



HAL
open science

Optimisation du métabolisme d'une souche d'*Escherichia coli* génétiquement modifiée pour la production de n-butanol à haut titre et rendement

Antoine Boulet

► To cite this version:

Antoine Boulet. Optimisation du métabolisme d'une souche d'*Escherichia coli* génétiquement modifiée pour la production de n-butanol à haut titre et rendement. Biotechnologies. INSA de Toulouse, 2019. Français. NNT : 2019ISAT0044 . tel-03624950

HAL Id: tel-03624950

<https://theses.hal.science/tel-03624950>

Submitted on 30 Mar 2022

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

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



THÈSE

En vue de l'obtention du **DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE**

Délivré par l'Institut National des Sciences Appliquées de
Toulouse

Présentée et soutenue par
Antoine BOULLET

Le 6 décembre 2019

**Optimisation du métabolisme d'une souche d'Escherichia coli
génétiquement modifiée pour la production de n-butanol à haut
titre et rendement**

Ecole doctorale : **SEVAB - Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et
Bioingenieries**

Spécialité : **Ingénieries microbienne et enzymatique**

Unité de recherche :
TBI - Toulouse Biotechnology Institute, Bio & Chemical Engineering

Thèse dirigée par
Isabelle MEYNIAL-SALLES

Jury

Mme Beatrice PY, Rapporteur
M. Fabien PIERREL, Rapporteur
M. Philippe SOUCAILLE, Examineur
M. Henri-Pierre FIEROBE, Examineur
Mme Isabelle MEYNIAL-SALLES, Directrice de thèse
Mme Barbara SCHOEPP COTHENET, Président

Remerciements

Je tiens à remercier le Professeur Isabelle Meynial-Salles de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce doctorat.

Je tiens à remercier le Professeur Philippe Soucaille, le Dr. Henri-Pierre Fierobe et le Dr. Isabelle André pour leurs contributions et leur implication lors de ces travaux de thèse.

Je tiens à remercier le Dr. Béatrice PY, le Dr. Fabien Pierrel et le Dr. Barbara Schoepp Cothenet de l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'être rapporteurs de cette thèse.

Je remercie également l'ensemble de mes collègues dont le travail a permis d'enrichir ce manuscrit de thèse : Antoine Remy, Céline, Mailys, Lizeth, Guillaume Bergler, Nicolas Canu, Fabrizia, Aline, Adrien, Simon, Caroline Perdu, Antoine Rivière, Romain et Nicolas Vita.

Je remercie l'ensemble de mes collègues de TBI, et en particulier les membres de l'EAD3 qui m'ont aidé et soutenu au cours de cette thèse : Julie, Tom, Caroline, Guillaume, Gaoxin, Célia, Maya, Charles, Damien, Cécile, Sylvain, Christian, Minyeong, Thao, Emma et tous les autres...

Merci aux Toulousains d'avoir été présents lors de cette thèse, pour avoir partagé nos anecdotes de thésards, et pour avoir apporté une cohésion à notre groupe.

Merci à Erwan et Antoine pour m'avoir soutenu pendant cette thèse, et permis de décompresser en allant surfer.

Merci à mes parents et à ma sœur pour avoir été présents pour m'encourager, me motiver, et m'accompagner à chaque étape de ce parcours du combattant.

Merci à Joëlle, je n'aurais jamais été si loin sans toi.

Spécialité : Ingénieries microbienne et enzymatique

Prénom : Antoine

Nom : Boulet

Titre : Optimisation du métabolisme d'une souche d'*Escherichia coli* génétiquement modifiée pour la production de n-butanol à haut titre et rendement

Année : 2019

Lieu : INSA TOULOUSE

Résumé :

Dans le cadre du développement durable, la production de n-butanol par voie biologique est une alternative écologique par rapport à sa synthèse par voie pétrochimique. Il existe des microorganismes naturellement capables de produire du butanol, tels que les *Clostridia*, bactéries Gram positif, ayant une croissance strictement anaérobie. Ils produisent du butanol au travers d'une fermentation produisant un mélange d'acétone, de butanol et d'éthanol. La production de butanol en mélange avec d'autres molécules diminue le rendement de production en butanol et augmente le coût de purification. En 2015, l'équipe PEEP de TBI a construit une souche d'*E. coli* génétiquement modifiée exprimant la voie complète de conversion du pyruvate en n-butanol de *C. acetobutylicum*. Le métabolisme de cette souche a été conçu pour que les vitesses de croissance et de consommation du glucose soient couplées à la vitesse de production du butanol. En croissance en anaérobiose stricte en culture discontinue dans un milieu chimiquement défini à base de glucose supplémenté en extrait de levure (YE) et nitrate (NO_3^-), cette souche produit 3,3 g/L de butanol à un rendement de 0,23 g butanol /g glucose, en présence de coproduits minoritaires (succinate, lactate, acétate, butyrate). Ces coproduits diminuent le rendement de production en butanol et restent inattendus car les voies métaboliques correspondantes ont été supprimées. L'objectif de ce projet de thèse est d'identifier les voies métaboliques impliquées dans la production de ces coproduits et d'améliorer la compréhension du métabolisme de cette souche, afin de l'optimiser, d'augmenter le rendement butanol/glucose, et de simplifier le milieu de culture. Plusieurs pistes ont été envisagées : i) Expression de ferrédoxines NAD(P)⁺ oxydoréductases (FNOR) issues d'organismes autres que *C. acetobutylicum* dans l'objectif de coupler l'étape de réoxydation de la ferrédoxine réduite à la production d'ATP ; ii) Inactivation des voies métaboliques d'*E. coli* susceptibles d'être impliquées dans la synthèse des coproduits ; iii) Evolution adaptative *in vivo* de la souche, afin d'améliorer ses performances et accroître sa tolérance au butanol dans le milieu supplémenté avec YE et NO_3^- , puis iv) Evolution adaptative *in vivo* de la souche dans le milieu sans supplémentation. Ces stratégies ont conduit à i) La construction d'une nouvelle souche d'*E. coli* dont la croissance anaérobie dépend de la fonctionnalité d'une FNOR : la FNOR de *C. acetobutylicum*, le complexe Rnf de *C. ljungdahlii* et la FNOR de *C. tepidum* ont été évaluées. Cette approche a conduit à la sélection d'un mutant de la FNOR de *C. tepidum*, ayant une activité ferrédoxine NAD⁺ réductase 2,2 fois supérieure à celle de l'enzyme native. Cette FNOR mutante a ensuite été exprimée dans la souche d'*E. coli* Butanol en remplacement de la FNOR de *C. acetobutylicum*. La caractérisation de son phénotype a montré sa capacité à produire 3 g/L de butanol à un rendement de 0,26 g/g ; ii) La délétion des gènes *zwf* et *mdh* dans la souche Butanol a permis d'augmenter le titre en butanol produit à 6 g/L et le rendement à 0,33 g/g ; iii) L'évolution adaptative *in-vivo* de la souche d'*E. coli* Butanol en culture continue, dans le milieu supplémenté avec YE et Ni, a conduit à la sélection d'une population évoluée produisant 11 g/L de butanol à un rendement de 0,34 g/g. Le séquençage complet des génomes de clones isolés à partir de cette population a conduit à l'identification de mutations dans deux gènes, *yqhC* et *lptG*, potentiellement impliquées dans les performances de la souche ; iv) L'évolution adaptative *in-vivo* de la souche Butanol dans le milieu sans supplémentation a conduit à la sélection de clones évolués produisant 2,5 g/L de butanol à un rendement de 0,28 g/g en culture discontinue. A notre connaissance, la production maximale de butanol reportée, couplée à la croissance anaérobie chez *E. coli*, ne dépasse pas 0,6 g/L, en milieu chimiquement défini à base uniquement de glucose.

Mots-clés : Ingénierie métabolique ; *Escherichia coli* ; éthanol ; n-butanol ; métabolisme anaérobie ; Ferrédoxine NAD(P)⁺ oxydoréductase ; Rnf

Lieu des travaux de recherche :

TBI, Toulouse Biotechnology Institute, Bio & Chemical Engineering, UMR5504, UMR792, CNRS, INRA, INSA, 135 avenue de Rangueil, 31400 Toulouse, France

Titre de la thèse en anglais : Metabolic optimization of an *Escherichia coli* strain engineered for n-butanol production at high yield and titer

Abstract:

When it comes to sustainable development, n-butanol production by biological means represents an environmentally friendly alternative compared to petrochemical means. Some organisms are able to produce butanol naturally, such as the *Clostridiace* family, which are Gram-positive bacteria, growing in strict anaerobic conditions. They produce butanol in mixture with acetone and ethanol, which reduce the production yield of butanol and increase the purification costs. In 2015, the PEEP team of TBI built a genetically modified strain of *E. coli*, expressing the complete conversion pathway from pyruvate to butanol from *C. acetobutylicum*. This strain's metabolism was built so that the growth and glucose consumption speeds are coupled with the butanol production speed. In strict anaerobic growth in batch culture, in a chemically defined medium based on glucose and supplemented with yeast extracts (YE) and nitrate (NO_3^-), this strain produces 3,3 g/L of n-butanol, with a yield of 0,23 g butanol/g glucose, among other minority coproducts (succinate, lactate, acetate, butyrate). These coproducts lower the butanol production yield, and remain unexpected, because the corresponding metabolic pathways were deleted. The goal of this PhD project consists in identifying the metabolic pathways involved in the coproducts production and improving the understanding of the strain, in order to optimize it, improve the butanol/glucose yield, and simplify the culture medium. Several aspects are considered: expressing ferredoxin NAD(P)^+ oxidoreductases (FNOR) from organisms other than *C. acetobutylicum*, in order to combine the reoxidation of the reduced ferredoxin to the generation of ATP; ii) inactivating the metabolic pathways from *E. coli* which may be involved in the coproducts synthesis; iii) performing an evolutionary *in-vivo* adaptation of the strain, in order to improve its performances and increase its tolerance to butanol in a chemically defined medium supplemented with YE and NO_3^- , and then iv) performing an evolutionary adaptation of the Butanol strain to allow its growth in the chemically defined medium without any supplementation. These strategies lead to i) the construction of a new *E. coli* strain, with its anaerobic growth depending on the functionality of an FNOR: the FNOR from *C. acetobutylicum*, the Rnf complex from *C. ljungdahlii* and the FNOR from *C. tepidum* were assessed. This work lead to the selection of a mutant of the FNOR from *C. tepidum*, which has a ferredoxin NAD^+ reductase activity 2,2 times higher than the native enzyme. This mutant FNOR was then expressed in the *E. coli* strain producing butanol, as a replacement of *C. acetobutylicum*'s. The characterization of its phenotype demonstrated its capacity to produce 3 g/L of butanol, with a yield of 0,26 g/g; ii) the deletion of the genes *zwf* and *mdh* in the Butanol strain also lead to an improvement of the production in butanol up to 6 g/L, and of the yield up to 0,33 g/g; iii) the *in-vivo* evolution of the Butanol strain, in continuous culture (chemostat) with regulated pH, in the medium supplemented with YE and Ni, lead to the selection of an evolved strain producing up to 11 g/L of butanol, and a yield of 0,34 g/g. The complete sequencing of the genomes of the clones isolated from this population lead to the identification of mutations in two genes, *yqhC* and *lptG*, potentially involved in the strain's performances; iv) the *in-vivo* adaptation of the Butanol strain in the medium without any supplementation lead to the selection of a evolved clones producing 2,5 g/L of butanol, and a yield of 0,28 g/g in batch culture. To our knowledge, the highest production of butanol observed coupled with anaerobic growth in *E. coli* does not exceed 0,6g/L, in a chemically defined medium base on glucose without any supplementation.

Key words: Metabolic engineering; *Escherichia coli*; n-butanol; ethanol; Anaerobic metabolism; Ferredoxin NAD(P)^+ oxidoreductase; Rnf

PUBLICATIONS

Ferredoxin NAD(P)⁺ oxidoreductases: key enzymes in anaerobic bacterial world

Antoine Boulet, Isabelle Meynial-Salles

A soumettre avant fin 2019

Development of a new engineered *E. coli* chassis strain for *in vivo* functional screening and directed evolution of Ferredoxin NAD(P)⁺ oxidoreductases

Antoine Boulet, Céline Foulquier, Antoine Rémy, Caroline Perdu, Simon Brège, Isabelle André, Philippe Soucaille, Isabelle Meynial-Salles

A soumettre avant fin 2019

COMMUNICATIONS par AFFICHES

A Novel Ferredoxin NADP⁺ Reductase for Bioethanol Production at High Yield in Engineered *Escherichia coli* Grown in Glucose Mineral Medium

Antoine Boulet, Céline Foulquier, Philippe Soucaille, Isabelle Meynial-Salles. (2018)

Metabolic Engineering 12 conference, Systems Metabolic Engineering for Superior Bio-Production, Munich, Allemagne

Table des matières

Titre : Optimisation du métabolisme d'une souche d' <i>Escherichia coli</i> génétiquement modifiée pour la production de n-butanol à haut titre et rendement.....	4
PUBLICATIONS.....	6
COMMUNICATIONS par AFFICHES.....	6
Présentation du projet de recherche.....	14
1. Introduction.....	14
2. Objectifs des travaux de recherche.....	18
Chapitre I : Introduction bibliographique.....	24
1. <i>Escherichia coli</i> : Physiologie et métabolisme.....	24
1.1. Introduction.....	24
1.2. Le métabolisme d' <i>E. coli</i>	25
1.2.1. Mécanismes de transport et utilisation des sucres.....	26
1.2.2. Les voies métaboliques chez <i>E. coli</i>	28
1.2.2.1. La glycolyse.....	28
1.2.2.2. Le cycle de Krebs.....	30
1.2.2.3. La voie des pentoses phosphates.....	31
1.2.2.4. Entner-Doudoroff.....	34
1.2.3. Respiration et fermentation.....	35
1.2.4. Regulation de la biogénèse des centres Fer-Soufre (Fe-S) par IscR.....	38
1.2.5. Les transhydrogénases (UdhA et PntAB).....	40
1.2.5.1. La transhydrogénase membranaire PntAB.....	41
1.2.5.2. La transhydrogénase soluble UdhA.....	42
1.2.5.3. Régulation de l'expression des transhydrogénases chez <i>E. coli</i>	46
1.2.5.4. Evolution adaptative des transhydrogénases et de leur régulation.....	47
2. Le choix d' <i>Escherichia coli</i> comme « châssis » pour l'ingénierie métabolique.....	49
2.1. Modèle informatique du métabolisme à l'échelle du génome.....	50
Application.....	51
Utilisation des GEM chez <i>E. coli</i> pour.....	51
Limitation des GEM.....	51
2.2. Ingénierie métabolique d' <i>Escherichia coli</i> pour la production d'éthanol et de butanol... 54	54
2.2.1. La production d'éthanol par voie fermentaire.....	54
2.2.1.1. Ingénierie métabolique d' <i>E. coli</i> pour la production d'éthanol à partir de glucose	55
2.2.1.1.1. Seconde génération de souches éthanologéniques : Intégration de l'opéron PET dans le génome.....	56
2.2.1.1.2. Construction de souches éthanologéniques à partir d' <i>E. coli</i> K12.....	57

2.2.1.4.	Troisième génération de souche éthanologénique : Amélioration des performances lors de la culture en milieu chimiquement défini	58
2.2.1.5.	Utilisation de la lignocellulose par les souches éthanologéniques sans prétraitement	60
2.2.2.	La production de n-butanol par voie fermentaire.....	61
2.2.2.1.	Bactéries naturellement productrices de n-butanol.....	61
2.2.2.1.1.	Ingénierie métabolique des bactéries naturellement productrices de n-butanol afin d'augmenter la concentration finale et le rendement.....	63
2.2.2.2.	Production hétérologue de n-butanol	66
2.2.2.2.1.	Ingénierie métabolique d' <i>E. coli</i> pour la production de n-butanol.....	67
2.2.2.2.2.	Optimisation de la production en n-butanol chez <i>E. coli</i>	68
2.2.2.3.	Production hétérologue de n-butanol à partir de substrats complexes et diminution des nutriments requis.....	76
2.2.2.4.	Identification d'une enzyme clef de <i>C. acetobutylicum</i> de la voie de conversion CoA dépendante de l'acétyl-CoA en n-butanol.....	78
2.2.2.5.	Production hétérologue de n-butanol à l'aide de la voie des céto-acides.....	81
2.2.2.6.	Bilan de la production hétérologue de n-butanol chez <i>E. coli</i>	82
2.2.3.	Augmentation de la tolérance au butanol chez <i>E. coli</i>	83
3.	Les Ferrédoxines NAD(P) ⁺ oxydoréductase, enzymes clefs du métabolisme anaérobie (Revue)	87
3.1.	Introduction.....	87
3.2.	Revue bibliographique.....	87
	Introduction.....	88
I.	Ferredoxin-NAD(P) ⁺ oxidoreductases (FNORs).....	92
a.	Classification.....	93
b.	Structure.....	96
c.	Function.....	98
d.	Identification and characterization of FNOR in anaerobes	100
e.	Metabolic engineering strategies using overexpression of FNOR to modify electron fluxes .	103
II.	Electron-Bifurcating NADH-dependent reduced ferredoxin:NADP ⁺ oxidoreductase (Nfn)	105
a.	Structure.....	105
b.	Classification.....	107
c.	<i>In vivo</i> functionality of Nfn in the metabolism of anaerobic bacteria	107
d.	Metabolic engineering strategies using Nfn complex.....	109

III.	Membrane-bound, ion-translocating ferredoxin:NAD ⁺ oxidoreductase (Rnf).....	111
	Ferredoxin:NAD ⁺ oxidoreductase activity assays	114
a.	Structure/function.....	114
b.	Roles of the Rnf complex in anaerobe organisms.....	116
	Role of the Rnf complex in <i>A. woodii</i> metabolism	116
	Role of the Rnf complex in <i>Clostridium ljungdahlii</i> metabolism	118
c.	Metabolic engineering using overexpression of Rnf complex	119
	Conclusion	120
	Chapitre II : Matériel & Méthodes	124
1.	Souches et amorces PCR	124
1.1.	Liste des souches utilisées.....	124
1.2.	Liste des plasmides utilisés.....	128
1.3.	Liste des RBS optimisés	130
1.4.	Liste des amorces PCR utilisées.....	131
2.	Milieux de culture.....	136
2.1.	Milieux solides	136
2.2.	Milieux liquides.....	136
2.3.	Utilisation d'antibiotiques	137
3.	Conditions de cultures.....	138
3.1.	Conservation des souches d' <i>E. coli</i>	138
3.2.	Conditions de croissance des souches <i>E. coli</i> TOP10, et des souches de production pour leur construction	138
3.3.	Conditions de croissance des souches de production d' <i>E.coli</i>	138
3.4.	Cultures continues en fermenteur	139
4.	Techniques de génie génétique	140
4.1.	Isolement et manipulation des acides nucléiques	140
4.1.1.	Mini et Midi-préparations d'ADN plasmidique d' <i>E. coli</i>	140
4.1.2.	Détermination de la concentration en ADN.....	140
4.1.3.	Techniques de clonage	140
4.1.4.	Amplification de fragments d'ADN par réaction de PCR.....	141
4.2.	Construction des plasmides	141
4.2.1.	Construction des plasmides exprimant les gènes codant pour les protéines des complexe Rnf (<i>PL016, PL019 et PL033</i>)	141
4.2.2.	Construction des plasmides exprimant les <i>fnor</i> (<i>PL024 et PL048</i>)	142
4.2.3.	Construction des plasmides pour la production de la transhydrogénase UdhA.....	143
4.2.4.	Modification du plasmide <i>pCF3*</i>	144

4.3.	Transformation des souches d' <i>E. coli</i>	144
4.3.1.	Transformation par choc thermique.....	144
4.3.2.	Transformation par électroporation.....	145
4.4.	Construction de simples mutants par remplacement du gène d'intérêt par une cassette de résistance à un antibiotique.....	145
4.5.	Délétion de gènes par transduction généralisée à l'aide du phage P1.....	146
4.5.1.	Préparation d'un lysat de phages P1.....	146
4.5.2.	Transduction en utilisant un lysat de phages.....	146
4.6.	Élimination des marqueurs de résistance grâce à l'expression de la FLP recombinase portée par le plasmide pCP20.....	147
5.	Méthodes de biochimie.....	148
5.1.	Préparation des extraits acellulaires pour les tests d'activité sur la transhydrogénase.....	148
5.2.	Préparation des extraits acellulaires pour les tests d'activité FNOR (Ferredoxin NAD(P) ⁺ oxydoréductase).....	148
5.3.	Purification de la transhydrogénase d' <i>E. coli</i>	149
5.4.	Analyse des protéines.....	150
5.4.1.	Concentration en protéines.....	150
5.4.2.	Détermination du poids moléculaire des protéines par chromatographie d'exclusion stérique (SEC).....	150
5.4.3.	Analyse sur gel dénaturant de polyacrylamide (SDS-PAGE) des protéines.....	151
5.5.	Mesure des activités enzymatiques.....	151
5.5.1.	Détermination de l'activité transhydrogénase sur extrait acellulaires et protéines purifiées.....	151
5.5.2.	Détermination de l'activité FNOR sur extrait acellulaire.....	152
5.6.	Dosage des substrats et des produits de fermentation.....	153
5.7.	Analyse de l'expression des gènes Rnf par immunodétection.....	154
5.7.1.	Préparation des échantillons pour le Western-blot.....	155
5.7.2.	Western-blot des protéines composant le complexe Rnf.....	156
6.	Modélisation moléculaire.....	157
7.	Séquençage complet du génome d' <i>E. coli</i>	157
7.1.	Préparation de l'ADN génomique.....	158
7.2.	Analyse des résultats.....	159
7.3.	Validations des mutations par séquençage de Sanger.....	159
Chapitre III : Développement d'une souche d' <i>E. coli</i> châssis pour le criblage <i>in vivo</i> de ferrédoxine NAD(P) ⁺ oxydoréductases fonctionnelles.....		
1.1.	Introduction.....	162
1.2.	Résultats.....	163
A.	Introduction.....	163
B.	Material and methods.....	167
a)	Strains and Plasmids.....	167

b)	Plasmid/pathway construction	170
i)	Construction of Rnf vectors pPL016, pPL019 and pPL033	170
ii)	Construction of pPL024	171
iii)	Construction of pPL048	171
iv)	Construction of <i>pPAL7_UdhA vectors</i>	171
c)	Medium and cell culturing.....	172
d)	Enzymology and protein purification	172
e)	Protein 3D modelling.....	174
f)	Genomic sequencing with Ion torrent	174
g)	Analytical methods.....	174
h)	Immunodetection of Rnf complexes by Western blot	175
C.	Results and discussion.....	175
a)	Construction of the growth-based selection engineered <i>E. coli</i> strain platform for the screening <i>in vivo</i> of functional Ferredoxin NAD(P) ⁺ reductases screening under anaerobic conditions.....	175
b)	Phenotype characterization of the ST034 strain expressing different FNORs from a plasmid grown on glucose mineral medium with yeast extract and nitrate under strict anaerobic conditions.....	177
c)	<i>In-vivo</i> adaptive evolution of the growth-based selection platform expressing a functional FNOR	180
d)	Identification of genetic targets responsible for <i>E. coli</i> adaptive evolution using genome-wide analysis.....	182
e)	Role of the mutations in the adaptation for the growth in mineral medium	183
f)	Functional characterization of the mutation found in the transhydrogenase UdhA.....	184
g)	Purification and characterization of UdhA and UdhA R455Q proteins.....	185
h)	Insight into the dimerization interaction of UdhA	187
i)	Functional characterization of the (Δ N264) Ferredoxin NAD(P) ⁺ oxidoreductase variant from <i>C. tepidum</i>	189
D.	Conclusion	190
	Acknowledgments.....	191
E.	Supplementary material.....	191
1.3.	Discussion	194
	Chapitre IV : Production hétérologue de n-butanol chez <i>E. coli</i> à l'aide la voie complète de conversion du pyruvate en n-butanol de <i>C. acetobutylicum</i>	198
1.	Evaluation <i>in-vivo</i> des performances de la souche <i>E. coli</i> MG1655 Δ <i>ldhA</i> , Δ <i>pflAB</i> , Δ <i>ack-pta</i> , Δ <i>iscR</i> , Δ <i>frdabcd</i> , Δ <i>aceE</i> , Δ <i>mgsA</i> , Δ <i>adhE</i> Δ <i>melB::TT02 ptrc01/RBS01*2crt-hbd ptrc30RBS01*2atoB pCF3* udhA R455L</i> (ST001) en culture discontinue sans régulation de pH	198
1.1.	Reséquençage complet de l'ADN génomique de la souche ST001	202
1.2.	Etude de l'impact de la mutation Arg455Leu sur l'activité catalytique d'UdhA identifiée lors du reséquençage de l'ADN génomique de la souche ST001 après culture en anaérobiose	205
1.2.1.	Purification et caractérisation d'UdhA Arg455Leu.....	205
1.2.2.	Modélisation de la structure d'UdhA Arg455Leu.....	207

2. Évaluation et évolution <i>in-vivo</i> des performances de la souche ST001 en culture continue à pH régulé dans un milieu chimiquement défini à base de glucose supplémenté avec 4g/L d'extrait de levure et 5 à 10mM de nitrate.	208
2.1. Ré-isolément et caractérisation de clones à partir de la population évoluée : identification des cibles de l'évolution :	213
2.1.1. Séquençage complet des ADN génomiques extraits des clones ré-isolés EARY-55-1 et EARY-55-2.....	215
3. Simplification du milieu de culture : adaptation de la croissance de la souche Butanol dans un milieu de culture chimiquement défini à base de glucose sans extrait de levure et sans nitrate..	221
3.1. Evolution adaptative <i>in vivo</i> de la souche Butanol en culture discontinue sans régulation de pH dans le milieu chimiquement défini sans supplémentation en extrait de levure ni nitrate	222
3.1.1. Ré-isolément de clones à partir de la population évoluée capable de croître et de produire du butanol en anaérobiose lors de la culture dans le milieu chimiquement défini à base de glucose sans supplémentation en extrait de levure et sans apport de nitrate	226
3.1.2. Séquençage complet de l'ADN génomique extrait du clone ré-isolés ST023-5	227
3.2. Évaluation des performances de la souche ST023-5 en culture continue en anaérobiose dans le milieu chimiquement défini à base de glucose sans supplémentation en extrait de levure et en nitrate.....	229
3.2.1. Séquençage complet de l'ADN génomique extrait de la population évolué ST025	231
4. Identification de voies métaboliques susceptibles de favoriser la production de succinate, lactate, et acétate dans la souche ST001	232
4.1. Inactivation de la pyruvate kinase II: PykA.....	232
4.2. Inactivation de la voie des pentoses phosphates.....	235
4.3. Inactivation de la malate déshydrogénase : Mdh	241
4.3.1. Séquençage complet de l'ADN génomique extrait du clone ré-isolé ST160-10.4 :.	246
4.3.1.1. Etude de l'impact du transposon dans UdhA, surexprimé dans le vecteur pCF3*udhA identifié dans la souche ST160-10, sur l'activité catalytique de la transhydrogénase.....	247
5. Modification de la voie métabolique de conversion du pyruvate en n-butanol dans la souche ST001 :	247
6. Production de n-butanol à partir de cellobiose	252
7. Bilan des souches construites au cours de cette étude produisant du butanol	254
Conclusion générale	256
Références bibliographique	261
Liste des Figures	305
Liste des Tableaux	310
Abréviations	314

Présentation du projet de recherche

1. Introduction

Le n-butanol est un alcool aliphatique saturé composé de 4 atomes de carbone, sa formule moléculaire est C_4H_9OH et sa masse moléculaire est de 74,12 g/mol. Il est utilisé comme synthon pour la synthèse de composés tels que l'acrylate, et l'ester de méthacrylate. Le butanol est utilisé directement dans la fabrication d'adhésif, de revêtement industriel, de laques pour la peinture, dans les parfums, et également comme arôme artificiel de fruits. Le butanol présente également des caractéristiques énergétiques proches de l'essence, qui en font un candidat de remplacement au carburant fossile. Cependant, le n-butanol est produit aujourd'hui majoritairement par voie pétrochimique. Il existe 3 procédés industriels majeurs pour la production de n-butanol par voie pétrochimique : (a) par oxo synthèse à partir de propène, (b) par la voie de synthèse Reppe, et (c) par l'hydrogénation du crotonaldéhyde. Ces trois procédés sont représentés en Figure 1.

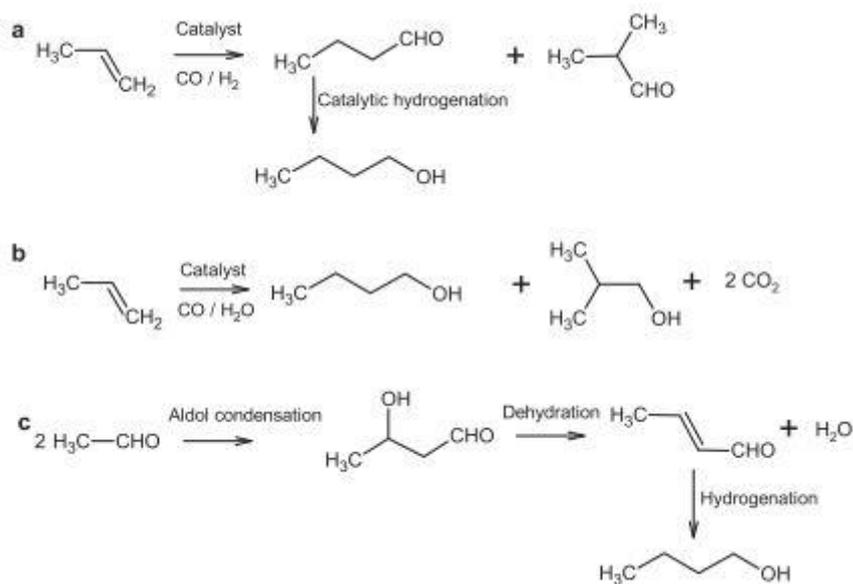


Figure 1 : Procédés pétrochimiques pour la production de 1-butanol : (a) oxo synthèse, (b) synthèse Reppe et (c) hydrogénation du crotonaldéhyde. D'après (Uyttebroek *et al.*, 2015).

La production de 1-butanol par oxo synthèse est le procédé de production le plus communément utilisé. La première étape de l'oxo synthèse est une hydroformylation du propène, qui est suivie par une hydrogénation des aldéhydes formés. Des catalyseurs tels que le Co, Rh ou Ru sont utilisés pour ajouter le monoxyde de carbone et l'hydrogène à la double liaison C-C dans la phase liquide contenant le propène. Cette catalyse forme un mélange isomérique d'aldéhydes (1-butanol et 2-méthylpropanal) qui, après hydrogénation, forme les alcools correspondants (1-butanol et isobutanol). Ce procédé,

utilisé depuis les années 70, a été optimisé au cours du temps afin de favoriser la production de 1-butanol par rapport à l'isobutanol. Initialement, le rendement était de 75% de 1-butanol pour 25% d'isobutanol, et il est aujourd'hui de 95% de 1-butanol pour 5% d'isobutanol (Uyttebroek *et al.*, 2015). Ce procédé se déroule à une température comprise entre 100 et 180° en présence d'un gaz contenant un mélange CO/H₂. L'optimisation du procédé a consisté à diminuer la pression du gaz contenant le mélange CO/H₂, à une pression de 1 à 5 MPa (par rapport à 20 à 30 MPa pour le procédé initial), et à utiliser un catalyseur Rh. En 2010, les sociétés BASF, Oxea Group et Dow Chemical Company étaient les plus gros producteurs mondiaux de butanol utilisant ce procédé (Uyttebroek *et al.*, 2015).

Historiquement, avant les années 50, la production du butanol par voie pétrochimique était effectuée par l'hydrogénation du crotonaldéhyde formé après la condensation aldolique et la déshydratation d'acétaldéhyde. Cependant, la découverte de la voie de synthèse du butanol par Walter Reppe en 1952 (Reppe *et al.*, 1955), puis la découverte de l'oxo synthèse ont conduit à l'abandon de la production du n-butanol à partir de l'hydrogénation du crotonaldéhyde.

Dans le procédé de synthèse Reppe, la carbonylation du propène est effectuée en faisant réagir le propène, le monoxyde de carbone, et de l'eau, à une pression de 0,5 à 2 MPa et une température de 100°C en présence d'un catalyseur composé d'ammonium quaternaire ou de carbonyle ferrique polynucléaire. Ce procédé permet de produire un mélange de butanol et d'isobutanol à un rendement de 86% de 1-butanol pour 14% d'isobutanol. La production de butanol par la voie de synthèse Reppe fut utilisée à l'échelle industrielle par BASF jusqu'en 1984, puis remplacée par le procédé d'oxo synthèse en raison du coût plus attractif de ce dernier (Uyttebroek *et al.*, 2015; Weissermel and Arpe, 2003).

Cependant, devant les problèmes de répartition et de raréfaction des énergies fossiles, ainsi que les préoccupations environnementales, la production de n-butanol par voie pétrochimique n'est pas viable au long terme, et une solution utilisant une source d'énergie renouvelable est nécessaire. La production du n-butanol par voie fermentaire, à partir d'une source de carbone renouvelable, est une alternative à l'utilisation des ressources pétrochimiques. Il existe des organismes capables de produire du n-butanol naturellement, tels que les *Clostridia*, qui sont des bactéries Gram positif, formant des spores et ayant une croissance strictement anaérobie, au travers d'une fermentation dite ABE car produisant un mélange d'Acétone, de Butanol et d'Ethanol. Ces bactéries sont capables de produire du butanol à partir de sources de carbone variables, telles que les molasses, l'amidon de maïs, ou le glucose, mais elles ne sont pas capables d'utiliser la cellulose directement comme source de carbone.

Parmi les *Clostridia*, *Clostridium acetobutylicum* est déjà utilisée à l'échelle industrielle depuis la 1^{ère} guerre mondiale, dans un procédé dit « de Weizmann », qui permet de produire un mélange d'acétone, de butanol et d'éthanol. Ce procédé est représenté en Figure 2.

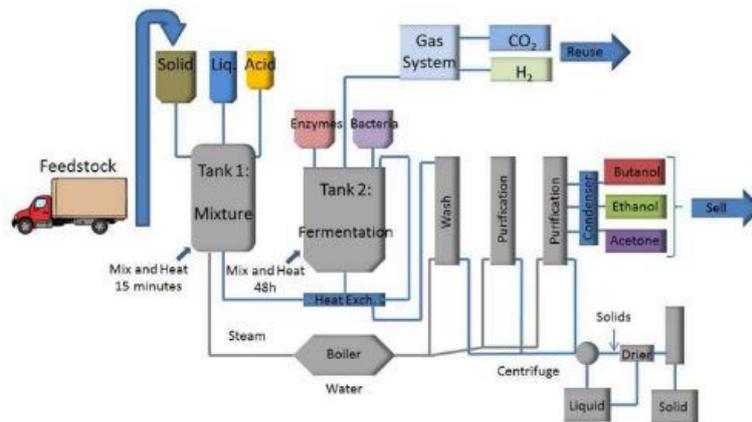


Figure 2 : Procédé de Weizmann pour la production d'acétone, butanol et éthanol par voie fermentaire. D'après (Trindade and Santos, 2017).

Jusqu'aux années 50, les deux tiers de la production mondiale de butanol étaient réalisés par fermentation. Cependant, à partir de 1960, la production de n-butanol par fermentation avait pratiquement cessé, en raison de la baisse du prix du pétrole ainsi que l'amélioration du procédé de synthèse chimique, diminuant le coût de la synthèse du butanol par cette voie. De plus, une montée des prix des matières premières utilisées comme sources de carbone pour la fermentation a entraîné l'arrêt des procédés de synthèse de butanol par fermentation (Jones and Woods, 1986).

La production de n-butanol par fermentation a récemment connu un nouvel essor, en raison des propriétés du butanol comme substitut à l'essence. Le butanol peut être utilisé pur, ou mélangé avec l'essence à n'importe quelle concentration, alors que l'éthanol ne peut être mélangé que jusqu'à 85% (Dürre, 2007). De plus, le butanol pur ou mélangé à l'essence est déjà compatible avec les moteurs à essence utilisés actuellement, et ne nécessite pas leur modification (Trindade and Santos, 2017). La pression de vapeur du butanol (0,53 kPa à 20°C (Yan and Liao, 2009)) est inférieure à celle de l'éthanol (5,8 kPa à 20°C), ce qui limite les risques lors du transport et de la manipulation. Le butanol n'est pas hygroscopique, contrairement à l'éthanol, permettant d'effectuer le mélange essence-butanol directement en raffinerie et de stocker le mélange, alors que le mélange essence-éthanol doit être effectué peu de temps avant l'usage. Le butanol est également moins corrosif et peut donc être utilisé dans les infrastructures actuellement utilisées pour l'essence sans modification (cuves, conduites, pompes, stations-services...). La teneur énergétique du butanol (29,2 Mj/L) est similaire à celle de

l'essence (32,5 Mj/L) alors que celle de l'éthanol est inférieure (21,2 Mj/L). Le Tableau 1 résume les propriétés du butanol et de l'éthanol en comparaison avec l'essence.

Carburant	Teneur énergétique (Mj/L)	Ratio Air-carburant	Indice d'octane
Essence	32,5	14,6	91-99
Ethanol	21,2	3,0	129
Butanol	29,2	11,2	96

Tableau 1 : Comparaison entre l'essence et les biocarburants. D'après (Dürre, 2007)

Entre 2005 et 2007, les sociétés BP et Dupont ainsi que le gouvernement chinois ont ré-ouvert des usines pour une production de n-butanol par voie fermentaire (Dürre, 2007; Trindade and Santos, 2017). La décision de relancer la production de n-butanol par voie fermentaire était guidée par un prix du pétrole élevé à cette époque, ainsi que par plusieurs crises pétrolières. Cependant, le prix du pétrole est rapidement redescendu, rendant la production de n-butanol par voie fermentaire économiquement moins intéressant par rapport à la synthèse pétrochimique, entraînant la fermeture des usines.

Malgré ce revirement, de nombreux efforts ont été réalisés afin d'améliorer le titre et le rendement en n-butanol produit par *C. acetobutylicum*, dans le but de le rendre économiquement viable par rapport à la synthèse pétrochimique (Nguyen *et al.*, 2018). Le coût majoritaire de la production du n-butanol étant la distillation (Uyttebroek *et al.*, 2015), réalisée afin de séparer le butanol du milieu de culture, d'importantes recherches ont été entreprises afin d'améliorer le procédé d'extraction. De plus, le procédé de production a également fait l'objet d'importantes recherches afin d'augmenter la quantité et le rendement en butanol produit, afin d'améliorer la rentabilité du procédé. Le Tableau 2 liste les prix de l'éthanol et du n-butanol sur le marché international en 2016.

Produit	Prix international en 2016
Ethanol	\$0.66/L
n-Butanol (Synthèse chimique)	\$1.34/L
n-Butanol (Bioproduction)	\$0.83/L

Tableau 2 : Prix de l'éthanol et du n-butanol sur le marché international. D'après (Trindade and Santos, 2017).

Suite à des travaux d'ingénierie métabolique et à l'amélioration du procédé d'extraction du butanol, on observe que la production de n-butanol par voie fermentaire, en 2016, était concurrentielle par rapport à la production de n-butanol par voie pétrochimique, mais pour utiliser le butanol comme biocarburant, son prix devait encore se rapprocher de celui de l'éthanol, qui restait inférieur à celui du butanol produit par voie fermentaire. Cependant, le prix du butanol issu de la synthèse pétrochimique

est toujours lié au prix du pétrole, ce qui peut aboutir à un prix inférieur à celui du n-butanol produit par fermentation lorsque le prix du pétrole est faible. Par exemple, sur la période entre 2012 et 2014, le prix du baril était compris entre \$100 et \$140, puis il a chuté à une valeur comprise entre \$40 et \$70 entre les années 2015 et 2017. Par ailleurs, le prix du butanol produit par fermentation fluctue également en fonction du prix de la matière première utilisée comme source de carbone. Pour reprendre l'exemple de l'année 2016 (Tableau 2), 1 tonne de cannes à sucre coûtait \$27,26 et 1 tonne de sucre raffiné coûtait \$480 sur le marché international (Trindade and Santos, 2017). Comparativement, c'est le prix de matière première le plus bas qui rendra un procédé plus intéressant que l'autre.

C'est l'ingénierie du métabolisme de *C. acetobutylicum* qui a permis de rendre la production de n-butanol compétitive par rapport à la production pétrochimique. Cependant, la production de coproduits, dont l'acétone et l'éthanol produits lors de la fermentation ABE de *C. acetobutylicum*, représente un frein à l'utilisation du n-butanol comme biocarburant en augmentant le coût de purification du butanol.

Une alternative, afin de produire du butanol comme unique produit de fermentation, est d'exprimer la voie complète de conversion du pyruvate en n-butanol de *C. acetobutylicum* de façon hétérologue dans d'autres organismes. Cette stratégie d'expression hétérologue devrait permettre de générer une souche homoproductrice de n-butanol, et de contourner la régulation de la voie métabolique chez l'organisme hôte. Cette voie hétérologue de conversion du pyruvate en n-butanol de *C. acetobutylicum* a été introduite dans divers organismes, dont les organismes modèles *Escherichia coli* (Inui *et al.*, 2008) et *Saccharomyces cerevisiae* (Nielsen *et al.*, 2009). Dans un premier temps, la production de butanol chez ces organismes est restée faible, de l'ordre de quelques mg/L de butanol produit. Par la suite, les étapes limitantes de la voie ont été identifiées, et les efforts se sont concentrés sur la production de n-butanol chez *E. coli* (Atsumi *et al.*, 2008a). L'ingénierie du métabolisme central d'*E. coli* a permis d'orienter le flux de carbone vers la production de n-butanol, pour la favoriser. Ainsi, plusieurs souches d'*E. coli* ont été construites par différents laboratoires, avec des stratégies de construction et d'expression des gènes variables, qui sont décrites en détail dans le Chapitre I, partie 2.2. Ces souches permettent de produire entre 10 et 20 g/L de n-butanol sans production d'acétone, ce qui en fait d'excellents candidats pour concurrencer la production de n-butanol par *C. acetobutylicum*.

