPC MDH3c Δpyk1 PEPC MDH3c Δpyk1 PEPC MDH3c Δpyk1 PEPC MDH3c Δpyk1	YNB glucose 100 g/L CaCO3 50g/L YNB glucose 100 g/L CaCO3 50g/L YNB glucose 100 g/L CaCO3 50g/L YNB glucose 100 g/L CaCO3 50g/L
Chapitre 3 3.3.2	PMS-delta-cen clone 28 PMS-delta-2mu clone 34 PMS-delta-mae1 clone 45	PEPC MDH3c Δpyk1 PEPC MDH3c Δpyk1 PEPC MDH3c MAE1c Δpyk1	YNB glucose 100 g/L CaCO3 50g/L YNB glucose 100 g/L CaCO3 50g/L YNB glucose 100 g/L CaCO3 50g/L
Chapitre 3 4.1	4PL 4PL PMS-U PMS-U PMS-antisens PMS-antisens	PEPC MDH3c spMAE PEPC MDH3c spMAE PEPC MDH3c spMAE pyk1 antisens PEPC MDH3c spMAE pyk1 antisens	YNB tampon phosphate glucose 50 g/L YNB glucose 50 g/L CaCO3 6 g/L YNB tampon phosphate glucose 50 g/L YNB glucose 50 g/L CaCO3 6 g/L YNB tampon phosphate glucose 50 g/L YNB glucose 50 g/L CaCO3 6 g/L
Chapitre 4 1.1.1	PMS-U PMS-U PMS-U PMS-U	PEPC MDH3c spMAE PEPC MDH3c spMAE PEPC MDH3c spMAE PEPC MDH3c spMAE	YNB tampon phosphate glucose 50 g/L YNB tampon phosphate glucose 50 g/L Na2CO3 6 mM YNB tampon phosphate glucose 50 g/L CaCO3 6 g/L YNB glucose 50 g/L CaCO3 6 g/L
Chapitre 4 1.1.2	PMS-U PMS-U PMS-U PMS-U PMS-U PMS-U PMS-U	PEPC MDH3c spMAE PEPC MDH3c spMAE PEPC MDH3c spMAE PEPC MDH3c spMAE PEPC MDH3c spMAE PEPC MDH3c spMAE PEPC MDH3c spMAE	YNB tampon phosphate glucose 50 g/L YNB tampon phosphate glucose 50 g/L CaCO3 2 g/L YNB glucose 50 g/L CaCO3 2 g/L YNB tampon phosphate glucose 50 g/L CaCO3 4 g/L YNB glucose 50 g/L CaCO3 4 g/L YNB tampon phosphate glucose 50 g/L CaCO3 6 g/L YNB glucose 50 g/L CaCO3 6 g/L
Chapitre 4 1.1.3	4PL 4PL PMS-U PMS-U	PEPC MDH3c spMAE PEPC MDH3c spMAE	YNB tampon phosphate éthanol 15 g/L CaCO3 6 g/L YNB éthanol 15 g/L CaCO3 6 g/L YNB tampon phosphate éthanol 15 g/L CaCO3 6 g/L YNB éthanol 15 g/L CaCO3 6 g/L
Chapitre 4 2.1	PMS-U PMS-U	PEPC MDH3c spMAE PEPC MDH3c spMAE	YNB glucose 50 g/L YNB glucose 50 g/L
Chapitre 5 2.1	4PL PM-TU 4PL PM-TU	PEPC MDH3c PEPC MDH3c	YNB tampon phosphate glucose 100 g/L YNB tampon phosphate glucose 100 g/L Milieu minéral tampon phosphate glucose 100 g/L Milieu minéral tampon phosphate glucose 100 g/L
Chapitre 5 2.2	4PL PM-TU	PEPC MDH3c	Milieu minéral glucose 100 g/L Milieu minéral glucose 100 g/L