2. Objectifs des travaux de recherche

Le présent projet de thèse est intégré dans le cadre du projet ANR Cellutanol, intitulé « Creation of an engineered cellulosome-bearing strain of *Escherichia coli* for the production of cellulosic butanol ». Ce projet ANR a pour objectif de développer un procédé de production d'un biocarburant de seconde

génération, qui utiliserait la biomasse ligno-cellulosique comme source de carbone. L'idée repose sur le développement d'une souche d'*E. coli* capable de convertir directement la biomasse ligno-cellulosique en n-butanol sans prétraitement enzymatique de la biomasse, rejoignant le concept de CBP (Consolidated BioProcess). Cette approche permettrait d'utiliser une source d'énergie renouvelable issue de l'agriculture qui n'entrerait pas en concurrence avec les ressources alimentaires. De plus, l'utilisation de la biomasse ligno-cellulosique sans prétraitement permettrait de réduire les coûts de production, et ainsi d'utiliser le butanol comme biocarburant de seconde génération. Pour atteindre cet objectif, le n-butanol doit être produit à un rendement proche du rendement théorique de conversion glucose-butanol (0,41 g/g) et à une concentration la plus élevée possible. En conséquence, la souche productrice de n-butanol doit être capable de tolérer des concentrations élevées en butanol dans le milieu de culture, et la composition du milieu de culture utilisé pour la croissance doit être la plus simple possible afin de favoriser la production de n-butanol, et faciliter sa purification.

En 2015, l'équipe Ingénierie et Evolution des Voies métaboliques chez les procaryotes de TBI a construit une souche d'*E. coli* génétiquement modifiée exprimant la voie complète de conversion du pyruvate en n-butanol de *C. acetobutylicum*. Le métabolisme de cette souche a été conçu de telle sorte que les vitesses de croissance et de consommation du glucose soient couplées à la vitesse de production de n-butanol (Soucaille *et al.*, 2015). En croissance en anaérobiose stricte en culture discontinue dans un milieu chimiquement défini à base de glucose supplémenté en extrait de levure et nitrate, cette souche produit du n-butanol comme produit principal de fermentation (3,3 g/L) à un rendement de 0,23 g de glucose/g de n-butanol (56 % du rendement théorique maximal), en présence de quelques coproduits (succinate, lactate, acétate, butyrate) en concentrations minoritaires. La production de ces coproduits a pour conséquence de diminuer le rendement de production en n-butanol, et reste inattendue car les voies métaboliques anaérobies connues conduisant à la synthèse de ces produits ont été supprimées. *E. coli* étant une bactérie anaérobie facultative, l'addition de nitrate comme accepteur final d'électrons dans le milieu de culture favorise la croissance en anaérobiose mais s'accompagne d'une consommation de NADH, nécessaire pour la production de n-butanol, conduisant à une diminution du rendement de production de butanol et favorisant la production de butyrate.

Un des premiers objectifs de ces travaux a été l'expression de différentes Ferrédoxine NAD(P)⁺ oxydoréductases chez *E. coli*, avec pour objectif de coupler l'étape de réoxydation de la ferrédoxine réduite à la production d'ATP. Ainsi, une souche d'*E. coli* génétiquement modifiée, chez laquelle la croissance anaérobie et la production d'éthanol sont dépendantes de la fonctionnalité soit d'une

enzyme soit d'un complexe enzymatique ayant une activité ferrédoxine NAD(P)⁺ réductase, a été construite. Cette souche permet un criblage d'enzymes fonctionnelles direct *in vivo*, et force également leur évolution, permettant de sélectionner des enzymes dont l'activité enzymatique sera plus élevée. Le complexe Rnf a fait l'objet d'une étude approfondie, en raison de son activité ferrédoxine NAD(P)⁺ oxydoréductase, permettant de conserver l'énergie en produisant de l'ATP au travers d'un efflux d'ions. Au cours de cette étude, les complexes Rnf de *C. ljungdahlii* et *D. alaskensis* ont été étudiés afin de déterminer leurs fonctionnalités chez *E. coli* en présence de la ferrédoxine de *C. acetobutylicum*. De plus, la fonctionnalité de la ferrédoxine NAD(P)⁺ oxydoréductase de *C. tepidum* a également été étudiée à l'aide de la souche de criblage. Son expression dans cette souche a permis de faire évoluer l'enzyme *in vivo*, dont l'activité ferrédoxine NAD⁺ réductase est augmentée par rapport à l'enzyme native. Ensuite, cette FNOR évoluée a été introduite dans la souche Butanol et son phénotype a été caractérisé, et comparé au phénotype de la souche exprimant la FNOR de *C. acetobutylicum* et la transhydrogénase UdhA.

Un second axe de recherche a porté sur une modification rationnelle du métabolisme de la souche *E. coli* Butanol, afin d'augmenter le rendement de production du butanol en diminuant la quantité de coproduits formés lors de la fermentation (succinate, acétate, lactate), bien que les voies métaboliques anaérobies correspondantes aient déjà été supprimées. Le flux de carbone a été redirigé au travers de la glycolyse, par l'inactivation de la voie des pentoses phosphate et l'inactivation de la malate déshydrogénase consommatrice de NADH. Cela a permis d'augmenter le titre en butanol produit par la souche d'*E. coli* Butanol.

Un troisième axe de recherche a porté sur l'amélioration des performances de la souche Butanol par évolution adaptative *in vivo*. En effet, le métabolisme de cette souche a été conçu de telle sorte que les vitesses de croissance et de consommation du glucose soient couplées à la vitesse de production de n-butanol. La sélection *in vivo* d'une population ayant une vitesse de croissance supérieure à la souche avant adaptation permet donc l'amélioration de la production de n-butanol. Cette méthode a conduit à l'augmentation de la concentration en butanol produit, et de sa vitesse de production, et, par conséquent, a amélioré la tolérance de la souche d'*E. coli* au butanol. L'évolution adaptative *in vivo* a ensuite été poursuivie en simplifiant au cours du temps le milieu de culture chimiquement défini à base de glucose, en diminuant progressivement l'ajout en extrait de levure et en nitrate, nécessaires à la croissance de la souche Butanol initiale. Les mutations générées au cours de ces évolutions adaptatives ont été identifiées par le séquençage complet de l'ADN génomiques de clones évolués ré-isolés à partir de différentes populations sélectionnées.

Ce manuscrit de thèse, qui rend compte de l'ensemble des travaux réalisés au cours de ce projet de thèse, est organisé en quatre parties :

Le premier chapitre est consacré à une étude bibliographique sur *Escherichia coli*, et porte sur son métabolisme et son utilisation pour la production de composés d'intérêt industriel. En particulier, cette étude détaille la production d'éthanol et de butanol par voie fermentaire chez *E. coli*. Une partie de cette étude bibliographique est consacrée à l'étude des Ferrédoxine NAD(P)⁺ oxydoréductases chez les organismes anaérobies afin de montrer le rôle central de ces enzymes dans le métabolisme anaérobie. Cette étude des Ferrédoxine NAD(P)⁺ oxydoréductases a été rédigée sous le format d'une revue scientifique.

Le second chapitre est dédié à la description du matériel biologique utilisé, ainsi qu'aux techniques de biologie moléculaire, de biochimie, et d'enzymologie utilisées lors des expérimentations présentées dans ce manuscrit de thèse.

Le troisième chapitre présente la construction et l'utilisation d'une nouvelle souche d'*E. coli* génétiquement modifiée chez laquelle la croissance anaérobie et la production d'éthanol sont dépendantes de la fonctionnalité d'une enzyme ou d'un complexe enzymatique ayant une activité Ferrédoxine NAD(P)⁺ réductase. Ce chapitre est rédigé sous la forme d'un article scientifique pour être soumis ultérieurement à un journal scientifique.

Le quatrième chapitre présente les différentes stratégies testées pour améliorer les performances de la souche d'*E. coli*, initialement construite, produisant du n-butanol comme produit de fermentation majoritaire. Ce chapitre présente la caractérisation phénotypique de la souche d'*E. coli* initiale, productrice de butanol, et les confronte aux caractérisations phénotypiques des souches obtenues suite à une évolution *in-vivo* réalisée en culture continue, et également aux caractérisations phénotypiques des souches dont le métabolisme a été modifié afin de diminuer la production des coproduits. De plus, le phénotype de la souche exprimant la FNOR évoluée de *C. tepidum* est comparé à celui de la souche d'*E. coli* initialement construite, qui nécessitait la co-expression de la FNOR de *C. acetobutylicum* et la transhydrogénase UdhA afin d'être fonctionnelle.

CHAPITRE I

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Introduction bibliographique

1. *Escherichia coli* : Physiologie et métabolisme

1.1. Introduction

Escherichia coli est une bactérie Gram négative qui appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*, découverte en 1885 par Theodor Escherich (Mainil, 2013). Ce bacille est capable de croître en aérobiose comme en anaérobiose, ce qui le définit comme une bactérie anaérobie facultative. Cette bactérie est présente dans l'intestin des mammifères et fait partie du microbiote intestinal humain (Ravcheev and Thiele, 2016). Il existe différentes souches d'*E. coli*, certaines inoffensives et d'autres pathogènes. Les souches utilisées dans les laboratoires, telles que la souche K-12 et les souches qui en dérivent, comme la souche MG1655, ne présentent pas de danger pour l'homme, et sont classées au niveau 1 de danger biologique (le plus faible niveau). Une réaction du système immunitaire (Mainil, 2013) peut être déclenchée par l'antigène O, généralement composé d'une répétition d'oligosaccharides, et situé sur la membrane externe. Ces souches de laboratoire en sont dépourvues, ainsi que de facteur de virulence ou de colonisation, qui, chez les espèces pathogènes, sont responsables des maladies provoquées chez les êtres humains (Soupene *et al.*, 2003).

Il existe différents types de souches de laboratoire, adaptées à des applications variées. Les souches K décrites précédemment sont les plus utilisées, mais les souches B (BL21) et ses dérivés sont communément utilisées pour la production de protéines recombinantes (Neidhardt and Kushner, 2017; Studier and Moffatt, 1986). Ces souches BL21 sont de parfaits candidats car elles permettent une forte expression des protéines, leurs protéases *lon* et *ompT* sont inactivées, et elles sont insensibles à l'inhibition due aux fortes concentrations en glucose (Meyer and R., 2012). Une grande variété de souches a été développée en laboratoire afin d'exprimer des caractéristiques particulières utilisées ensuite dans des domaines précis. Parmi les souches qui dérivent des BL21, la souche Rosetta (Novagen) permet d'améliorer l'expression des protéines recombinantes d'origine eucaryote qui contiennent des codons rarement utilisés chez *E. coli*. Les souches Origami (Novagen), qui dérivent de la souche K-12, possèdent des mutations dans les gènes *trxB* et *gor*, et présentent un pouvoir réducteur réduit dans leur cytoplasme, ce qui favorise la formation des ponts disulfure. Les souches DH5 α sont fréquemment utilisées pour la production des plasmides en biologie moléculaire, car l'endonuclease 1 (*endA*) et la recombinase (*recA*) sont inactives (Phue *et al.*, 2008). Les souches W présentent des avantages lors de procédés industriels, comme par exemple l'utilisation d'une gamme de substrats plus étendue, la génération de moins d'acétate, et une meilleure tolérance aux produits formés (Park *et al.*, 2011; Prieto and Di, 1996). Un exemple de souche W à visée industrielle est la souche KO11 pour

la production d'éthanol (Jarboe *et al.*, 2007) : cette souche est décrite en détails dans la section sur la production d'éthanol en utilisant *E. coli*.

1.2. Le métabolisme d'*E. coli*

Le métabolisme central du glucose chez *E. coli*, représenté Figure 3, constitue le squelette de son métabolisme, car il fournit aux cellules les composés indispensables à la croissance et à la survie. La dégradation du glucose a lieu au travers de la glycolyse avec la formation de pyruvate. Le pyruvate est ensuite utilisé par le cycle de Krebs en aérobiose, ou pour la fermentation en anaérobiose.

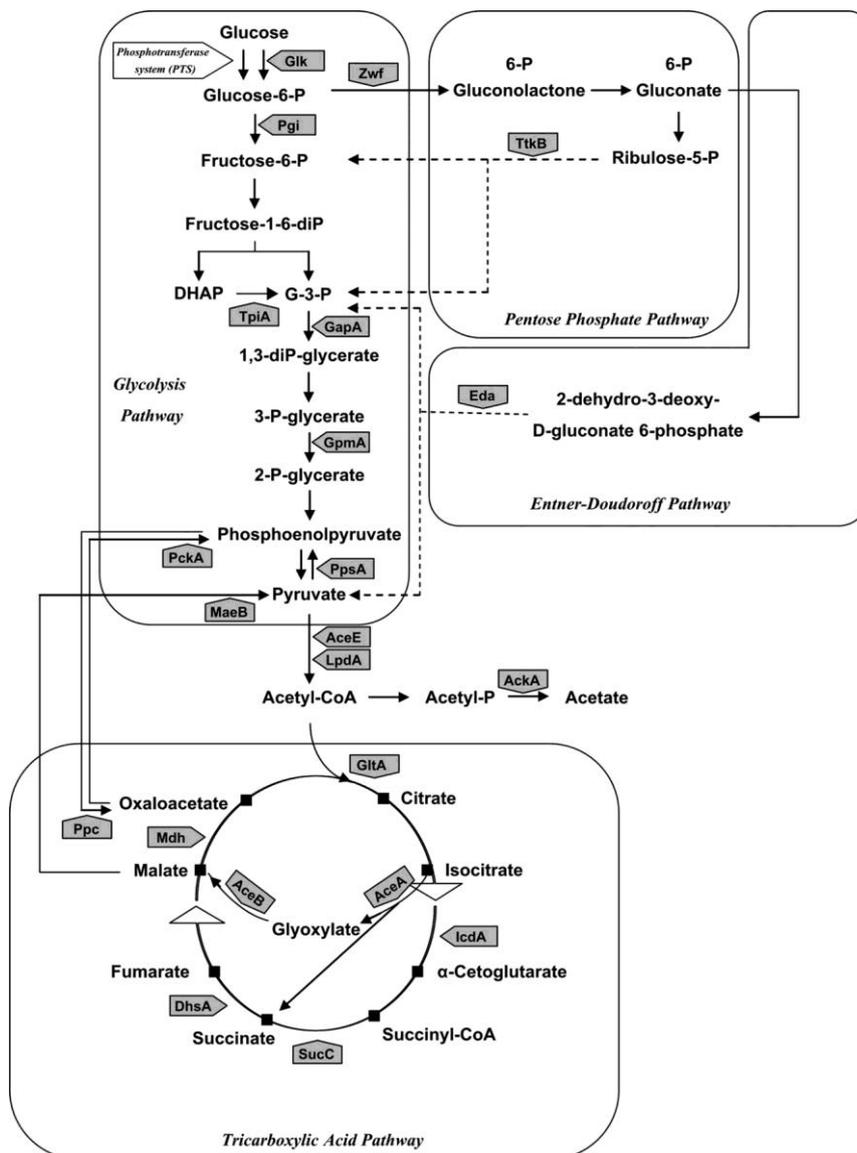


Figure 3 : Métabolisme centrale d'*E. coli*. D'après (Trauchessec *et al.*, 2014).



L'équation (1) correspond au bilan de la glycolyse, et l'équation (2) correspond au bilan du cycle de Krebs pour 2 molécules de pyruvate. La glycolyse a une production nette de 2 ATP pour 1 glucose, le cycle de Krebs permet la production de 2 ATP supplémentaires, à partir des 2 pyruvates formés lors de la glycolyse. Les intermédiaires réducteurs (NADH, UQH₂) formés lors de la glycolyse et du cycle de Krebs sont utilisés comme donneurs d'électrons pour les réactions de la chaîne respiratoire qui produisent l'ATP. Chaque NADH est transformé 3 ATP, et le UQH₂ en 2 ATP par la chaîne respiratoire. En cumulant la glycolyse, le cycle de Krebs, et la chaîne respiratoire, on obtient 38 ATP pour 1 glucose. Cependant, en anaérobiose, le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire sont inactifs (Clark, 1989). La glycolyse devient la source principale d'ATP, et le NADH formé est utilisé pour la production d'un mélange d'éthanol, d'acétate, et de lactate, afin de le réoxyder et permettre à la cellule de se multiplier. Ces voies métaboliques sont contrôlées par plusieurs mécanismes, qui favorisent l'adaptation au changement d'environnement. Certaines enzymes de ces voies métaboliques sont soumises à une régulation par des métabolites cellulaires ou des signaux extracellulaires. Ces facteurs de régulation permettent une autorégulation rapide du métabolisme en fonction des conditions physiologiques et de l'environnement. De plus, il existe d'autres mécanismes de régulation indirects, qui interagissent sur l'expression et la transcription des enzymes impliquées dans les voies métaboliques. Cependant, ces régulations nécessitent plus de temps pour leur mise en place. Ces régulations représentent un obstacle à la conduite de l'ingénierie métabolique des voies d'*E. coli*, et nécessitent une fine compréhension de leurs mécanismes afin d'anticiper leurs effets.

1.2.1. Mécanismes de transport et utilisation des sucres

Lors des procédés industriels, le milieu de culture contient des sucres peu coûteux, qui sont parfois les déchets d'un premier procédé. *E. coli* possède la capacité d'utiliser une grande gamme de substrats, tels que les hexoses (glucose, mannose, galactose et fructose) mais aussi des pentoses (xylose et arabinose), et également de l'acide uronique. Cependant, pour la recherche et la production à forte valeur ajoutée, le glucose est le sucre le plus utilisé en fermentation avec *E. coli*, en raison de son coût relativement faible, et du fait qu'il soit la source de carbone et d'énergie la plus favorable pour la croissance d'*E. coli*. La Figure 4 représente le système phosphotransférase (PTS) chez *E. coli*, utilisé pour le transport du glucose dans le cytoplasme (Tchieu *et al.*, 2001).

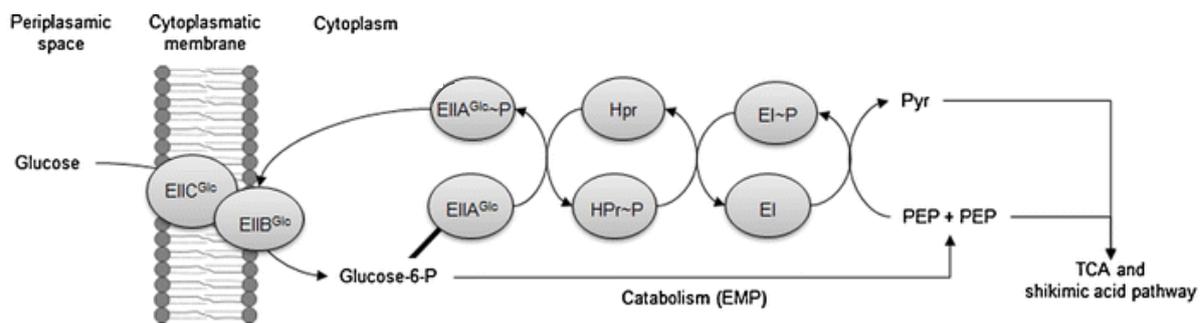


Figure 4 : Mécanisme de transport du glucose via le système phosphotransférase (PTS) chez *E. coli*. EMP : Embden-Meyerhof-Parnas. D'après (Escalante *et al.*, 2012)

Le système PTS est composé de parties solubles, avec l'enzyme E I (EI), le transporteur phosphohistidine (HPr) et l'enzyme E II (EIIA^{Glc}). Le système PTS est également composé de protéines associées à la membrane avec l'enzyme C E II (EIIc^{Glc}) et l'enzyme B E II (EIIB^{Glc}) qui forme le complexe EIIcB^{Glc}. Ces protéines sont spécifiques de chaque sucre. Les protéines solubles sont responsables du transfert du groupement phosphate en provenance du PEP (**PhosphoEnolPyruvate**) vers les enzymes II spécifiques des sucres, EIIA^{Glc} et EIIB^{Glc}. La protéine EIIc^{Glc} est une perméase intégrée à la membrane qui reconnaît et transporte spécifiquement un ou plusieurs sucres (Saier, 2000), qui sont ensuite phosphorylés par EIIB^{Glc}. Chez *E. coli*, 21 complexes enzymatiques de type II ont été identifiés et chacun d'eux est impliqué dans le transport de différents sucres. Ce système présent dans la membrane participe au transport et à la phosphorylation du glucose, mais également d'autres sucres tels que le fructose. L'utilisation du PEP comme donneur du groupement phosphate est nécessaire à l'entrée des sucres, créant un lien étroit entre l'activité du système PTS et la glycolyse. Lors de la croissance d'*E. coli* en milieu minimum (M9) en utilisant du glucose comme source de carbone, le système PTS utilise 50% du PEP disponible (Holms, 1986). Le système PTS joue un rôle important entre le ratio de PEP/pyruvate dans la cellule et dans la distribution du carbone dans les différentes voies métaboliques. L'inactivation du système PTS, par la délétion de l'opéron *ptsHICrr*, provoque une diminution du transport du glucose qui impacte fortement la croissance des souches PTS⁻. Cette souche PTS⁻ a ensuite été adaptée *in-vivo*, permettant de restaurer la croissance sur glucose en absence de l'opéron *ptsHICrr*. Une analyse transcriptomique de la souche adaptée a montré que la consommation rapide du glucose et l'augmentation du taux de croissance dépendent de la fonctionnalité de *galP* et *glk*, qui codent respectivement pour la perméase au galactose et la glucoquinase. La souche adaptée présente également une augmentation de 95% de l'activité de la première partie de la glycolyse, avec l'activité spécifique de Glk et Pgi multipliée respectivement par 2 et par 4. De plus, une mutation dans *arcB* permet d'augmenter l'activité du cycle de Krebs. Cette souche PTS⁻ adaptée n'utilise plus le PEP pour

importer le glucose. L'excédent de PEP est disponible pour la production de composés aromatiques tels que le DAHP et la L-phenylalanine. Cette étude montre que l'inactivation du système PTS provoque d'importants changements dans la distribution du carbone dans les différentes voies métaboliques, et montre la plasticité du métabolisme d'*E. coli* (Flores *et al.*, 2005).

1.2.2. Les voies métaboliques chez *E. coli*

1.2.2.1. La glycolyse

La glycolyse est considérée comme le cœur du métabolisme, les intermédiaires de la voie et ses cofacteurs étant utilisés par les autres voies métaboliques et permettant la synthèse des acides aminés, des nucléotides, des coenzymes, des acides gras et autres composés nécessaires pour la croissance. Ces voies de biosynthèse sont représentées en Figure 5. De plus, le glucose est le sucre privilégié par la cellule (Lin and Iuchi, 2003). La glycolyse est une séquence de plusieurs réactions enzymatiques qui convertissent le glucose en pyruvate (Figure 6). Elle a lieu indifféremment en condition aérobie ou anaérobie. L'énergie libérée par la conversion du glucose est stockée sous forme d'ATP et de NADH. La glycolyse peut être divisée en deux parties : la première est composée de 4 étapes qui permettent de scinder une molécule de glucose (C6) en deux molécules de phosphoglyceraldéhyde et dihydroxyacétone phosphate (C3). Deux molécules d'ATP sont nécessaires à cette conversion, pour fournir les groupements phosphates au phosphoglyceraldéhyde et au dihydroxyacétone phosphate. Le dihydroxyacétone est ensuite converti en phosphoglyceraldéhyde par la triose-phosphate isomérase.

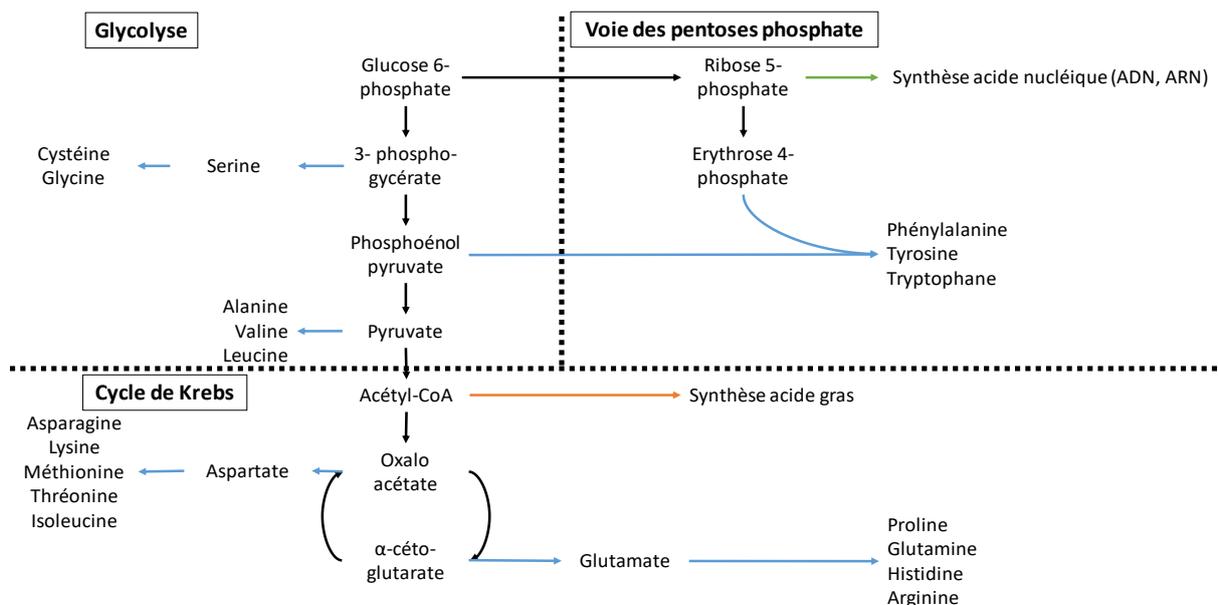


Figure 5 : Représentation schématique des voies de biosynthèse associées aux principales voies métaboliques. Les flèches bleues représentent les voies de biosynthèse des acides aminés, la flèche verte la voie de biosynthèse des acides nucléiques, la flèche orange la voie de biosynthèse des acides gras.

La deuxième partie de la glycolyse est composée de cinq réactions réalisant l'oxydation du phosphoglyceraldéhyde en pyruvate. Cette seconde partie génère quatre molécules d'ATP par glucose, ce qui conduit à un rendement net de 2 molécules d'ATP par glucose consommé pour la glycolyse. La glycolyse est régulée de façon allostérique par les enzymes de la voie réalisant des réactions irréversibles. Dans la glycolyse, deux réactions irréversibles sont catalysées par la phosphofructokinase (Pfk) et la pyruvate kinase (Pyk). La réaction catalysée par Pfk est considérée comme l'étape limitante de la glycolyse. Cette enzyme est inhibée par le PEP et l'ATP, et activée par l'ADP (Blangy *et al.*, 1968; Fenton *et al.*, 2003; Fenton and Reinhart, 2002). La seconde enzyme clé de la glycolyse, Pyk, existe sous deux isoformes de l'enzyme chez *E. coli*, Pyk-I ou Pyk-F, et Pyk-II ou Pyk-A. Chaque isoforme possède des propriétés cinétiques différentes (Zhao *et al.*, 2017). Les deux isoenzymes catalysent la synthèse du pyruvate, mais Pyk-F est la plus active (Ponce *et al.*, 1995). Pyk-F est activée par le fructose 1,6-bisphosphate, ce qui permet une forte production de pyruvate lorsque qu'il y a beaucoup d'intermédiaires dans la 1^{ère} partie de la glycolyse. Pyk-F est inhibée par l'ATP, ce qui permet de réduire le flux passant par la glycolyse lorsqu'il y a déjà beaucoup d'énergie disponible pour la cellule.

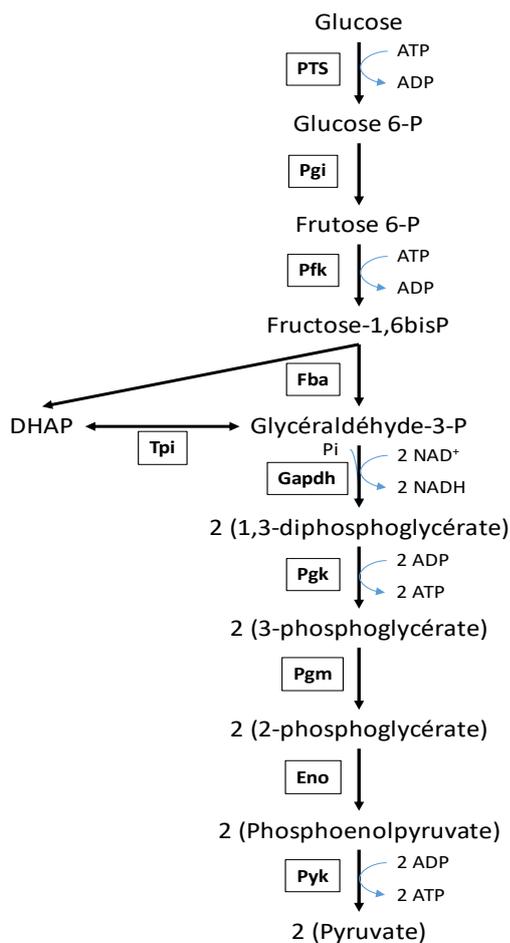


Figure 6 : La voie d'Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), également appelée glycolyse chez *E. coli*

Le métabolite le plus important pour la régulation allostérique de la glycolyse est le PEP, c'est le composé phosphorylé le plus énergétique de toutes les molécules impliquées dans le catabolisme du glucose. Chez *E. coli*, il a été montré que le niveau de PEP affecte le flux de carbone de la glycolyse et du cycle de Krebs (Peng *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2003). En plus d'être inhibiteur de Pfk, le PEP inhibe également la glucokinase, la phosphoglucosomerase (Pgi) et l'aldolase (Fba)(Ogawa *et al.*, 2007). Les gènes impliqués dans la glycolyse sont également régulés de façon transcriptionnelle. Comme expliqué précédemment, les facteurs de régulation ArcAB et Fnr sont impliqués dans la régulation de la glycolyse (Shalel-Levanon *et al.*, 2005a) mais les gènes Crp, FruR et Mlc sont également impliqués dans la modulation de l'expression des gènes du métabolisme central d'*E. coli* (Perrenoud and Sauer, 2005). FruR (ou Cra (Saier and Ramseier, 1996)) est également un régulateur, celui-ci global, qui régule le flux de carbone dans le métabolisme central entre la glycolyse et la néoglucogenèse (Crasnier-Mednansky *et al.*, 1997; Ow *et al.*, 2007; Sarkar and Shimizu, 2008).

1.2.2.2. Le cycle de Krebs

Le cycle de Krebs, Figure 7, permet l'oxydation des sucres en CO₂ et H₂O en utilisant l'acétyl-CoA issu de la glycolyse ou de la β-oxydation des acides gras. L'utilisation de l'acétyl-CoA par le cycle de Krebs génère de l'énergie sous forme d'ATP et d'équivalents réducteurs, tel que le NADH et QH₂, qui seront ensuite utilisés pour produire de l'énergie via la chaîne respiratoire. Les intermédiaires du cycle de Krebs sont également impliqués dans la synthèse d'acides aminés et d'acides nucléiques (Figure 5). Cependant en anaérobiose le cycle de Krebs est inactif (Clark, 1989) et seules certaines enzymes sont encore actives, elles sont par exemple utilisées pour la synthèse d'α-ketoglutarate conduisant à la synthèse du glutamate (Gray *et al.*, 1966) lors de la culture en milieu synthétique. Chez *E. coli*, le cycle de Krebs est constitué de 8 enzymes (Figure 7), et démarre par le transfert du groupement acétyl de l'acétyl-CoA sur l'oxaloacétate, pour former le citrate. A l'issue des réactions du cycle, 1 mole d'oxaloacétate est formée avec 2 moles de CO₂, 3 moles de NADH, 1 mole d'QH₂ et 1 mole d'ATP. Ainsi, le cycle peut reprendre avec une nouvelle mole d'acétyl-CoA. Le cycle de Krebs est régulé par 3 enzymes clés : la citrate synthase, l'isocitrate déshydrogénase et la 2-oxoglutarate déshydrogénase.

La citrate synthase est inhibée par le citrate, l'ATP et le NADH, et activée par l'ADP. L'isocitrate déshydrogénase est inhibée par le NADH et l'ATP, et activée par l'ADP. La 2-oxoglutarate déshydrogénase est inhibée par le succinyl-CoA, le NADH et l'ATP.

Le niveau d'expression des enzymes du cycle de Krebs dépend de trois facteurs majeurs : la présence ou l'absence d'oxygène, la répression catabolique exercée par le glucose, et l'équilibre entre catabolisme et anabolisme dicté par la nature du milieu de culture (milieu riche/milieu

synthétique)(Gray *et al.*, 1966). D'un point de vue régulation transcriptionnelle, les régulateurs globaux ArcAB et Fnr décrits précédemment sont également impliqués dans la régulation du cycle de Krebs (Shalel-Levanon *et al.*, 2005b).

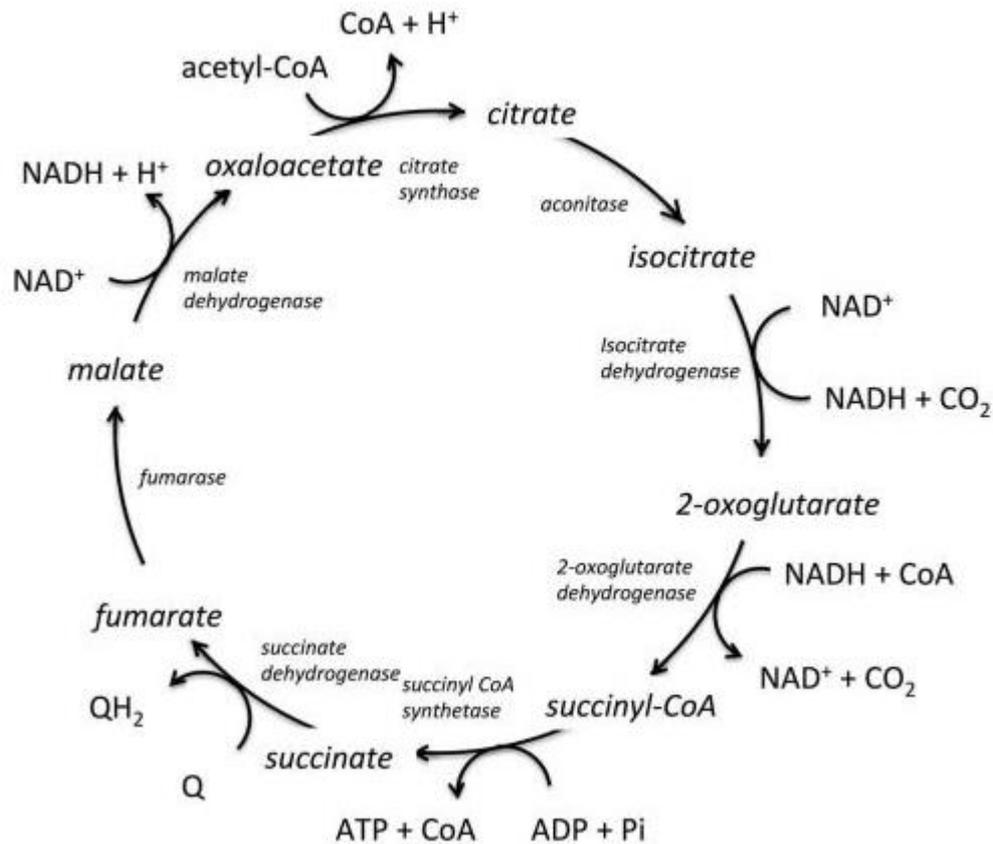


Figure 7 : Le cycle de Krebs chez *E. coli*. Q et QH₂ sont des paires de donneur/accepteurs d'électrons et sont les points d'entrée à la chaîne de transfert d'électrons. D'après (Cannon, 2014).

1.2.2.3. La voie des pentoses phosphates

La voie des pentoses phosphates (PPP) est une voie alternative pour la dégradation du glucose qui est divisée en deux branches (Sprenger, 1995). La branche oxydative convertit le glucose-6-phosphate en 6-phosphogluconate, en produisant du NADPH et du ribulose-5-phosphate. Le NADPH est utilisé pour la synthèse de biomasse, et le ribulose-5-phosphate est un précurseur pour la synthèse des acides nucléiques. La branche non-oxydative permet la production de fructose-6-phosphate, glyceraldehyde-3-P, et d'erytrose-4-P, en connectant la voie des pentoses phosphates à la glycolyse et aux voies de biosynthèse des acides aminés aromatiques. La voie des pentoses phosphates procure à la cellule des intermédiaires pour la biosynthèse des acides aminés, des vitamines, des nucléotides et des composés de la paroi cellulaire. Chez *E. coli*, elle est composée de 7 enzymes et est représentée Figure 8.

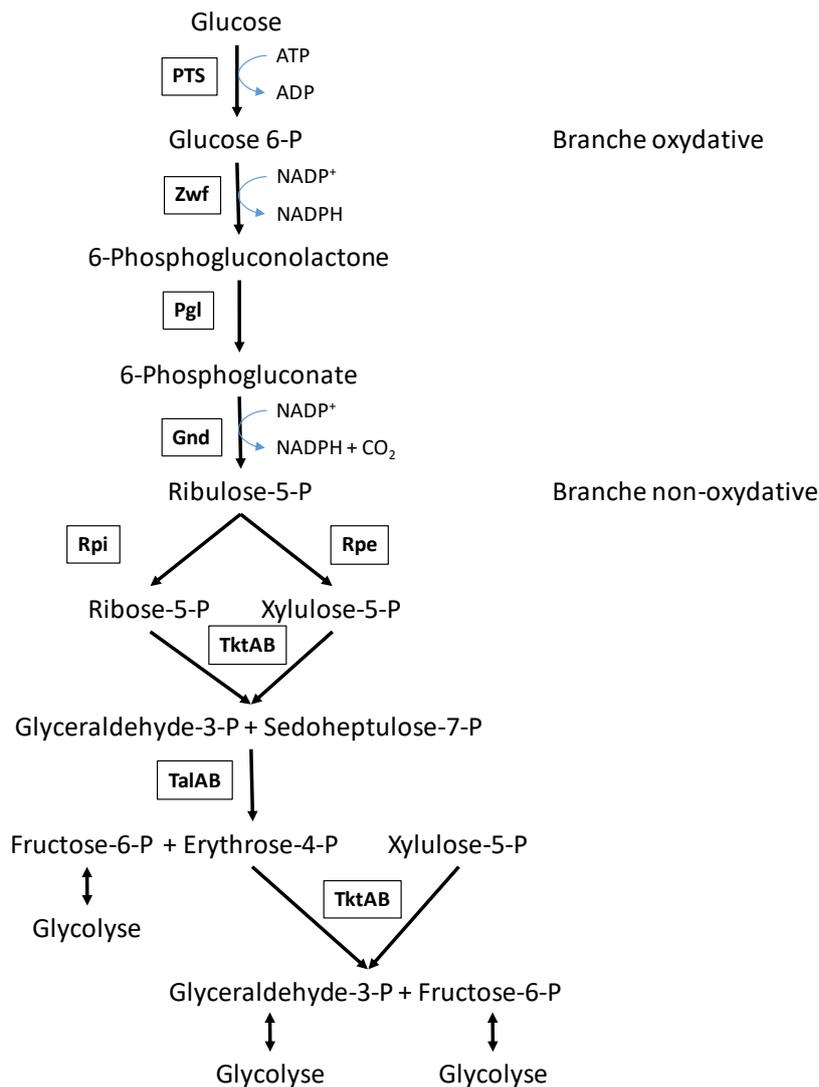


Figure 8 : La voie des pentoses phosphates chez *E. coli*.

1.2.2.3.1. Branche oxydative

La première enzyme de la branche oxydative est la glucose-6-phosphate déshydrogénase, exprimée par le gène *zwf*. Cette enzyme catalyse la conversion du glucose-6-phosphate en 6-phosphogluconolactone et génère du NADPH (Zhao *et al.*, 2004). Cette étape de la voie des pentoses phosphates est considérée comme la source la plus abondante de NADPH. La réaction est irréversible chez *E. coli*. La G6PDH est spécifique du NADPH, et son activité est inhibée par le NADPH, les acides gras, et le CoA. Cette étape contrôle le flux métabolique passant par la voie des pentoses phosphates et dépend de l'état énergétique et redox dans la cellule. Ensuite le 6-phosphogluconolactone est déshydraté par la 6-phosphogluconolactonase en 6-phosphogluconate. Lorsque la source de carbone est limitante pour la croissance, c'est cette étape de déshydratation qui est limitante de la PPP. La 6-

phosphogluconate déshydrogénase catalyse la conversion du 6-phosphogluconate en ribulose-5-P et en CO₂. En condition fermentaire, cette étape génère également du NADPH.

1.2.2.3.2. Branche non-oxydative

La ribulose-5-phosphate épimérase (Rpe) catalyse la conversion du ribulose-5-phosphate en xylulose-5-phosphate (Sprenger, 1995). Cette épimérase Rpe joue un rôle clé dans l'utilisation des pentoses. Elle est exprimée en opéron, avec des gènes responsables de la synthèse d'acides aminés aromatique. La ribose-5-phosphate isomérase A est responsable de l'interconversion du ribose-5-P et du ribulose-5-P (Zhang *et al.*, 2003). La transketolase (Tkt) transfère 2 carbones aux molécules entrant dans la voie des pentoses phosphates, à partir de ses intermédiaires, afin de modifier les structures de ces molécules. La transaldolase transfère 3 carbones et modifie le squelette des intermédiaires de la voie.

1.2.2.3.3. Utilisation des pentoses

La voie des pentoses phosphates permet chez *E. coli* l'utilisation des pentoses, tels que le D-xylose (Gonzalez *et al.*, 2002), le D-ribose, et le L-arabinose (Macpherson *et al.*, 1981). L'import de ces sucres est effectué par des perméases inductibles, spécialement dédiées à ces sucres. Cependant, l'expression de ces perméases est régulée par un mécanisme de répression catabolique du carbone (CCR) en présence de glucose (Kolodrubetz and Schleif, 1981; Ratushny *et al.*, 2006). Ce mécanisme CCR repose sur l'activateur de transcription Crp. Ce régulateur influe sur plus de 260 opérons et il est activé par l'AMPc. Le niveau d'AMPc dépend en partie de l'état de phosphorylation du système PTS. Lorsque la vitesse d'absorption du glucose par le système PTS est importante, une partie du complexe nommé EIIA^{Glc} est en grande partie non phosphorylé, donc le niveau d'AMPc est faible, et Crp n'est pas activé : les perméases pour les pentoses sont donc réprimées. Lorsque le glucose présent dans le milieu de culture est épuisé, le système PTS est majoritairement sous la forme phosphorylé, entraînant l'augmentation du niveau d'AMPc, l'activation de Crp, et l'expression des perméases pour les pentoses. Il existe également un autre mécanisme de régulation CCR : en présence de glucose, la forme phosphorylée de EIIA^{Glc} inhibe directement l'activité de plusieurs perméases qui n'appartiennent pas au système PTS ainsi que la glycérol kinase, afin d'empêcher l'absorption et l'utilisation d'autres sources de carbone que le glucose (Kremling *et al.*, 2015).

1.2.2.3.4. Régulation de la voie des Pentoses Phosphates

Le flux métabolique passant par la PPP est régulé par l'activité de la G6PDH (Zwf), l'activité de cette enzyme est contrôlée par la disponibilité en NADP⁺. La 6-phosphogluconate déshydrogénase est

également régulée par le taux de croissance des cellules. Chez *E. coli*, la voie des PPP est composée de 7 enzymes (Figure 8), la plupart sont inhibées par le produit qu'elles forment. L'activité de la glucose-6-phosphate déshydrogénase et de la 6-phosphogluconate déshydrogénase dépend du potentiel redox et énergétique de la cellule. L'activité de ces enzymes est inhibée par l'ATP, le NADH et le NADPH. D'un point de vue régulation transcriptionnelle, *zwf* est induit par SoxS, MarA et Rob, *gnd* par GadE, *talA-tktB* par CreB et *rpiB* par RpiR et LipB (Ratushny *et al.*, 2006).

1.2.2.4. Entner-Doudoroff

La voie métabolique d'Entner-Doudoroff (Figure 9) relie la branche oxydative de la voie des pentoses phosphates à la glycolyse en réalisant le catabolisme du 6-phosphogluconate en pyruvate et en glycéraldéhyde-6-phosphate. Cette voie métabolique est uniquement présente chez les procaryotes. Cette voie métabolique utilise deux enzymes : la première, 6-phosphogluconate déshydratase (Edd) et la seconde, 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase (Eda). Cette voie métabolique permet la production nette d'une mole de glyceraldehyde-3-P et d'une mole de pyruvate à partir d'une mole de 6-phosphogluconate. Chez *E. coli*, la voie d'Entner-Doudoroff est importante pour la croissance de la bactérie dans son habitat naturel (Intestins et milieu aquatique). Elle l'utilise pour la métabolisation des sucres acides tels que le gluconate, le glucuronate et le galacturonate. La fonctionnalité de cette voie métabolique a été démontrée en utilisant le gluconate comme source de carbone, et nécessite que les enzymes de la voie d'E-D, Edd et Eda soient actives. Pour démontrer l'implication de la voie d'E-D chez *E. coli*, des mutants ont été construits. Le mutant *edd* est capable de pousser sur glucose de manière similaire à la souche sauvage, mais sa croissance est diminuée de 60 à 70% sur gluconate, par rapport à la souche sauvage (Bausch *et al.*, 1998). Le mutant *eda* est, lui, incapable de pousser sur gluconate (Fuhrman *et al.*, 1998). Il a également été démontré que le gluconate, glucuronate, le methyl- β -D-glucuronide et la limitation en phosphate ou en carbone induisent l'expression des gènes *edd* et *eda* (Bachi and Kornberg, 2009; Murray and Conway, 2005). L'induction d'*edd* est également favorisée en présence d'une faible concentration en oxygène.

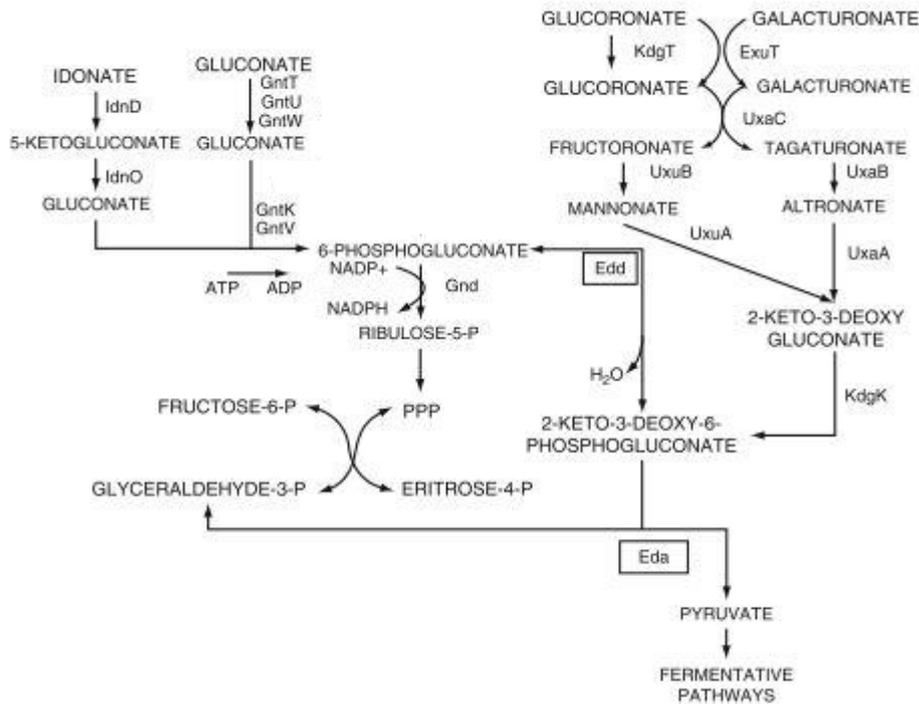


Figure 9 : La voie d'Entner-Doudoroff chez *E. coli* couplée au catabolisme des sucres acides. D'après (Orencio-Trejo *et al.*, 2010)

1.2.3. Respiration et fermentation

E. coli est capable de croître en métabolisant différents substrats, en présence ou en absence d'oxygène. La croissance en présence d'oxygène permet aux cellules de produire jusqu'à 38 moles d'ATP par mole de glucose en utilisant la glycolyse combinée au cycle de Krebs. *E. coli* est capable d'utiliser d'autres accepteurs d'électrons que l'oxygène : cette respiration est dite respiration anaérobie, et peut utiliser les composés azotés (NO_3^- et NO_2^-), le diméthyl sulfoxyde (DMSO), le triméthylamine-N-oxide (TMAO) et le fumarate comme accepteurs d'électrons alternatifs (Gunsalus, 1992). La réduction de l'accepteur d'électron est catalysée par des oxydo-reductases dédiées qui couplent l'oxydation du NADH aux quinones de la chaîne respiratoire (Unden and Bongaerts, 1997). Ces réactions enzymatiques associées à la membrane produisent un efflux de protons, générant une force proton-motrice. La différence de potentiel provoque un influx de protons au travers de la membrane, puis les complexes protons-dépendants permettent la synthèse d'ATP, le transport de nutriments, ou les mouvements du flagelle. Les cellules privilégient l'utilisation de l'oxygène comme accepteur d'électron, mais en son absence, elles utilisent l'accepteur avec le plus grand potentiel redox. La fermentation peut également avoir lieu sans accepteur d'électrons, si l'équilibre redox est maintenu lors du procédé (Clark, 1989). Cependant, durant cette étape, des co-produits sont excrétés hors de la cellule. Lors de la croissance en anaérobiose, plusieurs régulateurs globaux sont impliqués

dans la régulation du métabolisme : le principal système est le système de régulation ArcAB (« aerobic respiration control »)(Iuchi and Lin, 2014; Salmon *et al.*, 2005). La sous-unité membranaire ArcB agit comme senseur du niveau d'oxygène, et phosphoryle la sous-unité ArcA en absence d'oxygène, la rendant active (Iuchi and Weiner, 1996). ArcA est un régulateur de la transcription, qui se fixe sur l'ADN lorsqu'il est phosphorylé. ArcA phosphorylé se fixe directement sur le promoteur, ou sur des sites de fixation, et masque les sites d'activation. Son implication a été démontrée dans la régulation de l'expression du cycle de Krebs, le cycle du glyoxylate, et la dégradation des acides gras (Alexeeva *et al.*, 2003). Cette répression du cycle de Krebs en anaérobiose induit une forte diminution en ATP disponible pour la cellule. Pour compenser cette perte, le flux de la glycolyse est augmenté (Koebmann *et al.*, 2002). Le régulateur Fnr (« fumarate, nitrate reduction ») contient un cluster Fe-S sensible à l'oxygène qui sert de senseur direct à l'oxygène et module l'expression de plus de 100 gènes en réponse à la limitation en oxygène (Kiley and Beinert, 2003). Fnr réprime l'expression des gènes impliqués dans la respiration aérobie et active l'expression des gènes impliqués dans la respiration anaérobie (Kang *et al.*, 2005). Fnr est impliqué dans la transition entre un environnement aérobie vers un environnement anaérobie, et active les déshydrogénases impliquées dans la respiration anaérobie ainsi que les oxydases et réductases terminales utilisées par les accepteurs alternatifs d'électrons. L'ensemble des gènes régulés par Fnr est détaillé dans le Tableau 3.

Groupe	niveau d'expression suite au passage en anaérobiose		Gènes
	souche sauvage	souche Δ FNR	
I	réduit	augmenté	<i>lpdA yfiA yceD trpB cyoA gpmA crr nuoE manX yadF tufA prlA rplM gatY trmD ndh manY manZ ompA rplT rpsJ speD speE cydA rpsT thlD rplS ptsG atpB rpsA yajG oppA yggV rpmB yajC talA</i>
II	augmenté	réduit	<i>fdhF iadA yhiV ydbA_2 caiT yjiH b2866 pyrD mobB yhjW b2878 yjiZ yjeH recC tdh araB yhjN narY glnE yeiA ybeS nanT acrF uraA yjdH yicM xylE glnD yjcS yggF pstS yidK yjiE tra5_2 metL yhcL yidE mhpF tynA glgA b3051 yhfS sbp sbm mrcA yheF yadQ speC yhjJ flip yabM yhhT dinG yjeM yhhJ proW rarD sbcC</i>
III	réduit	non-modifié	<i>ylcB b1200 ycgC ftsN rplB rplO dppA rplC ymfN goaG hflC ymfM lamB ilvH rpsE ygiC yfhG ykgG ykgI katE rplD tig yliG rplQ ybfH wbbJ ytfL ychG fabG malM rplI rpsH ycdT yabI pheA b1808 nfi yojH fdoH acpP yfiB rplE hupB rfbX yabK</i>
IV	augmenté	non-modifié	<i>appB hdeA appC gadB hdeB gadA poxB cyaA ybeD mrr ygjD ubiC</i>
V	augmenté	encore plus important	<i>ybjX</i>
VI	similaire	augmenté	<i>gapA hisJ ydcF purN yhbJ nrdB gapC_1 artI potF</i>
VII	réduit	encore plus réduit	<i>frdA ybdE nirB ylcD rpmC</i>
VIII	similaire	réduit	<i>nikA nadC ycbO narX yjiL emrK ycfT yaaU yi41 ilvY lysU yqiG vjcP ybhK parC yiaY yfbS sdaB fhuC yjeT b1012 b2438 gcvT fumB yceL dfp umuC aroK dadX aroP aat yaaJ yigN</i>

Tableau 3 : Analyse transcriptomique sur micropuces à ADN pour identifier les gènes régulés par le régulateur global Fnr lors du passage d'une croissance aérobie à une croissance anaérobie. Les résultats transcriptomiques sont comparés à une souche dont le gène *fnr* a été inactivé (Δ Fnr). D'après (Salmon *et al.*, 2003)

Afin de régénérer les cofacteurs réduits et une production d'ATP suffisante, *E. coli* possède un métabolisme flexible en ajustant la proportion des produits de fermentation. Les produits majoritaires sont le succinate, le formate, l'acétate, le lactate et l'éthanol. La croissance en condition anaérobie est considérée comme limitée en énergie et nécessite un flux accru dans la glycolyse (Koebmann *et al.*, 2002) afin de permettre la survie et la croissance de la cellule. Le métabolisme d'*E. coli* en anaérobiose est représenté Figure 10.

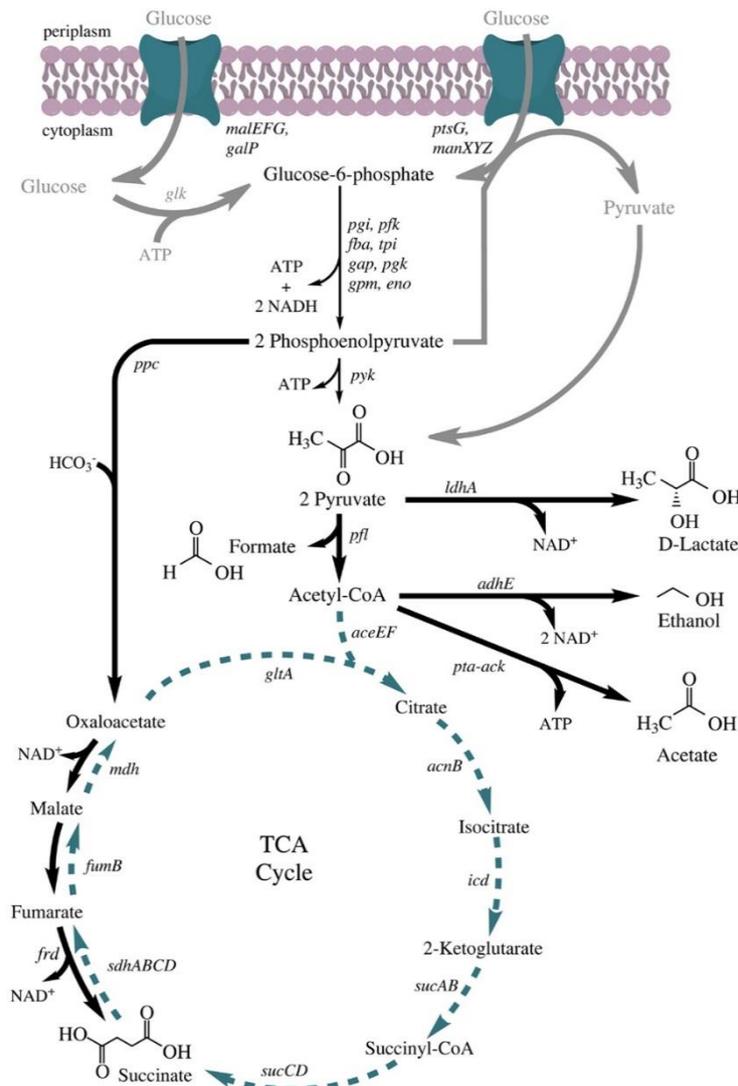


Figure 10 : Métabolisme central du carbone chez *E. coli* sauvage en anaérobiose. D'après (Förster and Gescher, 2014)

1.2.4. Regulation de la biogénèse des centres Fer-Soufre (Fe-S) par IscR

Les centres Fe-S sont des co-facteurs ubiquitaires d'un grand nombre de protéines impliquées dans la respiration, la réparation de l'ADN, et la régulation de l'expression des gènes (Fontecave, 2006). Chez *E. coli*, la majorité de la biogénèse des centres Fe-S est catalysée par les protéines du système ISC. Ce système est exprimé dans un opéron nommé *isc*, composé des gènes *iscRSUA-hscBA-fdx* (Mettert and Kiley, 2014). Parmi ces gènes, *iscR* code pour un facteur de transcription permettant de réguler l'expression du système ISC en fonction des besoins en biogénèse de centres Fe-S de la cellule (Santos et al., 2015). La protéine IscR est présente sous deux formes, sous forme d'une holo-protéine contenant un centre [2Fe-2S], et sous forme d'apo-protéine ne contenant pas de centre Fe-S. C'est cette différence qui permet la régulation de l'expression du système ISC. Lorsque IscR possède un

centre [2Fe-2S], fourni par le système ISC, l'holo-protéine est capable de se fixer directement au promoteur d'*iscR* (P_{iscR}) pour réprimer la transcription de l'opéron (Mettert and Kiley, 2014). Cela permet de coupler l'expression du système ISC à la demande en Fe-S, au travers de la quantité en holo-protéine d'IscR contenant un centre [2Fe-2S]. Le mécanisme de régulation du système ISC est décrit Figure 11.

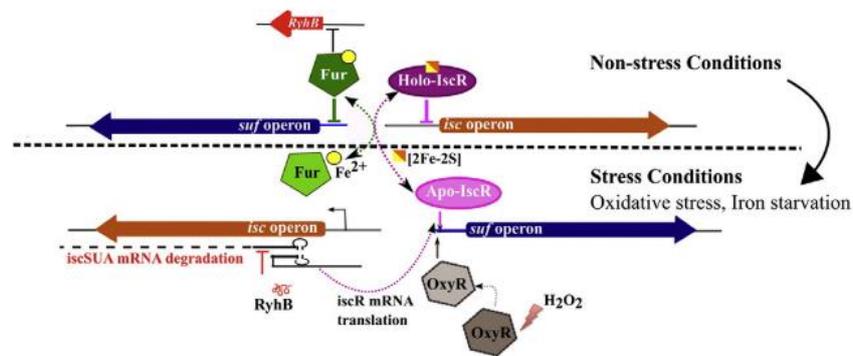


Figure 11 : Régulation de la biosynthèse des centres Fe-S chez *E. coli*. D'après (Santos *et al.*, 2015)

Chez *E. coli*, il existe un second système impliqué dans la biogénèse des centres Fe-S. Ce système nommé SUF est exprimé par l'opéron *sufABCDSE* (*suf*) (Garcia *et al.*, 2019). C'est ce système qui permet la biogénèse de centres Fe-S en condition de stress oxydatif, ou de manque de fer, alors que le système ISC est utilisé comme système majoritaire en absence de stress (K. C. Lee *et al.*, 2008). L'expression du système SUF est également sous le contrôle du facteur de transcription IscR. De plus, les facteurs de transcription OxyR et Fur sont également impliqués dans l'expression du système SUF (Lee *et al.*, 2003). Le mécanisme de régulation du système SUF est décrit en Figure 11.

Des études chez *E. coli* ont également mis en évidence qu'IscR est impliqué dans la régulation d'opérons codant pour des protéines possédant des centres Fe-S, qui sont impliquées dans métabolisme anaérobie (Giel *et al.*, 2006; Schwartz *et al.*, 2001). Par exemple, IscR réprime l'expression de l'hydrogénase, *hyaA*, en aérobiose, et les facteurs de transcription ArcA et AppY permettent de lever cette répression lors du passage en anaérobiose (Nesbit *et al.*, 2012). L'ensemble des opérons régulés par IscR est décrit dans le Tableau 4.

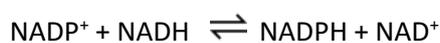
Opérons	Activité IscR	Fonction	Facteur de transcription additionnel	Références
<i>iscR</i>	Répresseur	Biosynthèse centre Fe-S	Aucun	(Giel <i>et al.</i> , 2006; Schwartz <i>et al.</i> , 2001)
<i>erpA</i>			Inconnu	(Giel <i>et al.</i> , 2006)
<i>sufA</i>	Activateur		Fur, OxyR	(Lee <i>et al.</i> , 2003; K. C. Lee <i>et al.</i> , 2008)
<i>nfuA</i>			Inconnu	(Giel <i>et al.</i> , 2006)
<i>hyaA</i>	Répresseur	Production d'hydrogène	ArcA, AppY	(Giel <i>et al.</i> , 2006; Nesbit <i>et al.</i> , 2012)
<i>hybO</i>			FNR, ArcA	(Giel <i>et al.</i> , 2006)
<i>napF</i>	Répresseur	Réduction nitrate	FNR, NarP, ModE	(Giel <i>et al.</i> , 2006)
<i>ydiU</i>	Activateur	Inconnue	Inconnu	(Giel <i>et al.</i> , 2006)

Tableau 4 : Opérons régulés par IscR chez *E. coli*. D'après (Santos *et al.*, 2015)

Des travaux réalisés par Jones *et al.* ont montré que la délétion du facteur de transcription IscR chez *E. coli* pouvait augmenter l'activité de certaines protéines à centre Fe-S (Akhtar and Jones, 2008). Les auteurs ont réalisé l'expression recombinante d'une hydrogénase Fe-Fe clostridiale dans une souche BL21, et ils ont comparé l'activité enzymatique entre une souche sauvage et une souche mutante Δ *iscR*. Ils ont observé une activité hydrogénase multipliée par 3 dans la souche mutante par rapport à la souche sauvage, lors de la croissance en anaérobiose. La délétion d'*iscR* semble donc une stratégie intéressante pour favoriser l'expression de protéines recombinantes contenant des centres Fe-S, en anaérobiose chez *E. coli* (Akhtar and Jones, 2014; Kuchenreuther *et al.*, 2010; Wiegand *et al.*, 2018).

1.2.5. Les transhydrogénases (UdhA et PntAB)

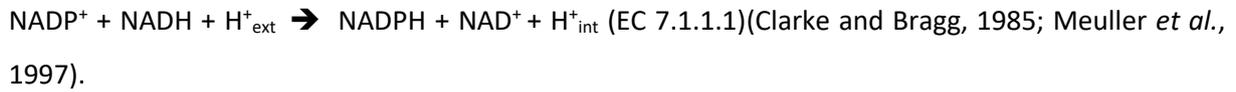
La réoxydation des cofacteurs NADH et NADPH joue un rôle crucial dans le métabolisme d'une bactérie (Canonaco *et al.*, 2001). Il existe une famille d'enzyme, les transhydrogénases (Sauer *et al.*, 2004), qui sont spécialisées dans le maintien de l'équilibre redox. Ces pyridines nucléotides transhydrogénases catalysent le transfert d'électrons entre le NAD⁺ et le NADP⁺ selon l'équation suivante :



E. coli présente la particularité de posséder deux types distincts de transhydrogénases (Boonstra *et al.*, 1999), alors qu'un seul type de transhydrogénase est généralement présent par organisme. Les *Enterobacteriaceae* sont les seules exceptions connues.

1.2.5.1. La transhydrogénase membranaire PntAB

La transhydrogénase PntAB d'*E. coli* est un complexe protéique rattaché à la membrane qui, *in-vivo*, utilise l'import de protons au travers de la membrane pour réaliser la réduction du NADP⁺ par le NADH. La réaction du complexe PntAB correspond à l'équation suivante :



Lorsque le complexe enzymatique est fonctionnel, sa structure est un tétramère composé de deux sous unités, α et β , exprimées à partir des deux gènes *pntA* et *pntB*. PntAB est représenté Figure 12 d'après la structure déduite de la cristallisation du complexe (Johansson *et al.*, 1999, 2005). Le complexe enzymatique contient trois domaines distincts : les domaines I et III contiennent respectivement les sites de fixation pour le NAD(H) et le NADP(H). Le domaine II est rattaché à la membrane par un domaine transmembranaire composé de 13 hélices alpha partagées entre les sous-unités alpha et beta du complexe. Il a été déterminé que PntAB est l'enzyme principale impliquée dans la génération de NADPH, lors de la croissance sur glucose en culture discontinue, et en présence d'oxygène : 35 à 45% du NADPH requis pour la biosynthèse est produit par PntAB (Sauer *et al.*, 2004). Le reste du NADPH requis est produit via la voie des pentoses phosphates (G6PDH), et par l'isocitrate déshydrogénase (IDH) avec respectivement 35 à 45% et 20 à 25%.

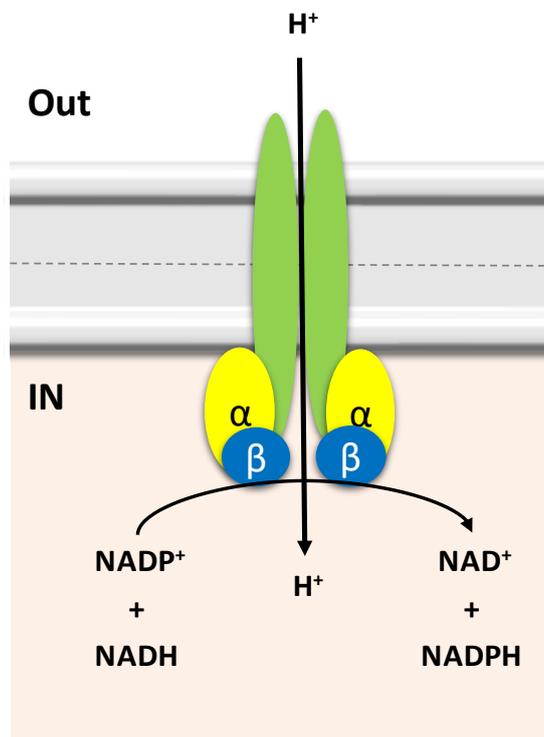


Figure 12: Schéma de la transhydrogénase PntAB. D'après (Johansson *et al.*, 1999).

1.2.5.2. La transhydrogénase soluble UdhA

La seconde transhydrogénase d'*E. coli* est une protéine soluble qui, contrairement à PntAB, ne nécessite pas de gradient de proton pour effectuer le transfert d'électrons entre le NADPH et le NAD⁺. Elle est exprimée par le gène *sthA*, également appelée *udhA*. Ce gène code pour une protéine soluble qui fait partie de la famille des flavoprotéines disulfide oxydoréductases. La séquence protéique de cette transhydrogénase ne présente pas de point commun avec PntAB et catalyse la réaction suivante :



La transhydrogénase soluble d'*E. coli* a été identifiée par comparaison de séquence protéique avec les transhydrogénases Sth de *Pseudomonas fluorescens* et *Azotobacter vinelandii* déjà caractérisées. Des homologies de séquence protéique respectives de 62% et 64% d'identité ont été obtenues entre les transhydrogénases Sth de *Pseudomonas fluorescens* et *Azotobacter vinelandii* par rapport à UdhA d'*E. coli* (Boonstra *et al.*, 1999).

La transhydrogénase d'*E. coli* UdhA a été purifiée par deux groupes (Boonstra *et al.*, 1999; Cao *et al.*, 2011), le premier en utilisant l'enzyme native, afin de démontrer son activité transhydrogénase, et le second en utilisant une enzyme recombinante fusionnée avec une étiquette histidine en position C-terminale, afin de déterminer les paramètres cinétiques de l'enzyme.

La première étude a consisté à effectuer la surexpression d'*udhA* dans un vecteur pBluescript SK(+), et la purification en une étape, par chromatographie d'affinité, avec de la résine d'agarose composée d'adénosine-2', 5'-diphosphate. Sur extrait acellulaire brut, une activité spécifique de 2,9 U/mg a été mesurée, puis, après purification, l'activité spécifique de l'enzyme purifiée est de 85 U/mg. Cette première étude a permis de démontrer l'activité transhydrogénase d'UdhA et ainsi confirmer l'analyse bioinformatique établissant son identité de séquence protéique avec d'autres transhydrogénases solubles déjà identifiées.

La seconde étude a permis de caractériser UdhA et de déterminer les paramètres cinétiques de l'enzyme. Pour une activité maximale, les tests doivent être réalisés en tampon 50 mM Tris-HCl, à un pH de 7,5, et une température de 35°C. Le NADPH joue le rôle d'activateur pour l'enzyme ainsi que le 2'-AMP, l'ADP, l'AMP et l'ATP. Au contraire, le NADP⁺ inhibe l'activité de l'enzyme *in-vitro*. Cette inhibition peut être levée par l'ajout de Ca²⁺, au contraire les ions métalliques, tels que Mn²⁺, Co²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺ et Cu²⁺, inhibent l'enzyme. Ces activateurs et inhibiteurs de l'activité transhydrogénase *in-vitro* pourraient éventuellement répondre à la question d'une régulation allostérique de l'enzyme *in-vivo*,

comme discuté dans la partie régulation de la transcription ci-dessous. Par exemple, le ratio NADPH/NADP⁺ *in-vivo* pourrait moduler l'activité de l'enzyme *in-vivo*. L'AMPc semble également un excellent candidat pour la régulation de l'équilibre redox. Comme détaillé précédemment, une forte concentration en AMPc inhibe la transcription de *pentAB* et pourrait ici augmenter l'activité d'UdhA, conduisant à l'augmentation du ratio NADH/NAD⁺ nécessaire pour le métabolisme. Les paramètres cinétiques K_m , V_{max} et k_{cat} ont également été déterminés et sont résumés dans le Tableau 5.

Substrat	K_m (μM)	V_{max} ($\mu\text{M min}^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{mol}^{-1} \text{L s}^{-1}$)
NADPH	68,3	48,4	167,9	$2,46 \times 10^6$
Thio-NAD ⁺	133,2	74,8	259,5	$1,94 \times 10^6$

k_{cat}/K_m ratio : Préférence de 1.25 fois pour le NADPH

Tableau 5 : Paramètres cinétiques de la transhydrogénase sauvage avec un His-Tag en C-terminal. Les données sont issues de la publication de (Cao *et al.*, 2011).

Bien que la caractérisation biochimique de l'enzyme purifiée ait été effectuée, il existe peu d'informations concernant la structure d'UdhA d'*E. coli*, et aucune structure cristalline n'est actuellement publiée. UdhA appartient à la famille des flavoprotéines disulfide oxydoréductases, telles que les lipoamides déshydrogénases, les glutathionnes réductases et les mercuriques réductases. Ces enzymes ont la particularité d'être actives lorsqu'elles forment un homodimère. Ces enzymes possèdent des domaines caractéristiques que l'on retrouve chez UdhA. En N-terminal, on retrouve un domaine de fixation pour le FAD, avec le motif de Rossman caractéristique (Gly-X-Gly-X-X-Gly/Ala) (Figure 13).

STH_AZOVI	-MAVYNYDVVVI GTGPAG EGAAMNAVKAGRKVAVVDDRPQVGGNCTHLG T IPSKALRHSV
STH_PSEFL	-MAVYNYDVVVL GSGPAG EGAAMNAAKAGRKVAMVDSRRQVGGNCTHLG T IPSKALRHSV
STH_ECOLI	MPHSYDYDAIVI GSGPGG EGAAMGLVKQGARVAVIERYQNVGGGCTHWG T IPSKALRHAV
STH_AZOVI	RQIMQYNNPLFRQIGEPWF SFADVLKSAEQVIAKQVSSRTGYARNRIDTFFGTASF
STH_PSEFL	RQIMQFNTNPMFRAIGEPWF SFPDVLKSAEKVISKQVASRTGYARNRVDVFFGTGSFA
STH_ECOLI	SRIIEFNQNP LYS DHSRLLRSSFADILNHADNVINQQTRMRQGFYERNHCEILQGNARFV
STH_AZOVI	DEHTIEVVHLNGMVETLVAKQFVIATGSRPYRPADVDFTHPRIYDSDTILSLGHTPRRLI
STH_PSEFL	DEQTVVEVCANGVVEKLVAKHIIIIATGSRPYRPADIDF SHPRIYDSDTILSLGHTPRKLI
STH_ECOLI	DEHTLALDCPDGSVETLVTAEFVVIACGSRPYHPTDVFTHPRIYDSDSILSMHHEPRHVL
STH_AZOVI	IY GAGVIG CEYASIFSGLGVLVDLIDNRDQLLSFLDDEISDSLSYHLRNNNVLIRHNEEY
STH_PSEFL	VY GAGVIG CEYASIFSGLGVLVELVDNRGQLLSFLDSEISQALSYHF SNNNITVRHNEEY
STH_ECOLI	IY GAGVIG CEYASIFRGM DVKVDLINTRDRLLAFLDQEMSDSLSYHF WNSGVVIRHNEEY
STH_AZOVI	ERVEGLDNGVILHLKSGKKIKADAF LWSNGRTGNTDKL GLENIGL KANGRGQIQVDEHYR
STH_PSEFL	DRVEGVDNGVILHLKSGKKIKADALLWCNGRTGNTDKLGMENIGVKVNSRGQIEVDENYR
STH_ECOLI	EKIEGCDGDMHMLKSGKKL KADCLLYANGRTGNTDSLALQNI GLETD SRGQLKVNSMYQ
STH_AZOVI	TEVSNIIYAAGDVIGWPSLASAAYDQGRSAAGSITE -NDSWRFVDDVPTGIYTIPEISSVG
STH_PSEFL	TCVPNIYGAGDVIGWPSLASAAHDQGRSAAGSIVD -NGSWRFVNDVPTGIYTIPEISSIG
STH_ECOLI	TAQPHVYAVGDVIGYPSLASAAYDQGRIAAQALVKGEATAHLIEDIPTGIYTIPEISSVG
STH_AZOVI	KTERELTQAKVPYEVGKAFFKGMARAQI AVEKAGMLKILFHRETLEILGVHCFGYQASEI
STH_PSEFL	KNEQELTQAKVPYEVGKAFFKGMARAQI AGE PQGMLKILFHRETLEVLGVHCFGYQASEI
STH_ECOLI	KTEQQLTAMKVPYEVGRAQFKHLARAQIVGMNVGTLKILFHRETKEILGIHCFGERAAEI
STH_AZOVI	VHIGQAIMNQKGEANTLKYFINTTFNYPTMAEAYRVAAYDGLNRLF
STH_PSEFL	VHIGQAIMSQPGELN LKYFVNTTFNYPTMAEAYRVAAYDGLNRLF
STH_ECOLI	IHIGQAIMEQKGGGNTIEYFVNTTFNYPTMAEAYRVAALNGLNRLF

Figure 13 : Alignement des séquences protéiques entre les transhydrogénases soluble STH de *Azobacter vinelandii* (AZOVI), *Pseudomonas fluorescens* (PSEFL) et *E. coli* (ECOLI). L'alignement a été effectué par le programme CLUSTAL W. (*) Indique la thréonine conservée par les STHs ; (-) : motif de Rossmann caractéristique (Gly-X-Gly-X-X-Gly/Ala) pour la fixation du FAD et du NAD(P). D'après (Boonstra *et al.*, 2000).

Des études montrent que UdhA contient un FAD lié de façon non covalente (Boonstra *et al.*, 1999). Les enzymes appartenant à la famille des flavoprotéines disulfide oxydoréductases possèdent ensuite, généralement, deux résidus cystéines qui constituent des sites redox actifs. Pour les transhydrogénases d'*E. coli*, *P. fluorescens*, et *A. vinelandii*, seul le premier résidu cystéine est conservé. Le second est systématiquement remplacé par une thréonine (Boonstra *et al.*, 2000). Boonstra *et al.* (2000) ont conclu de cette analyse que les transhydrogénases solubles sont une nouvelle classe d'enzymes au sein de la famille des flavoprotéines disulfide oxidoreductases.

Au centre de la transhydrogénase soluble STH, on retrouve un site de fixation pour le NAD(P)⁺, de nouveau accompagné du motif de Rossmann caractéristique (Gly-X-Gly-X-X-Gly/Ala) (Figure 13).

L'extrémité C-terminale de la protéine, de la position 247 à la position 455 chez *E. coli* correspond à un domaine de dimérisation.

La taille native de Sth chez *E. coli* a été estimée par filtration sur gel à 386 kDa (+/- 31 kDa) avec la présence d'un monomère d'une taille estimée de 51,6 kDa (+/- 3,5kDa) (Boonstra *et al.*, 1999). D'après la séquence protéique la masse moléculaire d'UdhA est estimée à 51,56 kDa. D'après ces résultats, il semble qu'une unité fonctionnelle d'UdhA soit présente sous la forme d'un homo-octamère. Des études plus approfondies de la structure ont été réalisées chez *P. fluorescens* et *A. vinelandii* (Boonstra *et al.*, 2000; French *et al.*, 1997). Contrairement à UdhA d'*E. coli*, chez ces deux organismes, Sth forme des structures filamenteuses d'un diamètre d'approximativement 11 nm et une longueur pouvant atteindre 300 nm pour *A. vinelandii*, et jusqu'à 1 μm pour *P. fluorescens*. La présence de ces filaments a été démontrée par spectroscopie électronique, voir Figure 14.

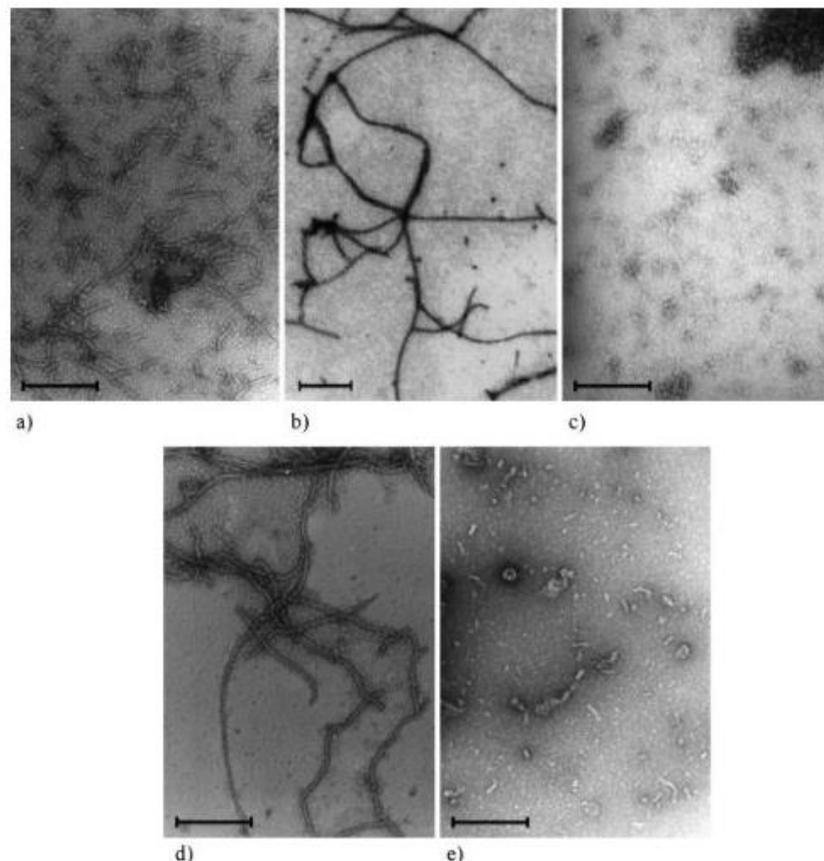


Figure 14 : Photomicrographie électronique des protéines Sth de (a) *A. vinelandii*, (b) *P. fluorescens*, (c) *E. coli*, (d) chimère avec C-terminal de *P. fluorescens* et (e) chimère avec C-terminal d'*E. coli*. La barre d'échelle correspond à 200 nm. D'après (Boonstra *et al.*, 2000).

D'après le spectre de diffraction optique de Sth d'*A. vinelandii*, un modèle de la structure des polymères a été proposé (Figure 15).

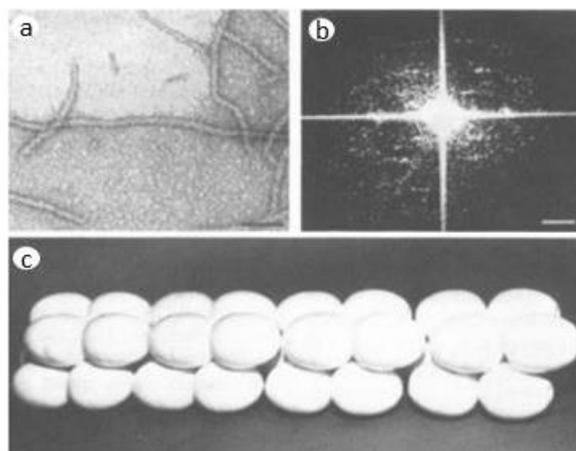


Figure 15 : Photomicrographie électronique et spectre de diffraction optique de la transhydrogénase Sth d'*A. vinelandii*. (a) Photomicrographie électronique d'un polymère de transhydrogénase, La barre d'échelle correspond à 64nm, (b) Spectre de diffraction optique d'un seul polymère, La barre d'échelle correspond à 19.2nm^{-1} , (c) Modèle proposé pour l'arrangement des sous-unités dans le polymère de la transhydrogénase STH de *A. vinelandii*. D'après (Voordouw *et al.*, 1980).

Selon ce modèle, les polymères sont composés d'anneaux, contenant quatre sous-unités Sth, et formant un tétramère. Ces tétramères s'alignent linéairement afin de former le polymère. La plus petite unité fonctionnelle de l'enzyme serait un octamère, composé de deux anneaux de tétramères (Voordouw *et al.*, 1980). Afin d'approfondir la compréhension du mécanisme de polymérisation de ces enzymes, des enzymes chimériques de Sth d' *A. vinelandii* ont été construites (Boonstra *et al.*, 2000). Les 113 acides aminés de la région C-terminale de Sth de *A. vinelandii* ont été remplacés par ceux issus de *P. fluorescens* et *E. coli*. La structure a ensuite été analysée par spectroscopie électronique, (Figure 14). On observe que l'enzyme chimérique, avec l'extrémité C-ter de *P. fluorescens*, forme toujours des filaments, alors que celle avec l'extrémité C-ter d'*E. coli* n'en forme plus. Malgré les modifications de structure les deux enzymes chimériques conservent une activité enzymatique importante, avec respectivement 176 U/mg et 259 U/mg, comparé à 360 U/mg pour la protéine native.