Conditions	Observations	Conclusion
Fioles fond lisse 110 rpm 48 h Fioles fond lisse 110 rpm 48 h Fioles fond lisse 110 rpm 48 h	* PM clone 7 et clone 9: production de malate et production d'éthanol augmentée par rapport à CEN.PK2-1C	* Mise en évidence du fonctionnement de PEPC et de MDH3c * Eventuel effet transhydrogénase dû à l'expression de MDH3 dans le cytosol
Fioles fond lisse 110 rpm 26 h Fioles fond lisse 110 rpm 26 h Fioles fond lisse 110 rpm 26 h Fioles fond lisse 110 rpm 26 h	* PMS clones 1 et 2: production de malate très supérieure (3 g/L) à PM et 4PL (pas de malate)	Présente de spMAE cruciale pour l'export du malate dans le milieu Pas de malate chez PM car durée d'essai trop courte
Fioles fond lisse 110 rpm 120 h Fioles fond lisse 110 rpm 120 h Fioles à baffles 110 rpm 120 h Fioles à baffles 110 rpm 120 h Fioles fond lisse 110 rpm 120 h Fioles fond lisse 110 rpm 120 h Fioles à baffles 110 rpm 120 h Fioles à baffles 110 rpm 120 h	* Concentration finale en malate identique avec ou sans baffles * Augmentation de la production de malate en présence de CaCO <sub>3</sub>	* Pas d'influence de l'agitation/aération sur la production de malate * Influence de la présence de carbonate de calcium et donc de l'apport de carbone inorganique sur la production de malate; mais difficile de différencier apport de carbone inorganique et effet d'augmentation du pH
Fioles fond lisse 110 rpm 288 h Fioles fond lisse 110 rpm 321 h Fioles fond lisse 110 rpm 288 h Fioles fond lisse 110 rpm 321 h Fioles fond lisse 110 rpm 216 h Fioles fond lisse 110 rpm 216 h Fioles fond lisse 110 rpm 216 h	* Problème d'expression de spMAE * Production d'un composé inconnu en présence de CaCO <sub>3</sub> dosé en équivalent malate * Très faible croissance * Croissance légèrement améliorée avec l'expression de MAE1c	* Complémentation au moins partielle de la délétion par PEPC et MDH3c et production d'un composé inconnu car spMAE pas exprimé * Problème d'expression de spMAE vraisemblablement dû à une contre-sélection lors de la sélection des transformants sur milieu avec éthanol * Obtention de souches Δpyk1 avec spMAE actif très compliquée
Fioles fond lisse 200 rpm 168 h Fioles fond lisse 200 rpm 168 h	* Souches PMS-U et PMS-antisens: production de malate et succinate augmentée par rapport à 4PL * Effet positif du CaCO <sub>3</sub> sur la production d'acides organiques * Pas de différence entre PMS-U et PMS-antisens	* Effet des transgènes sur la production de malate par rapport à la souche 4PL * Stimulation de la production de malate par CaCO <sub>3</sub> : CO <sub>2</sub> produit par la souche insuffisant pour production optimale * Pas possible de vérifier l'expression de l'antisens par qPCR: peut-être problème d'expression?
Fioles fond lisse 200 rpm 120 h Fioles fond lisse 200 rpm 120 h Fioles fond lisse 200 rpm 120 h Fioles fond lisse 200 rpm 120 h	* Dans la condition tampon + CaCO <sub>3</sub> , moins de malate et de succinate que dans la condition CaCO <sub>3</sub> seul * Mêmes concentrations en malate pour Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> + tampon et CaCO <sub>3</sub> + tampon	* Influence négative du tampon sur la production d'acides organiques * Pas d'influence du sel de carbonate sur la production de malate et succinate
Fioles fond lisse 200 rpm 168 h Fioles fond lisse 200 rpm 168 h	* Meilleurs titres en malate et succinate obtenus pour la condition CaCO <sub>3</sub> seul 6 g/L * CaCO <sub>3</sub> 2 g/L et 4 g/L: CaCO <sub>3</sub> semble entièrement dissous à la fin de l'essai	* 6 g/L de CaCO <sub>3</sub> seul semble la meilleure condition pour le format de nos essais (durée et concentration en glucose) * On dissout plus de 4 g/L mais moins de 6 g/L de CaCO <sub>3</sub> par essai (dans les conditions testées)
Fioles fond lisse 200 rpm 168 h Fioles fond lisse 200 rpm 168 h Fioles fond lisse 200 rpm 168 h Fioles fond lisse 200 rpm 168 h	* Mêmes titres de malate et de succinate pour les deux souches mais décalage de la cinétique * Titres inférieurs à ceux obtenus en fin d'essai base glucose	* Les différences observées sont probablement dues au fait qu'en croissance sur glucose le glycérol est également reconstitué et participe à la formation de biomasse et d'acides organiques
Bioréacteur Air 477 h Bioréacteur Air 5% CO <sub>2</sub> 477 h	* Meilleur titre et meilleur rendement de malate en présence de 5% CO <sub>2</sub> sur la phase de consommation de glucose	* Confirmation de l'incorporation de carbone inorganique pour la production de malate
Fioles fond lisse 110 rpm 50 h Fioles fond lisse 110 rpm 50 h Fioles fond lisse 110 rpm 50 h Fioles fond lisse 110 rpm 50 h Bioréacteur 50 h Bioréacteur 50 h	* Souche PM-TU: moins d'éthanol et plus de glycérol que 4PL * Meilleure croissance, plus d'éthanol et moins de glycérol en milieu minéral reconstitué que sur YNB	* Problème avec la mise en place de l'effet transhydrogénase: peut-être dû à la déviation du carbone après formation du malate qui part vers la mitochondrie? * Milieu minéral reconstitué mieux adapté à ces essais que le milieu YNB

**Annexe 6.** Détermination de la concentration en acides nucléiques et de la qualité des extractions d'ADN génomiques par spectrophotométrie.

Souche	ATCC	Concentration (ng/μL)	Absorbance à 260 nm	Pureté (A260/A280)	Pureté (A260/A230)
<i>S. cerevisiae</i> S288c	26108	2098	1,354	1,94	2,73
<i>S. pombe</i> DSM70756	24843	700	0,452	1,90	2,40
<i>E. coli</i> K12		2728	1,764	1,993	2,517

**Annexe 7.** Vérification de l'intégrité des ARN totaux extraits par migration d'un microgramme d'ARN sur gel d'agarose 0,8%. 1 : souche CEN.PK2-1C ; 2 : souche PM clone 7 ; 3 : souche PM clone 8 ; 4 : souche PM clone 9 ; 5 : souche CEN.PK2-1C ; 6 : souche PMS-delta-CEN clone 28 ; 7 : souche PMS-delta-2μ clone 34 ; 8 : souche PMS-delta-mae1 clone 36.



**Annexe 8.**

**A. Séquençage du gène *ecppc* après clonage dans le pDONR221.**

				59500	841	.....	900
				59501	121	.....	180
				Query	942	ATATCACCCGCCACGTCCTGCTACTCAGCCGCTGGAAAGCCACCGATTGTTCTCTGAAAG	1001
				59500	901	.....	960
				59501	181	.....	240
Query	42	AGCTCGGGCCCCAAATAATGATTTTATTTTACTGATAGTGACCTGTTTCGTTGCAACAAA	101	Query	1002	ATATTCAGGTGCTGGTTTCTGAACTGTCGATGGTTGAAGCGACCCCTGAACTGCTGGCGC	1061
59500	2	.....-	60	59500	961	.....	1020
59503	1187	.....	1139	59501	241	.....	300
Query	102	TTGATGAGCAATGCTTTTTTATAATGCCAACTTTGTACAAAAAGCAGGCTTAAAAATGA	161	Query	1062	TGGTTGGCGAAGAAGGTGCCGCAGAACCCTATCGCTATCTGATGAAAAACCTGCGTTCTC	1121
59500	61	.....	120	59500	1021	.....A.....A.....	1080
59503	1138	.....A.....C.....G.....	1093	59501	301	.....	360
Query	162	ACGAACAATATTCGCATTGCGTAGTAATGTCAGTATGCTCGGCAAAGTCTGGGAGAAA	221	Query	1122	GCCTGATGGCGACACAGGCATGGCTGGAAGCGCGCCTGAAAGGCGAAGAAGTCCAAAAAC	1181
59500	121	.....	180	59500	1081	.....	1140
				59501	361	.....	420
Query	222	CCATCAAGGATGCGTTGGGAGAACACATTCTTGAACGCGTAGAACTATCCGTAAGTTGT	281	Query	1182	CAGAAGCCTGCTGACACAAAACGAAGAAGTGTGGGAACCGCTCTACGCTTGCTACCAGT	1241
59500	181	.....	240	59500	1141	.....C.....A.....	1184
Query	282	CGAAATCTTCACGCGCTGGCAATGATGCTAACC GCCAGGAGTTGCTCACCACCTTACAAA	341	59501	421	.....	480
59500	241	.....	300	Query	1242	CACTTCAGGCGTGTGGCATGGGTATTATCGCCAACGGCGATCTGCTCGACACCCTGCGCC	1301
Query	342	ATTTGTGCAACGACGAGCTGCTGCCGTTGCGCGTGCCTTAGTCAGTTCCTGAACTGG	401	59501	481	.....	540
59500	301	.....	360	Query	1302	GCGTGAAATGTTTCGGCGTACCCTGGTCCGTATTGATATCCGTCAGGAGAGCACGCGTC	1361
Query	402	CCAACACCGCCGAGCAATACCACAGCATTTCGCCGAAAGGCGAAGCTGCCAGCAACCCGG	461	59501	541	.....	600
59500	361	.....	420	Query	1362	ATACCGAAGCGCTGGGCGAGCTGACCCGCTACCTCGGTATCGGCGACTACGAAAGCTGGT	1421
Query	462	AAGTGATCGCCCGCACCCCTGCGTAACTGAAAAACCAGCCGAACTGAGCGAAGACACCA	521	59501	601	.....	660
59500	421	.....	480	Query	1422	CAGAGGCCGACAAAACAGGCGTTCCTGATCCGCGAACTGAACTCCAACGTCGCTTCTGC	1481
Query	522	TCAAAAAGCAGTGGAAATCGCTGTCGCTGGAAGTGGTCTCACGGCTCACCCAACCGAAA	581	59501	661	.....	720
59500	481	.....	540	Query	1482	CGCGCAACTGGCAACCAAGCGCCGAAACGCGGAAGTGTCTGATACCTGCCAGGTGATTG	1541
Query	582	TTACCCGTCGTACTGATCCACAAAATGGTGAAGTGAACGCCTGTTTAAAACAGCTCG	641	59501	721	.....	780
59500	541	.....	600	Query	1542	CCGAAGCACCGCAAGGCTCCATTGCCGCTACGTGATCTCGATGGCGAAAACGCCGTCG	1601
Query	642	ATAACAAAGATATCGCTGACTACGAACACAACCAGCTGATGCGTGCCTGCGCCAGTTGA	701	59501	781	.....	840
59500	601	.....	660	Query	1602	ACGTACTGGCTGTCCACCTGCTGCTGAAAGAAGCGGGTATCGGGTTTGGCATGCCGGTTG	1661
Query	702	TCGCCAGTCATGGCATAACCGATGAAATCCGTAAGCTGCGTCCAAGCCCGGTAGATGAAG	761	59501	841	.....	900
59500	661	.....	720	59502	1	.....-	36
Query	762	CCAAATGGGGCTTTGCCGTAGTGGAAAACAGCCTGTGGCAAGGCGTACCAAATTACCTGC	821	Query	1662	CTCCGCTGTTTGA AACCCCTCGATGATCTGAACAACGCCAACGATGTCATGACCCAGCTGC	1721
59500	721	.....	780	59501	901	.....	960
59501	5	.....-	60	59502	37	.....	96
Query	822	GCGAACTGAACGAACAACCTGGAAGAGAACCCTCGGCTACAACTGCCCGTCGAATTTGTTT	881	Query	1722	TCAATATTGACTGGTATCGTGGCCTGATTCAGGGCAAACAGATGGTGTGATTGGCTATT	1781
59500	781	.....	840	59501	961	.....	1020
59501	61	.....	120	59502	97	.....	156
Query	882	CGGTCCGTTTACTTCGTGGATGGGCGGCGACCCGCGACGCAACCCGAACGTCCTGCGG	941	59503	1	.....G.....	58