1.2.5.3. Régulation de l'expression des transhydrogénases chez *E. coli*

Dans un premier temps, la régulation de l'expression de ces deux transhydrogénases était considérée comme étant modulée par l'état redox des cellules (Sauer *et al.*, 2004). En cas d'excès de NADPH, *udhA* aurait été surexprimée, et *pntAB* réprimée, et inversement lors d'un excès de NADH. Cette théorie a ensuite été infirmée par une étude sur la régulation de ces deux enzymes lors de la croissance sur 8 substrats différents (Haverkorn van Rijsewijk *et al.*, 2016). L'expression des transhydrogénases chez *E. coli* a été comparée entre une croissance sur glucose et une croissance sur galactose, acétate, pyruvate, glycérol, fructose, succinate et gluconate, afin de déterminer la régulation de ces enzymes.

L'expression des transhydrogénases est indépendante de la sur- ou sous-production effective en NADPH, mais elle est modulée par la quantité de nutriments présents, et par la vitesse de croissance, ce qui ajuste la production aux besoins en cofacteurs redox NADPH et NADH. Les régulateurs de transcription impliqués dans la régulation de l'expression des deux transhydrogénases répondent à deux signaux majoritaires. Le premier signal est la quantité d'acides aminés présents. Elle est détectée par les facteurs de transcription Lrp et ArgP. ArgP est impliqué dans l'activation de la transcription de *pntAB*, alors que Lrp active la transcription de *pntAB* et inactive celle d'*udhA*. La fixation du facteur de transcription Lrp sur la région promotrice de *pntAB* a été démontrée expérimentalement (Haverkorn van Rijsewijk *et al.*, 2016). Le second signal de régulation de la transcription des transhydrogénases est la quantité intracellulaire d'AMPc. Lors de périodes de forte croissance, le niveau d'AMPc intracellulaire est faible, et le besoin en NADPH pour la biosynthèse est fort. Le niveau d'AMPc régule la transcription de *pntAB* par la fixation allostérique de l'AMPc au facteur de transcription Crp. Lorsque l'AMPc est fixé à Crp, on observe une répression de la transcription de *pntAB*. Plus la quantité d'AMPc est importante, plus la répression est forte. Il existe d'autres régulateurs de transcription de *pntAB* : HNS qui active sa transcription, et IHF et Fur la répriment. Le régulateur de la respiration ArcA affecte négativement la transcription d'*udhA*. Bien que ces facteurs de régulation ne détectent pas directement le niveau de NADPH pour moduler l'expression, ils permettent à la cellule d'ajuster l'équilibre redox en fonction de ses besoins et de son état physiologique. Cependant, l'équilibre redox doit être ajusté très rapidement en cas de stress, avec un ajustement en quelques secondes. Or, ici, la régulation par les facteurs de transcription peut prendre plusieurs minutes. Il est donc possible qu'il existe un autre système de régulation de l'activité des transhydrogénases, probablement par allostérie, qui n'aurait pas encore été mis en évidence.

1.2.5.4. Evolution adaptative des transhydrogénases et de leur régulation

La régulation de ces deux transhydrogénases, PntAB et UdhA, joue un rôle important dans la flexibilité du métabolisme et permet de maintenir l'équilibre redox de la cellule (Auriol *et al.*, 2011; Canonaco *et al.*, 2001; Charusanti *et al.*, 2010). Par exemple, l'inactivation de la phosphoglucose isomérase (Pgi) chez *E. coli* conduit à une importante diminution du taux de croissance. Il est nécessaire d'effectuer une adaptation afin de restaurer la croissance. L'inactivation de Pgi empêche d'utiliser la glycolyse pour métaboliser le glucose, et c'est la voie des pentoses phosphates qui est alors utilisée exclusivement, créant ainsi une surproduction de NADPH. Lors de l'évolution adaptative de cette souche, plusieurs mutants d'*E. coli*, qui contiennent des mutations permettant de rétablir l'équilibre NADPH/NADH, ont été isolés (Charusanti *et al.*, 2010). L'une des mutations observées touche la région promotrice du gène *udhA* : la guanine en position -64 est remplacée par une adénine ou une thymine.

Les auteurs ont émis l'hypothèse que cette mutation de la région promotrice augmente l'expression d'*udhA*, et ainsi augmente le ratio NADH/NAD⁺ et réduit le ratio NADPH/NADP⁺. Plusieurs mutations qui inactivent la transhydrogénase PntAB ont également été constatées. Ces mutations génèrent des formes tronquées de PntAB, rendant le complexe non fonctionnel, et permettent ainsi de diminuer la formation de NADPH à partir de NADH. L'inactivation de PntAB a été retrouvée seule ou en complément des mutations précédentes dans la région promotrice d'*udhA*. Une autre stratégie afin de rétablir la croissance du mutant Δ *pgi* a été de surexprimer UdhA à partir d'un plasmide (Canonaco *et al.*, 2001). Dans ce cas, on a également observé une amélioration de la croissance, confirmant ainsi que ce problème de croissance est lié au déséquilibre redox de la souche.

En 2010 Auriol *et al.* (2010) a construit une souche d'*E. coli* chez laquelle les voies de réoxydation du NADPH ont été inactivées et le métabolisme réorienté afin de forcer l'utilisation des voies réductrices du NADP⁺ lors de la croissance sur glucose, dans le but d'étudier la flexibilité et l'adaptabilité du métabolisme d'*E. coli* en présence d'un fort déséquilibre redox (Auriol *et al.*, 2011). Le flux métabolique a été redirigé dans la voie des pentoses phosphates par la délétion des gènes *pgi* et *edd* inactivant ainsi la première étape de la glycolyse et de la voie d'Entner-Doudoroff respectivement. La transhydrogénase UdhA et la NAD(P)H:quinone oxydoréductase (*qor*) ont également été inactivées par la délétion de leurs gènes respectifs, pour empêcher la réoxydation du NADPH en NADH ou en quinone réduite. Cette souche a ensuite été caractérisée lors de cultures en aérobiose dans un milieu minimum contenant du glucose. Une croissance réduite avec un taux de croissance de 0,04h⁻¹ et une faible vitesse de consommation du glucose de 0,9 mmol.g⁻¹.h⁻¹ est observée dans la souche génétiquement modifiée par rapport à la souche native, qui a un taux de croissance de 0,6 h⁻¹ et une vitesse de consommation du glucose de 10,4 mmol.g⁻¹.h⁻¹ dans les mêmes conditions de culture. Une évolution adaptative a ensuite été réalisée pour forcer l'évolution de la souche : après environ 20 générations, la population sélectionnée a un taux de croissance 6 fois supérieur à la souche initiale. A partir de cette population, des clones ont été isolés et la séquence de leur ADN génomique a été analysée par la technique d'hybridation sur puces à ADN, et comparée à la séquence d'ADN génomique de la souche non évoluée. Les auteurs ont obtenu 5 signaux différents entre les clones isolés et la souche évoluée : les 4 premiers signaux correspondent aux délétions des gènes *pgi*, *edd*, *udhA* et *qor*, et le 5^{ème} signal correspond à une mutation dans le gène *nuoF*, qui code pour la NADH:ubiquinone oxydoréductase. Cette mutation a ensuite été confirmée par un séquençage de Sanger. La mutation *nuoF** provoque le remplacement du glutamate en position 184 par une alanine. Les auteurs ont ensuite produit, purifié, et mesuré l'activité enzymatique de ce mutant NuoF* et ont montré que la mutation observée dans *nuoF* permet à la NADH:ubiquinone oxydoréductase d'utiliser le NADH mais aussi le NADPH comme donneur d'électrons pour générer une force proton motrice. Cet exemple montre qu'en présence d'un

excès de NADPH chez *E. coli*, la transhydrogénase UdhA joue un rôle essentiel au maintien de l'équilibre redox, mais qu'en son absence, la flexibilité du métabolisme permet à *E. coli* de surmonter cette limitation. On retrouve d'autres exemples dans la littérature où la surexpression des transhydrogénases favorise l'équilibre redox vers la production de produits d'intérêt, tels que la production d'hydromorpone (B. Boonstra *et al.*, 2000), de (S)-2-chloropropionate (Jan *et al.*, 2013) et la production de butanol par *E. coli* (Soucaille *et al.*, 2015).

2. Le choix d'*Escherichia coli* comme « châssis » pour l'ingénierie métabolique

E. coli présente l'avantage d'une croissance rapide, dans des conditions de culture simple, avec différents substrats. Son métabolisme est flexible et possède la capacité de s'adapter, rendant cette bactérie intéressante pour l'étude en laboratoire mais également pour l'usage industriel. L'ensemble des connaissances disponibles sur la biochimie, la physiologie, et la génétique d'*E. coli* ont permis de réaliser des progrès rapides en ingénierie métabolique et en biologie de synthèse. Il existe de nombreux outils génétiques qui permettent de modifier rapidement le génome d'*E. coli* ainsi que son métabolisme. Ces outils ont permis d'utiliser cette bactérie comme biocatalyseur de nombreux produits (Figure 16) (Zhao *et al.*, 2019).

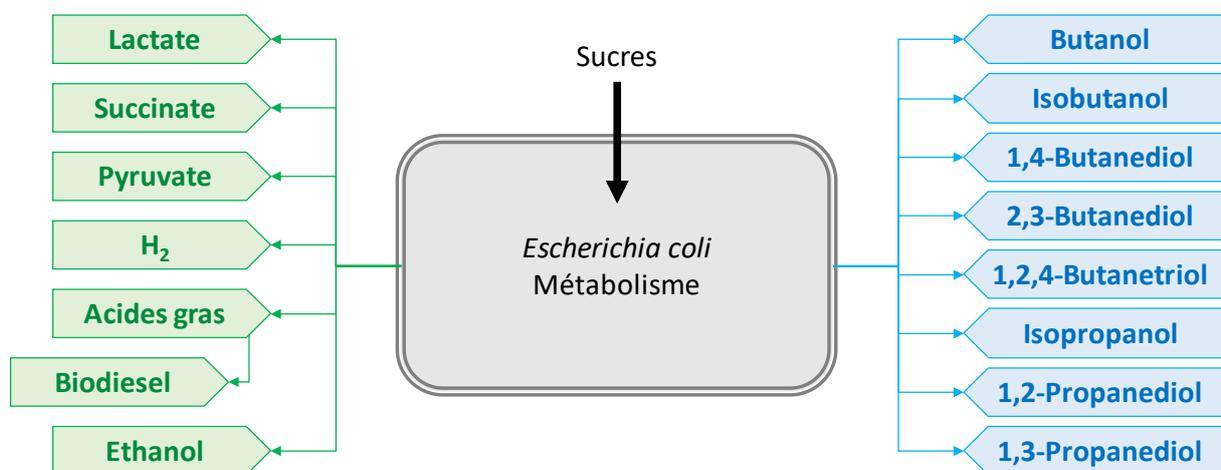


Figure 16 : Les sucres peuvent être convertis en une large variété de produits métaboliques grâce à la souplesse du métabolisme d'*E. coli*. D'après (Zhao *et al.*, 2019)

En particulier, le génome de la souche MG1655 est connu depuis 1997 (Blattner *et al.*, 1997), et la construction de la « *E. coli* Keio Knockout Collection » en 2006 (Baba *et al.*, 2006) a permis une étude approfondie de la physiologie d'*E. coli*. Cette collection, construite à partir de la souche BW25113, est composée d'environ 4000 mutants, avec un unique gène inactivé par mutant : Cela permet d'étudier les conséquences associées à la perte de fonctionnalité du gène visé. Les outils d'édition de génome, tels que le remplacement de gène par une cassette de résistance à un antibiotique (Datsenko and Wanner,

2000), la modification d'expression de gène chromosomique (Meynial-Salles *et al.*, 2005a), ou la technique CRISPR-Cas9 développée chez *E. coli* (Jiang *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2017) facilitent l'ingénierie métabolique de la souche (Jiang *et al.*, 2015). Par exemple, *E. coli* a été optimisée pour la synthèse d'acides aminés (tryptophane, phénylalanine, thréonine, lysine), ce qui était précédemment réalisé, à un rendement plus faible, par *Corynebacterium glutamicum* (Gusyatiner *et al.*, 2017; Kojima *et al.*, 2000). *E. coli* est également un hôte de choix pour établir la démonstration de faisabilité d'une voie synthétique fonctionnelle, avec, par exemple, la production de 1,3-propanediol (Sabra *et al.*, 2016), et de 1,4-butandiol (Burgard *et al.*, 2016).

Cependant, *E. coli* présente des limitations dans son utilisation comme hôte pour l'ingénierie métabolique. *E. coli* n'est pas capable de produire des produits biopharmaceutiques glycosylés, ou des protéines ayant une structure quaternaire complexe, ou encore des protéines avec beaucoup de ponts disulfures (Pontrelli *et al.*, 2018a). De plus, la culture d'*E. coli* n'est pas possible à pH trop faible ou trop élevé, ni à haute température. *E. coli* est également sensible aux attaques par les phages lors de cultures en conditions non-stériles de certains procédés industriels (de Melo *et al.*, 2018).

2.1. Modèle informatique du métabolisme à l'échelle du génome

La reconstruction du réseau métabolique d'*E. coli* à l'échelle du génome, en intégrant le séquençage complet du génome et les données biochimiques et enzymatiques disponibles, a permis la construction de modèles informatiques du métabolisme. Ces modèles sont appelés « genome-scale model (GEM) » et sont utilisés pour créer une simulation informatique du métabolisme d'un organisme sous des conditions spécifiques de croissance. Les GEMs sont un format structuré de l'information et sont utilisés lors d'approches informatiques quantitatives afin d'estimer la réponse d'un organisme dans des conditions données. *E. coli* est un organisme modèle dans la construction et l'utilisation des GEMs. Le premier GEM sur *E. coli*, nommé *iJE660* a été publié en 2000 (Edwards and Palsson, 2000). Ce modèle a ensuite été régulièrement mis à jour, conduisant aux versions *iJR904* (Reed *et al.*, 2003), *iAF1260* (Feist *et al.*, 2007) et la plus récente *iJO1366* (Orth *et al.*, 2011). Les GEMs d'*E. coli* ont été utilisés pour répondre à des questions dans six catégories distinctes : l'ingénierie métabolique, la découverte de nouvelles fonctions métaboliques, le comportement phénotypique, l'analyse du réseau métabolique, l'évolution bactérienne et les interactions inter-espèces. Le Tableau 6 récapitule ce que les modèles apportent par catégorie et quelles sont les futures applications envisagées et les limitations actuelles des GEM.

Application	Utilisation des GEM chez <i>E. coli</i> pour	Limitation des GEM
Ingénierie métabolique	<ul style="list-style-type: none"> -Déléter des gènes (Combinaison de délétion) -Introduire des gènes -Sur- ou sous-exprimer des gènes -Tester rapidement l'impact global de l'introduction d'une voie métabolique hétérologue -Rechercher des biomarqueurs associés à une fonction particulière -Identifier les étapes limitantes d'une voie métabolique -Déterminer les suppléments à faire dans le milieu de culture 	<ul style="list-style-type: none"> -Prédire les perturbations par les régulations des voies métaboliques -Prédire l'inhibition allostérique -Prédire de façon précise l'expression de gènes hétérologues -Manque de données biologique
Découverte biologique	<ul style="list-style-type: none"> -Prédire la croissance en fonction de la source de carbone et du milieu utilisés -attribuer une fonction à un gène -guider la réannotation des gènes -connecter les métabolites isolés à des réactions connues 	<ul style="list-style-type: none"> -Prédire la régulation des isoenzymes -prédire l'expression des gènes -prédire l'état fonctionnel des protéines (maturation)
Comportement phénotypique	<ul style="list-style-type: none"> -Prédire les conditions optimales de croissance -prédire et interpréter les changements de croissance -prédire si un gène est essentiel -aider à l'interprétation des résultats expérimentaux 	<ul style="list-style-type: none"> - Expliquer pourquoi les performances observées sont inférieures à celles prédites

	-découper le métabolisme en nœuds métaboliques, lien de dépendance, fonctions essentielles, et déterminer la robustesse générale du système	
Analyse du réseau métabolique	-décrire les interactions complexes du métabolisme -évaluer la modularité de fonctions -évaluer la régulation du métabolisme d'après la structure du métabolisme	-Peu de prédictions peuvent être validées expérimentalement
Evolution bactérienne	-Prédire les gènes essentiels - Donner des renseignements sur l'évolution d'une souche	-Prédire l'évolution d'une souche -prédire les mutants apparus lors de l'évolution -prédire l'effet des mutations
Interaction inter-espèces	-Modéliser l'échange de métabolites -Déterminer le ratio coût/bénéfice entre bactéries commensales	-Pas de mesure possible des flux d'échange entre plusieurs cellules -Données limitées pour la construction des modèles d'interaction

Tableau 6 : Force et faiblesse des GEMs en fonction de leurs applications. Tableau d'après (McCloskey *et al.*, 2013).

L'utilisation des GEMs en ingénierie métabolique permet de modifier rationnellement le génome d'*E. coli*, afin d'orienter le métabolisme vers la production du ou des produits souhaités. Les propositions données pour répondre à un problème par les GEMs s'appuient sur les données génomiques, protéomiques, (stœchiométrie et cinétique des enzymes impliquées dans les voies métaboliques concernées) et sur la régulation des voies métaboliques. Les GEMs peuvent également être utilisés pour identifier des stratégies de couplage entre la production d'un produit d'intérêt avec la croissance de la bactérie. Ces stratégies de couplage conduisent à des souches plus robustes, ayant peu de chance d'évoluer au cours de leurs cultures. Les stratégies d'ingénierie métabolique utilisant les GEMs sont souvent contre-intuitives et plusieurs exemples démontrent leur intérêt dans ce domaine. Par exemple, pour produire de la flavonone chez *E. coli*, une analyse a été effectuée en utilisant les GEMs, puis validée expérimentalement (Chemler *et al.*, 2010; Fowler *et al.*, 2009). Le modèle a créé une stratégie de délétion, afin de favoriser l'accumulation de NADPH dans la cellule pour diriger le flux vers la production de flavonone, tout en maintenant l'équilibre redox optimal pour la cellule (Ratio

NADPH/NADP⁺). Un autre exemple est la production de 1,4 butanediol chez *E. coli*. Les auteurs ont remanié le métabolisme d'*E. coli*, afin d'intégrer une voie hétérologue de production du 1,4 butanediol en rendant la production de ce métabolite essentielle pour maintenir l'équilibre redox et la croissance lors de la culture anaérobie (Yim *et al.*, 2011). Cependant, dans les exemples détaillés précédemment, les auteurs ont dû sélectionner soigneusement parmi les stratégies proposées par le GEM, afin d'éviter les stratégies conduisant à des souches non-viables. L'utilisation des GEMs pour guider l'ingénierie métabolique requiert une forte connaissance du métabolisme biochimique de l'hôte afin de sélectionner les stratégies viables *in-vivo*.

Les GEMs intègrent de plus en plus d'informations afin de permettre une prédiction fiable du phénotype. Cependant, le nombre accru d'informations va aussi augmenter la complexité de la réponse fournie par le modèle, et parfois masquer la réponse souhaitée par l'utilisateur. Pour répondre à cette problématique, des modèles simplifiés ont été construits à partir du modèle global (Ataman *et al.*, 2017) ou des modèles dédiés à une fonction précise, telle que la cinétique des enzymes (Khodayari and Maranas, 2016). *EColiCore2* (ECC2) est un modèle métabolique simplifié d'*E. coli* basé sur le dernier GEM d'*E. coli* iJO1366 (Hädicke and Klamt, 2017). Il comprend 486 métabolites et 499 réactions. L'avantage de ce modèle simplifié est qu'il est possible de réaliser les calculs à partir d'un ordinateur standard en un temps raisonnable. De plus, le nombre réduit de réactions permet d'avoir une représentation claire et concise du métabolisme global au travers d'un graphique. Ce modèle est également à privilégier pour une utilisation dans le cadre de l'enseignement grâce à sa taille réduite qui augmente la clarté du message. Afin de valider la pertinence de ce modèle simplifié, les auteurs ont comparé la réponse donnée par ECC2 par rapport au modèle complet dans plusieurs cas concrets. Les auteurs ont tenté d'augmenter la production d'éthanol en anaérobiose chez *E. coli* par inactivation de plusieurs gènes, dans les deux modèles. La production d'éthanol à partir de glucose en anaérobiose chez *E. coli* a été simulée en paramétrant la vitesse d'absorption de l'oxygène à 0 et en augmentant la vitesse d'absorption du glucose à 18,5 mmol/gDW/h afin de refléter les conditions *in-vivo* chez *E. coli* en anaérobiose. Les modèles ont été paramétrés pour obtenir un rendement minimum de 1.4 moles en éthanol par mole de glucose et un taux de croissance minimal de 0.05h⁻¹. Pour les deux modèles, la limite du nombre de délétions possibles a été fixée à 10. Le modèle global a trouvé 44 066 combinaisons possibles de délétions à réaliser (impliquant 169 réactions) alors que le modèle simplifié a proposé 2176 combinaisons (impliquant 38 réactions) permettant, d'après les modèles, la production d'éthanol à haut-rendement. Une analyse détaillée des résultats montre que le modèle simplifié a besoin de réaliser en moyenne 5 délétions alors que le modèle global a besoin au minimum de 6 délétions. De plus, parmi les résultats fournis par le modèle simplifié, 5 gènes candidats pour la délétion sont absents des propositions fournies par le modèle global, probablement en raison de la

limitation à 10 délétions possibles. On aboutit à un résultat de 33 réactions candidates à l'inactivation commune entre le modèle simplifié ECC2 et le modèle global *iJO1366*, après l'élimination des stratégies impliquant la délétion d'un gène essentiel chez *E. coli* ou incompatible avec d'autres délétions.

Les GEMs représentent un outil de choix dans l'ingénierie métabolique. Leur utilisation est de plus en plus systématique et la précision et la fiabilité des analyses augmentent régulièrement. Cependant, il est toujours nécessaire de sélectionner avec soin la stratégie à utiliser en tenant compte des spécificités des voies métaboliques de l'hôte utilisé en cohérence avec les voies métaboliques hétérologues introduites.

2.2. Ingénierie métabolique d'*Escherichia coli* pour la production d'éthanol et de butanol

2.2.1. La production d'éthanol par voie fermentaire

L'éthanol est l'un des produits de fermentation sécrété lors de la croissance d'*E. coli* en milieu chimiquement défini de type M9 sur glucose, en anaérobiose. Cependant, d'autres produits sont également formés (Acétate, lactate, succinate et formate)(Clark, 1989). Ce résultat s'explique par le déséquilibre redox de la voie native de production de l'éthanol chez *E. coli*. La synthèse d'éthanol est catalysée par l'éthanol déshydrogénase (aldéhyde/alcool déshydrogénase) codée par le gène *adhE* qui transforme une mole d'acétyl-CoA en une mole d'éthanol, en deux étapes, utilisant deux moles de NADH. Or, un seul NADH est formé par acétyl-CoA synthétisé lors de la croissance sur glucose ou xylose comme source de carbone, (Orencio-Trejo *et al.*, 2010). Par conséquent, il n'est pas possible de produire de l'éthanol comme produit unique de fermentation dans une souche sauvage d'*E. coli* (Kim *et al.*, 2007), sans réorientation du métabolisme.

Actuellement, la production industrielle d'éthanol par voie fermentaire est réalisée par *Saccharomyces cerevisiae*, et permet la production d'éthanol à partir d'hexoses (Biocarburant de 1^{ere} génération) à un titre d'environ 100 g/L et un rendement de conversion de 0,46 g/g soit 90% du rendement théorique maximum. Cependant, cette bioproduction entre en compétition avec des ressources alimentaires, en utilisant du maïs ou de la canne à sucre. Dans le cadre du développement des biocarburants de seconde génération, dont le but est d'utiliser la biomasse végétale comme source de carbone, la lignocellulose représente une source de carbone intéressante pour la production d'éthanol (Dien *et al.*, 2003; Galbe and Zacchi, 2002). La lignocellulose est composée de cellulose, d'hémicellulose, de lignine et de pectine. *E. coli* devient un candidat d'intérêt pour la production d'éthanol à partir de lignocellulose, du fait de sa capacité à utiliser les hexoses et les pentoses (principaux composants de

l'hémicellulose). Cependant, lors de l'hydrolyse acide de la lignocellulose, des composés toxiques pour les microorganismes sont libérés en fonction de la composition de la lignocellulose. A partir de l'hémicellulose, du furfural va être généré, à partir de la cellulose, de l'hydroxyméthylfurfural et à partir de la lignine, des alcools (catéchol, coniferyl), des aldéhydes (cinnamaldehyde, hydroxybenzaldehyde, syringaldehyde) et des acides (caproïque, coumarique, ferulique). *E. coli* présente l'avantage d'être plus résistante que les microorganismes éthanologéniques, vis à vis des composés toxiques produits lors de l'hydrolyse acide de la lignocellulose (Zaldivar *et al.*, 1999).

2.2.1.1. Ingénierie métabolique d'*E. coli* pour la production d'éthanol à partir de glucose

Afin que l'éthanol soit le produit de fermentation majoritaire, le métabolisme anaérobie d'*E. coli* doit être rationnellement modifié (Trinh *et al.*, 2008). La première génération de souches d'*E. coli* génétiquement modifiées pour la production d'éthanol a été transformée avec un plasmide contenant l'opéron PET. Cet opéron contient la voie métabolique de production d'éthanol à partir de pyruvate de *Zymomonas mobilis*, exprimant les gènes codant pour la pyruvate décarboxylase (*pdc*) et l'alcool déshydrogénase (*adhB*), représentés Figure 17. L'introduction de la voie métabolique pour la production d'éthanol de *Z. mobilis* chez *E. coli* permet théoriquement la production de 2 moles d'éthanol par mole de glucose consommé, en maintenant l'équilibre redox de la cellule. L'éthanol est alors le produit de fermentation majoritaire de cette souche, avec une production en culture discontinue à partir de glucose de 5,8 à 6,9% (vol/vol) et de 4,8 à 5,2% à partir de xylose (Alterthum and Ingram, 1989; Ingram and Conway, 1988; Neale *et al.*, 1988). Cependant, l'expression de l'opéron sur un plasmide peut présenter un problème de stabilité de la souche lors de la fermentation.

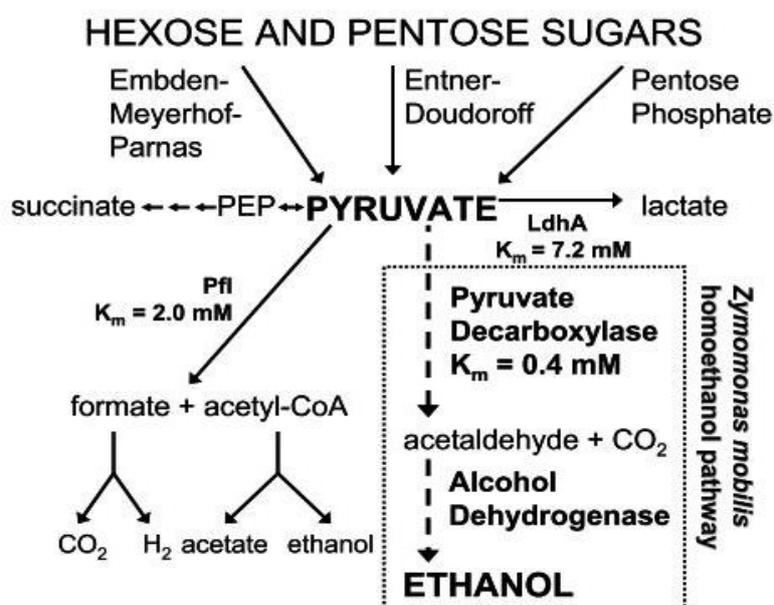


Figure 17 : Conversion des hexoses et des pentoses en éthanol par *E. coli* exprimant la voie métabolique pour la production d'éthanol de *Zymomonas mobilis*. D'après (Jarboe *et al.*, 2007).

2.2.1.2. Seconde génération de souches éthanologéniques : Intégration de l'opéron PET dans le génome

Une seconde génération de souches a été construite en intégrant les gènes sur le chromosome pour augmenter la stabilité de la souche lors de la fermentation et éviter la perte de l'opéron PET. Cette souche, nommée KO11, qui dérive d'*E. coli* W, a été construite par Ingram *et al.* (Jarboe *et al.*, 2007; Ohta *et al.*, 1991a). L'opéron PET a été intégré au chromosome sous le contrôle du promoteur *pfl*, avec un marqueur de résistance au chloramphénicol. Le choix d'intégrer l'opéron PET à la place du gène *pflB* a été effectué car ce gène est fortement exprimé lors de la croissance en anaérobiose chez *E. coli* (Sawers and Böck, 1989, 1988). Une évolution adaptative a été effectuée avec la souche KO11 pour adapter l'expression de l'opéron PET *in-vivo*, et ainsi améliorer la production en éthanol. L'ingénierie du métabolisme a été poursuivie pour rediriger le flux de carbone vers la production en éthanol. Le locus *frdABCD* a été inactivé pour empêcher la production de succinate. La fermentation discontinue en milieu LB, supplémenté avec 100 g/L de glucose ou 80 g/L de xylose, de la souche KO11, a conduit à la production respective de 54 et 42 g/L d'éthanol, une productivité d'environ 0,9 g/L/h d'éthanol, et un rendement de 107% (0,54 g/g) par rapport au rendement théorique maximum (0,51g éthanol/ g sucre), du fait de la métabolisation des nutriments présents dans le milieu LB (Ohta *et al.*, 1991a). Cette souche a ensuite été cultivée avec des hydrolysats en provenance de l'industrie agroalimentaire et de l'agriculture, tels que le lactosérum doux, la fibre de maïs, et la bagasse de la canne à sucre. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 7.

Organisme	Biomasse	Ethanol g/L	Temps de fermentation	% du rendement théorique	Références
<i>E. coli</i> KO11	Balles de riz	46	72	92	(Moniruzzaman and Ingram, 1998)
	Bagasse de la canne à sucre	37	60	90	(Asghari <i>et al.</i> , 1996)
	Fibre de maïs	44	72	94	(Asghari <i>et al.</i> , 1996)
	Pulpe de betterave	40	120	n/a	(Doran <i>et al.</i> , 2000)
	Son de maïs	38	48	100	(Bell <i>et al.</i> , 1992)
	<i>Pinus</i> sp (bois résineux)	35	48	100	(Barbosa <i>et al.</i> , 1992)
	Peau d'orange	28	72	81	(Grohmann <i>et al.</i> , 1994)
	Lactosérum doux	20	96	96	(Leite <i>et al.</i> , 2000)
	Bois de saule	4.5	14	n/a	(Sivers <i>et al.</i> , 1994)
	Eaux usées de brasserie	15	84	n/a	(Rao <i>et al.</i> , 2007)

Tableau 7 : Biomasse utilisée par la souche *E. coli* KO11 pour la production d'éthanol. D'après (Jarboe *et al.*, 2007).

2.2.1.3. Construction de souches éthanologéniques à partir d'*E. coli* K12

Une autre série de souches a été construite, dérivant d'*E. coli* K12, appelée FBR (« Fermentation Biochemistry Research »). Dans ces souches, la lactate déshydrogénase et la pyruvate formiate lyase sont inactivées, et sont donc incapables de recycler le NADH produit. L'opéron PET a été exprimé dans ces souches à partir d'un plasmide sous le contrôle du promoteur *lac* (Alterthum and Ingram, 1989). L'expression de l'opéron PET a permis aux cellules de restaurer leur croissance en rétablissant l'équilibre redox et produire de l'éthanol comme produit de fermentation majoritaire (Dien *et al.*, 2003). Ces souches ont été cultivées en milieu riche, en utilisant du glucose ou du xylose comme sources de carbone, avec des productions d'éthanol maximum respectives de 46,6 g/L et 43,8 g/L à un rendement d'environ 91% du rendement maximal théorique (Dien *et al.*, 1998). La souche FBR3 a également été cultivée en LB supplémenté avec des fibres de maïs (66 g/L de sucres) et elle a atteint une productivité en éthanol de 0.71g/L/h (Dien *et al.*, 2000, 1999).

2.2.1.4. Troisième génération de souche éthanologénique : Amélioration des performances lors de la culture en milieu chimiquement défini

La croissance de l'ensemble des souches éthanologéniques décrites précédemment a été réalisée à l'aide d'un milieu de culture complexe, afin d'obtenir la production d'éthanol à hauts titres et rendement. Cependant, pour l'utilisation de ces souches dans un procédé industriel, le coût de ces nutriments est trop important, et le risque de contamination élevé (Jarboe *et al.*, 2007). Par exemple, lors de la culture de la souche KO11 en milieu minimum M9 supplémenté avec 40 g/L de glucose ou de xylose, la productivité pour la production en éthanol est divisée par 2, et le rendement est inférieur à 70% du rendement théorique maximum par rapport à la culture réalisée en milieu de culture LB (Huerta-Beristain *et al.*, 2008). Une nouvelle souche a été construite, à partir de KO11, afin de pallier ce problème. La généalogie des souches est présentée Figure 18.

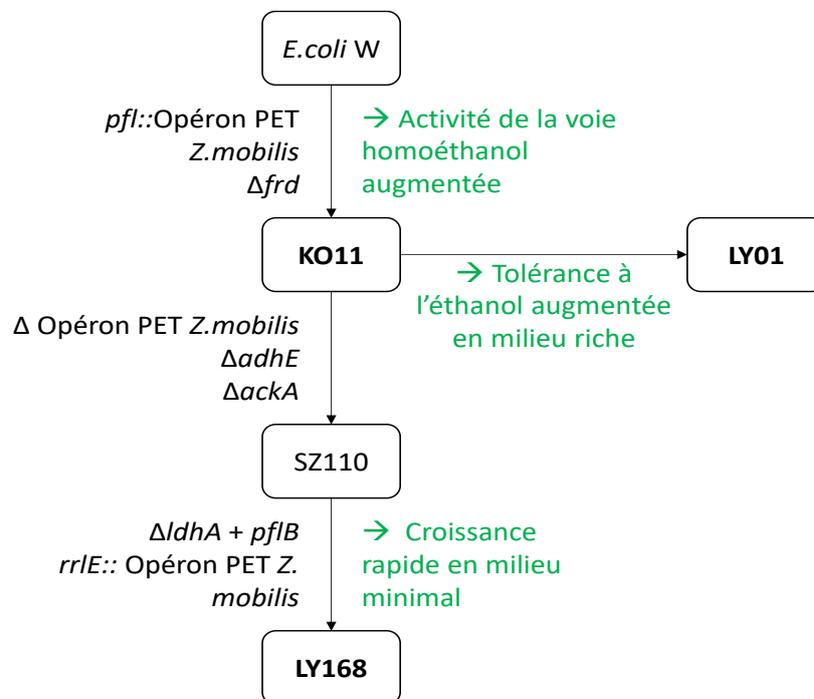


Figure 18 : Généalogie des souches d'*E. coli* exprimant l'opéron PET de *Z. mobilis*. D'après (Jarboe *et al.*, 2007).

La souche LY168 a été génétiquement modifiée, afin d'inactiver toutes les voies en compétition avec la voie de production de l'éthanol : les gènes *ldhA* et *ackA* ont été inactivés. De plus, le gène *adhE* d'*E. coli* a été inactivé, afin d'éviter une compétition entre l'alcool déshydrogénase de *Z. mobilis*, surexprimée dans cette souche, et l'enzyme native d'*E. coli*. Cependant, le locus *pfl* a été restauré (site d'intégration du PET dans KO11) afin de rétablir l'activité de la pyruvate-formiate lyase dans la souche LY168, car les délétions des gènes *ackA* et *adhE* permettent d'éviter les pertes de carbone indésirables. Il n'est donc pas nécessaire d'inactiver *pflB* par ailleurs. De plus, les auteurs ont émis l'hypothèse que l'absence de l'activité de *pflB* pouvait limiter le niveau d'acétyl-CoA dans la cellule (Jarboe *et al.*, 2007).

L'opéron PET contenant la *pdg*, *adhA* et *adhB* de *Z. mobilis* sans promoteur a ensuite été intégré de façon aléatoire par transposon, afin de sélectionner la meilleure expression pour l'opéron (Yomano *et al.*, 2008). Comme la croissance est couplée à la production d'éthanol dans cette souche, une sélection a ensuite été réalisée en milieu minimum (NBS) contenant du xylose comme source de carbone, sans ajout d'antibiotique. Les meilleurs candidats ont ensuite été enrichis par des cultures en série en milieu minimum contenant du xylose, permettant l'obtention d'une population ayant un taux de croissance et une production en éthanol supérieurs à la souche initiale. A partir de cette population, un isolement a été réalisé sur milieu solide, et un clone représentatif de la population, nommé LY158, a été sélectionné. Les cassettes de résistance aux antibiotiques ont été éliminées de la souche LY158, conduisant à une nouvelle souche nommée LY160. Les performances de ce clone ont ensuite été améliorées par évolution adaptative en réalisant des sous-cultures en milieu minimum (NBS) avec xylose, toutes les 24h pendant 32 jours. Le chromosome de la souche obtenue, appelée LY160im, a été complètement réséquencé et l'opéron PET a été localisé dans *rrlE* dans le sens de transcription du gène. Ce gène code pour une sous-unité de l'ARN ribosomal 23S. Il possède 2 promoteurs, permettant une forte expression lorsque le taux de croissance est important (phase exponentielle), et une expression basale lorsque le taux de croissance est faible (phase stationnaire). La dernière amélioration de cette souche a été l'intégration du gène *estZ* de *Pseudomonas putida*, qui code pour une estérase active sur les chaînes d'acides gras courts, permettant de diminuer la concentration en acétate d'éthyle dans le milieu de culture (Hasona *et al.*, 2002). La présence d'acétate d'éthyle dans le mou de fermentation accroît le coût de purification pour obtenir de l'éthanol pur lors d'un procédé de production industrielle. L'acétate d'éthyle entre en compétition avec la production d'éthanol, en étant produit par la condensation d'un acétyl-CoA et d'un éthanol, par une alcool acétyltransférase. Il existe plusieurs acétyltransférases potentielles dans le génome d'*E. coli*, mais les travaux réalisés par Hasona *et al.* (2002) n'ont pas permis d'identifier l'enzyme responsable de la production d'acétate d'éthyle chez *E. coli* (Choi *et al.*, 2008; Hasona *et al.*, 2002; Kallel-Mhiri and Miclo, 1993). La souche finale est appelée LY168.

Cette souche, LY168, produit 0.5 g d'éthanol par gramme de xylose, lors de la croissance en culture discontinue, à pH régulé, en anaérobiose, dans un milieu minimum (NBS) supplémenté en xylose, et en présence de bétaïne. La concentration en éthanol produit par LY168 en 24h dans un tel milieu est similaire à celle observée en LB (45g/L) (Martinez *et al.*, 2007). Les performances de cette souche, comparées aux performances des autres souches éthanologéniques, sont présentées dans le Tableau 8. Cette souche remplit donc l'objectif de produire de l'éthanol à hauts titre et rendement, à partir de xylose, sans source de complexe d'azote, et ouvre les portes aux biocarburants de seconde génération.

Organisme	Xylose g/L	Milieu	Ethanol g/L	Rendement g/g	Référence
<i>E. coli</i> LY168	90	Min	45,5	0,51	(Yomano <i>et al.</i> , 2008)
<i>E. coli</i> LY168	90	LB	45,3	0,50	(Yomano <i>et al.</i> , 2008)
<i>E. coli</i> KO11	90	LB	43,2	0,48	(Yomano <i>et al.</i> , 2008)
<i>E. coli</i> KO11	90	Min	26,9	0,30	(Yomano <i>et al.</i> , 2008)
<i>E. coli</i> FRB5 (pLOI297)	95	LB	41,5	0,44	(Dien <i>et al.</i> , 2000)
<i>E. coli</i> LY01	90	LB	42,4	0,47	(Yomano <i>et al.</i> , 1998)
Non recombinante <i>E. coli</i> SE2378	50	LB	20,5	0,41	(Kim <i>et al.</i> , 2007)
<i>K. oxytoca</i> M5A1 (pLOI555)	100	LB	46,0	0,46	(Ohta <i>et al.</i> , 1991b)
<i>Z. mobilis</i> CP4 (pZB5)	60	YE	23,0	0,38	(Lawford and Rousseau, 2003)
<i>S. cerevisiae</i> RE700A (pKDR)	50	YEP	23,0	0,46	(Sedlak and Ho, 2004)
<i>S. cerevisiae</i> RWB217	20	Min	8,7	0,44	(Kuyper <i>et al.</i> , 2005)

Tableau 8 : Comparaison entre différents organismes pour la production d'éthanol en utilisant le xylose comme source de carbone. D'après (Jarboe *et al.*, 2007). LB : extrait de levure + tryptone ; Min : milieu minéral (NBS)+ 1mM bétaïne ; YE : extrait de levure supplémenté avec du phosphate ; YEP : milieu supplémenté avec de l'extrait de levure + peptone.

2.2.1.5. Utilisation de la lignocellulose par les souches éthanologéniques sans prétraitement

Plus récemment, Munjal *et al.* (2015) ont construit une souche capable de convertir un hydrolysât de paille de blé en éthanol (Zhao *et al.*, 2019). Pour cela, la souche SSY12 exprime de façon constitutive un système de sécrétion d'une β -glucosidase, qui a permis de produire 9,4 g/L d'éthanol à partir de l'hydrolysât de paille de blé, avec un rendement de 85% (Munjal *et al.*, 2015). Cependant, les concentrations en éthanol obtenues montrent qu'une optimisation du système est nécessaire avant sa mise en place à l'échelle industrielle car on observe un titre final faible (inférieur à 10 g/L) alors que la souche LY168 permet de produire jusqu'à 45 g/L d'éthanol en milieu minimum sur xylose. De plus, les procédés industriels de production d'éthanol par fermentation qui utilisent les levures permettent

d'avoir des titres supérieurs à 100g/L à partir d'hexoses, or, le cout du procédé est inversement proportionnel au titre en éthanol. L'intérêt d'*E. coli* est de pouvoir utiliser directement la lignocellulose, qui est un substrat moins cher que celui actuellement utilisé, et d'obtenir une procédé industriel compétitif par rapport à l'actuel, en dépit du titre en éthanol moins élevé.

2.2.2. La production de n-butanol par voie fermentaire

2.2.2.1. Bactéries naturellement productrices de n-butanol

La première trace documentée d'une production de n-butanol par voie fermentaire a été rédigée par Pasteur en 1861. L'organisme *Clostridium acetobutylicum* est la bactérie la plus connue pour la production de n-butanol à l'échelle industrielle. Elle se caractérise par une fermentation dite ABE, qui produit un mélange d'acétone, de butanol, et d'éthanol, à un ratio 3:6:1 (Jones and Woods, 1986). Son utilisation à l'échelle industrielle remonte à la 1^{ère} guerre mondiale, où l'acétone produit était utilisé pour la production de cordite par le procédé de Weizmann, l'explosif majoritaire utilisé à cette époque (Jones and Woods, 1986).

Lors de la culture discontinue à pH non régulé en milieu minimum sur glucose, *C. acetobutylicum* produit dans un premier temps du butyrate, de l'acétate, de l'hydrogène et du dioxyde de carbone. Cette phase, appelée l'acidogénèse, se déroule lors de la phase exponentielle de croissance de la bactérie (Figure 19). En fin de phase exponentielle, la production d'acide diminue, à cause de la chute du pH à environ 4,5. La seconde phase, appelée solvantogénèse, démarre par une réassimilation de l'acide acétique et butyrique, produits lors de l'acidogénèse. Ces acides sont ensuite convertis en solvants, acétone, butanol et éthanol (Figure 19). Au cours de cette phase, aucune croissance n'est observée.

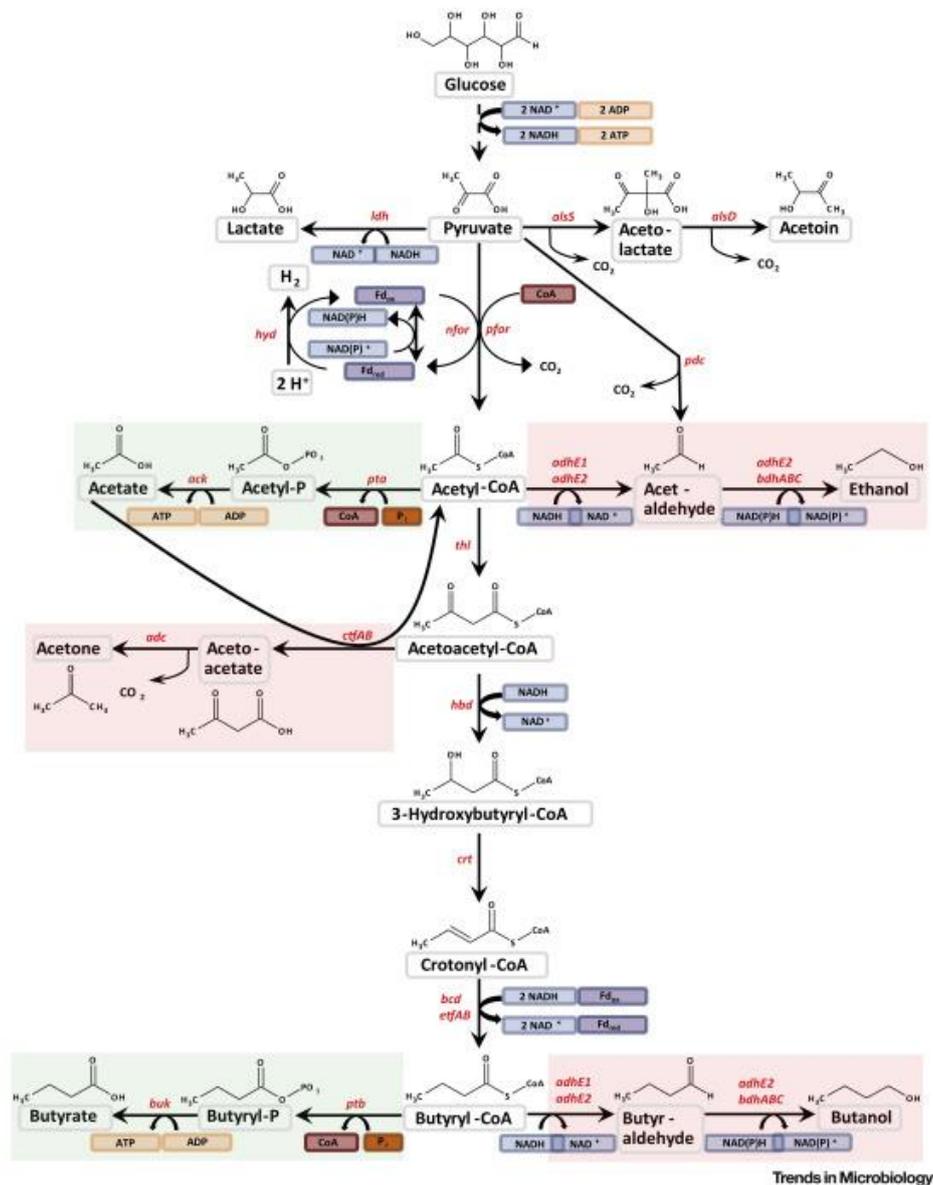


Figure 19 : Métabolisme central de *C. acetobutylicum*. Les produits principaux lors de l'acidogénèse sont encadrés en vert et les produits principaux lors de la solvantogénèse sont encadrés en rouge. D'après (Yoo *et al.*, 2019).

Cette capacité à réassimiler les acides donne un large avantage à *C. acetobutylicum* dans la nature, pour la compétition vis à vis des ressources par les micro-organismes, mais la production de n-butanol a également un effet délétère sur la membrane et certaines protéines qui la composent. C'est pour cela que la solvantogénèse est liée à la synthèse d'endospores par la cellule, lui permettant d'assurer sa survie.

La production de n-butanol par la fermentation ABE, à l'échelle industrielle, avait pratiquement disparu dans les années 60, en raison de son coût prohibitif en compétition avec la synthèse pétrochimique

(Jones and Woods, 1986). Cependant, la raréfaction des énergies fossiles et les préoccupations pour l'environnement ont relancé l'intérêt de la production du butanol par voie fermentaire. En 2009, la Chine a ouvert plusieurs centres de production de n-butanol utilisant la fermentation ABE pour la production de plus de 200.000 tonnes de n-butanol par an (Xue *et al.*, 2017). À la suite d'une rapide diminution du prix du baril de pétrole, la plupart de ces centres ont été fermés, ou leurs activités fortement ralenties, car la fabrication de butanol par voie pétrochimique est plus compétitive sur le plan économique. Afin de diminuer les coûts de la production de n-butanol par voie fermentaire, d'importants efforts ont été entrepris dans les secteurs industriels et académiques (Xue *et al.*, 2017), pour améliorer les souches et les procédés de production.

Lors d'une fermentation ABE il est difficile d'avoir plus de 2% (p/v) de n-butanol présent dans le milieu de culture. Par comparaison, les procédés industriels de production d'éthanol par fermentation produisent environ 15% (v/v). De plus, lors de l'utilisation de *C. acetobutylicum* dans un procédé continu, on observe une diminution de la production de solvant au cours du temps, dû à la dégénérescence de la souche.

2.2.2.1.1. Ingénierie métabolique des bactéries naturellement productrices de n-butanol afin d'augmenter la concentration finale et le rendement

D'important travaux d'ingénierie métabolique ont été entrepris, afin de créer de nouvelles souches de *C. acetobutylicum* présentant des performances améliorées couplées à des procédés de récupération *in-situ* du butanol, rendant possible son utilisation pour une production compétitive de n-butanol à l'échelle industrielle. La progression de l'ingénierie métabolique et de l'optimisation des procédés est représentée dans le Tableau 9. En 2003, Tomas *et al.* (2003) ont construit une souche surexprimant l'opéron *groESL*, afin d'accroître la tolérance au butanol de *C. acetobutylicum*, et ainsi augmenter le titre maximal en butanol produit. La souche ATCC 824 (pGROE1) surexprimant les gènes *groESL*, produit 17,1 g/L de butanol, et 0,97 g/L d'éthanol, avec un ratio butanol/éthanol de 17,69 g/g (Tomas *et al.*, 2003). En 2012, Lee *et al.* (2012) ont modifié le métabolisme de *C. acetobutylicum* afin de rediriger le flux de carbone vers la production de butanol. Les auteurs ont inactivé les voies de biosynthèse de l'acétate et du butyrate, en inactivant les gènes *pta* et *buk*, et la production de butanol a été favorisée en surexprimant un gène mutant *adhE1*. Cette souche BEKW (pPthID485G), produit 18,9 g/L de butanol et 2 g/L d'éthanol avec un ratio B/E de 9,45 g/g (Lee *et al.*, 2012). En 2015, Xu *et al.* (2015) ont conduit une évolution adaptative en bioréacteur de *C. acetobutylicum* afin d'accroître la production de butanol en générant des mutations aléatoires bénéfiques. La souche obtenue, nommée JB200, produit 21g/L de butanol et 2 g/L d'éthanol pour un ratio B/E de 10,5 g/g (Xu *et al.*, 2015).

Récemment, Nguyen *et al.* (2018) ont réalisés une ingénierie rationnelle du métabolisme de *C. acetobutylicum* couplée à un système de distillation en ligne afin de favoriser la production de n-butanol (Nguyen *et al.*, 2018). Les auteurs ont construit plusieurs souches successives améliorant progressivement la production en n-butanol. Dans la première souche de *C. acetobutylicum* développée, nommée CAB1057, le flux de carbone a été réorienté vers la production de butanol en inactivant la production de butyrate, d'acétone et de lactate. La production de butyrate a été éliminée par l'inactivation des gènes *ptb* et *buk*, qui codent respectivement pour la phosphotransbutyrylase et la butyrate kinase, qui sont impliquées dans les deux dernières étapes de la production de butyrate chez *C. acetobutylicum*. La production d'acétone a été éliminée par l'inactivation des gènes *ctfAB* qui codent pour l'acetoacetyl-CoA-acétate CoA transférase impliquée dans la première étape de production de l'acétone. La production de lactate a été éliminée par l'inactivation du gène *ldhA*, qui code pour la lactate déshydrogénase, qui est impliquée dans la dernière étape de production du L-lactate. L'ingénierie métabolique réalisée sur la souche CAB1057 est représentée Figure 20.

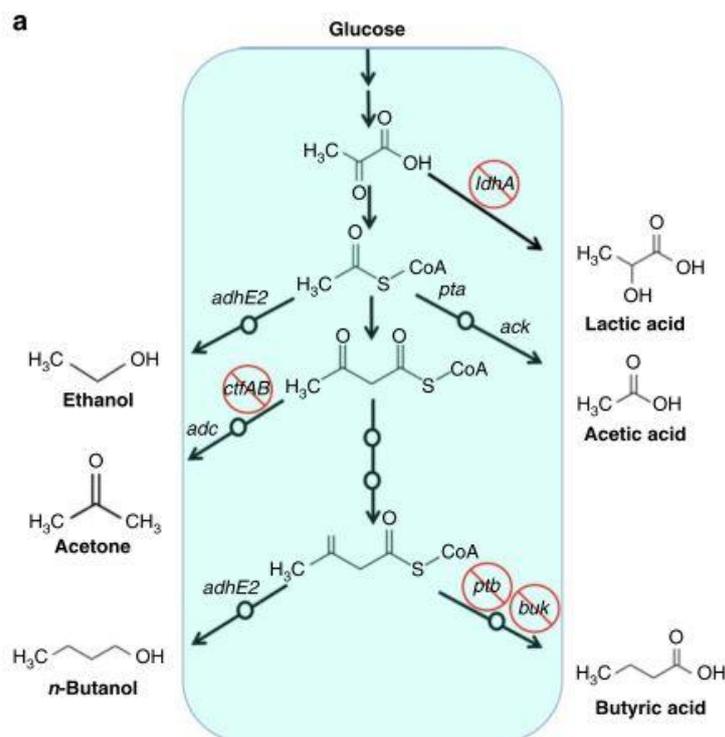


Figure 20 : Ingénierie métabolique de *Clostridium acetobutylicum* pour la production de n-butanol. D'après (Nguyen *et al.*, 2018)

Après la fermentation de cette souche CAB1057 et analyse des flux métaboliques, seule une augmentation de la production en acétate et en éthanol a été observée, alors que la production en n-butanol reste similaire à la souche sauvage. Pour rediriger le flux de carbone vers la production

d'alcool, les auteurs ont inactivé le gène *rexA* dans la souche CAB1057, conduisant à la souche CAB1058. Ce gène *rexA* code pour le répresseur de transcription Rex, qui régule la transcription des gènes *crt-bcd-etfAB-hbd* et *thl*, impliqués dans la production de n-butanol en fonction de l'état redox des cellules. La production dans la souche CAB1058 est améliorée et le rendement en alcool par rapport à la souche précédente, mais seule la production en éthanol a été améliorée, alors que la production en butanol reste inchangée. Les auteurs ont ensuite identifié l'activité thiolase (ThIA) comme étant l'activité limitante dans la production de n-butanol, ce qui est dû à une forte inhibition de l'enzyme en présence de CoA-SH. Les auteurs ont donc choisi d'exprimer la thiolase d'*E. coli* (AtoB), dont la séquence de codons a été harmonisée pour l'expression chez *C. acetobutylicum*, puis introduite dans le génome de la souche CAB1058, au loci de *thIA*. AtoB présente une activité catalytique supérieure à ThIA, est moins sensible au CoA-SH, et son activité ne dépend pas de l'état redox de la cellule (Nguyen *et al.*, 2018). La production observée avec cette souche CAB1059 ne montre qu'une légère amélioration du ratio butanol/éthanol avec 0,84 au lieu de 0,59, alors que l'activité thiolase est 1,7 fois plus importante. Cela suggère que le ratio C4/C2 n'est pas contrôlé par le niveau d'activité de la thiolase mais semble plutôt contrôlé thermodynamiquement. Suite au remplacement de ThIA par AtoB dans la souche CAB1059, les auteurs ont identifié la réduction de l'acetoacetyl-CoA par Hbd comme étant l'étape limitante pour la production de n-butanol, dû au manque de NADH disponible pour l'enzyme. Lors d'une précédente étude (Yoo *et al.*, 2015), il a été démontré que, lors de la solvantogénèse, le ratio NADPH/NADP⁺ est 70 fois supérieur au ratio NADH/NAD⁺. Les auteurs ont donc décidé de remplacer *hbd* de *C. acetobutylicum*, qui a une activité NADH dépendante, par *hbd1* de *C. kluyveri*, dont l'activité NADPH dépendante a été démontrée. La caractérisation phénotypique de cette souche, nommée CAB1060, montre qu'elle produit des alcools avec un ratio butanol/éthanol (6,5 mol/mol) 6 fois supérieur à la souche précédente, et elle est capable de produire du butanol, dans un milieu minimum à partir de glucose sans addition de source d'azote organique, à un rendement de 0,34 g/g. Les performances de cette souche ont été évaluées lors d'une culture continue et une production stable de n-butanol (9-10 g/L) et de biomasse a été observée sur une période supérieure à 45 jours. Cela démontre la capacité de cette souche à produire du butanol comme produit de fermentation majoritaire de manière stable au cours du temps. Afin d'améliorer le titre et la productivité de la souche CAB1060, la culture de la souche, en continu, a été couplée à une distillation à faible pression *in-situ*. Nguyen *et al.* (2018) ont observé une concentration en butanol entre 9 et 10 g/L dans le fermenteur, et une concentration de 550g/L en n-butanol dans le distillat en présence d'une forte concentration en biomasse (DO_{600nm} 90-100). Dans ce distillat, on retrouve également 60g/L d'éthanol et 3,3 g/L d'acétate. Ces performances sont restées stables sur plus de 170h et la productivité moyenne en n-butanol a été calculée à 14 g/L/h, contre 1,5 g/L/h pour l'éthanol. Le rendement moyen

de n-butanol est d'environ 0,35 g/g soit 84% du rendement théorique maximum. Les performances de ce procédé, dans lequel la CAB1060 est couplée à la distillation *in-situ*, sont proches des performances actuellement obtenues pour la production d'éthanol par voie fermentaire à l'échelle industrielle.

Méthode de séparation	Fermentation contrôle (g/L)		Fermentation couplée (g/L)		Condensat (g/L)		Commentaire	Références
	Butanol	ABE	Butanol	ABE	Butanol	ABE		
Récupération du produit <i>in situ</i> en 1 étape								
DS	9-10	-	10,5	-	550	-	<i>C. acetobutylicum</i> CAB1060	(Nguyen <i>et al.</i> , 2018)
GS	19,1	31,3	113,2	172,1	150,5	195,9	<i>C. acetobutylicum</i> JB200	(Xue <i>et al.</i> , 2012)
GS	12,0	19,9	66,1	106,3	150,6	200	<i>C. acetobutylicum</i> B3	(Chen <i>et al.</i> , 2014)
PV	12,8	20,7	34,5	54,9	169,6	253,3	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 55025 ; membrane Zeolite-PDMS	(Xue <i>et al.</i> , 2015)
PV	12,8	19,2	105,4	155,0	18,6-484,7	34,6-653,1	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 ; membrane silicalite-silicone	(Qureshi <i>et al.</i> , 2001)
EX	11,6-13,7	-	35,9	-	27,3	-	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 ; Oleyl alcool	(Li <i>et al.</i> , 2012)
EX	-	21,6	-	36,6	-	-	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 ; 2-butyl-1-octanol	(González-Peñas <i>et al.</i> , 2015)
AD	11,5	17,7	27,2	40,7	85,8	-	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 ; Dowex Optipore L-493	(Wiehn <i>et al.</i> , 2014)
AD	18,3	-	54,6	-	167,1	190,4	<i>C. acetobutylicum</i> JB200 ; Norit ROW0.8	(Xue <i>et al.</i> , 2016a)
Récupération du produit <i>in situ</i> en 2 étapes								
GS-GS	16,2	25,5	19,8	31,8	420,3	532,3	<i>C. acetobutylicum</i> JB200	(Xue <i>et al.</i> , 2013)
GS/PV	12,1	20,8	-	-	167,1	269,4	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 ; membrane PDMS	(Setlhaku <i>et al.</i> , 2013)
GS-PV	16,2	25,5	75,7	110,0	521,3	622,9	<i>C. acetobutylicum</i> JB200 ; membrane CNTs-PDMS	(Xue <i>et al.</i> , 2016b)

Tableau 9 : Bilan des études sur le couplage de la fermentation de *C. acetobutylicum* avec un procédé de récupération du n-butanol. DS : distillation à faible pression ; GS : extraction gazeuse (« gas stripping ») ; PV : pervaporation ; EX : extraction ; AD : adsorption. Fermentation couplée : Le titre en butanol et ABE correspond à la totalité du butanol et ABE produit lors de la fermentation et du procédé de récupération. Condensat : Les titres en butanol et ABE sont ceux obtenus lors du procédé de récupération. D'après (Xue *et al.*, 2017).

2.2.2.2. Production hétérologue de n-butanol

L'expression hétérologue de la voie de production du n-butanol de *C. acetobutylicum* chez d'autres microorganismes représente une alternative pour développer une souche produisant le n-butanol comme unique produit de fermentation. L'expression hétérologue de la voie CoA-dépendante de *C. acetobutylicum* pour la production de butanol permet d'éviter la co-production d'acétone, qui

accompagne naturellement la production de butanol chez *C. acetobutylicum*. Cela permet également de travailler dans des organismes pour lesquels des outils génétiques à disposition sont nombreux, facilitant l'optimisation.

2.2.2.2.1. Ingénierie métabolique d'*E. coli* pour la production de n-butanol

La production hétérologue de n-butanol a été réalisée chez *E. coli* à la suite de l'introduction de la voie CoA-dépendante de *C. acetobutylicum* (Gheshlaghi *et al.*, 2009). Parmi les gènes décrits codant les différentes enzymes potentiellement impliquées dans la voie CoA-dépendante de production de *C. acetobutylicum*, Inui *et al.* (2008) ont sélectionné les gènes *thl*, *hbd*, *crt*, *bcd*, *etfAB* et *adhE2* en deux opérons. La souche d'*E. coli* exprimant cette voie produit 14mg/L de n-butanol en anaérobiose, en utilisant le glucose comme source de carbone (Inui *et al.*, 2008). Ce résultat apporte la preuve de concept qu'il est possible de produire du n-butanol chez *E. coli* en utilisant la voie CoA-dépendante de *C. acetobutylicum*. Cependant, la faible quantité de butanol produit indique qu'une ou plusieurs étapes de la voie de biosynthèse du butanol sont limitantes. Les travaux réalisés par Atsumi *et al.* (2008) et présentés dans la partie « Optimisation de la production de n-butanol chez *E. coli* » ci-dessous, ont ensuite permis d'identifier les étapes limitant la production de butanol chez *E. coli* (Atsumi *et al.*, 2008a).

Cette voie métabolique a également été introduite dans différents organismes, tels que des cyanobacteria (Lan and Liao, 2012) et *S. cerevisiae* (Nielsen *et al.*, 2009). Dans un premier temps, les titres finaux et la productivité obtenus chez ces organismes étaient très inférieurs à ceux obtenus avec *C. acetobutylicum*, comme indiqué dans le Tableau 10 ci-dessous.

Organismes	Concentration en butanol produit	Références
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	835 mg.L ⁻¹	(Krivoruchko <i>et al.</i> , 2013; Lian <i>et al.</i> , 2014; Shi <i>et al.</i> , 2016; Steen <i>et al.</i> , 2008; Swidah <i>et al.</i> , 2015)
<i>Pseudomonas putida</i>	120 mg.L ⁻¹	(Nielsen <i>et al.</i> , 2009; Rühl <i>et al.</i> , 2009)
<i>Bacillus subtilis</i>	24 mg.L ⁻¹	(Kataoka <i>et al.</i> , 2011; Nielsen <i>et al.</i> , 2009)
<i>Lactobacillus brevis</i>	300 mg. L ⁻¹	(Berezina <i>et al.</i> , 2010)
<i>Synechococcus elongatus</i>	404 mg.L ⁻¹	(Lan <i>et al.</i> , 2013; Lan and Liao, 2012)

Tableau 10 : Production hétérologue de n-butanol en fonction de l'hôte

2.2.2.2. Optimisation de la production en n-butanol chez *E. coli*

Les premiers travaux d'expression de la voie de conversion de l'acétyl-CoA en butanol de *C. acetobutylicum* chez *E. coli* ont montré que la voie était fonctionnelle mais la production reste limitée par l'activité enzymatique de certaines enzymes ou de leur spécificité de cofacteur (Inui *et al.*, 2008). Afin d'optimiser la production en n-butanol, plusieurs modifications ont été introduites par Atsumi *et al.* (2008)(Atsumi *et al.*, 2008a), afin d'améliorer le titre en butanol. Dans un premier temps, des enzymes issues d'autres organismes mais ayant la même activité que leur homologue de *C. acetobutylicum* ont été testées, puis dans un second temps le flux de carbone a été redirigé vers la production en butanol et en inactivant les voies métaboliques en compétition.

- le gène *thl* de *C. acetobutylicum*, codant pour la thiolase qui réalise la condensation de 2 molécules d'acétyl-CoA en une molécule d'acétoacétyl-CoA, a été remplacé par le gène *atoB* d'*E. coli*, permettant de multiplier par trois la concentration en butanol produit (70 mg/L) (Atsumi *et al.*, 2008a). Cette augmentation du titre est dû au fait que la thiolase d'*E. coli* présente une activité catalytique supérieure à la thiolase de *C. acetobutylicum* (AtoB : 1078 U/mg ; Thl : 276 U/mg), elle est également moins sensible au CoA-SH qui inhibe l'activité de l'enzyme (Duncombe and Frerman, 1976; Nguyen *et al.*, 2018; Shen *et al.*, 2011; Wiesenborn *et al.*, 1988).
- Le flux de carbone a été redirigé vers la production en butanol par la délétion des gènes *ldhA*, *adhE*, *frdBC*, pour éliminer les voies métaboliques en compétition pour l'utilisation de l'acétyl-CoA et du NADH, permettant de produire 260 mg/L de n-butanol en milieu M9, supplémenté avec 0,1% d'acide casamino cultivé en semi-anaérobiose. De plus, les auteurs ont effectué la délétion des gènes *pta* et *fnr* dans l'objectif d'augmenter le flux de carbone vers la production d'acétyl-CoA (Atsumi *et al.*, 2008a). La souche obtenue, nommée JCL88, est capable de produire 552 mg/L de butanol en milieu riche (TB) supplémenté avec 2 % de glycérol, cultivée en semi-anaérobiose. La souche JCL88, cultivée en milieu M9 supplémenté avec 2 % de glucose, ne produit que 113 mg/L de n-butanol. On observe également une forte diminution des co-produits (lactate, acétate, éthanol et succinate) grâce aux délétions effectuées. Cependant, le titre en n-butanol obtenu par cette souche demeure largement inférieur à celui obtenu chez *C. acetobutylicum*.

Atsumi *et al.* (2008), ont également émis l'hypothèse que la réduction du crotonyl-CoA par le complexe Bcd-EtfAB de *C. acetobutylicum* exprimé chez *E. coli* pouvait être une étape limitante dans la production de n-butanol. En effet, les auteurs n'ont pas réussi à mesurer l'activité *in-vitro* du complexe,

et les candidats testés pour remplacer ce complexe ont abouti à une production plus faible en butanol. Plus tard, Li *et al.* (2008) ont démontré que le complexe Bcd-EtfAB avait une activité ferrédoxine dépendante (Li *et al.*, 2008). Ces résultats conduisent à la conclusion que la réduction du crotonyl-CoA par le complexe Bcd-EtfAB est bien une des étapes limitant la production de n-butanol chez *E. coli*, celui-ci ne produisant pas de ferrédoxine.

Pour augmenter la production de n-butanol chez *E. coli*, Shen *et al.* (2011) ont construit une souche couplant la consommation de NADH à la production en n-butanol (Shen *et al.*, 2011). Les auteurs ont utilisé le NADH comme agent de pression de sélection afin d'améliorer la production de n-butanol, en inactivant les voies de production de l'éthanol, du lactate et du succinate par la délétion des gènes *adhE*, *ldhA* et *frdBC*. Cette souche nommée JCL166 est incapable de croître en anaérobiose en raison de l'absence de réaction consommant le NADH, générant ainsi une pression de sélection pour le NADH. Afin d'accroître cette pression, la formiate déshydrogénase de *Candida boidinii* a été surexprimée sur un plasmide permettant d'oxyder le formiate en CO₂ et NADH. Afin de rendre la voie de production du n-butanol uniquement NADH-dépendante, le complexe Bcd-EtfAB catalysant la réduction du crotonyl-CoA a été remplacé par la trans-enoil-CoA de *Treponema denticola* Ter. Cette trans-enoil-CoA est capable de réaliser la réduction du crotonyl-CoA en utilisant uniquement le NADH comme équivalent réducteur, et ne nécessite pas la présence de ferrédoxine ou de flavodoxine comme co-facteur. A partir des travaux réalisés précédemment sur la souche JCL88, Shen *et al.* ont également effectué la délétion du gène *pta* afin d'éliminer la voie de production de l'acétate, l'une des voies consommant le plus d'acétyl-CoA. Cette délétion crée un second facteur de pression de sélection pour la production de n-butanol par l'accumulation d'acétyl-CoA. Pour cette nouvelle souche nommée JCL299, les auteurs ont également utilisé la thiolase d'*E. coli* AtoB qui avait donné de meilleurs résultats dans la souche précédente. Le métabolisme de la souche JCL299 est représenté Figure 21.

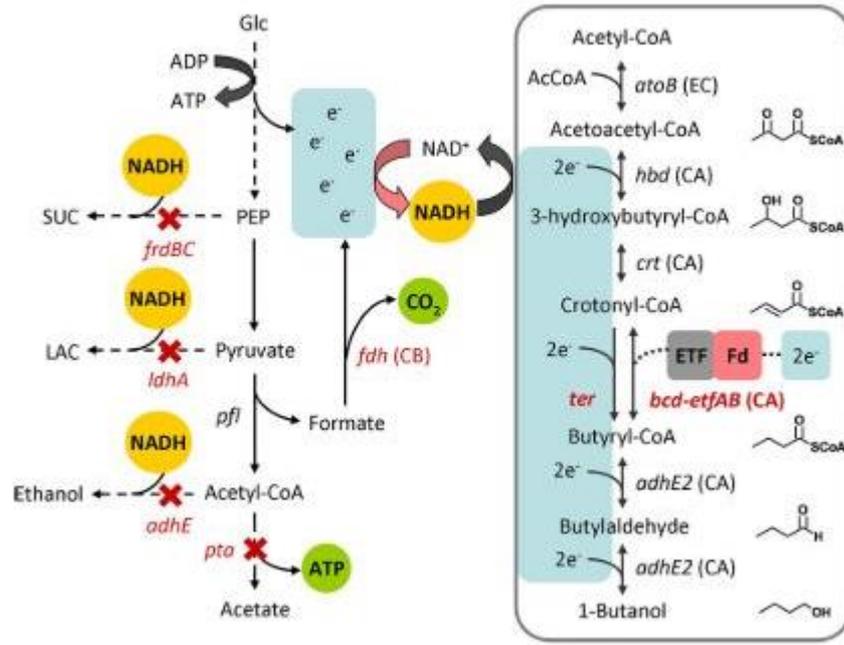


Figure 21 : Ingénierie métabolique d’*E. coli* pour la production de n-butanol générant une force motrice couplant la croissance de la souche en anaérobiose à la production en n-butanol. D’après (Shen *et al.*, 2011).

La souche obtenue, JCL299, produit jusqu’à 15 g/L de n-butanol lors de la fermentation en culture discontinue avec régulation de pH dans du milieu riche (TB) en anaérobiose, à un rendement de 88% du rendement théorique maximum, et une productivité de 0,2g/L/h, ce qui est équivalent à la production en n-butanol observée chez *C. acetobutylicum* ATCC824 sauvage lors de sa culture discontinue (0,25 g/L/h)(Nguyen *et al.*, 2018; Shen *et al.*, 2011). La souche JCL299 a également été cultivée en fermentation continue-discontinue, en anaérobiose dans du milieu riche (TB), couplé à un système d’extraction gazeuse (« gas stripping ») (Qureshi and Blaschek, 2000). Cette méthode a permis d’obtenir 30g/L de n-butanol dans le condensat, avec un rendement de 70% par rapport au rendement théorique maximum, et une productivité de 0,18g/L/h. Les résultats des cultures de la souche JCL299 sont présentés Figure 22.

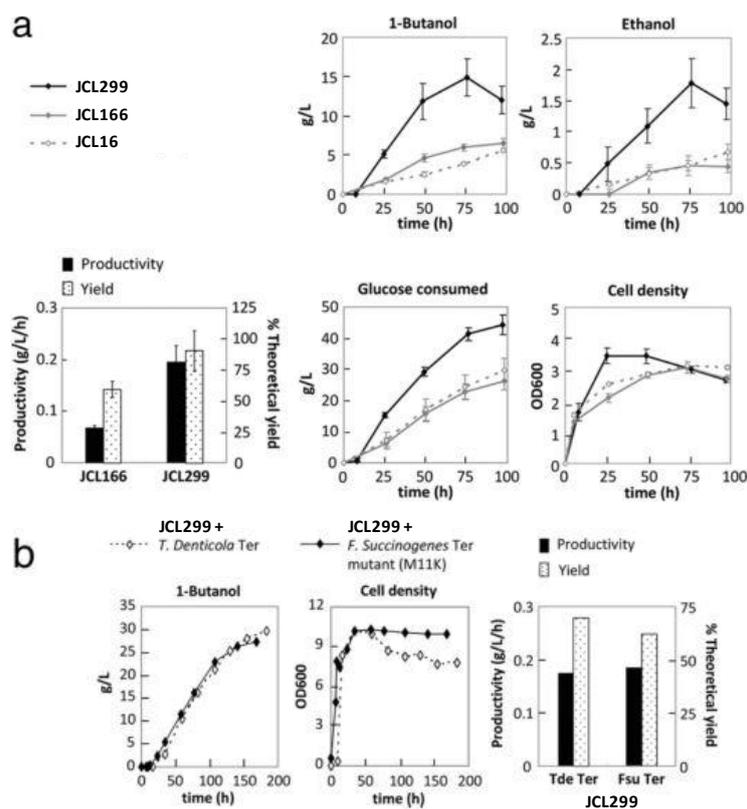


Figure 22 : Suivi des cultures de la souche JCL299. A. Fermentation en culture discontinue avec régulation de pH dans du milieu riche (TB) ; B. Fermentation continue-discontinue, en anaérobiose dans du milieu riche (TB), couplée à un système d'extraction gazeuse (« gas stripping »). D'après (Shen *et al.*, 2011).

L'expression des gènes codant pour la voie de production du n-butanol a été modifiée dans la souche JCL299 afin de placer l'expression de ces gènes sous le contrôle des promoteurs natifs de la fermentation d'*E. coli*, tel que *ldhA*, *frdABCD*, *adhE* et *ackA*. Cela a permis de contrôler l'induction des gènes en fonction des conditions de culture, et ainsi d'obtenir une souche plus stable, même en absence d'antibiotique (Wen and Shen, 2016). Cette approche a permis de produire 10 g/L de n-butanol en 24h avec une productivité de 0,4g/L/h et un rendement de 60% lors de la culture en fermentation continue-discontinue en milieu riche (TB) supplémenté avec 3% de glucose lors de cultures à forte densité cellulaire (DO_{600nm} initiale : 9-10) (Wen and Shen, 2016).

L'ingénierie rationnelle du métabolisme de la souche *E. coli* JCL299 permet le couplage de la croissance et de la production en n-butanol. Cependant, une accumulation de pyruvate (2 g/L) et de butanoate (1,8 g/L) a été observée lors de la culture en anaérobiose et représente le problème majeur de cette souche. Ohtake et al (2017) ont comparé le métabolome de la souche JCL166 à celui de la souche JCL299 (JCL166 Δpta) afin d'identifier les facteurs conduisant à la production de ces co-produits (Ohtake *et al.*, 2017). Lors de cette analyse métabolomique, 78 métabolites intracellulaires

(métabolites centraux, nucléotides, acides aminés et cofacteurs) ont été mesurés sur ces deux souches. Les auteurs ont observé une accumulation d'intermédiaires CoA tel que l'acétyl-CoA, le 3-hydroxybutanoyl-CoA, le butanoyl-CoA, et une quantité plus faible de CoA libre, uniquement dans la souche JCL299 et non dans la souche JCL166. A partir de ces résultats, les auteurs ont émis l'hypothèse que l'accumulation des co-produits était due à la quantité réduite de Coenzyme A disponible pour la production de n-butanol et ils ont estimé que l'accumulation des intermédiaires CoA était due à un manque d'activité de la butanoyl-CoA réductase (AdhE2). La mesure de l'activité spécifique d'AdhE2 a été réalisée à partir de butyryl-CoA ou de butyraldéhyde comme substrat, avec pour valeurs respectives 0,014 et 0,007 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ (Shen *et al.*, 2011).

Afin d'optimiser l'activité de cette enzyme, les auteurs ont construit une librairie de 8 RBS pour le gène *adhE2*, permettant d'augmenter le taux d'initiation de traduction du gène. Cette librairie de RBS a été construite en utilisant RBS Calculator v1.1. A l'issue de la sélection de cette librairie dans la souche JCL299 les auteurs ont obtenu 7 souches produisant plus de 7g/L de butanol en 24h par rapport à la souche initiale, qui produit 3,9 g/L en 24h. Une caractérisation fine de la meilleure souche productrice en butanol a montré une activité butanoyl-CoA réductase 2,1 fois supérieure à la souche initiale. Cette souche optimisée, nommée JCL299FT, est capable de produire 18,3g/L de n-butanol en 78h (rendement 76%) lors de la culture en anaérobiose dans du milieu riche (TB) supplémenté avec 2% de glucose, ce qui représente une amélioration de 33% par rapport à la souche initiale (Ohtake *et al.*, 2017). De plus, la production de pyruvate a diminué de 80% et la production de butanoate de 20% dans la souche JCL299FT.

Afin d'utiliser une souche pour un usage industriel, il est nécessaire d'avoir une souche stable au cours des fermentations. L'un des facteurs d'instabilité est la perte de plasmides dans une souche de production : ces plasmides impactent également les performances des souches, en utilisant les ressources de la cellule afin d'être maintenus dans la cellule (Martinez *et al.*, 1999). L'une des dernières optimisations pour la production de n-butanol chez *E. coli* a été l'intégration des gènes responsables de la production en butanol dans le chromosome d'*E. coli* (H. Dong *et al.*, 2017). Les travaux réalisés pour la construction de cette souche sont représentés Figure 23.

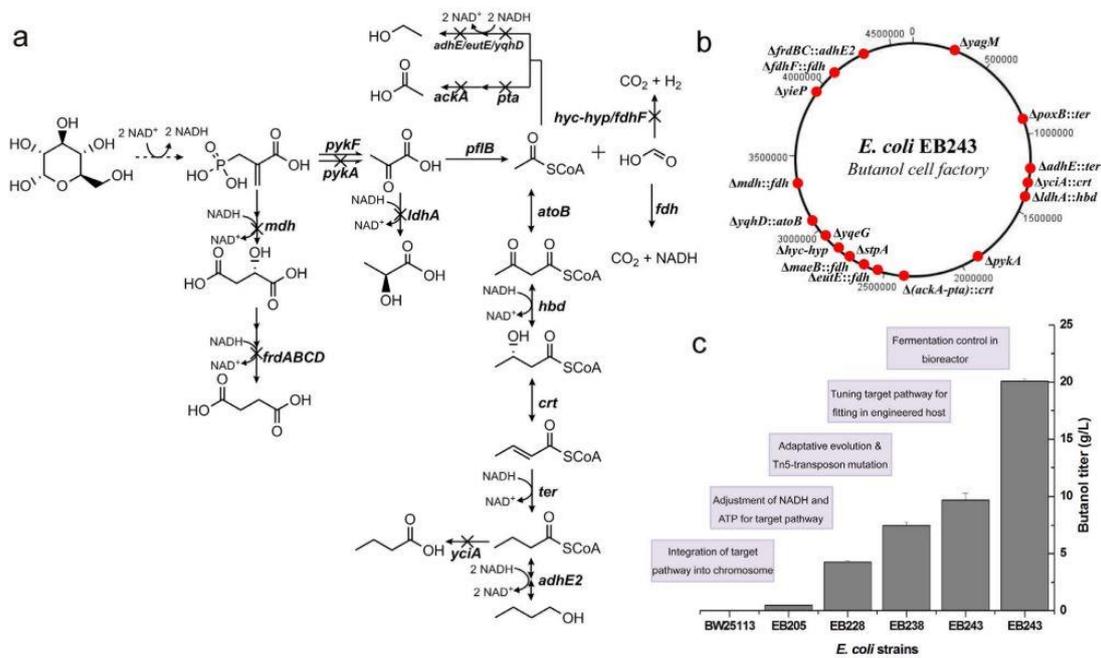


Figure 23 : Construction d'une souche d'*E. coli* pour la production de n-butanol sans plasmide. (a) Ingénierie du métabolisme d'*E. coli* pour la production de n-butanol. (b) Représentation graphique du génome de la souche EB243. (c) Étapes clés lors de la construction de la souche. D'après (H. Dong *et al.*, 2017).