Query 1782	CCGACTCAGCAAAAGATGCGGGAGTGATGGCAGCTTCTGGGCGCAATATCAGGCACAGG	1841	59503	1019	.....	1078
59501 1021	.....A.....	1080				
59502 157	.....	216	Query 2802	CCGGCTAAAACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTTGGCATTATAAGAAAGCATTGCTTATCAA	2861	
59503 59	.....T.....T.....	118	59500 106	.....T.....A.....C.....	61	
			59503 1079	.....	1138	
Query 1842	ATGCATTAATCAAAACCTGCGAAAAAGCGGGTATTGAGCTGACGTTGTTCCACGGTCGCG	1901	Query 2862	TTTGTGCAACGAACAGGTCACATCAGTCAAAATAAAATCATTATTTGCCATCCAGCTG	2921	
59501 1081	.....	1102	59500 60	.....	12	
59502 217	.	217	59503 1139	.....	1198	
59503 119	.....	178				
			Query 2922	ATATCCCCTATAGTGAGTCGTATTACATGGTCATAGCTGT	2961	
Query 1902	GCGGTTCCATTGGTCGCGGGCGGCACCTGCTCATGCGGCGCTGCTGTCAACCCGCCAG	1961	59503 1199	.....	1238	
59503 179	.....	238				
Query 1962	GAAGCCTGAAAGGCGGCCTGCGCGTAACCGAACAGGGCGAGATGATCCGCTTTAAATATG	2021				
59503 239	.....	298				
Query 2022	GTCTGCCAGAAATCACCGTCAGCAGCCTGTCGCTTTATACCGGGGCGATTCTGGAAGCCA	2081				
59503 299	.....	358				
Query 2082	ACCTGCTGCCACCGCCGGAGCCGAAAGAGAGCTGGCGTCGCATTATGGATGAACTGTCAG	2141				
59503 359	.....	418				
Query 2142	TCATCTCCTGCGATGTCTACCGCGCTACGTACGTGAAAACAAAGATTTTGTGCCTTACT	2201				
59503 419	.....	478				
Query 2202	TCCGCTCCGCTACGCCGGAACAAGAACTGGGCAAACTGCCGTTGGGTTACGTCGGCGA	2261				
59503 479	.....	538				
Query 2262	AACGTCGCCCAACCGGCGCGTTCGAGTCACTACGCGCCATTCCGTGGATCTTCGCCTGGA	2321				
59503 539	.....	598				
Query 2322	CGCAAAACCGTCTGATGCTCCCCGCCTGGCTGGGTGCAGGTACGGCGCTGCAAAAAGTGG	2381				
59503 599	.....	658				
Query 2382	TCGAAGACGGCAACAGAGCGAGCTGGAGGCTATGTGCCGCGATTGGCCATTCTTCTCGA	2441				
59503 659	.....	718				
Query 2442	CGCGTCTCGGCATGCTGGAGATGGTCTTCGCCAAAGCAGACCTGTGGCTGGCGGAATACT	2501				
59503 719	.....	778				
Query 2502	ATGACCAACGCCTGGTAGACAAAGCACTGTGGCCGTTAGGTAAGAGTTACGCAACCTGC	2561				
59503 779	.....	838				
Query 2562	AAGAAGAAGACATCAAAGTGGTGTGGCGATTGCCAACGATTCCCATCTGATGGCCGATC	2621				
59503 839	.....	898				
Query 2622	TGCCGTGGATTGCAGAGTCTATTACGCTACGGAATATTTACACCGACCCGCTGAACGTAT	2681				
59503 899	.....	958				
Query 2682	TGCAGGCCGAGTTGCTGCACCGCTCCCGCCAGGCAGAAAAAGAAGGCCAGGAACCGGATC	2741				
59503 959	.....	1018				
Query 2742	CTCGCGTCGAACAAGCGTTAATGGTCACTATTGCCGGGATTGCGGCAGGTATGCGTAATA	2801				

**Annexe 8B. Séquençage du gène *mdh3<sub>c</sub>* après clonage dans le pDONR221.**

			60474	780	.....	839
			60475	613	.....	672
Query	42	AGCTCGGGCCCCAAATAATGATTTTATTTTACTGATAGTGACCTGTTTCGTTGCAACAAA	101			
60474	2	.....-.....	59			
Query	102	TTGATGAGCAATGCTTTTTTATAATGCCAACTTTGTACAAAAAGCAGGCTAAAAAATGG	161			
60474	60	.....	119			
Query	162	TCAAAGTCGCAATTCTTGGCGCTTCTGGTGGCGTGGGACAACCGCTATCATTACTGCTAA	221			
60474	120	.....	179			
Query	222	AATTAAGCCCTTACGTTTCCGAGCTGGCGTTGTACGATATCCGAGCTGCGGAAGGCATTG	281			
60474	180	.....	239			
60475	13	.....	72			
Query	282	GTAAGGATTTATCTCACATCAACACCAACTCAAGTTGTGTGCGTTATGATAAGGATAGTA	341			
60474	240	.....	299			
60475	73	.....	132			
Query	342	TTGAGAACACCTTGTCAAATGCTCAGGTGGTGCTAATACCGCTGGTGTCCAGAAAAGC	401			
60474	300	.....	359			
60475	133	.....	192			
Query	402	CCGGTTTAACTAGAGATGATTTGTTCAAGATGAACGCCGGTATTGTCAAAGCCTGGTAA	461			
60474	360	.....	419			
60475	193	.....	252			
Query	462	CCGCTGTGGAAAGTTCGCACCAAAATGCGAGGATTTTAGTCATTTCAAACCTGTAAACA	521			
60474	420	.....	479			
60475	253	.....	312			
Query	522	GTTTGGTCCCTATTGCTGTGGAAACTTTGAAGAAAATGGGTAAGTTCAAACCTGGAAACG	581			
60474	480	.....	539			
60475	313	.....	372			
Query	582	TTATGGGTGTGACGAACCTTGACCTGGTACGTGCAGAAACCTTTTGGTAGATTATTTGA	641			
60474	540	.....	599			
60475	373	.....	432			
Query	642	TGCTAAAAAACCCAAAAATTGGACAAGAACAAGACAAAACCTACAATGCACAGAAAGGTCA	701			
60474	600	.....	659			
60475	433	.....	492			
Query	702	CTGTTATTGGGGTCATTACAGGGAAACCATATCCCAATAATCACCGACAAATCGCTGG	761			
60474	660	.....	719			
60475	493	.....	552			
Query	762	TATTTCAACTTGATAAGCAGTACGAGCACTTCATTCATAGGGTCCAGTTCGGAGGTGATG	821			
60474	720	.....	779			
60475	553	.....	612			
Query	822	AAATTGTCAAAGCTAAACAGGGCGCCGGTTCCGCCACGTTGTCCATGGCGTTCGCGGGG	881			
			60474	780	.....	839
			60475	613	.....	672
Query	882	CCAAGTTTGCTGAAGAAGTTTTGAGGAGCTTCCATAATGAGAAACCAGAAACGGAGTCAC	941			
60474	840	.....	899			
60475	673	.....	732			
Query	942	TTTCCGCATTCGTTTATTTACCAGGCTTAAAAAACGGTAAGAAAGCGCAGCAATTAGTTG	1001			
60474	900	.....	959			
60475	733	.....	792			
Query	1002	GCGACAACCTCTATTGAGTATTTTTCCTTGCCAATTGTTTGGAGAAATGGTAGCGTAGTAT	1061			
60474	960	.....	1019			
60475	793	.....	852			
Query	1062	CCATCGATACCAGTGTCTTGAAAAACTGTCTCCGAGAGAGGAACAACCTCGTTAATACTG	1121			
60474	1020	.....	1079			
60475	853	.....	912			
Query	1122	CGGTCAAAGAGCTACGCAAGAATATTGAAAAAGCAAGAGTTTCATCCTAGACTCTTGAA	1181			
60474	1080	.....-.....A.....	1138			
60475	913	.....	972			
Query	1182	ACCCAGCTTTCTTGTACAAAAGTTGGCATTATAAGAAAGCATTGCTTATCAATTTGTTGCA	1241			
60474	1139	.....G.....	1173			
60475	973	.....	1032			
Query	1242	ACGAACAGGTCACTATCAGTCAAATAAAATCATTATTTGCCATCCAGCTGATATCCCCT	1301			
60475	1033	.....	1092			
Query	1302	ATAGTGAGTCGTATTACATGGTCATAGCTGT	1332			
60475	1093	.....	1123			