Dans un premier temps, Dong *et al.* (2017) ont sélectionné les gènes *atoB*, *hbd*, *crt*, *ter* et *adhE2*, et les ont intégrés au génome, aux locus respectifs *yqhD*, *ldhA*, *ack-pta*, *adhE* et *frdBC*. Les gènes ont été intégrés sous le contrôle du promoteur constitutif miniPtac, et permettent d'inactiver simultanément les voies de production de l'éthanol, du lactate, de l'acétate et du succinate. Le gène *fdh* codant pour la formiate déshydrogénase de *C. boidinii* a été intégré au loci *eutE* codant une potentielle acétaldéhyde déshydrogénase. L'introduction de la formiate déshydrogénase de *C. boidinii* a pour objectif d'augmenter la disponibilité en NADH dans la souche, en convertissant le formiate en NADH. De plus, l'inactivation de *eutE* élimine une perte potentielle d'acétyl-CoA, utilisée par l'acétaldéhyde déshydrogénase pour produire de l'acétaldéhyde. Cette souche, nommée EB205, est capable de produire 0,47 g/L de butanol lors de cultures discontinues en anaérobiose sur milieu riche (M9Y) et 2,62 g/L en milieu TB. Les auteurs ont émis l'hypothèse qu'un faible niveau de NADH était responsable du faible titre en butanol observé. Dans l'objectif d'augmenter le NADH disponible, les auteurs ont inactivé la formiate-hydrogène lyase native d'*E. coli* en procédant à la délétion des gènes *hyc-hyp* et *fdhF*. De plus, une copie supplémentaire du gène *fdh* de *C. boidinii* a été intégrée au loci *fdhF* sous le contrôle du promoteur natif afin d'éliminer la compétition pour l'utilisation du formiate entre la formiate déshydrogénase de *C. boidinii* et le complexe formiate-hydrogène lyase natif d'*E. coli*, qui convertit le formiate en CO₂ et H₂. Cette souche, nommée EB215, accumule bien le formiate mais ne produit pas plus de butanol (0,87 g/L en milieu M9Y). Malgré l'absence d'accumulation de malate ou

de fumarate, les auteurs ont ensuite effectué la délétion des gènes *mdh* et *fumAC*, impliqués dans la voie de production du fumarate, afin de limiter la perte de NADH pour la formation de coproduits. Ils ont observé une augmentation de 280% de la production en butanol dans la souche Δmdh et une augmentation de 122% dans la souche $\Delta fumAC$, mais l'addition des 2 délétions n'as pas un effet cumulatif : les auteurs ont donc conservé uniquement la souche Δmdh (EB216 Δmdh : 1,60g/L en milieu M9Y). Une délétion du gène *pykA*, codant pour la pyruvate kinase II, a été ajoutée à cette souche, permettant de produire 2,20g/L de butanol avec cette souche EB222. À la suite de cette construction, les auteurs ont déterminé que *fdh* était l'étape limitante à la production en butanol. Deux nouvelles copies du gène *fdh* de *C. boidinii* ont été intégrées dans le chromosome, aux locus *maeB* et *mdh*, sous le contrôle du promoteur P_{ydfz} , fortement exprimé lors de la fermentation. Cette souche, nommée EB228, est capable de produire 4,26 g/L de butanol lors de la culture en milieu M9Y. Suite à ces constructions, les auteurs ont procédé à une évolution adaptative, afin d'améliorer la production en butanol. La souche EB228 a été initialement utilisée pour la réalisation de trois évolutions adaptatives successives. La production en butanol dans cette souche est liée à sa croissance : les auteurs ont donc cherché un mutant possédant un taux de croissance supérieur à la souche initiale. Cette évolution adaptative a été réalisée par sous-cultures successives en milieu M9Y toutes les 24h. A l'issue de 52 sous-cultures, un clone présentant des performances accrues a été isolé et nommé EB232. On observe une augmentation de 45% du butanol produit (6,4g/L) dans cette souche, par rapport à la souche EB228. A l'issue d'une seconde adaptation de 49 sous-cultures, la souche isolée EB233 montre qu'une faible amélioration de la production en butanol (6,7g/L) a été obtenue. Une troisième adaptation a été réalisée avec 14 repiquages, conduisant à l'isolement d'un clone, nommée EB234, produisant 6,9g/L de butanol. A l'issue de cette évolution adaptative, une expérience de mutagenèse aléatoire a été conduite afin d'isoler de nouveaux gènes candidats pour améliorer la production en butanol. Les auteurs ont utilisé le système de transposon Tn5 afin de générer les mutations. Sur l'analyse de la croissance de 4400 mutants, 6 produisent un titre en butanol supérieur à celui de la souche avant mutation. L'ADN génomique de ces 6 mutants a été séquencé et les auteurs ont ciblé 4 mutations pouvant avoir un impact sur la production en butanol : *yieP* (potentiel régulateur de transcription), *stpA* (protéine liée à l'ADN), *yqeG* (potentiel transporteur) et *yagM* (CP4-6 prophage). Ces 4 gènes candidats ont été inactivés dans la souche EB234, conduisant à la souche nommée EB238, capable de produire 7,5g/L de butanol (15% d'amélioration). La dernière amélioration apportée à cette souche a été l'introduction d'une nouvelle copie des gènes *crt* et *ter* aux locus *poxB* et *yciA*, avec une séquence RBS optimisée afin d'augmenter l'expression des 2 gènes. Cette souche, nommée EB234, est capable de produire 9,7 g/L de butanol lors de la culture discontinue en anaérobiose dans le milieu M9Y. Cette souche ne nécessite pas l'ajout d'antibiotique afin de maintenir

les gènes nécessaires à la production en butanol, et exprime de façon stable les gènes intégrés dans le génome. EB243 permet de produire $20,08 \pm 0,18$ g/L de n-butanol lors de fermentation en culture discontinue en milieu M9 supplémenté avec 5g/L d'extrait de levure et 7% de glucose, avec un rendement de 83% par rapport au rendement théorique maximal et une productivité de 0,28 g/L/h. Pour obtenir ce résultat, la souche EB243 est cultivée en aérobiose pendant 12h. A l'issue de cette phase en aérobiose, 5,65g/L de butanol sont produits ainsi que 6,53g/L de pyruvate. La culture est ensuite placée en anaérobiose jusqu'à atteindre 72h de culture. Lors du passage en anaérobiose la croissance de la souche est stoppée, le pyruvate accumulé est reconsommé (1,22g/L après 72h de culture), et la concentration en butanol atteint 20 g/L. Lors de ce procédé, le pH de la culture est maintenu à 6,8 et la concentration des co-produits (éthanol, acétate, lactate et butyrate) ne dépasse pas 2 g/L. Cette souche EB243 présente des performances supérieures à celles observées lors de fermentation en culture discontinue de *C. acetobutylicum* ATCC824 sauvage (Nguyen *et al.*, 2018), et présente également l'avantage de ne contenir aucun plasmide, par rapport à JCL299. Cependant, la production de n-butanol chez *E. coli* est toujours dépendante d'une source de nutriments complexes dans le milieu de culture.

L'ensemble des souches présentées ci-dessus nécessite l'apport de sources d'azote complexes dans le milieu de culture afin de croître. Cependant, la présence d'extrait de levure dans le milieu de culture augmente le risque de contamination au cours du procédé, et la composition de l'extrait de levure peut varier entre les lots, ce qui peut entraîner des variations dans les performances observées. De plus, lors d'un procédé industriel, le coût en extrait de levure utilisés pour supplémenter le milieu de culture est trop important. Pontrelli *et al.* (2018) ont utilisé la souche JCL166, présentée précédemment, pour effectuer une évolution adaptative dans le milieu M9 supplémenté en glucose en présence d'une concentration décroissante en extrait de levure, afin d'obtenir une souche capable de croître en milieu minimum (Pontrelli *et al.*, 2018b). La souche JCL166 initiale est incapable de croître en milieu M9 en utilisant le glucose comme source de carbone et sans supplémentation en extrait de levure. Pour faciliter l'adaptation, cette souche a été transformée avec un plasmide contenant le gène mutagène *mutD5*. Suite à la réalisation de 30 repiquages, les auteurs ont obtenu une souche capable de croître en milieu minimum supplémenté en glucose et de produire 600 mg/L de butanol en 24h, par rapport à 6,5 g/L en 72h sur milieu riche pour la souche initiale JCL166. Les auteurs ont isolé des clones capables de croître en milieu minimum et ont procédé à un reséquençage de leur ADN génomique. Ils ont identifié une mutation dans le gène *pcnB* (Plasmid Copy Number B) codant pour la poly(A) polymérase I (PAP I). Masters *et al.* (1993) ont démontré que *pcnB* était impliqué dans le maintien des plasmides contenant une origine de répllication de type ColE1, et que l'inactivation du gène n'avait pas d'impact sur la croissance d'*E. coli* (Masters *et al.*, 1993). Pontrelli *et al.* (2018) ont donc conclu que la

mutation observée dans le gène *pcnB*, chez les clones capables de croître en milieu minimum, provoque une diminution du nombre de copies de plasmides avec une origine de réplication ColE1 portés par la souche (Pontrelli *et al.*, 2018b). Cela crée un nouvel équilibre entre la voie de production du butanol et les ressources disponibles pour la croissance, permettant ainsi la croissance en milieu minimum. Les auteurs ont également identifié des mutations dans le système ArcAB et dans le facteur de transcription « integration host factor -IHF ». Les auteurs ont émis l'hypothèse que les mutations dans ces régulateurs globaux de la transcription provoquent un réarrangement de l'équilibre redox et sont responsables de la modification du profil des co-produits formés. Suite à l'analyse génomique, les auteurs ont effectué une analyse du métabolome de la souche adaptée BP1, comparée à la souche JCL166, afin d'identifier les variations entre le type et la quantité de métabolites formés avant et après adaptation. L'analyse du métabolome montre une diminution de CoenzymeA libres, et une augmentation en acétyl-CoA et butanoyl-CoA, dans la souche adaptée BP1 par rapport à la souche avant adaptation. D'après cette analyse, les auteurs ont conclu que le CoA est utilisé pour la synthèse de butanol de manière plus efficace. Cependant, le titre en butanol produit par la souche BP1 (600 mg/L) n'est pas compatible avec son utilisation pour un procédé industriel de production de n-butanol.

2.2.2.3. Production hétérologue de n-butanol à partir de substrats complexes et diminution des nutriments requis

L'ensemble des résultats présentés précédemment a été obtenu en utilisant du glucose comme unique source de carbone. Cependant, dans un procédé industriel, les sources de carbone utilisées contiennent souvent un mélange de sucre. De plus, pour une production industrielle viable, la lignocellulose représente la meilleure source de carbone renouvelable pour la production de biocarburant. La production de butanol par *E. coli* a été évaluée à partir de différents substrats dans une souche similaire à la souche JCL299, dont le métabolisme est représenté Figure 24.

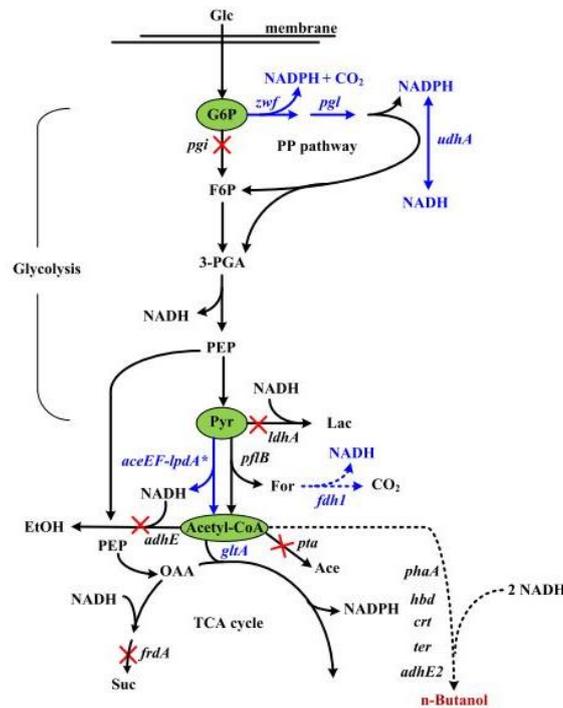


Figure 24 : Ingénierie métabolique réalisée dans la souche d'*E. coli* But-8 pour la production de n-butanol. D'après (Saini *et al.*, 2016b).

La différence majeure entre cette souche, nommée But-8, et les souches qui lui sont associées est l'inactivation de la phosphoglucoisomérase, pour forcer l'utilisation la voie des pentoses phosphate. Afin de favoriser la formation de NADPH qui, couplée à l'utilisation de la transhydrogénase soluble UdhA, sera converti en NADH utilisable pour la production de n-butanol (Saini *et al.*, 2016b). Les auteurs ont identifié le manque de NADH comme étant un point limitant dans la production de butanol, et le fait d'utiliser la voie des pentoses phosphates associée à la transhydrogénase UdhA permet d'accroître la quantité de NADH par rapport à l'utilisation de la glycolyse.

Cette souche But-8 a été construite afin de produire du n-butanol à partir d'hydrolysats de cellulose et d'hémicellulose, qui contiennent principalement un mélange de xylose et de glucose après hydrolyse. Pour cela, un système de co-culture a été utilisé avec une souche dite But-8-Glu, dont le gène *xyIA* a été inactivé, qui est capable d'utiliser uniquement le glucose et une souche dite But-8-Xyl, dont le gène *glk* a été inactivé, qui est capable d'utiliser uniquement de xylose. Cette co-culture a été réalisée en présence de xylose mélangé avec du glucose, conduisant à une production de 5,2 g/L de butanol (Rendement 63%) et une productivité de 0,17 g/L/h, lors de la culture en micro-aérobiose dans le milieu riche M9Y supplémenté avec 13g/L de glucose et 6,7g/L de xylose (Saini *et al.*, 2017a, 2016b). Il existe également d'autres sources de carbone à faible coût, telles que le glycérol, qui sont employées dans les procédés industriels. La souche développée par Saini *et al.* permet une production de 6,9 g/L

de n-butanol, lors de la culture en micro-aérobiose dans le milieu riche M9Y supplémenté avec 20 g/L de glycérol (Saini *et al.*, 2017b), et une production de 2,05 g/L de n-butanol a été observée à partir d'acide palmitique (Dellomonaco *et al.*, 2010). La production en butanol par *E. coli* But-8 a été évaluée en utilisant un hydrolysats de paille de riz comme source de carbone. Initialement, 4,9 g/L de butanol ont été produits. Afin d'améliorer ce résultat, la fermentation a été conduite dans un fermenteur avec une haute densité cellulaire, et 5,8 g/L de butanol ont été produits (Saini *et al.*, 2016a).

Une souche d'*E. coli* exprimant les gènes responsables de la production en butanol en deux opérons (Opéron 1 : *crt-bcd-etfAB-hbd* ; Opéron 2 : *atoB-adhE2*) et les enzymes pour des cellulases, xylanases, β -glucosidases et des xylobiosidases a été construite.– Cette souche est capable de croître en utilisant la cellulose et l'hémicellulose contenues dans le millet vivace, une graminée vivace originaire d'Amérique du Nord, préalablement traité avec des liquides ioniques afin de dégrader la paroi des cellules des plantes – a permis de produire 28 mg/L de n-butanol (Bokinsky *et al.*, 2011). Ce résultat montre la faisabilité du couplage entre une dégradation de la lignocellulose par *E. coli* et une production en butanol.

2.2.2.4. Identification d'une enzyme clef de *C. acetobutylicum* de la voie de conversion CoA dépendante de l'acétyl-CoA en n-butanol

Comme montré précédemment par Inui *et al.* (2008) et Atsumi *et al.* (2008) l'expression de la voie de *C. acetobutylicum* pour la conversion de l'acétyl-CoA en butanol à travers l'expression des gènes *thl*, *hbd*, *crt*, *bcd*, *etfAB* et *adhE2* de *C. acetobutylicum* ne conduit pas à une production de n-butanol en concentration élevée (Atsumi *et al.*, 2008a; Inui *et al.*, 2008). L'étape limitant cette production a été identifiée comme étant la très faible activité du complexe Butyryl-CoA déshydrogénase (Bcd-EtfAB) chez *E. coli* (non détecté sur extrait brut d'*E. coli* par Atsumi *et al.* (2008)). Le complexe Bcd-EtfAB a été identifié comme ferrédoxine dépendant, nécessitant donc l'expression de la ferrédoxine de *C. acetobutylicum* et la présence d'une enzyme de réoxydation de cette ferrédoxine produite (Boynton *et al.*, 1996; Buckel and Thauer, 2018a; Yoo *et al.*, 2015). En 2015, l'identification d'une ferrédoxine NADP⁺ oxydoréductase (Fnor) impliquée dans la production *in-vivo* de n-butanol chez *C. acetobutylicum* en condition de solvantogénèse a été réalisée et brevetée par (Soucaille *et al.*, 2015). Les auteurs ont ensuite co-exprimé cette enzyme avec les autres gènes de la voie de conversion de l'acétyl-CoA en n-butanol (*atoB*, *hbd*, *crt*, *bcd*, *etfAB* *adhE2*) ainsi que les gènes codant pour la ferrédoxine (Fd) et la Pyruvate ferredoxine oxydo réductase (Pfor) de *C. acetobutylicum* chez *E. coli*. Le métabolisme central de cette souche d'*E. coli* a été rationnellement modifié afin de rediriger le flux de carbone vers la production de butanol. Pour cela, les gènes *ldhA*, *mgsA*, *pflAB*, *ackA*, *pta*, *frdABCD*, *adhE* ont été inactivés afin d'éliminer la co-production de lactate, formate, acétate, succinate et

d'éthanol lors de la production de n-butanol en anaérobiose. Les auteurs ont également procédé à la délétion du gène *aceE*, codant pour la pyruvate déshydrogénase, qui catalyse la conversion du pyruvate en acétyl-CoA en anaérobiose, et remplacé par la pyruvate:ferrédoxine oxydoréductase (Pfor) de *C. acetobutylicum* (Gheshlaghi *et al.*, 2009). L'utilisation de la Pfor pour réaliser la décarboxylation du pyruvate en acétyl-CoA d'introduire la voie complète de conversion du pyruvate en n-butanol de *C. acetobutylicum* chez *E. coli*. Le gène *iscR*, présenté dans le Chapitre I partie 1.2.4, a également été inactivé dans cette souche, afin de favoriser l'expression des protéines contenant des centres Fe-S issues de *C. acetobutylicum* chez *E. coli* (Akhtar and Jones, 2008). Le métabolisme de cette souche est représenté Figure 25.

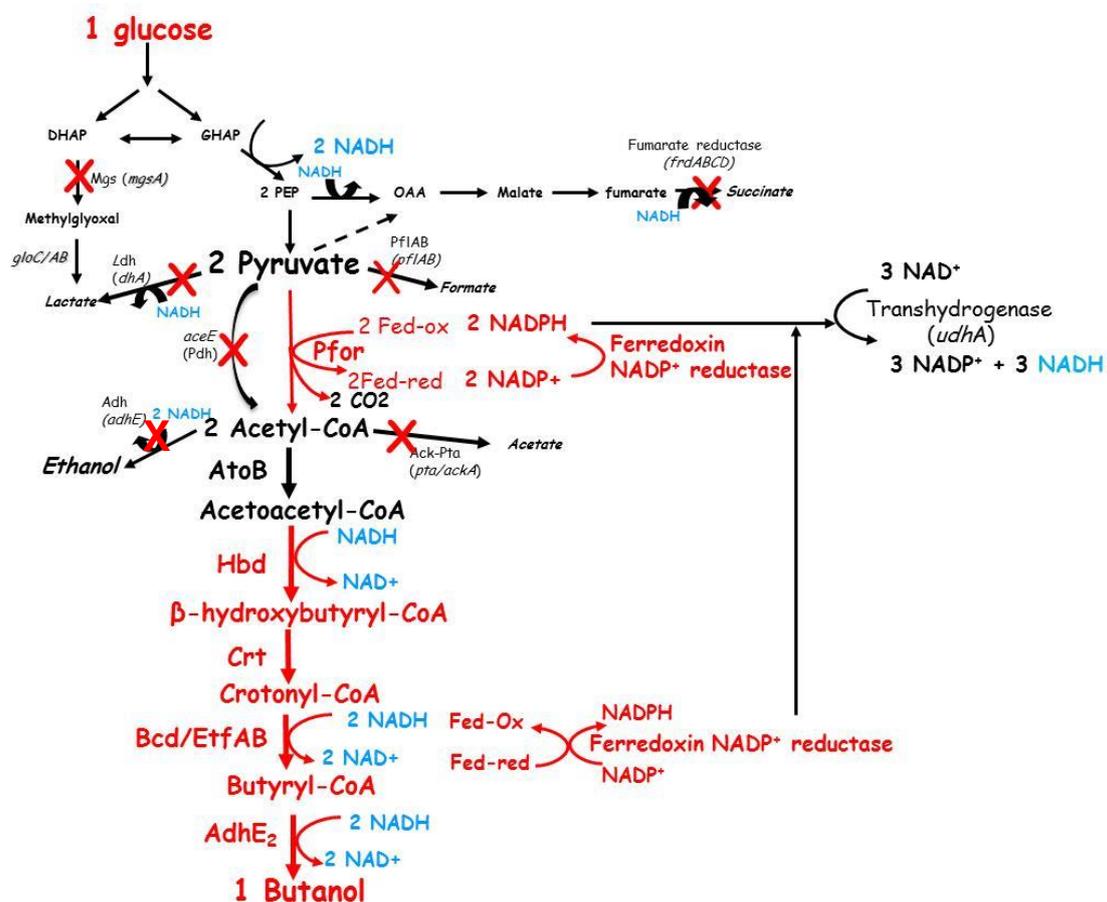


Figure 25 : Voies métabolique pour la production de n-butanol chez *E. coli* en utilisant la voie CoA-dépendante de *C. acetobutylicum*. Les flèches en noir correspondent au métabolisme natif d'*E. coli* et les flèches en rouge correspondent à la voie CoA-dépendante de *C. acetobutylicum*. D'après (Soucaille *et al.*, 2015) Brevet N° EP15306225.

Pour permettre une bonne expression des gènes de *C. acetobutylicum*, leurs séquences ont été codon-harmonisées pour l'expression chez *E. coli* (Angov *et al.*, 2008). Les 9 gènes issus de *C. acetobutylicum*,

nécessaires à la production en n-butanol dans cette souche d'*E. coli*, ont été exprimés de la façon suivante :

- les gènes *crt* et *hbd* ont été intégrés au chromosome d'*E. coli* au loci *melB* et exprimés sous la dépendance du promoteur *trc01*.
- les gènes *adhE2*, *bcd*, et *etfAB* sont exprimés en opéron sur un vecteur à bas nombre de copies pSC101 sous le contrôle du promoteur constitutif *thl*.
- les gènes *pfor*, *fd*, *fnor*, et *udhA* sont exprimés dans un second opéron sous le contrôle d'un promoteur constitutif pGI1.6, placé également dans le vecteur pSC101.
- le gène *atoB* d'*E. coli* a été sélectionné en raison de sa plus forte activité catalytique, pour effectuer la condensation de 2 acétyl-CoA en acétoacétyl-CoA au lieu du gène *thl* de *C. acetobutylicum*. Cependant, plutôt qu'une surexpression sur un vecteur, c'est le promoteur natif du gène *atoB* présent sur le chromosome qui a été remplacé par un promoteur constitutif (P_{trc30}) afin d'assurer un niveau d'expression suffisant.

La production de n-butanol par cette souche requiert 5 moles de NADH et 3 moles de ferrédoxines réduites pour produire 1 mole de butanol à partir d'une mole de glucose. En faisant le bilan de cette voie métabolique on observe que 2 moles de NADH sont produites lors de la glycolyse, mais 3 moles de NADH sont encore nécessaires pour produire 1 mole de n-butanol et 3 ferrédoxines réduites sont générées. L'expression du gène codant Ferrédoxine NADP⁺ oxydoréductase de *C. acetobutylicum* permet la réoxydation de la ferrédoxine réduite en régénérant 3 moles de NADPH. La surexpression du gène *udhA* codant la transhydrogénase d'*E. coli* permet théoriquement de convertir les 3 moles de NADPH en 3 moles de NADH nécessaire pour la production de n-butanol. La stratégie d'ingénierie métabolique réalisée dans cette souche d'*E. coli* permet de coupler les vitesses de croissance de la souche et de consommation de glucose à la vitesse de production en butanol. En croissance en anaérobiose sur glucose, la production de butanol est nécessaire pour maintenir l'équilibre redox.

Cette souche est capable de produire $3,3 \pm 0,2$ g/L de n-butanol, lors de cultures anaérobies discontinues, sans régulation du pH, en utilisant le glucose comme source de carbone, dans un milieu minéral supplémenté avec 4 g/L d'extrait de levure et 5mM de nitrate, à un rendement de 0,23 g/g soit 56% du rendement théorique maximum. L'expression de la ferrédoxine nécessaire au complexe Bcd/EtfAB et de la Ferrédoxine NADP⁺ oxydoréductase, ayant pour fonction la réoxydation de la ferrédoxine, conduit à une production de butanol à un titre final plus de 5 fois plus élevé, comparé à l'équivalent de cette souche décrit précédemment (JCL88 – 552 mg/L de butanol). Cependant, il est à noter que la souche d'*E. coli* décrite ci-dessus et la souche JCL88 possèdent d'autres différences, telles

que l'expression de la Pfor de *C. acetobutylicum*, l'intégration des gènes *crt-hbd* dans le chromosome, et l'expression constitutive du gène chromosomique *atoB* chromosomique plutôt qu'une surexpression sur un vecteur.

2.2.2.5. Production hétérologue de n-butanol à l'aide de la voie des céto-acides

Il existe une voie métabolique alternative pour la production de n-butanol à partir de glucose chez *E. coli* qui n'utilise pas la voie CoA-dépendante de *C. acetobutylicum*, et permet de s'affranchir de la sensibilité à l'oxygène des enzymes issues de *C. acetobutylicum* : la voie de production des cétoacides, « keto acid pathway », cette voie est représentée Figure 26.

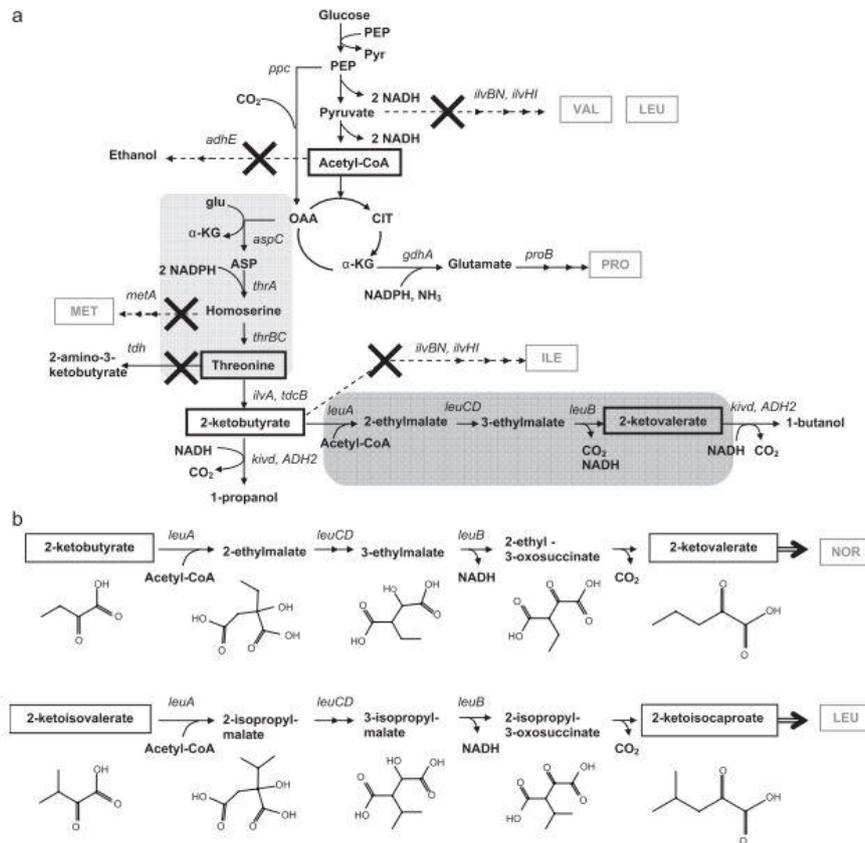


Figure 26 : Illustration schématique de la production de butanol-propanol via les voies de biosynthèse de la thréonine et de la norvaline chez *E. coli*. L'inactivation des voies métaboliques sont indiquées par les croix. Les rectangles à traits épais sont placés sur les précurseurs essentiels à la production d'alcool. La voie de la thréonine est grisée clair, et la voie de la norvaline est grisée sombre. Les voies qui mènent à la biosynthèse de la valine, de la leucine, de l'isoleucine, de la proline, et de la méthionine sont indiquées par leurs abréviations correspondantes. (b) Réactions catalysées par les enzymes de biosynthèse de la leucine LeuABCD. La première partie montre la synthèse du précurseur au butanol, le 2KV, qui passe par la voie non-naturelle de la norvaline. La deuxième partie montre la synthèse du précurseur à la leucine, le 2 ketoisocaproate. Le 2 ketoisovalerate est le substrat naturel pour la LeuA. Les 2 ketoacides sont encadrés. D'après (Shen and Liao, 2008).

Les voies de biosynthèse des acides aminés génèrent des céto-acides qui peuvent être convertis en alcools, en effectuant une décarboxylation puis une réduction. Ces réactions sont respectivement catalysées par la α -céto acide décarboxylase (KDC) de *Lactococcus lactis* (Kivd) et l'alcool déshydrogénase 2 (ADH) de *S. cerevisiae* (*Adh2*), surexprimées sur un plasmide. Le n-butanol peut être produit par cette voie métabolique en utilisant le 2-Ketovalérate (KV) comme céto-acide précurseur.

Le 2-Ketovalérate (KV) est un intermédiaire dans la biosynthèse de la norvaline, et intervient dans une réaction secondaire de la voie de biosynthèse de la leucine qui utilise le 2-ketobutyrate comme précurseur. Ce 2-ketobutyrate est produit à partir de la L-Thréonine par la thréonine déshydratase (*IlvA*). Pour produire du n-butanol par la voie des céto-acides, une première souche d'*E. coli* a été construite (Atsumi *et al.*, 2008b), produisant 0,2mM de n-butanol avec la surexpression de KDC et ADH. Les auteurs ont ensuite surexprimé la voie de biosynthèse de la leucine ainsi que la thréonine déshydratase en construisant un opéron *ilvA-leuABCD* sous le contrôle du promoteur P1LacO1. La surexpression de cet opéron permet de multiplier par 3 la quantité de butanol produit (0,6mM) par rapport à la souche sans surexpression (0,2mM). L'addition de 8 g/L de thréonine directement dans le milieu de culture conduit à une importante augmentation du titre en butanol (3,2mM). Les auteurs ont donc conclu que la thréonine était l'élément limitant dans la production de n-butanol par la voie des céto-acides. Une seconde souche a été construite, afin d'augmenter la synthèse de n-butanol par la voie des céto-acides, en dérégulant la synthèse des acides aminés et en éliminant les voies en compétition (Shen and Liao, 2008). Pour supprimer le rétrocontrôle de la synthèse de thréonine, l'opéron *thrABC*, insensible à l'inhibition par la thréonine, a été surexprimé. De plus, les gènes *metA* et *tdh*, codant pour la biosynthèse de méthionine et la dégradation de la thréonine, ont été inactivés pour éviter la perte de carbone au cours de la synthèse de thréonine. Les gènes *ilvB* et *ilvI* ont également été inactivés pour éviter la perte de 2-ketobutyrate pour la biosynthèse d'isoleucine, valine et leucine. Cette souche produit 2 g/L de n-butanol lors de la culture en milieu M9Y supplémenté avec 30 g/L de glucose (Shen and Liao, 2008). Cependant, cette production s'accompagne d'une production de n-propanol à un ratio 1:1 car le 2-ketobutyrate est le céto-acide précurseur du n-propanol.

2.2.2.6. Bilan de la production hétérologue de n-butanol chez *E. coli*

Le Tableau 11, résume les différentes souches d'*E. coli* décrites dans la littérature pour production de n-butanol et compare leurs performances.

Souche	Butanol (g/L)	Substrat	Milieu de culture	Mode de culture	Référence
Expression de la voie CoA dépendante de <i>C. acetobutylicum</i>					
JM109	0,014	Glc	M9	Discontinue	(Inui <i>et al.</i> , 2008)
JCL88	0,113	Glc	M9	Discontinue	(Atsumi <i>et al.</i> , 2008a)
JCL88	0,552	Gly	TB	Discontinue	(Atsumi <i>et al.</i> , 2008a)
JCL299	15	Glc	TB	Discontinue	(Shen <i>et al.</i> , 2011)
JCL299	30	Glc	TB	Continue-discontinue + « gas stripping »	(Shen <i>et al.</i> , 2011)
JCL299FT	18,3	Glc	TB	Discontinue	(Ohtake <i>et al.</i> , 2017)
EB243	20	Glc	M9Y	Discontinue	(H. Dong <i>et al.</i> , 2017)
But-8	5,2	Glc+Xyl	M9Y	Discontinue	(Saini <i>et al.</i> , 2017a)
But-16	6,9	Gly	M9Y	Discontinue	(Saini <i>et al.</i> , 2017b)
But-8	5,8	Hpr	M9Y	Continue-discontinue	(Saini <i>et al.</i> , 2016a)
LISBP	3,1	Glc	Min+YN	Discontinue	(Soucaille <i>et al.</i> , 2015)
BP1	0,6	Glc	M9	Discontinue	(Pontrelli <i>et al.</i> , 2018b)
Utilisation de la voie des céto-acides					
CRS-ButOH23	2	Glc	M9Y	Discontinue	(Shen and Liao, 2008)

Tableau 11 : Bilan des souches d'*E. coli* produisant du n-butanol. Abréviations : Glc : Glucose ; Gly : glycérol ; Xyl : xylose ; Hpr : hydrolysate de paille de riz ; M9Y : milieu M9 supplémenté en extrait de levure ; Min+YN : milieu minimum supplémenté en extrait de levure et en nitrate.

2.2.3. Augmentation de la tolérance au butanol chez *E. coli*

Les efforts déployés en ingénierie métabolique chez *E. coli*, décrits ci-dessus, ont permis d'accroître fortement la production hétérologue de n-butanol. Cependant, la toxicité du butanol est encore une limite au développement d'un procédé industriel à haut titre et rendement. La croissance d'*E. coli* est fortement impactée par la présence de butanol, et la croissance est pratiquement nulle en présence d'une concentration de 1% (v/v) de butanol dans le milieu de culture (Abdelaal *et al.*, 2015). Le butanol fluidifie les membranes, ce qui les dépolarise et peut avoir un effet létal sur les cellules. Plusieurs études ont été réalisées afin d'améliorer la tolérance au butanol d'*E. coli* (Liu *et al.*, 2017; Liu and Qureshi, 2009). Deux approches majoritaires sont utilisées au cours de ces études : i) l'évolution adaptative en présence d'une quantité exogène croissante de butanol, suivie de l'analyse du génotype pour déterminer les cibles de l'adaptation, ii) le choix rationnel de gènes à modifier ou à surexprimer afin d'accroître la tolérance au butanol.

Afin d'améliorer la tolérance au butanol chez *E. coli*, Abdelaal *et al.* (2014) ont utilisé les travaux réalisés chez *C. acetobutylicum* en surexprimant les gènes *groESL* de *C. acetobutylicum* chez *E. coli* (Abdelaal *et al.*, 2015). Les gènes *groESL* codent pour des protéines chaperonnes, et leurs surexpressions avaient permis d'augmenter la tolérance au butanol chez *C. acetobutylicum* (Tomas *et al.*, 2003). La surexpression de *groESL* chez *E. coli* permet d'améliorer la croissance d'*E. coli* de 27% en présence de 0,8% (v/v) de butanol, mais en présence de 1 % (v/v) de butanol, la croissance n'est améliorée que de 9% dans la souche surexprimant les gènes *groESL*, par rapport à la souche témoin (Abdelaal *et al.*, 2015). Cette stratégie a pour objectif de protéger la cellule des dommages effectués par le butanol et ainsi accroître la tolérance globale d'*E. coli*.

Une seconde stratégie a consisté à modifier une pompe à efflux présente chez *E. coli*, afin de sécréter le butanol à l'extérieur des cellules (Fisher *et al.*, 2014). Fisher *et al.* (2014) ont construit une librairie de 50 000 variants du gène *acrB* qui code pour une perméase de la membrane interne qui fait partie de l'une des trois sous-unité qui compose une pompe à efflux de la famille RND (Resistance-Nodulation-Division), puis les ont exprimés sur des plasmides contenant les gènes *tolC* et *acrA*, qui codent respectivement pour le canal de la membrane externe et une lipoprotéine périplasmique qui compose la pompe à efflux TolC-AcrAB. La population de souches exprimant la librairie de gènes *acrB* a été ensuite soumise à une sélection en présence de butanol afin de déterminer les mutations favorisant la tolérance au butanol d'*E. coli* en présence de 0,7% (v/v) de butanol. A l'issue de cette sélection, 2 variants ont été sélectionnés, car ils permettent d'augmenter la croissance d'*E. coli* de respectivement 30 et 25% après 6h de croissance. Les mutations présentes dans ces variants ont ensuite été analysées, afin de déterminer les mutations responsables de la sécrétion du butanol. Les auteurs ont conclu que les mutations AcrB I466F et AcrB M355L étaient responsables de l'amélioration de la croissance d'*E. coli* en présence de butanol, dans les variants 1 et 2 respectivement. Ces pompes à efflux, capables de sécréter le n-butanol, présentent un avantage et un inconvénient : elles ne consomment pas directement de l'ATP, mais elles s'accompagnent d'un gradient de protons vers le cytoplasme, ce qui peut avoir un impacte sur les ressources énergétiques de la cellule.

L'évolution adaptative d'*E. coli* pour accroître sa tolérance au butanol à partir d'une même population initiale a donné deux mécanismes indépendants de résistance au butanol (Reyes *et al.*, 2013, 2012). La première évolution réalisée par (Reyes *et al.*, 2012) a mené à une souche ayant une tolérance pour la polymyxine B, un peptide cationique antimicrobien. Dans les souches générées au cours de cette étude, on observe la surexpression de gènes impliqués dans la synthèse des acides gras, des lipopolysaccharides, des peptidoglycane, des lipoprotéines, de la biotine et du pantothénate. On observe également une baisse de l'expression de gènes impliqués dans la synthèse des phospholipides.

En particulier, on peut observer dans la souche MG6 une augmentation de l'expression de *lptA* qui fait partie du système de transport des lipopolysaccharides (LPS), LptABCDEFG, impliqué dans le transport des lipopolysaccharides de la membrane interne vers la membrane externe (Daley *et al.*, 2005; Ruiz *et al.*, 2008). La seconde évolution réalisée par Reyes *et al.* (2013) a permis à *E. coli* de développer une tolérance au butanol, et a permis sa croissance en présence de 0,8% (v/v) de butanol (Reyes *et al.*, 2013). Cette adaptation a conduit à la surexpression des gènes *ygfO*, *setA* et *mdtA* codant pour des transporteurs membranaires. On observe également la surexpression des gènes *gcvH*, *treF* et *pgsA*, qui sont des gènes en lien avec un stress osmotique de la cellule. En particulier, le gène *pgsA*, est impliqué dans la synthèse de cardiolipine, un glycerophospholipide qui fait partie des membranes d'*E. coli*. La modification de la composition lipidique de la membrane d'*E. coli* semble l'un des moyens d'augmenter la tolérance au butanol, et cette stratégie est également observée chez *C. acetobutylicum* (Baer *et al.*, 1987).

D'autres stratégies ont également été mises en place afin de faciliter la génération de mutations favorisant la tolérance au butanol chez *E. coli* (He *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2011; Si *et al.*, 2016). Les travaux réalisés par Lee *et al.* (2011) ont permis de sélectionner une souche d'*E. coli* capable de tolérer 1,2% (v/v) de butanol à l'issue de l'utilisation d'une librairie d'activateurs de la transcription artificiels (Lee *et al.*, 2011). L'analyse de l'expression des gènes dans la souche tolérante au butanol d'*E. coli* a montré une surexpression des gènes *sdhCDAB*, *flu*, et *ybgD*, qui codent respectivement pour le complexe de la succinate déshydrogénase membranaire, pour un autotransporteur impliqué dans la formation de biofilm, et pour une potentielle protéine fibriale. Le gène *glpC*, qui code pour la sous-unité C de la glycérol-3-Phosphate déshydrogénase fonctionnelle en anaérobiose, est également surexprimé. L'association de ces surexpressions conduit à une souche plus tolérante au butanol que la souche initiale.

Les auteurs Si *et al.* (2016) ont développé une souche capable de tolérer 2% (v/v) de butanol en effectuant une ingénierie globale des facteurs de transcription chez *E. coli*, puis en analysant la transcription des gènes dans la souche tolérante au butanol (Si *et al.*, 2016). Les auteurs ont mis en évidence que la baisse de l'expression des gènes *yibT* et *yghW* était impliquée dans le mécanisme de tolérance au butanol en modifiant la composition en acide gras présents dans la membrane. La baisse de l'expression du gène *ybjC*, qui code pour une protéine présente dans la membrane interne mais dont la fonction est inconnue, semble également jouer un rôle dans la tolérance au butanol.

L'étude réalisée par He *et al.* (2019) a mis en évidence que des mutations présentes dans les gènes *acrB* et *rob* étaient responsables de l'augmentation de la tolérance au butanol chez *E. coli* (He *et al.*,

2019). Cette étude confirme le rôle du transporteur AcrAB dans l'augmentation de la tolérance au butanol chez *E. coli* d'après les études réalisées par (Fisher *et al.*, 2014) décrites précédemment. L'autre gène muté lors de l'étude de He *et al.* (2019), *rob*, code pour un régulateur de la transcription qui se fixe directement à l'ADN et qui est impliqué dans la régulation de l'expression de plus de 50 gènes, dont *acrAB* (Ma *et al.*, 1996). Il est donc possible que la mutation présente dans le gène *rob* permette l'expression d'*acrAB* en présence de butanol pour favoriser la tolérance de la souche. De plus, les auteurs ont montré que la délétion de *TqsA*, impliqué dans le transport d'AI-2, a pour conséquence d'augmenter l'expression de gènes impliqués dans la synthèse de LPS, et permet d'augmenter la tolérance au butanol chez *E. coli* (He *et al.*, 2019).

Une autre approche pour augmenter la tolérance au butanol d'*E. coli* a consisté à modifier directement la membrane d'*E. coli*, en introduisant un agent chimique directement dans la membrane, afin de la stabiliser en présence d'une concentration importante de butanol (Hinks *et al.*, 2015). L'ajout de COE1-5C (« *a five-ringed oligo-polyphenylenevinylene conjugated with an aromatic oligoelectrolyte* » (Hinks and Wuertz, 2017)) dans la membrane empêche le butanol d'augmenter la fluidité de la membrane et de la dépolariser, ce qui entraîne la perte de croissance. Cette méthode a permis d'améliorer la tolérance d'*E. coli* avec une croissance observée en présence de 1,75% de butanol.

Pour conclure, différents mécanismes ont été identifiés conduisant à une augmentation de la tolérance lors de l'addition exogène de butanol à des cultures aérobies d'*E. coli*. Les mécanismes impactent principalement la composition de la membrane. Le Tableau 12 regroupe les modifications génétiques à apporter pour augmenter la tolérance au butanol d'*E. coli* lors de culture en présence de butanol exogène.

Référence	Surexpression	Inactivation	Mutagenèse dirigée
(Abdelaal <i>et al.</i> , 2015)	<i>groESL</i>		
(Fisher <i>et al.</i> , 2014)	<i>tolC, acrA</i>		AcrB I466F ou AcrB M355L
(Reyes <i>et al.</i> , 2012)	<i>lptA, cfa, basR, lplA</i>	<i>gmm</i>	
(Reyes <i>et al.</i> , 2013)	<i>ygfO, setA, mdtA</i> <i>gcvH, treF, pgsA</i>		
(Lee <i>et al.</i> , 2011)	<i>sdhCDAB, flu, ybgD,</i> <i>glpC</i>		
(Si <i>et al.</i> , 2016)		<i>yibT, yghW, ybjC</i>	
(He <i>et al.</i> , 2019)		<i>tqsA, rob</i>	<i>acrB C₁₁₉₈T</i>

Tableau 12 : Gènes identifiés comme impliqués dans la tolérance au butanol lors de la croissance d'*E. coli* en présence de butanol exogène.

3. Les Ferrédoxines NAD(P)⁺ oxydoréductase, enzymes clefs du métabolisme anaérobie (Revue)

3.1. Introduction

Nombreux sont les microorganismes anaérobies produisant naturellement des métabolites d'intérêt industriel à partir de substrats variés. Toutefois, ces métabolites sont produits, la plupart du temps, en mélange, et les rendements de production sont trop faibles pour envisager l'utilisation de ces bactéries à l'échelle industrielle. Il est donc nécessaire de modifier le métabolisme natif de ces bactéries de façon rationnelle pour réorienter les flux de carbone et d'électrons vers la production du (des) métabolites d'intérêt. Chez les bactéries anaérobies, différents types de cofacteurs sont impliqués dans le transfert d'électrons au sein du métabolisme central : i) les nicotinamides adénines dinucléotides (NADH et/ou NADPH), qui sont les plus communs, et ii) de petites protéines de faible potentiel, telles que les ferrédoxines ou les flavodoxines. Les transferts d'électrons entre les ferrédoxines et les nicotinamides adénines dinucléotides sont alors catalysés par des enzymes ayant une activité ferrédoxine NAD(P)⁺ oxydoréductases. Plusieurs types de ces enzymes ont été décrites chez les bactéries anaérobies, selon qu'elles aient seulement une activité oxydoréductase (FNOR), ou qu'elles soient impliquées dans des mécanismes tels que la bifurcation d'électrons (Nfn) et la régénération d'ATP au travers d'un gradient de protons (Rnf), qui permettent la conservation de l'énergie. La partie 3 du chapitre I présente les connaissances actuelles et les caractéristiques de ces différentes enzymes ou complexes enzymatiques. La présentation est faite sous la forme d'une revue bibliographique intitulée : « Ferredoxin NAD(P)⁺ oxidoreductases: key enzymes in anaerobic bacterial world » afin de la soumettre à un journal scientifique.

3.2. Revue bibliographique

Title: Ferredoxin NAD(P)⁺ oxidoreductases : key enzymes in anaerobic bacterial world

Abstract:

Anaerobic bacteria represent an important group of industrial microorganisms. They have the ability to produce a wide range of biochemical products from sugars, hemicellulose, cellulose, or syngas as substrates. In anaerobic metabolism, both carbon and electron fluxes finely work together to determine the nature of the fermentation products and the ratio between them. This review focuses on the anaerobic metabolism using ferredoxin, a small iron sulfur protein, as the specific partner to catalyze numerous metabolic enzymes or enzymatic complexes by carrying electrons. There is a lack of knowledge about the ferredoxin-dependent pathways in anaerobic bacteria, which is a limiting point to implement them in metabolic engineering strategies and develop synthetic metabolic pathways. In

this review, we presented the research progress on the mechanisms involved in the regulation of the electron fluxes between ferredoxin and NADPH and/or NADH in anaerobic bacteria and their use in metabolic engineering strategies. There are three kinds of NAD(P)⁺: ferredoxin oxidoreductase enzymes which are able to catalyze the transfer of electrons from reduced ferredoxin to NAD(P)⁺: i) the ferredoxin-NAD(P)⁺ oxidoreductases (FNORs), ii) the electron-bifurcating transhydrogenase (Nfn) and iii) the Rnf complex. This exergonic reaction is often coupled with another endergonic reaction for energy conservation. Thus, NAD(P)⁺: ferredoxin oxidoreductase are key enzymes of the anaerobic metabolism and a better understanding of their features and role is an essential parameter. Implementing them in metabolic engineering strategies to balance the reducing power correctly can improve the production yield of some metabolites identified as industrial valuable chemicals.

Keywords: Anaerobic metabolism; electron fluxes; redox balance; Ferredoxin; ferredoxin NAD(P)⁺ oxidoreductases (FNOR); Nfn complex; Rnf complex

Introduction

In the field of metabolic engineering combined to synthetic biology, efficient engineered biocatalysts are built for the production of desired molecules at high titer and yield: thus, both carbon and electron fluxes must be rationally optimized and balanced in parallel with the selection of appropriate enzymes comprising metabolic pathways. However, electron fluxes are often neglected in comparison to the two other parameters, forgetting that recycling of redox partners could also constrains the yield, especially for the anaerobes. Electron carriers in anaerobes can be sorted into several kinds of molecules, among which i) small electron carrier proteins, such as ferredoxin (Fd) or flavodoxins, ii) redox partners, such as Flavin based nucleotides (FAD, FMN), nicotinamide adenine dinucleotides (NAD (H) or NADP (H)). All act as electron carriers to balance the metabolic reactions. Therefore, an accurate knowledge of the co-factor or redox partner specificity of the selected enzymes forming the different metabolic pathways is important to precisely balance the global metabolism. Channeling the electron flux toward a desired pathway was already applied to enhance the production of succinic acid in *C. glutamicum*, of butanol in *C. acetobutylicum*, and of ethanol in *C. thermocellum* (Lo *et al.*, 2017; Nguyen *et al.*, 2018; Qi *et al.*, 2018; Tian *et al.*, 2016; Z. Zhou *et al.*, 2015). However, the lack of knowledge about ferredoxin dependent pathways in anaerobic microorganisms in general is still a limiting point for incorporating them into metabolic engineering strategies in heterologous hosts.

Ferredoxin (Fd) is a small iron sulfur protein able to transfer electrons in biochemical reactions (Bruschi, 2002; Mortenson *et al.*, 1962). First isolated from the anaerobic *Clostridium pasterianum* bacterium (Valentine, 1964), Fd is a widespread molecule from plants to bacteria and archaea, and

ubiquitous among clostridia (Jones and Woods, 1986). The metalloclusters composing Fd differ between organisms ([2Fe-2S], [3Fe-4S] and [4Fe-4S]) and shuttle electrons through them. The 2[4Fe-4S] Fds, which were first isolated from anaerobic bacteria (Guerrini *et al.*, 2008), are small (55 residues) and contain two [4Fe-4S] clusters. They act as a low potential electron carriers ($E^\circ \approx -450$ mV) (-300mV to -700mV) achieving the [4Fe-4S]^{2+,+} redox transition. *In-vivo*, they are involved in anaerobic metabolic pathways, such as hydrogen production (Demuez *et al.*, 2007; Gauquelin *et al.*, 2018; Girbal *et al.*, 2005) and more rarely in aerobic and photosynthetic electron transfer chains (Meyer, 2008). The differences of amino acids sequences among Fds have led to the classification of Fd into two phylogenetically distinct families (Meyer, 2001). Their structures are represented in Figure 1.

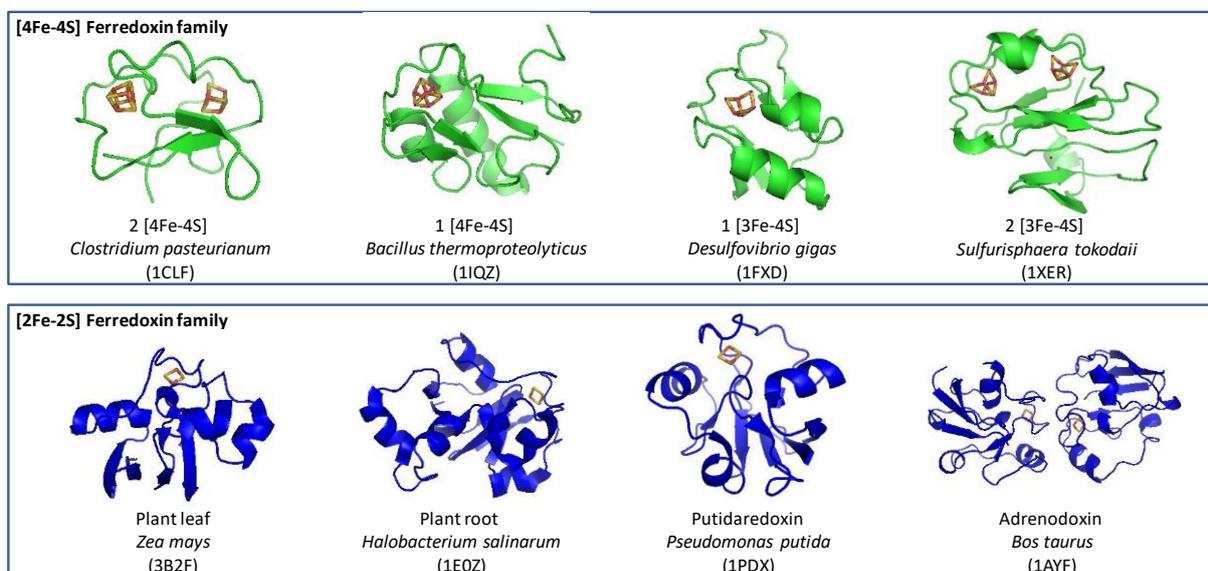


Figure 1: Structural representation of the [4Fe-4S] and [2Fe-2S] ferredoxin families. Adapted from (Meyer, 2008)

However, some Fd proteins sharing homology of amino acids sequences with [4Fe-4S] Fd may show variation in the type of cluster (3Fe or 4Fe), the number of cluster (one or two), and the length of the polypeptide chain (up to 100 residues). The Fds of *Desulfovibrio gigas* (PDB ID: 1FXD) and *Sulfurisphaera tokodaii* (PDB ID: 1XER) respectively have one and two [3Fe-4S] clusters, the Fds from *Thermotoga maritima* (PDB ID: 1VJW) and *Bacillus thermoproteolyticus* (PDB ID: 1IQZ) have only one [4Fe-4S] cluster, the Fd from *Azobacter vinelandii* (PDB ID: 7FD1) is an hybrid with one [4Fe-4S] cluster and one [3Fe-4S] cluster (Meyer, 2008). All the Fds detailed above have evolved from the 2[4Fe-4S] ferredoxin from *Clostridium* type Fd such as the Fd of *Clostridium pasteurianum* (PDB ID: 1clf) and belong to the same family (Meyer, 2008). The second family, built by amino acids comparison, is composed of Fds with [2Fe-2S] cluster, and their structures are represented in the Figure 1. This family of Fds is found in plants and algae. *In-vivo*, these Fds are electron carriers in photosynthesis, and ensure transport between the photosystem I and several enzymes. Some Fds of this family also transfer

electrons in redox chains with enzymes such as hydroxylases and oxygenases in a wide range of organisms, from bacteria to mammals (Meyer, 2001). The family of [2Fe-2S] Fds is divided into two sub-groups due to the difference in their biological functions: the plant and the mammalian type [2Fe-2S] Fds. The plant type [2Fe-2S] Fds are dedicated to the transport of electrons in the photosynthetic system and ensure the link between “light” and “dark” metabolism. The [2Fe-2S] Fds from vertebrates, called adrenodoxin, and from bacteria, called putidaredoxin are involved in the transfer of electrons to P450 cytochromes. Plant and mammalian type [2Fe-2S] Fds share homologies of structure, with a globular monomeric structure, one [2Fe-2S] cluster, and a length between 90 to 130 residues. These [2Fe-2S] Fds (-150 to – 450mV) achieve the [2Fe-2S]^{2+,+} redox transition of the cluster (Meyer, 2008). In the literature an exhaustive classification of Fd was recently proposed with the [2Fe-2S] Fds classified into nine sub-categories and the [4Fe-4S] Fds distributed into seven sub-categories (Atkinson *et al.*, 2016). The classification is represented in Table 1.

[2Fe-2S] Fd family	[4Fe-4S] Fd family
Plant-leaf	Clostridial
Plant-root	Alvin-like
Hydrogenosomal	Hybrid [3Fe-4S]/[4Fe-4S],
Eukaryotic-P450	Hybrid Zn-binding
Eukaryotic-ISC	Photosystem
Prokaryotic-P450	Nitrogenase
Prokaryotic-ISC	Monocluster
Nitrogenase-protecting	
Thioredoxin-like	

Table 1: Classification of [2Fe-2S] and [4Fe-4S] ferredoxins according to (Atkinson *et al.*, 2016).

Therefore, Ferredoxins are involved in a wide diversity of cellular functions. To understand better the parameters influencing the ferredoxin electron transfers in cells, Mutter *et al.* (2019) designed and built synthetic ferredoxins to produce symmetric ferredoxins (Mutter *et al.*, 2019). The ability of these artificial ferredoxins to shuttle electrons *in vivo* was evaluated in an *E. coli* EW11 strain, expressing both the Ferredoxin NADP⁺ oxidoreductase (FNOR) from *Zea mays* and the Sulfite I Reductase (SIR). The engineered strain is unable to grow in a minimal medium containing sulfate as sulfur source under microaerophilic conditions, except in presence of a synthetic ferredoxin able to efficiently transfer electrons from the FNOR to SIR. Through this work, the authors demonstrated that the difference of the midpoint potential between the synthetic ferredoxin and the FNOR electron donor impacted the effectiveness of the electron transfer. They concluded that synthetic ferredoxins with a midpoint potential close to the FNOR electron donor are the most efficient. From the construction and the study

of these artificial ferredoxins, the authors discovered simple rules to tune the midpoint potential of synthetic ferredoxins, depending on the composition of outer-shell and inner-shell residues. It may be then possible to develop synthetic ferredoxin adapted for an optimized electrons flow with specific oxidoreductases. This study highlights the importance of the characterization of ferredoxin dependent oxidoreductases to closely correlate the enzymes with their redox partners, to develop optimized synthetic metabolic pathway for electron transfer and implement them into metabolic engineering strategies.

In this review, a state of the art of the different kinds of ferredoxin NAD(P)⁺ oxidoreductases involved in reduced ferredoxin reoxidation driving the electron flux in anaerobic microorganisms is presented. These enzymes or enzymatic complexes create bridges between ferredoxin and nicotinamide (NAD⁺, NADH, NADP⁺ and NADPH)-dependent pathways. Three mechanisms were reported to catalyze these enzyme activities as shown in Figure 2: (i) the ferredoxin-NAD(P)⁺ oxidoreductases (FNORs), which transfer electrons from reduced Fd to NADP⁺ and/or NAD⁺ to regenerate NADPH and/or NADH, ii) the NADH-dependent reduced ferredoxin:NADP⁺ oxidoreductases (Nfn), which transfer electrons from reduced ferredoxin and NADH to 2 NADP⁺, to produce NADPH using an electron bifurcating mechanism (Müller *et al.*, 2018), and iii) a membrane bound ferredoxin NAD⁺ oxidoreductase encoded by the *rnf* genes, discovered 10 years ago in *Acetobacterium woodii*, involved in an energy conservation mechanism essential for the growth of some anaerobic bacteria (Müller *et al.*, 2018).

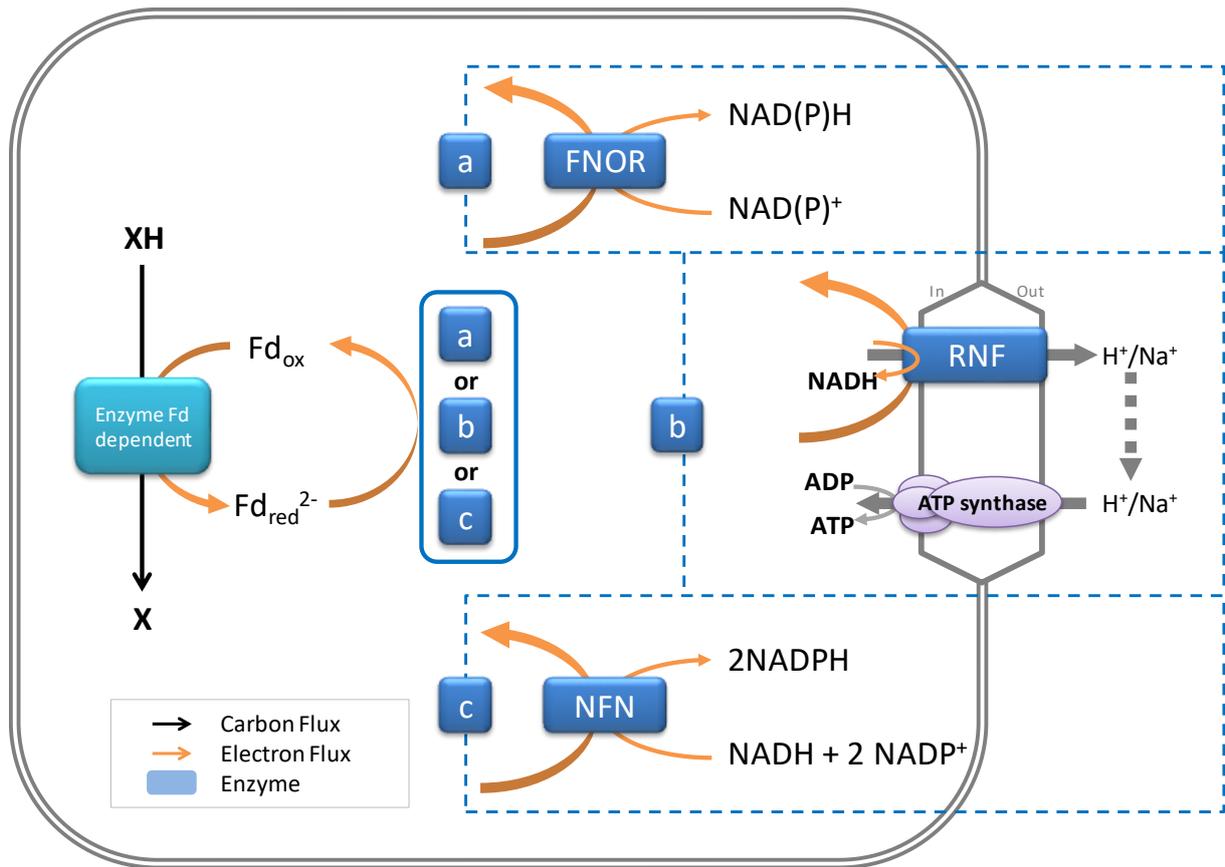
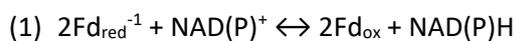


Figure 2: Example of a ferredoxin node in anaerobic metabolism with three alternative mechanisms to reoxidize reduced ferredoxin and maintain the redox balance.

I. Ferredoxin-NAD(P)⁺ oxidoreductases (FNORs)

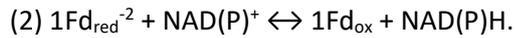
Ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductases and Ferredoxin-NAD⁺ oxidoreductases, also named ferredoxin NAD(P)⁺ oxidoreductases are found with various abbreviation in the literature, such as FNR, FPR and FNOR. For clarity purpose, in this publication, all the ferredoxin NAD(P)⁺ oxidoreductases are referred to as "FNOR".

FNORs are holoenzymes containing flavin adenine dinucleotide (FAD) that catalyze the transfer of reducing equivalents between ferredoxin (Fd) and nicotinamide (NAD(P)⁺/NAD(P)H) according to the equation (1) below.



The NADPH-dependent FNORs represent the largest fraction of known FNORs. Only few enzymes are able to use both NADPH and NADH and generally show a preference for one of them.

As already presented, there are different types of ferredoxins, depending on the organism, and on the amount of electrons carried. This variability may cause confusion in the stoichiometry of the equation (1), due to the number of electrons carried by the Fd. The [2Fe-2S] Fd, from plants, carries only one electron, whereas the [4Fe-4S] Fd found in anaerobic bacteria is able to carry up to two electrons. With [4Fe-4S] Fd, the equation (1) becomes (2):



In any case, the FNOR holoenzyme forms a ternary complex with the association of reduced Fd and NADP⁺ or NAD⁺ to perform the electron transfer from reduced Fd to NAD⁺ or NADP⁺ (Kamins, 1984). This reaction is also reversible, depending on the physiologic conditions. For example, FNORs from plant leaves perform the transfer of electron from reduced Fd to NADP⁺ during daylight and transfer electrons from NADPH to Fd at night.

FNORs are known to be involved in electron transfer chains such as photosynthesis, nitrogen fixation, steroid metabolism (Müller *et al.*, 2001). In anaerobic bacteria, FNORs are involved in ferredoxin dependent pathways leading to i) organic acids, solvents or alcohols production (Jones and Woods, 1986; Nguyen *et al.*, 2018; Saint-Amans *et al.*, 2001; Vasconcelos *et al.*, 1994; Yoo *et al.*, 2015), and ii) the regeneration of NADPH for anabolism, especially for the bacteria where the first enzyme responsible for the oxidative branch of the pentose phosphate pathway is missing (Crown *et al.*, 2011; Jungermann *et al.*, 1973; Petitdemange *et al.*, 1976).

a. Classification

There are several hundreds of proteins annotated as FNOR in SwissProt and Genbank databases, and at least fifty crystal structures of FNORs in PDB. These FNORs represent a wide range of enzymes with specific structure patterns leading to their classification (Aliverti *et al.*, 2008). However, only a small fraction were characterized, with their function in the metabolism demonstrated, especially for anaerobic bacteria. Based on phylogenetic and structural studies of the FNORs from aerobic bacteria, plants and mammals, already identified and characterized, the Ferredoxin NADP⁺ and NAD⁺ oxidoreductases are organized in two families: i) plant-type FNORs (Ceccarelli *et al.*, 2004) and ii) GR-type FNORs (Aliverti *et al.*, 2008), (GR standing for “glutathione reductases”) (Schulz *et al.*, 1978). However, the two protein families are not phylogenetically or structurally related, but present a homology of function. Each family is divided in sub-groups for which the main information are summarized in the Table 2.

The sub-groups of the plant-type FNOR are found in plastids and bacteria, and enzymes work as monomers.

The GR-type FNORs family is divided into three subgroups: the mitochondrial adrenodoxin reductase (AdR)-like, the bacterial oxygenase-coupled NADH-ferredoxin reductases (ONFRs)-like, and the NADPH-dependent thioredoxin reductase (TrxR)-like FNORs. In the literature, the subgroups AdR-like and ONFR-like are sometimes regrouped under the term of mitochondria-type FNOR, due to their similarity of function (reduction of cytochrome P450). The last subgroup, the TrxR-like FNOR is the latest addition to the GR-type family. It shows high amino acid sequence identity with thioredoxin reductases (Komori *et al.*, 2010; Seo *et al.*, 2009), but lacks the essential cysteine motif to perform this catalysis (Skråmo *et al.*, 2014), and is functional as homodimer.

None of the FNOR characterized from anaerobic bacteria can be associated to any defined family, as only few enzymes are identified and characterized. However, the recently discovered NADH-dependent FNOR from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*, sharing similarity of amino acid sequences with NfnA from *Thermotoga maritima* and with the dihydroorotate dehydrogenase (DodH) of *Lactococcus lactis* (Tian *et al.*, 2016), was helpful to build a protein homology model of the structure. Therefore, the NfnA subunit is known to present some similarities of sequences with the plant-type Ferredoxin NADP⁺ oxidoreductase (Demmer *et al.*, 2015) which relates the FNOR from anaerobe to the other FNOR already described.

Family of FNOR	Sub-group	Example of organisms	Main characteristics
Plant-Type FNOR	Plastidic-type	plants and cyanobacteria Examples: <i>S. oleracea</i> <i>Z. mays</i> <i>Nostoc species</i>	-Redox exchange between [2Fe-2S] Fd and NADP ⁺ /NADPH -Involved in various metabolic processes, from carbon assimilation to glutamate synthesis -Functional as monomer
	Bacterial-Type	Proteobacteria Examples: <i>A. vinelandii</i> , <i>R. capsulatus</i> (Nogués <i>et al.</i> , 2005) <i>E. coli</i> (Wan and Jarrett, 2002)	-Involved during oxidative stress -Ferredoxin reductase activity lower than in the plant type (Nogués <i>et al.</i> , 2005) -Functional as monomer
GR-Type FNOR	AdR-like	<i>M. tuberculosis</i> FprA (Bossi <i>et al.</i> , 2002) <i>H. sapiens</i> ADR <i>S. cerevisiae</i> ADR	- Reduction of cytochrome P450 with adrenodoxin (Ad) as redox partner -Functional as monomer (Aliverti <i>et al.</i> , 2008)
	ONFR-like	BphA4 from <i>Pseudomonas</i> sp. (Senda <i>et al.</i> , 2000) PDR from <i>P. putida</i> (Sevrioukova <i>et al.</i> , 2004) FNOR from <i>M. tuberculosis</i>	-Reduction of cytochrome P450 with putidaredoxin (Pd) as redox partner - Functional as a dimer
	TrxR-like	Firmicutes, green sulfur bacteria, α -proteobacteria and archaea (Seo <i>et al.</i> , 2009). Examples: YumC from <i>B. subtilis</i> (Seo <i>et al.</i> , 2004) <i>C. tepidum</i> (CT1512)(Seo and Sakurai, 2002) <i>S. tokodaii</i> (ST2133) (Yan <i>et al.</i> , 2014)	-Functional as homodimer -Electron transfer from reduced Fd to NADP ⁺ -FNOR from <i>C. tepidum</i> able to transfer electron from reduced Fd to both NAD ⁺ and NADP ⁺ (Seo <i>et al.</i> , 2016) - CT1512 successfully overexpressed in the anaerobe <i>C. acetobutylicum</i> to increase NAD(P)NAD(P)H availability (Qi <i>et al.</i> , 2018)
Anaerobic organisms	<i>T. saccharolyticum</i> (Tian <i>et al.</i> , 2016) <i>T. thermohydrosulfuricus</i> (Lovitt <i>et al.</i> , 1988) <i>C. saccharobutylicum</i> (Stutz and Reid, 2004)	- Redox homeostasis between Fd and NAD(P)H (Tian <i>et al.</i> , 2016) - Often annotated as β small unit of glutamate synthase (Stutz and Reid, 2004)	

Table 2: Structural/phylogenetic classification of ferredoxin-NAD(P)⁺ oxidoreductases adapted and updated from (Aliverti *et al.*, 2008) associated to their main characteristics. These groups were determined by both sequence and three-dimensional structure comparisons when available.

b. Structure

The amino acid sequences in the FNOR groups differ from each other, but they possess similarities in their architecture. They all have a two-domain structure, one for FAD or FMN and the other for NADP⁺/NADPH or NAD⁺/NADH binding, respectively localized in the N-terminus and C-terminus. The active site is located at the interface between the two binding domains. This architecture is typical of the super family of NADP⁺/NADPH-linked flavoenzymes, to which FNORs belong. However, there is a fundamental difference of structure between each family (Aliverti *et al.*, 2008) and their three-dimensional structures are represented in Figure 3.

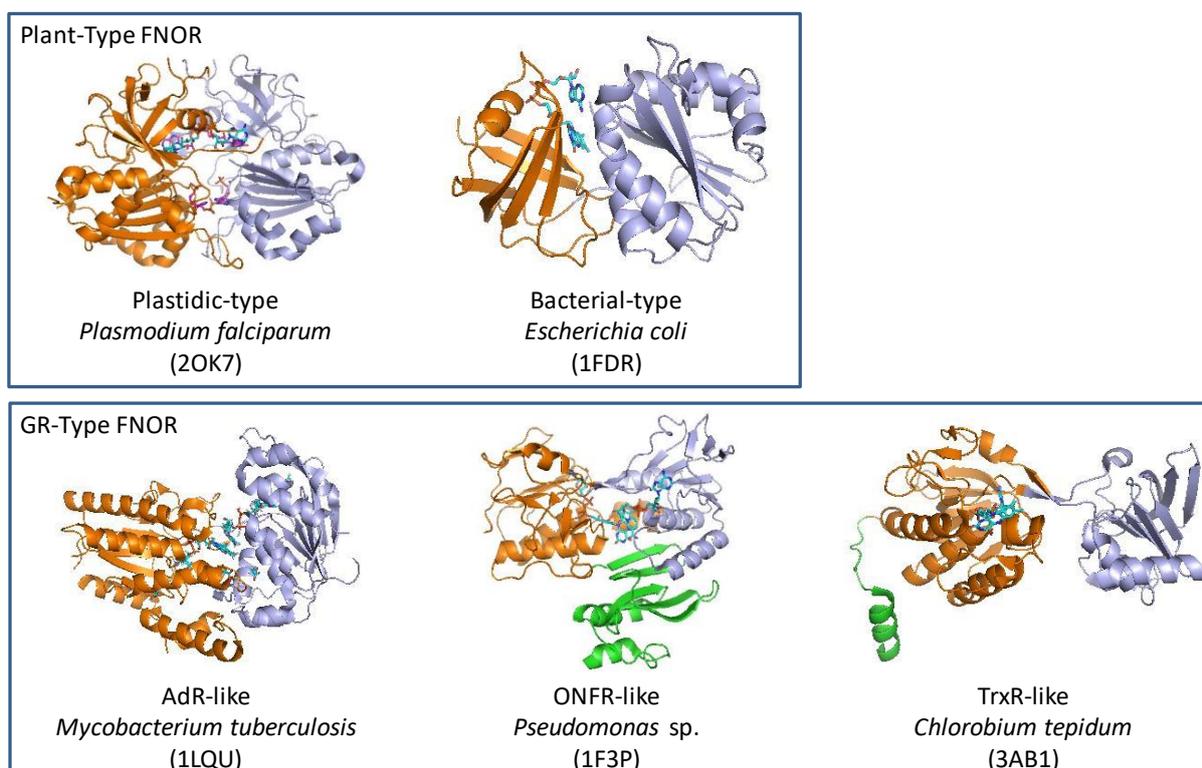


Figure 3: Three-dimensional structure of plastidic-type, bacterial-type, AdR-like, ONFR-like and TrxR-like FNORs. Plastidic-type: *Plasmodium falciparum* FNOR, chain A (PDB ID: 2OK7); bacterial-type: *Escherichia coli* FNOR (PDB ID: 1FDR); AdR-like: *Mycobacterium tuberculosis* FprA, chain A (PDB ID: 1LQU); ONFR-like: *Pseudomonas* sp. Strain KKS102 BphA4 (PDB ID: 1F3P); TrxR-like: *Chlorobium tepidum* CT1512, chain B (PDB ID: 3AB1). FAD-binding domains, NAD(P)-binding domains and C-terminal dimerization domain are respectively shown in orange, light blue, and green. Adapted and updated from (Aliverti *et al.*, 2008).

The FAD-binding domain structure is variable between plant-type and GR-type FNOR (Aliverti *et al.*, 2008). In plant-type FNORs, the FAD domain is localized in the N-terminus of the protein in one continuous segment. Its structure has a characteristic pattern with antiparallel β -barrel with a Greek-key motif. In GR-type FNORs, the FAD domain is composed by two discontinuous segments and has a characteristic pattern of a three-layers $\beta/\beta/\alpha$ -fold (Aliverti *et al.*, 2008). The NADPH-dependent and

NADH-dependent FNORs possess distinct binding domains and only a small amount is able to use both NADH and NADPH, such as the FNOR from *C. tepidum* (Seo and Sakurai, 2002). The NADP⁺ binding domain is similar for both families, with a Rossmann fold motif forming a three-layers sandwich $\alpha/\beta/\alpha$ and a parallel five-membered β -sheet (Aliverti *et al.*, 2008). Moreover, the specificity for NADP⁺/NAD⁺ is based on the same mechanism: positively charged residues interacting with the 2'-phosphate group of the adenosine monophosphate (AMP) moiety of a NADP⁺ for NADPH dependent FNOR. In NADH-dependent FNOR, the corresponding residues in NAD⁺ binding site create a hydrogen bond with the 2'-hydroxy group of the AMP moiety of NAD⁺ (Medina *et al.*, 2001). FNORs with a specificity for NADH only also have negatively charged residues to prevent NADPH from binding. The interaction of the ferredoxin with the FNORs is diverse between groups: the plastidic-type FNORs are able to use both [2Fe-2S] and [4Fe-4S] ferredoxin at a comparable reduction rate (López Rivero *et al.*, 2019), but the TrxR-like FNORs show a significant decrease of the reduction rate using [2Fe-2S] Fd rather than [4Fe-4S] Fd. It is also noticeable that during growth with low iron content, the flavodoxin (Fld) represents an alternative to Fd as an electron carrier (Wan and Jarrett, 2002), and is compatible with most FNORs.

The TrxR-like FNORs have the particularity to share stronger homologies of structure with *E. coli* TrxR than with the other FNORs. However, the cysteine motif (C-XX-C) performing the disulfide isomerization is missing, and is replaced by an FNOR activity (Muraki *et al.*, 2010). The TrxR-like FNORs' structure is characteristic, with a homodimer formation in one asymmetric unit and the presence of an extended C-terminus end (Muraki *et al.*, 2010; Seo *et al.*, 2013; Skråmo *et al.*, 2014). This extended C-terminus end is involved in the covering of the re-face of the isoalloxazine ring of the other monomer: it generates a hydrogen bond between, on one side, the isoalloxazine N5 of the FAD group from one monomer, and on the other side, the Thr/Ser residues in the C-terminus from the second monomer (Seo and Asano, 2018). TrxR-like FNORs are also characterized by their flexible hinge region localized at the interface between the FAD-binding domain and NAD(P)H-binding domain. This particularity makes possible important movements of one NAD(P)H binding domain with a rotation of 39.8° and a translation of 1.1 Å when the FAD protomer is superimposed to the second one. Muraki *et al.* hypothesized that the hinge-bending motion might be involved in Fd binding (Muraki *et al.*, 2010). This group includes NADPH-dependent FNOR (Komori *et al.*, 2010; Mandai *et al.*, 2009; Seo *et al.*, 2009, 2004; Yan *et al.*, 2014) but also bi-specific enzymes (NADPH/NADH) (Seo *et al.*, 2016; Seo and Sakurai, 2002). The FNORs are able to work both ways, by using Fd as electron donor or as acceptor, depending on the redox state and on the metabolism related to the FNOR. The FNOR from *C. tepidum* (CT1512) has been extensively studied and its crystal structure solved (Muraki *et al.*, 2010; Seo *et al.*, 2016, 2004).

For FNORs from anaerobic bacteria, no crystal structure was published up to now and it is difficult to identify them through blast searches of proteins, as it shares no identity with the already described FNORs from plants or aerobic bacteria (J. Lee *et al.*, 2008). Therefore, there is very few information about the structure of FNORs from anaerobic bacteria. A homology model was constructed for the NADH-dependent FNOR from *T. saccharolyticum*, using the crystal structure of the dihydroorotate dehydrogenase from *L. lactis* and the alignment with the NfnA sub-unit from *T. maritima* (which has 32% amino acid sequence identity with NfnA) to superimpose the NADH, FAD, and [2Fe-2S] cluster (Tian *et al.*, 2016). Even if the structure of the FAD binding domain of anaerobic FNOR is unknown. The presence of FAD was confirmed i) by visible absorption spectroscopy in the purified NADPH-dependent FNOR from *P. furiosus* (Ma and Adams, 2001) and ii) by the fast loss of *in vitro* enzyme activity in absence of FAD (Petitdemange *et al.*, 1976). Finally, the presence of at least three FeS clusters was confirmed by electron paramagnetic resonance in the NADPH-dependent FNOR for *P. furiosus* (Ma and Adams, 2001).

c. Function

Plant-type FNOR – plastidic-type:

The plastidic-type FNORs have been extensively described in the literature (Carrillo and Ceccarelli, 2003; Hanke and Mulo, 2012; Kamins, 1984; Karplus and Bruns, 1994; Karplus and Faber, 2004; Kozuleva *et al.*, 2016; Mulo and Medina, 2017). Still, the large knowledge available for plant-type FNORs is used for the interpretation of the results from the other kind of FNORs. FNORs are involved in the photosystem I (PSI) by reducing NADP^+ into NADPH at the end of the linear photosynthetic transfer (PET). Then, the reducing power generated is used for CO_2 assimilation by plants and cyanobacteria. This reaction requires the reduction of the plant-type [2Fe-2S] Fd by the PSI, and then, FNOR reoxidizes the ferredoxin and transfers the electrons to NADP^+ according to the equation (1) above. The transfer of the electrons from the two reduced Fd occurs in two sequential steps via the FAD bond into the FNOR (Kurusu *et al.*, 2001). The first electron transferred generates a neutral semiquinone form of the FNOR and the second electron generates the hydroquinone form of the enzyme (FNOR_{hq}). The electrons are transferred from FNOR_{hq} to NADP^+ in a single hybrid transfer (HT) (Kean *et al.*, 2017) and the limiting step of the reaction is the dissociation of oxidized ferredoxin (Ceccarelli *et al.*, 2004; Nogués *et al.*, 2005). This reaction occurs during light metabolism, but the FNOR reaction is reversible during dark metabolism. There are exceptions in this class of FNOR: as an example, *Leptospira interrogans* is a pathogenic Gram negative aerobic bacteria which possesses a plastidic-type FNOR (LepFNOR), which, *in vivo*, interacts with a bacterial [4Fe-4S] Fd (López Rivero *et al.*, 2019; Nascimento *et al.*, 2007).

Plant-type FNOR – bacterial-type: Also called FPR

The role of the bacterial-type FNORs has been demonstrated in the oxidative stress responses for *E. coli*, *A. vinelandii*, *S. enterica* and *Rhodobacter capsulatus* (Bittel *et al.*, 2003; Krapp *et al.*, 2002; Pomposiello and Demple, 2000; Yannoni and Burgess, 1998). In *E. coli*, the FNOR is involved in the SoxRS response system and maintains NADP(H) homeostasis. The binding mechanism of the FAD represents a major difference between plastidic type and aerobic bacteria type FNORs. The plastidic class is characterized by having an extended FAD conformation, whereas the bacterial class displays a folded FAD co-factor (Ceccarelli *et al.*, 2004). Due to the central role of the FAD in the electron transfers, it was hypothesized that the difference between the high catalytic efficiency of plastidic FNORs compared to the low catalytic efficiency of bacterial FNORs originates from the conformation of the FAD. A turnover number of 200-500s⁻¹ was observed for the plastidic type FNOR (*Anabaena sp.*) compared to 1-2 s⁻¹ for the bacterial FNOR (*R. capsulatus*) (Nogués *et al.*, 2005). Indeed, the limiting step observed for *R. capsulatus* was the transfer of the electrons from the FNOR_{hq} to the oxidized Fd or Fld (Ceccarelli *et al.*, 2004; Nogués *et al.*, 2005).

GR-type FNOR – AdR-like: also called mitochondrial-type

GR-type FNOR are distinguished from plant-type FNOR because of the FAD binding domain, which is different as already described above. This type of FNOR performs the reduction of cytochrome P450 with adrenodoxin (Ad) as redox partner (Ziegler *et al.*, 1999).

GR-type FNOR – ONRF-like:

The ONRFs-like FNOR, for bacterial oxygenase-coupled NADH-ferredoxin oxidoreductase, are mostly represented by the NADH dependent ferredoxin oxidoreductase from *Pseudomonas* species BphA4 (Aliverti *et al.*, 2008; Senda *et al.*, 2007, 2000). The FAD binding domain is similar to AdR-like FNOR, but the active site and the NAD-binding site are different. BpHA4 also possesses a third domain in C-terminus, involved in the homodimerization of the protein. The ONFR-like FNORs mainly use NADH as electron donor to reduce putidaredoxin (Pd). This type of FNOR performs the reduction of cytochrome P450 with Pd as redox partner.

GR-type FNOR – TrxR-like:

The novel type of TrxR-like FNORs was first reported in the green sulfur bacterium *C. tepidum* (Seo and Sakurai, 2002). This green sulfur bacterium phototrophically grows using sulfur compounds and

assimilating CO₂ through the reductive carboxylic acid cycle (Evans *et al.*, 1966; Wahlund and Tabita, 1997). During non-oxygenic photosynthesis using sulfur compounds as electron donors, the type I photoreaction center (RC) directly photoreduces Fd, then the TrxR-like FNOR from *C. tepidum* transfers the reducing power from the generated reduced ferredoxin to NADP⁺, to form NADPH. Since the discovery of the TrxR-like FNORs, they were identified in various organisms such as *Rhodospseudomonas palustris*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* by identity of amino acids sequences. However, the role of the newly discovered TrxR-like FNOR in the metabolism of these organisms remains poorly understood.

In *B. subtilis*, a Gram-positive facultative anaerobe bacterium, the Fd supports the reduction of cytochrome P450, and the TrxR-like FNOR, YumC, is responsible for the reduction of Fd using NADPH as electron donor (Green *et al.*, 2003; Seo *et al.*, 2004). In 2014, the gene *Bc0385* encoding an FNOR of *B. cereus* (a facultative anaerobe) was cloned and overexpressed in *E. coli* to purify and characterize the protein (Skråmo *et al.*, 2014). The purified NADPH dependent FNOR had a homodimeric structure of approximately 77.4 kDa. The crystal structure showed an asymmetric dimeric structure, characteristic from the thioredoxin reductase-like class of FNORs. However, the function of this FNOR in the redox networks of *B. cereus* remains unknown.

d. Identification and characterization of FNOR in anaerobes

Even if *in vitro* enzyme FNOR activities were already measured in crude extracts of Clostridia anaerobic cultures since more than 40 years ago (Jones and Woods, 1986; Petitdemange *et al.*, 1976), genes encoding these enzymes are poorly identified and only few enzymes were characterized. Indeed, as these enzymes have no or very low percentage of identity with already described FNOR families, the only way to identify them is to purify them under strict anaerobic conditions. Purification of such enzymes is often a heavy and hard work as enzymes are often highly oxygen sensitive.