**Annexe 8C. Séquençage du gène *spmae* après clonage dans le pDONR221.**

				6471	412	.....	471
Query	50	CCCCAAATAATGATTTTATTTTACTGATAGTGACCTGTTTCGTTGCAACAAATTGATGAG	109	Query	890	TTTATGTTTGTCCGGTCCACCAGCTTTCTCAGGTTTGGCCTTAATTAATATTGCGCGTGGT	949
6470	1	.....	60	6470	841	.....	900
6471	1159	.....A..	1103	6471	472	.....	531
Query	110	CAATGCTTTTTTATAATGCCAACTTTGTACAAAAAGCAGGCTTAAAAATGGGTGAACCTC	169	Query	950	GCTATGGGCAGTCGCCCTTATATTTTTGTTGGCGCCAACTCATCCGAGTATCTTGGTTTT	1009
6470	61	.....	120	6470	901	.....	960
6471	1102	.....C.....G.....	1065	6471	532	.....	591
Query	170	AAGGAAATCTGAAACAGAGGTATCATGAGTTGCTTGACTGGAATGTCAAAGCCCCTCAT	229	Query	1010	GTTTCTACCTTTATGGCTATTTTTATTTGGGGTCTTGCTGCTTGGTGTACTGTCTCGCC	1069
6470	121	.....	180	6470	961	.....	1020
				6471	592	.....	651
Query	230	GTCCCTCTCAGTCAACGACTGAAGCATTTCATGGTCTTGGTTTGCATGTACTATGGCA	289	Query	1070	ATGGTTAGCTTTTGTAGCGGGCTTTTCACTCGAGCCCCTCTCAAAGTTGCTTGTGGATGG	1129
6470	181	.....	240	6470	1021	.....	1080
				6471	652	.....	711
Query	290	ACTGGTGGTGTGGTTTGATTATTGGTTCTTTCCCTTTTCGATTTTATGGTCTTAATACA	349	Query	1130	TTTGCATTCATTTTCCCAACGTGGGTTTTGTTAATTGTACCATTGAGATAGGTAAAATG	1189
6470	241	.....	300	6470	1081	.....G.....G.....A.....	1137
Query	350	ATTGGCAAATTTGTTTATATTCTTCAAATCTTTTGTCTCTCTTTGGATCATGCATG	409	6471	712	.....	771
6470	301	.....	360				
Query	410	CTTTTTCGCTTTATTAATATCCTTCAACTATCAAGGATTCCTGGAACCATCATTGGAA	469	Query	1190	ATAGATTCCAAAGCTTTCCAAATGTTGGACATATCATTGGGGTCATTCTTTGTATTTCAG	1249
6470	361	.....	420	6471	772	.....	831
6471	1	.....-.....	53	Query	1250	TGGATCCTCCTAATGTATTTAATGGTCCGTGCGTTTCTCGTCAATGATCTTTGCTATCCT	1309
Query	470	AAGCTTTTCATTGCTACTTGTCTTCTTTCAATATCCACGTTTCATCGACATGCTTGCCATA	529	6471	832	.....	891
6470	421	.....	480	Query	1310	GGCAAAGACGAAGATGCCCATCCTCCACCAAAACCAAATACAGGTGTCTTAACCCCTACC	1369
6471	54	...-.....-.....	111	6471	892	.....	951
Query	530	TACGCTATCCTGATACCGGCGAGTGGATGGTGTGGGTCATTCGAATCCTTTATTACATT	589	Query	1370	TTCCCACCTGAAAAGCACCTGCATCTTTGGAAAAGTCGATACACATGTCACATCTACT	1429
6470	481	.....	540	6471	952	.....	1011
6471	112	.....	171				
Query	590	TACGTTGCAGTATCCTTTATATACTGCGTAATGGCtttttttACAATTTCAACAACCAT	649	Query	1430	GGTGGTGAATCGGATCCTCCTAGTAGTGAACATGAAAGCGTTTAAGCAACCCAGCTTTCT	1489
6470	541	.....	600	6470	98	.....T.	92
6471	172	.....	231	6471	1012	.....	1071
Query	650	GTATATACCATTGAAACCGCATCTCCTGCTTGGATTCTTCCTATTTCCCTCCTATGATT	709	Query	1490	TGTACAAAGTTGGCATTATAAGAAAGCATTGCTTATCAATTTGTTGCAACGAACAGGTCA	1549
6470	601	.....	660	6470	91	.....A.....C.....	32
6471	232	.....	291	6471	1072	.....	1131
Query	710	TGTGGTGTCAATTGCTGGCGCCGTCAATTCTACACAACCCGCTCATCAATAAAAAATATG	769	Query	1550	CTATCAGTCAAAAATAAAATCATTATTTGCCATCCAGCTGATATCCCCTATAGTGAGTCGT	1609
6470	661	.....	720	6470	31	.....	4
6471	292	.....	351	6471	1132	.....	1191
Query	770	GTTATCTTTGGTATCCTCTTTCAAGGACTTGGTTTTGGGTTTATCTTTACTGTTTGCC	829	Query	1610	ATTACATGG	1618
6470	721	.....	780	6471	1192	.....	1200
6471	352	.....	411				
Query	830	GTCAAATGTCTTACGGTTTTTACTGTAGGCCTGGCAAACCCCAAGATCGACCTGGTATG	889				
6470	781	.....	840				

**Annexe 8D. Séquençage du gène *mae1<sub>c</sub>* après clonage dans le pDONR221.**

Query 45452 45453	53 1 1138	CAATAATGATTTTATTTTACTGATAGTGACCTGTTTCGTTGCAACAAATTGATGAGCAA ..... .....A.....	112 52 1079	Query 45452 45453	1013 953 1	ATCAAGGCCGTTAAGAAAGTGTATCCAAGCGCCGTTCTGCATTTCGAAGATTTCCGGTGTT ..... .....T.....	1072 1012 29
Query 45452 45453	113 53 1078	TGCTTTTTTATAATGCCAACTTTGTACAAAAAGCAGGCTTAAAAATGTGGCCTATTTCAG ..... .....C.....G.....	172 112 1044	Query 45452 45453	1073 1013 30	AAGAACGCTAGAAGATTACTAGAAAAGTACAGGTACGAATTGCCATCATTCAACGATGAC ..... .....C.....	1132 1072 89
Query 45452 45453	173 113	CAATCGCGTTTATATTTCTTAACACTAGATCGCATAAAGCTACCACAACAAGAGAAAAT .....	232 172	Query 45452 45453	1133 1073 90	ATTCAGGGCACCAGTGCCTCGTATGGCCTCGTTGATTGCTGCTTTGAAACATACCAAC T.....C.....	1192 1131 149
Query 45452 45453	233 173	ACTTTCCAAAAGCCATACAGCGACGAGGAGGTCACTAAAACACCCGTCGGTTCTCGCGCC .....	292 232	Query 45452 45453	1193 1132 150	AGAGACTTGAAAGACACCAGAGTGCTTATTTACGGTGCCGGGCTGCGGGCCTCGGTATC ....	1252 1135 209
Query 45452 45453	293 233	AGAAAGATCTTCGAAGCTCCTCACCCACATGCCACTCGTTTACTGTAGAAGGTGCCATA .....	352 292	Query 45452 45453	1253 210	GCAGATCAAATTTGTAATCATATGGTACGCACGGCGTTGACAAGGAAGAAGCGCGCAAG .....	1312 269
Query 45452 45453	353 293	GAATGTCCCTTGGAGAGCTTTCAACTTTTAAACTCTCCTTTATTTAACAAGGGTTCTGCA .....	412 352	Query 45452 45453	1313 270	AAAATCTTCTTGATGGACAGACGTGGGTTAATTCTACAATCTTACGAGGCTAACTCCACT .....	1372 329
Query 45452 45453	413 353	TTTACACAAGAAGAAAGGAAGCGTTTAAATTTAGAAGCATTGCTACCACCACAAGTGAAC .....	472 412	Query 45452 45453	1373 330	CCCGCCCAACACGTATACGCTAAGAGTGATGCGGAATGGGCTGGTATCAACACCCGCTCT .....	1432 389
Query 45452 45453	473 413	ACTTTGGACGAACAACACTGGAAAGAAGCTACAAGCAGTTATGCTATTTGAAGACGCCCTTG .....	532 472	Query 45452 45453	1433 390	TTACATGATGTGGTGGAGAACGTCAAACCAACGTGTTTGGTTGGCTGCTCCACACAAGCA .....	1492 449
Query 45452 45453	533 473	GCCAAAACGACTTCATGACGCTTTGAGAGTACAGAACAAGTCTATATTTTGCATTA .....	592 532	Query 45452 45453	1493 450	GGCGCATTCACTCAAGATGTTCGTAGAAGAAATGCACAAGCACAATCCTAGACCGATCATT .....	1552 509
Query 45452 45453	593 533	ATAAGGAGACATATCAAGGAATTAGTTCCTATCATTTACACCCCAACCGAAGGTGATGCT .....	652 592	Query 45452 45453	1553 510	TTCCATTATCCAACCCTACTAGACTACACGAAGCCGTTCTGCCGATTTAATGAAGTGG .....	1612 569
Query 45452 45453	653 593	ATTGCTGCCTATTTCCACAGGTTTCAGAAAGCCAGAAGGTGTGTTTTTAGACATTACCGAA .....	712 652	Query 45452 45453	1613 570	ACCAACAACAACGCTCTTGTAGCTACCGATCTCCTTTCCACCTGTTGATGGTTACCGT .....	1672 629
Query 45452 45453	713 653	CCTGATTCATCGAATGTAGATTGGCTACATACGGTGGAGACAAAGATGTAGACTACATC .....	772 712	Query 45452 45453	1673 630	ATCTCGGAGAACAACAATTGTTACTCTTTCCAGGTATCGGTTTAGGTGCCGTACTATCG .....	1732 689
Query 45452 45453	773 713	GTTGTGTCGGATTTCGGAAGGTATTTCTGGGAATTGGTGACCAAGGTATCGGTGGTGTACGT .....	832 772	Query 45452 45453	1733 690	CGTGCCACCACCATCACAGACAAGATGATCTCCGCTGCAGTGGACCAACTAGCCGAATTG .....	1792 749
Query 45452 45453	833 773	ATTGCTATCTCCAAATTGGCATTGATGACGCTGTGCGGTGGTATTCATCCCGCCGCTGTG .....	892 832	Query 45452 45453	1793 750	TCGCCACTAAGAGAGGGCGACTCGAGACCTGGGTTGCTACCCGGCCTGGACACCATCACC .....	1852 809
Query 45452 45453	893 833	CTACCTGTGTGTTTGGACGTCGGTACTAACAACAAGAACTAGCCCGTGACGAATTGTAC .....	952 892	Query 45452 45453	1853 810	AACACTTCTGCGCTCTAGCTACCGCTGTGATCTTGCAAGCACTCGAGGAGGGAACCGCC .....	1912 869
Query 45452 45453	953 893	ATGGGTAACAAGTTCTCCAGAATCAGGGGTAAGCAATATGACGACTTCTTGAAAAATTC .....	1012 952	Query 45452 45453	1913 870	CGTATCGAGCAAGAACAAGTACCGGGAGGAGCTCCCGCGAAACTGTCAAGGTTCTCTCGT .....	1972 929

Query	1973	GAC	TTG	ACG	AATG	TTT	AC	AGT	GGG	TCAA	AGCC	CAA	AATG	TTG	GG	AGC	CTG	T	AC	AG	AC	CT	2032																																				
45453	930	.....																				989																																					
Query	2033	AT	GAT	CA	AGG	TCCA	ACAT	GAC	CCAT	CGG	TGC	AC	CA	CA	CA	CA	ATTG	T	AG	A	CC	C	AG	CT	TTC	2092																																	
45452	87	.....T																				82																																					
45453	990	.....																				1049																																					
Query	2093	TT	G	T	A	C	A	A	G	T	T	G	C	A	T	T	A	A	G	A	A	G	C	A	T	T	G	C	T	T	A	T	C	A	A	T	T	T	G	T	T	G	C	A	A	C	G	A	A	C	A	G	G	T	2152				
45452	81	.....A.....C.....																				22																																					
45453	1050	.....																				1109																																					
Query	2153	A	C	T	A	T	C	A	G	T	C	A	A	A	T	A	A	A	T	C	A	T	T	A	T	T	T	G	C	C	A	T	C	C	A	G	C	T	G	A	T	A	T	C	C	C	T	A	T	A	G	T	G	A	G	T	C	G	2212
45452	21	.....																				1																																					
45453	1110	.....																				1169																																					
Query	2213	T	A	T	T	A	C	A	T	G	G	T	C	A	T	A	G	C	T	G	2231																																						
45453	1170	.....																			1188																																						



**Titre:** Etude de la fixation du carbone inorganique chez la levure pour la production industrielle de molécules d'intérêt

**Mots clés:** Levure; CO<sub>2</sub>; malate; ingénierie métabolique; fermentation

**Résumé:** Ces dernières années ont vu un grand développement des biotechnologies blanches et de l'ingénierie métabolique avec l'objectif de remplacer les procédés de synthèse de molécules d'intérêt de l'industrie chimique classique par des voies de synthèse biologique. Dans ce contexte, les réactions anaplerotiques, qui produisent les acides dicarboxyliques, sont particulièrement intéressantes puisqu'au-delà de la production de ces molécules d'intérêt elles permettent une fixation nette de carbone, réduisant ainsi l'impact environnemental des procédés. Ce travail de thèse a donc porté sur l'élaboration d'une stratégie d'ingénierie métabolique faisant appel à des réactions de fixation de carbone inorganique chez la levure pour la production d'acide malique, une molécule plateforme ayant de nombreuses applications industrielles. La levure *Saccharomyces cerevisiae* a été choisie comme hôte pour sa commodité d'utilisation dans les procédés industriels et ses nombreux outils génétiques. L'approche développée repose sur la mise en place d'une voie de production d'acide malique par surexpression de la phosphoenolpyruvate carboxylase d'*Escherichia coli* (PEPC), de la malate déshydrogénase peroxysomale de *S. cerevisiae* relocalisée dans le cytosol (MDH) et du

transporteur d'acides dicarboxyliques de *Schizosaccharomyces pombe*. La souche de levure recombinante obtenue a été caractérisée lors d'essais en fioles, en présence notamment de carbonate de calcium pour assurer un apport de carbone inorganique. Ces essais ont permis de mettre en évidence un effet stimulant de l'apport de carbone inorganique sur la production de malate et d'obtenir des concentrations de malate de l'ordre de 2,5 g/L à partir de 50 g/L de glucose, pour un rendement maximal de 0,046 gramme de malate par gramme de glucose. Des essais en bioréacteur de 5 L en présence d'air ou d'air enrichi à 5% de CO<sub>2</sub> ont montré un effet positif de l'apport de carbone inorganique sous forme de dioxyde de carbone sur la production de malate. La concentration maximale de malate obtenue est de 1,46 g/L à partir de 50 g/L de glucose, soit un rendement de 0,029 gramme de malate par gramme de glucose. Des souches intermédiaires exprimant la PEPC et la MDH obtenues pour la production de malate ont également été caractérisées pour la production d'éthanol, car elles semblaient présenter une augmentation du rendement de production d'éthanol par effet transhydrogénase par rapport à la souche sauvage. Les essais n'ont cependant pas permis de confirmer cette augmentation de rendement.

**Title:** Study of inorganic fixation in yeast for the industrial production of molecules of interest

**Keywords:** Yeast; CO<sub>2</sub>; malate; metabolic engineering; fermentation

**Abstract :** White biotechnologies have been developing quickly during the last decades, aiming at replacing chemical syntheses by biological processes for the industrial production of target compounds. In this context, the implementation of anaplerotic reactions in the metabolism is of great interest, since those reactions allow both production of dicarboxylic acids and direct fixation of inorganic carbon. This work is about the development of a metabolic engineering strategy using inorganic carbon fixation reactions to produce malic acid, a compound with various industrial applications. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* was chosen as a host for its convenient use in industrial processes and the availability of genetic tools. The approach developed to produce malic acid is based on the overexpression of *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC), *S. cerevisiae* peroxysomale malate dehydrogenase relocated in the cytosol (MDH) and *Schizosaccharomyces pombe* dicarboxylic acid carrier. A recombinant yeast

strain expressing those three genes was obtained and characterised in shake-flasks experiments, involving more specifically calcium carbonate as an inorganic carbon source. Those experiments showed an enhancement of the malate production in the presence of calcium carbonate and allowed to obtain a concentration of 2.5 g/L from 50 g/L glucose, for a maximal yield of 0.046 gram malate per gram glucose. Fermentation experiments were performed in a 5 L bioreactor in the presence of air or 5% CO<sub>2</sub> enriched air; they confirmed the positive effect of inorganic carbon addition as CO<sub>2</sub> on malate production. A malate concentration of 1.46 g/L from 50 g/L glucose was obtained, giving a yield of 0.029 gram malate per gram glucose. Intermediate recombinant strains expressing PEPC and MDH were also characterised, for ethanol production, as they seemed to give increased ethanol yields, probably due to a transhydrogenase effect. Shake flasks and bioreactors experiments did unfortunately not confirm the yield improvement.