In 1988, Ferredoxin NAD⁺ oxidoreductase and Ferredoxin NADP⁺ oxidoreductase specific activities were measured *in-vitro* on cells from *Clostridium thermohydrosulfuricum* (renamed *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* or *T. ethanolicus*), a thermophilic anaerobic bacterium (Lovitt *et al.*, 1988). Measurements were done at 60°C using reduced ferredoxin coupled with metronidazole reduction, and values of 32 mU/mg and 92 mU were respectively obtained for Fd NAD⁺ reductase and Fd NADP⁺ reductase. The authors did not correlate these NAD(P) dependent FNOR activities to any gene. The physiological role of pyridine nucleotide ferredoxin oxidoreductases in the control of the electrons flow between low redox reactions and NAD⁺/NADP⁺ was highlighted, and a correlation between Fd NADP⁺ reductase activity and NADPH dependent ethanol production was

suggested. In 1994, ferredoxin NAD⁺ reductase and NADH ferredoxin reductase activities were also measured *in vitro* in crude extracts from *C. acetobutylicum* capable of converting sugars into organic acids, solvent and alcohols. Cells were grown in chemostat cultures on glucose or on a mixture of glycerol and glucose at a neutral pH (Vasconcelos *et al.*, 1994). The authors suggested that two distinct enzymes could catalyze these activities as a high *in vitro* NADH ferredoxin oxidoreductase activity (0.168 U/mg) was measured when the cells were grown on glucose, and a high *in vitro* Ferredoxin NAD⁺ reductase activity (0.293 U/mg) was found when the cells were grown on a glycerol and glucose mixture. A similar experiment was performed with *C. butyricum* VPI3266, an anaerobic clostridium naturally able to convert glycerol into 1,3-propanediol (Saint-Amans *et al.*, 2001). NAD(P)H ferredoxin reductases and Ferredoxin NAD(P) reductases activities were measured *in vitro* on crude extracts. However, the variation of the fourth activities when *C. butyricum* was grown in a mixture of glucose and glycerol was completely different from *C. acetobutylicum*, suggesting that only one NADH ferredoxin oxidoreductase was present in *C. butyricum*. Such analysis was also done later in the recombinant strain of *C. acetobutylicum* DG1 (pSPD5) in which the 1,3-propanediol pathway from *C. butyricum* was overexpressed (González-Pajuelo *et al.*, 2005). In any case, genes encoding the enzymes were not identified. More recently, a quantitative system-scale analysis, which clearly demonstrated the involvement of Ferredoxin NAD(P)⁺ oxidoreductase into the metabolism of *C. acetobutylicum*, was performed (Yoo *et al.*, 2015). In this study, *C. acetobutylicum* was grown in phosphate limited chemostat cultures maintained in the three different metabolic state acidogenic, solventogenic, and alcohologenic. The authors generated an electron flux map for the three conditions and clearly demonstrated that both ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase and ferredoxin-NAD⁺ oxidoreductase play key roles in *C. acetobutylicum* for the alcohol production, under solventogenesis and alcohologenesis conditions respectively. Under acidogenic conditions, reduced ferredoxin is primarily used to produce hydrogen. Only a small fraction is used by Ferredoxin NAD⁺ oxidoreductase to regenerate NADH needed for butyrate production and by ferredoxin NADP⁺ oxidoreductase to regenerate NADPH used for anabolic reactions, as the glucose 6-phosphate dehydrogenase is missing (Crown *et al.*, 2011). Under solventogenesis conditions, a significant amount of reduced ferredoxin is used by ferredoxin NADP⁺ oxidoreductase to produce NADPH needed for ethanol and butanol production additionally to anabolic reactions. Under alcohologenic conditions, reduced ferredoxin is primarily used to regenerate NADH by Ferredoxin NAD⁺ oxidoreductase for the production of alcohol. Even if the genes encoding FNOR enzymes were not identified in this work, this study demonstrated that FNORs participate to the metabolic flexibility of *C. acetobutylicum*, and are essential enzymes to link ferredoxin and NAD(P)⁺ dependent pathways (Girbal *et al.*, 1995; Yoo *et al.*, 2017, 2016).

A FNOR was recently identified and characterized in *T. saccharolyticum*, a thermophilic anaerobic bacterium. In 2008, a draft of the genome sequence was obtained from the strain *T. saccharolyticum* JW/SL-YS485 (Joe Shaw *et al.*, 2008), leading to an improved knowledge of the central metabolism of the strain. The presence of a pyruvate:ferredoxin oxidoreductase (Pfor or POR) and of a FNOR was identified by homology of sequence, with the Pfor of *T. maritima* and the FNOR of *P. furiosus*, respectively, and confirmed by specific activity measurements in crude extracts of both activities. The NAD(P)H FNOR activity was evaluated in cell extracts of *T. saccharolyticum*, using benzyl viologen as electron acceptor. A specific activity of 1.08 U/mg was detected using NADH as redox partner, whereas only 0.55 U/mg was detected using NADPH as redox partner. The authors suggested that considering the high FNOR activity, i) the FNOR could be the major pathway to transfer electrons from the reduced ferredoxin to NAD⁺ or NADP⁺, and ii) the regenerated NADH or NADPH is used for ethanol production. In 2016, the gene encoding the NADH-FNOR was finally unambiguously identified in *T. saccharolyticum* (Tian *et al.*, 2016). Two candidates named *tsac_0705* and *tsac_1705* were first identified by searching for the presence of both iron sulfur binding domains and NAD⁺ binding domain in the genome of *T. saccharolyticum* using Pfam online database. Both genes were overexpressed independently by insertion of an additional copy in the genome of *T. saccharolyticum*. The impact of the additional copy was evaluated by measuring the NADH-FNOR activity on cell extracts. Only one strain showed a 5-fold increase in the activity linked to the overexpression of the *tsac_1705*. This result strongly suggested that the *tsac_1705* was responsible for the NADH-FNOR activity. To confirm this result, the authors heterologously overexpressed the *tsac_1705* in *E. coli* and the recombinant protein was produced and purified to be biochemically characterized. The purified protein exhibited a NADH-FNOR activity and no NADPH-dependent activity was measured. Based on the NADH FNOR activity, the K_m for benzyl viologen was determined (0.07 ± 0.01 mM) and the V_{max} was 23 ± 0.3 U/mg. When the NAD⁺ FNOR activity was used, the K_m for NAD⁺ and the V_{max} were respectively 0.5mM and 3.28 U/mg. It was also observed that the *tsac_1705* was insensitive to oxygen, by measuring identical specific enzyme activities either from anaerobic or aerobic cultures when recombinant proteins were produced and purified. The predicted structure of *tsac_1705* shares 32% amino acid identity with the NfnA sub-unit from Nfn of *T. maritima* and has a monomeric structure. The last step of the characterization was to confirm the *in-vivo* role of *tsac_1705*, in the production of ethanol, in *T. saccharolyticum*. There are two ethanol production pathways in *T. saccharolyticum*, one NADH-based and one NADPH-based (Lo *et al.*, 2015). Three mutants of *T. saccharolyticum* were constructed: one with a deletion of *tsac_1705*, one with a deletion of *nfnAB* and the third with the deletion of both *tsac_1705* and *nfnAB*. The enzyme assays on crude extract done with all mutants showed that in the simple mutant with an inactivation of *tsac_1705*, 70% of the NADH-FNOR activity was lost, which demonstrates that *tsac_1705* is the

primary gene responsible for the NADH-FNOR activity in *T. saccharolyticum*. The analysis of products profiles in all mutants showed that the inactivation of both genes had no effect on ethanol production, suggesting that the two FNOR enzymes can complement one another. However, a decrease of the ethanol/acetate ratio from 1.66, for the wild type strain, to 1.07, for the double mutant, was observed. The decreased ethanol/acetate ratio confirmed that *tsac_1705* is responsible for the NADH-FNOR activity and that the ethanol production relies on the functionality of this FNOR through the NADH-dependent pathway. The identification and the biochemical characterization of the ferredoxin NAD⁺ oxidoreductase from *T. saccharolyticum* is one of the few examples described in the literature.

e. Metabolic engineering strategies using overexpression of FNOR to modify electron fluxes

As it was previously indicated, the Ferredoxin NAD⁺ oxidoreductases and Ferredoxin NADP⁺ oxidoreductases are key enzymes of the anaerobic metabolism. Therefore, to improve the native performance of the anaerobic bacteria for the production of chemicals at high yield, the introduction of such enzymes into metabolic engineering strategies seems to be a positive alternative to drive the electron flux through the pathway of interest. Such an approach was recently developed by Qi *et al.* 2018 to favor butanol production into *C. acetobutylicum* (Qi *et al.*, 2018). The authors overexpressed the Ferredoxin NAD(P)⁺ oxidoreductase from *C. tepidum*, (a Trx like type FNOR (Seo *et al.*, 2016), able to reduce both NAD⁺ and NADP⁺ from reduced ferredoxin), into three different strains of *C. acetobutylicum*: the wild type strain, a mutant in which the butyrate kinase is inactivated, and a mutant producing only organic acids. The idea was to create an exogenous synthetic pathway producing additional reoxidized ferredoxin and NAD(P)H needed for butanol production and consequently lowering the use of reduced ferredoxin for H₂ production. To quantify the effects of the FNOR overexpression on the redox status, the ratio of butanol to acetate and the final titer of butanol were compared, between the different recombinant strains and the corresponding control strains. The strongest effect was observed in the butyrate kinase inactivated mutant. The overexpression of the FNOR enhanced NAD(P)H availability and increased 1.4 fold the production of butanol (9 g/L) compared to the control strain *buk⁻* ATCC824 (6.5 g/L). The butanol/acetate ratio increased 1.6 fold, with 3.17 for the strain expressing the FNOR compared to 2.03 for the control strain *buk⁻* ATCC824. Through this work, authors demonstrated that the overexpression of the FNOR from *C. tepidum* in *C. acetobutylicum* increased NAD(P)H availability, and led to an improvement of the production of butanol, a valuable industrial chemical.

A metabolic engineering strategy using overexpression of FNOR was also done in *C. thermocellum*, able to produce ethanol from cellulose (Tian *et al.*, 2016). The ethanol production of *C. thermocellum* relies

on NADH dependent alcohol dehydrogenase and acetaldehyde dehydrogenase reactions. *C. thermocellum* is able to produce 25 g/L of ethanol, whereas *T. saccharolyticum* is able to produce up to 70 g/L of ethanol. However, *T. saccharolyticum* is not able to use the cellulose fraction of biomass. The authors compared the NADH-FNOR activity on both strains and found a 2-fold higher activity in *T. saccharolyticum* compared to *C. thermocellum*. They argued that the limited NADH-FNOR activity in *C. thermocellum* might be the limiting step for ethanol production. This hypothesis is also based on the fact that the NADH/NAD⁺ ratio is higher in *T. saccharolyticum* than in *C. thermocellum* (Beri *et al.*, 2016). To overcome this limitation, the newly discovered NADH-FNOR, from *T. saccharolyticum* was overexpressed in *C. thermocellum* to improve NADH availability for ethanol production. First, they encountered a problem to transform *C. thermocellum* with the vector expressing *tsac_1705*: colonies were only obtained in the strain of *C. thermocellum* where the Rnf complex is inactivated. The authors assumed that the co-expression of the FNOR and the endogenous Rnf complex created a futile cycle, where the Rnf complex reduced Fd using NADH as electron donor which resulted in a protons influx across the cell membrane, cancelling the proton gradient, and has a lethal effect on the cells. Despite this problem, the *C. thermocellum* strain with *rnf* inactivated and expressing the *tsac_1705* showed an increase of titer in ethanol by 28%, compared to the control (without any FNOR overexpression) (Tian *et al.*, 2016). The production of acetate also decreased in the strain expressing the FNOR, indicating a reducing electron flux through the hydrogenases and a redirection through FNOR for ethanol production.

Cupriavidus necator is a facultative chemolithoautotrophic bacterium able to grow efficiently in gas mixtures of CO₂/H₂/O₂ with minimal nutrient supplements. An alkane biosynthetic pathway was created in *C. necator* by overexpressing the acyl-ACP reductase (AAR) and the aldehyde deformylating oxygenase (ADO) from *Synechococcus elongatus*. The reaction catalyzed by ADO required an input of four electrons for each alkane produced. These electrons are supplied by reduced ferredoxin and require an FNOR to transfer them from NADPH to oxidized Fd, generating the reduced ferredoxin needed. A metabolic engineering strategy was developed by first overexpressing the endogenous Fd and FNOR encoding genes from *C. necator*, in the engineered strain for alkane production (Crépin *et al.*, 2018, 2016). The strain Re2061, was able to produce 0.435 mg/L of alka(e)nes with a yield of 18.7 mg/g_{CDW} (Crépin *et al.*, 2016). However, the authors assumed that the activity of ADO is the limiting step in alka(e)nes production and that the activity of the endogenous Fd/FNOR system was insufficient. Two novel strains, Re2061-pMAB1 and Re2061-pMAB2, respectively overexpressing Fd and FNOR from *C. necator* and *S. elongatus*, were constructed (Crépin *et al.*, 2018). The Re2061-pMAB1, expressing the Fd and FNOR encoding genes from *C. necator* in operon with *aar* and *ado* genes from *S. elongatus*, was able to produce 0.487 g/L of alka(e)nes with a yield of 22 mg/g_{CDW} whereas the Re2061-pMAB2,

expressing the Fd and FNOR encoding genes from *S. elongatus* in operon with *aar* and *ado* genes, was able to produce 1.48 g/L of alka(e)nes with a yield of 82 mg/ g_{CDW}. Through this metabolic engineering approach, it was showed that the co-expression of ADO with an additional heterologous Fd/FNOR system led to better electron transfer and significantly improved the yield of alka(e)ne production from fructose.

All these examples demonstrated that combining overexpression of exogenous FNOR to metabolic engineering strategies could modify the electron flow and favor the redirection of the carbon flux through ferredoxin dependent pathways increasing the yield of targeted products. The different features of FNORs already characterized, with specificities for either NADP⁺, NAD⁺ (or bi-specific for both), [2Fe-2S] Fd or [4Fe-4S] Fd, must be considered before their implementation in metabolic engineering strategies to adjust the redox balance towards the desired pathway (Lu *et al.*, 2015).

II. Electron-Bifurcating NADH-dependent reduced ferredoxin:NADP⁺ oxidoreductase (Nfn)

The NADH-dependent reduced ferredoxin:NADP⁺ oxidoreductase (Nfn), also called ferredoxin-dependent transhydrogenase, was first discovered in *Clostridium kluyveri*. This enzyme activity was identified several years ago in crude extracts of *C. kluyveri* by catalyzing *in vitro* the reduction of ferredoxin with NADPH in presence of NAD⁺ (Jungermann *et al.*, 1971; Thauer *et al.*, 1971). The mechanism of this reaction was misunderstood up to the discovery, a decade ago, of a mechanism called electron-bifurcation used to drive thermodynamically unfavorable reactions. This mechanism couples an endergonic electron transfer reaction to an exergonic redox reaction by splitting an electron pair. Nfn is a soluble complex found in the cytoplasm of several anaerobes such as *M. thermoacetica*, *T. maritima* or *P. furiosus*. *In vivo*, Nfn performed electron-confurcation by catalyzing the reduction of two NADP⁺, using one NADH and one reduced ferredoxin as electron donor to generate 2 NADPH (Buckel and Thauer, 2018b). However, due to the reversibility of the complex, Nfn was used as a model to study Flavin-based electron-bifurcation (FBEB) mechanism as it possesses the simplest structure among this kind of enzymes (Buckel and Thauer, 2018b; Demmer *et al.*, 2015; Müller *et al.*, 2018).

a. Structure

The electron-bifurcating Nfn complex is a heterodimer composed of two subunits, NfnA and NfnB with respective molecular masses around 30 and 50 kDa. The crystal structure of Nfn from *Thermotoga maritima* was successfully obtained and solved to understand FBEB mechanism (Buckel and Thauer, 2018b; Demmer *et al.*, 2015; Nguyen *et al.*, 2017). The electron-bifurcation mechanism in NfnAB, is

represented in Figure 4. The NfnA subunit is composed of one [2Fe-2S] cluster, a binding domain for one FAD, and one NAD(P) binding site. The NfnB subunit has two [4Fe-4S] clusters, respectively proximal and distal, and also contains two Rossmann folds that bind FAD and NADPH. The site for electron bifurcation is localized in the FAD of NfnB (b-FAD) which is close to the center of the complex. The FAD of NfnA (a-FAD), the iron clusters of both NfnA and B, and the co-factors participate to the electron transfer chain.

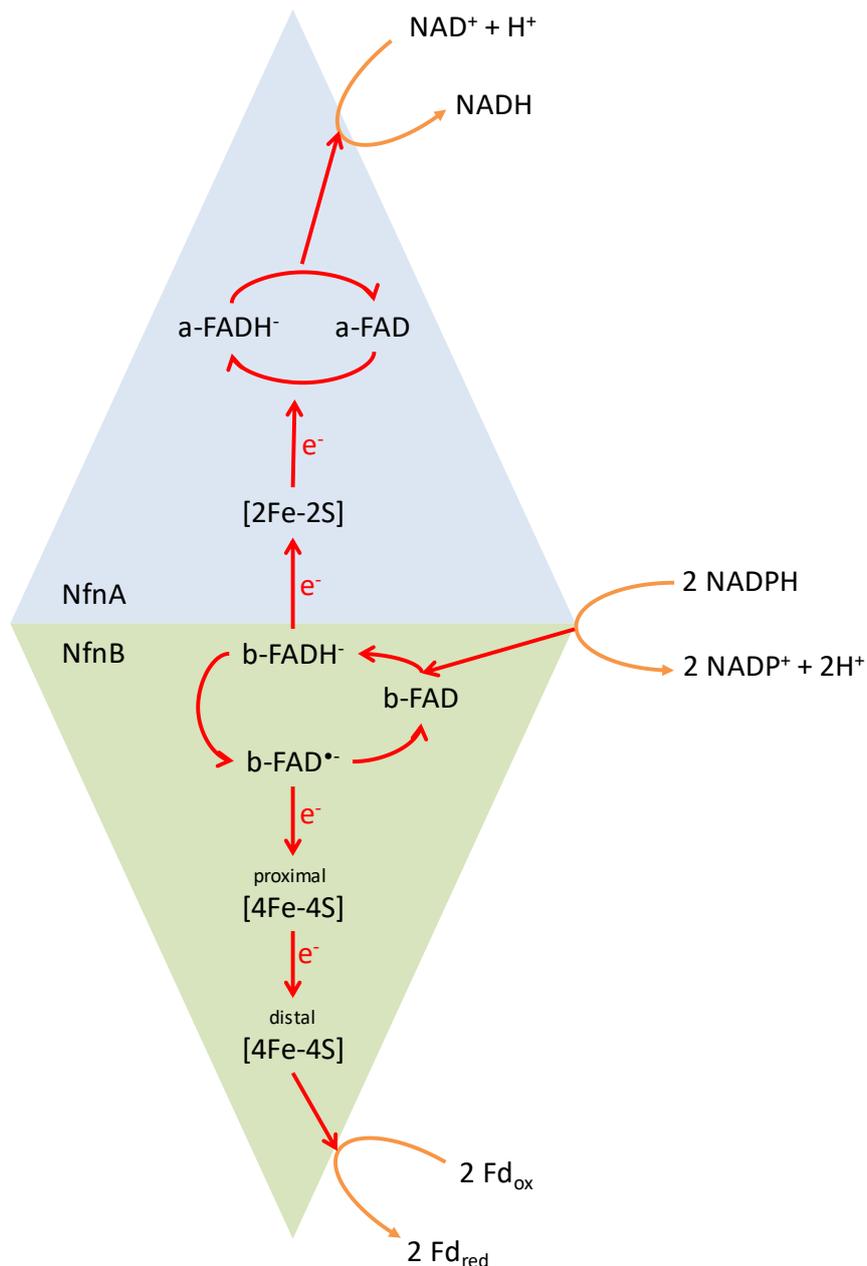


Figure 4: Schematic representation of the electron-bifurcation mechanism in the NfnAB complex. Figure adapted from the publication of Buckel and Thauer (2018)(Buckel and Thauer, 2018b).

The electron-bifurcation mechanism in NfnAB has been extensively described in the literature and requires 2 cycles of electron transfer to reduce 2 Fd and 1 NADH, from 2 NADPH (Buckel and Thauer, 2018b; Liang *et al.*, 2019; Lubner *et al.*, 2017). However, the b-FAD and [2Fe-2S] cluster of NfnA are not in range for a physiological electron transfer (15 Å between each) (Page *et al.*, 1999). Conformational changes were observed in the crystal structure of Nfn from *P. furiosus* after the binding of NADPH, which reduces the distance between the b-FAD and [2Fe-2S] cluster of NfnA to approximately 13 Å, allowing the electron transfer (Berry *et al.*, 2018).

b. Classification

The functionality of Nfn complexes was demonstrated in various organisms, from *C. kluyveri*, *T. maritima*, *P. furiosus*, to *M. thermoacetica*. However, genes encoding for putative Nfn complexes are widespread, they are found in anaerobic organisms, but also in some facultative anaerobic and aerobic organisms. From 4,588 complete genomes of bacteria, archaea and eukaryotes, 397 encode homologs of Nfn. They are distributed in members of Firmicutes, Fusobacteria, Bacteroidetes, Thermotogae, Proteobacteria, Actinobacteria, Spirochaetes and Euryarchaeota (Liang *et al.*, 2019). Despite a large distribution among the Firmicutes, some exceptions are present: there is no Nfn homologs in *C. acetobutylicum*, *C. pasteurianum* and *A. woodii*.

During evolution, the structure of NfnAB has remained highly conserved, and amino acids close to catalytic domains have been conserved among organisms using Nfn. However, during evolution, fusion, fission, and gene rearrangement of NfnAB were observed, leading to distinct structural patterns (Liang *et al.*, 2019). These gene rearrangements may have contributed to the evolution of Nfn. Some species have multiple copies of Nfn genes with different patterns between each set. For example, *P. furiosus* has two different sets of Nfn, respectively called NfnI and NfnII (Nguyen *et al.*, 2017). Each set shows differences in their architecture but also in their function. NfnI has a standard ferredoxin-dependent transhydrogenase activity (Ma and Adams, 2001) whereas NfnII has a Ferredoxin NADP⁺ oxidoreductase activity independent from NADH (Nguyen *et al.*, 2017). However, NfnII from *P. furiosus* remains not fully characterized to elucidate its function.

c. *In vivo* functionality of Nfn in the metabolism of anaerobic bacteria

C. kluyveri is able to grow on acetate and ethanol as carbon sources to produce butyrate, caproate and dihydrogen. This conversion requires the NADP⁺ reduction with NADH being regularly catalyzed by a membrane transhydrogenase. However, no gene encoding such enzyme was identified in *C. kluyveri*. Therefore, the redox balance of this process remained an enigma until the discovery of the Nfn

complex. As already explained, Nfn catalyzes *in-vivo* the electron-confermentation performing the reduction of NADP^+ using NADH and reduced Fd as electron donors (Norman *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2010). The NfnAB genes from *C. kluyveri* are expressed in the same cluster as Bcd/EtfAB, suggesting a strong association of Nfn with the butyrate production pathway. The Nfn activity is associated with the electron-bifurcation complex Bcd/EtfAB involved in butyrate production using the oxidized Fd and NADH for butyrate production. The corresponding metabolic pathways are represented in Figure 5. The reversibility of NfnAB was also observed *in vivo* during the growth of *C. kluyveri* using crotonate as carbon source: in this case, Nfn transfers electrons from NADPH to both ferredoxin and NAD^+ (Buckel and Thauer, 2018a).

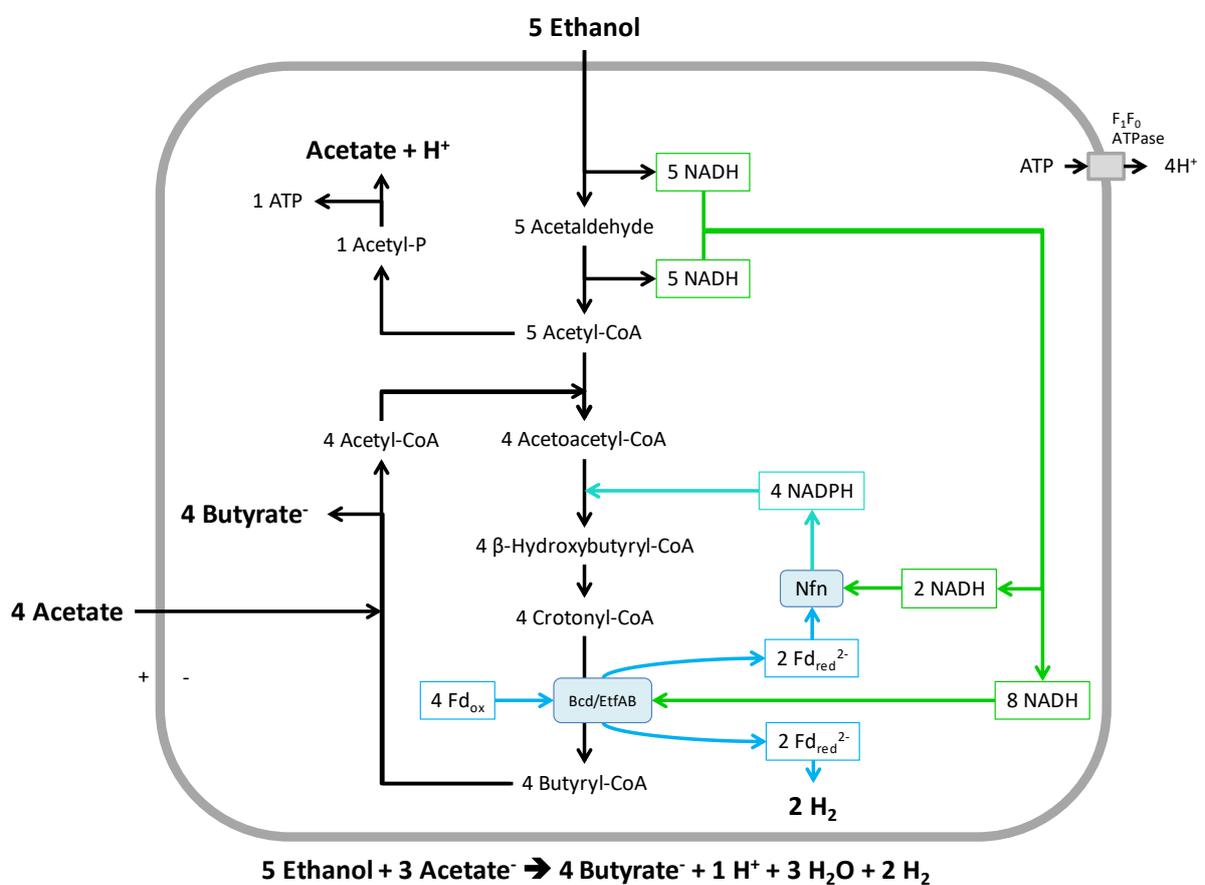


Figure 5: Representation of the ethanol-acetate fermentation of *C. kluyveri* at low ethanol and acetate concentrations. This figure is adapted from (Buckel and Thauer, 2013). For clarity purposes, this representation only shows the NADP^+ β -hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase to demonstrate the necessity of the ferredoxin dependent transhydrogenase activity of Nfn. At low concentrations of ethanol and acetate the Rnf complex of *C. kluyveri* is inactive and the F_1F_0 ATPase performs ATP hydrolysis.

Moorella thermoacetica is an anaerobic bacterium able to produce 3 moles of acetic acids from 1 mole of glucose (Huang *et al.*, 2012). The glycolysis produces 2 moles of pyruvate from 1 mole of glucose, and the pyruvate is further converted into 2 moles of acetic acid. Through this pathway, 2 moles of CO₂, 2 moles of reduced ferredoxin, and 2 moles of NADH are also generated. Then, the 2 moles of CO₂ produced are fixed via the Wood-Ljungdahl pathway (WLP) to produce 1 additional mole of acetic acid. However, there are two NADP oxidoreductases involved in the WLP, and no direct production of NADPH during the production of the acetic acid from the glycolysis and the conversion of the pyruvate to acetic acid. Therefore, the transhydrogenase activity of the Nfn complex was demonstrated to be involved in catalyzing the reduction of NADP⁺ using NADH and reduced Fd as electron donors. The 2 moles of NADPH generated are used for the CO₂ fixation, leading to the production of 1 mole of acetic acid. The metabolic pathway from *M. thermoacetica* are represented in Figure 6.

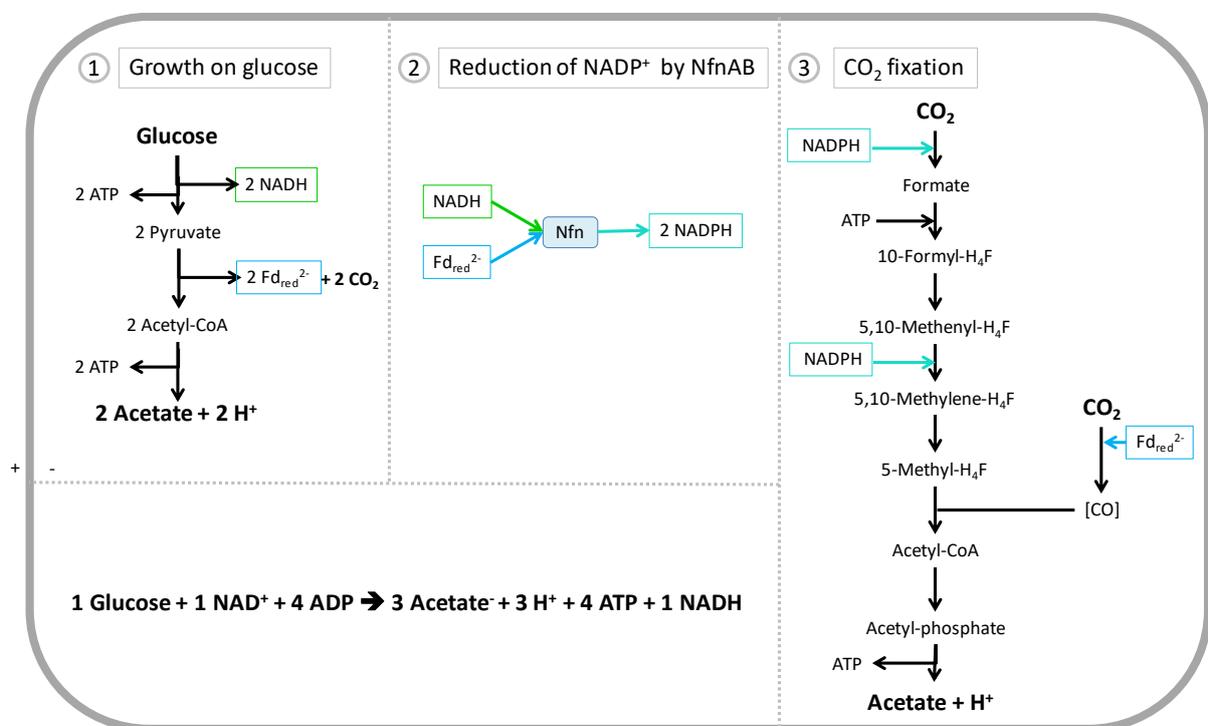


Figure 6: Metabolism of *M. thermoacetica*, producing of 3 moles of acetic acids from 1 mole of glucose using the transhydrogenase activity of the NfnAB complex.

d. Metabolic engineering strategies using Nfn complex

In *T. saccharolyticum*, the production of ethanol is ferredoxin dependent and occurs by two distinct pathways, depending on the nature of alcohol dehydrogenases (Adh) catalyzing the last step of ethanol pathway, which can be NADH or NADPH dependent as there are two kinds of Adh in *T. saccharolyticum* (Lo *et al.*, 2015; J. Zhou *et al.*, 2015). To demonstrate the implication of NfnAB in ethanol production,

NfnAB was inactivated in mutant strains of *T. saccharolyticum*, lacking either the NADH or the NADPH-dependent Adh. The engineered strain with the active NADH-dependent Adh, and NADPH dependent Adh inactivated, showed no significant modification in ethanol yield when NfnAB is inactivated, with 80% theoretical ethanol yield, meaning that NfnAB is not involved in the production of ethanol by the NADH dependent pathway. The strain harboring the active NADPH-dependent Adh, and an inactivation of the NADH-dependent Adh, showed a decrease in ethanol yield of about 30% of the theoretical value when NfnAB is inactivated. These results demonstrated the key role of NfnAB *in vivo* for NADPH generation and ethanol production in *T. saccharolyticum*.

C. thermocellum is able to use the cellulose fraction of biomass to produce a mixture of ethanol, acetic acid, lactic acid, CO₂ and H₂ by fermentation. *C. thermocellum* was engineered to increase ethanol production up to 25 g/L. However, organisms such as *T. saccharolyticum* are able to produce ethanol at higher titers (70 g/L). Therefore, the authors assumed that one of the enzymes of *C. thermocellum* involved in the ethanol production is not able to achieve a high titer of ethanol (Cui *et al.*, 2019). The authors replaced, one at a time, AdhE, NfnAB, the Pfor, and the ferredoxin of *T. saccharolyticum* by their homologue from *C. thermocellum* to determine the limiting enzyme in ethanol production for *C. thermocellum*. In *C. thermocellum*, NfnAB plays a role in the regeneration of the redox partners involved in ethanol production. The NfnAB from *T. saccharolyticum* (*Ts_nfnAB*) was inactivated and replaced by its homologue from *C. thermocellum* (*Ct_nfnAB*), expressed from a plasmid (Cui *et al.*, 2019). The *Ct_nfnAB* was successfully able to complement the function of *Ts_nfnAB*, showing that the NfnAB from *C. thermocellum* has the same *in-vivo* function as the NfnAB complex from *T. saccharolyticum*. The authors concluded that NfnAB from *C. thermocellum* is not limiting for ethanol production. The replacement of the Pfor of *T. saccharolyticum* by its homologue from *C. thermocellum* has shown a strong impact in ethanol production. Finally, the authors concluded that the reduced ethanol production in *C. thermocellum* was due to the inhibition of the Pfor by the accumulation of ethanol and NADH.

Therefore, implementing the NfnAB complex for the metabolic engineering of anaerobic microorganisms could lead to the improvement of the performances of ferredoxin-dependent pathways when NADPH is limiting. Therefore, the NfnAB activity is energy-independent, which is also an advantage for the metabolic engineering of anaerobic microorganisms where energy is limited. The flexibility of the NfnAB complex is also an asset with the reversibility of the complex, as it can be used to generate reduced ferredoxin and NADH from NADPH (Buckel and Thauer, 2018a; Huang *et al.*, 2012).

III. Membrane-bound, ion-translocating ferredoxin:NAD⁺ oxidoreductase (Rnf)

The Rnf complex is a ferredoxin:NAD⁺ oxidoreductase that couples an electron transport chain with an ionic transporter (Biegel *et al.*, 2011). There are two types of ion transporters for the Rnf complex: sodium transporters and proton transporters (Boiangiu *et al.*, 2006; Hess *et al.*, 2016; Imkamp *et al.*, 2007; Tremblay *et al.*, 2012). Both of these transports create a gradient of ions, generating a membrane potential that is then used by ATP synthase (Suzuki *et al.*, 2002) to produce ATP. This translocation of ions is generally coupled with the exergonic reaction of the oxidation of reduced ferredoxin, with NAD⁺ as electron acceptor (Biegel and Muller, 2010; Hess *et al.*, 2013) (Figure 7).

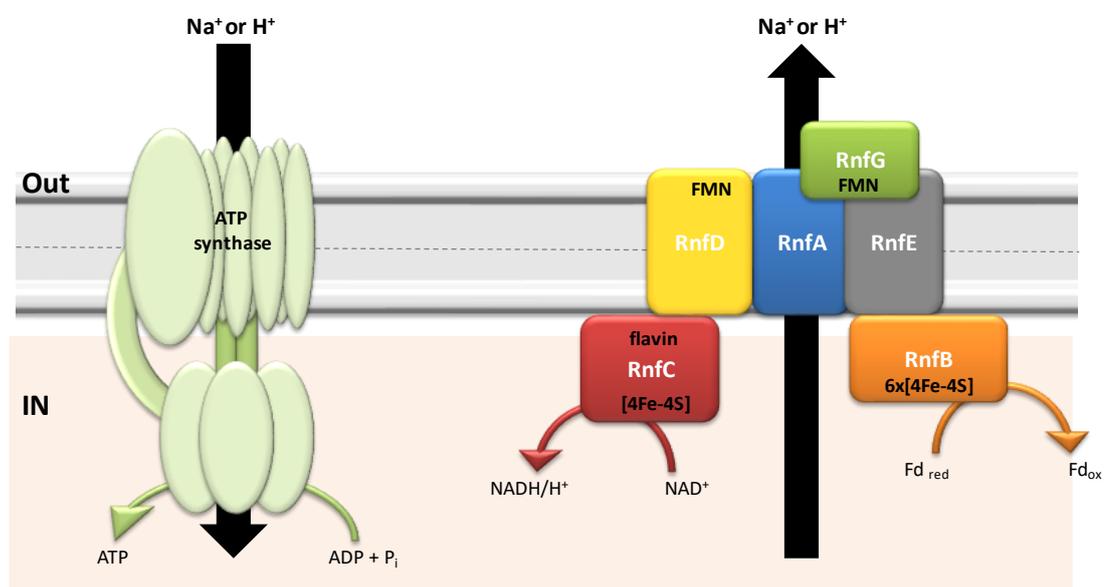


Figure 7: Representation of the Rnf complex coupled to ATP synthase. Adapted from (Hreha *et al.*, 2015).

Despite several attempts to purify the Rnf complex from acetogens or other bacteria, to prove its function, there is still no success in such characterization to this day, due to a problem of stability when the complex is solubilized with detergent (Westphal *et al.*, 2018).

In 2009, the Rnf activity was first discovered in *Acetobacterium woodii*, which is an acetogenic bacterium having the ability to autotrophically grow by converting hydrogen, in addition with carbon dioxide, to acetate, using the Wood-Ljungdahl pathway (WLP). Before the discovery of the Rnf complex, the net ATP production occurring during autotrophic growth was an enigma. The Rnf complex in *A. woodii* is the only energy conservation mechanism allowing the autotrophic growth at the thermodynamic limits of life (Müller, 2015; Schuchmann and Müller, 2014). Then, homologous genes were found in several anaerobic microorganisms, thanks to bioinformatics analyses, suggesting a wide spread mechanism for energy conservation (Schuchmann and Müller, 2014). The Rnf complex represents a rational explanation to understand the energetic balance of acetogens during autotrophic

growth on inorganic gases such as CO, H₂ and CO₂. Inorganic gases are potential sources of carbon and energy for acetogenic bacteria through the Wood-Ljungdahl pathway (WLP) for the production of acetate (Ragsdale and Pierce, 2008). The energetic balance of this pathway (Bertsch and Müller, 2015a) remained a mystery due to the absence of a net synthesis of ATP by substrate phosphorylation to sustain autotrophic growth (Schuchmann and Müller, 2014), until the recent discovery and characterization of the Rnf complex (Imkamp and Müller, 2002; Müller *et al.*, 2008; Norman *et al.*, 2018; Poehlein *et al.*, 2012).

Among acetogenic bacteria, two organisms are interesting models to analyze the energy conservation mechanisms of the Rnf complex: *Acetobacterium woodii* (Imkamp *et al.*, 2007) and *Clostridium ljungdahlii* (Tremblay *et al.*, 2012). These two organisms have the ability to use syngas as a carbon source (Bertsch and Müller, 2015b), but there are some variations in their mechanisms of energy conservation during autotrophic growth (Bengelsdorf *et al.*, 2018). The first model, *A. woodii*, is a Gram-positive chemolithoautotrophic bacterial species that produces acetate as its main product and uses H₂+CO₂ as well as fructose, glucose, lactate and other compounds as carbon sources. The second model, *C. ljungdahlii*, is a Gram-positive chemolithotrophic organism that produces acetate, ethanol and 2,3-butanediol through the WLP.

Both *A. woodii* and *C. ljungdahlii* have homologous genes encoding for the putative Rnf complex. The difference between *A. woodii* and *C. ljungdahlii* is that the first uses a Na⁺ gradient for chemiosmotic ATP synthesis, whereas the second uses an H⁺ gradient (Müller *et al.*, 2018). The WLP from *A. woodii* produces 0.3 moles of ATP per mole of acetate by generating an electrochemical Na⁺ potential through the Rnf complex to sustain autotrophic growth. For example, *Clostridium autoethanogenum* (Norman *et al.*, 2018), a close relative of *C. ljungdahlii* (Bengelsdorf *et al.*, 2016), produces 0.14 to 1.5 moles of ATP per mole of ethanol depending on the H₂ partial pressure in the syngas mixture (Mock *et al.*, 2015). These new discoveries in acetogenic bacteria for the coupling of WLP with the generation of transmembrane ion gradients have led to the modification of their bioenergetic classification. They were previously sorted into two classes: cytochrome containing and Na⁺ independent. A new bioenergetic classification was proposed by K. Schuchmann and V. Müller in 2014 (Schuchmann and Müller, 2014), 'Rnf-acetogens' and 'Ech-acetogens', with two subclasses, depending on whether the complex uses Na⁺ or H⁺ to generate the transmembrane ion gradient leading to ATP synthesis. Few organisms, from *Rumen butyrivibrios* (Hackmann and Firkins, 2015) to *C. thermocellum* (Rydzak *et al.*, 2012), are reported in the literature with the combination of genes for both Ech and Rnf complex, which both may ensure energy conservation.

The ATP synthesis occurs by two mechanisms (Müller, 2015): substrate-level phosphorylation (SLP) and chemiosmotic mechanism. In the SLP mechanism, the free energy from exergonic chemical reactions is directly coupled with the phosphorylation of ADP, leading to ATP synthesis. This free energy needs to be above -31.8 kJ/mol in standard conditions, and -60 kJ/mol in cellular condition, to phosphorylate ADP. However, very few reactions are capable of liberating such a high level of energy, which limits the number of reactions leading to ATP synthesis (Müller and Hess, 2017).

The chemiosmotic mechanism involves two steps: first, an electrochemical ion gradient is generated across the membrane, and then, ATP synthesis occurs through ATP synthases (Müller, 2003). According to thermodynamic analyses, an energy of approximately -20 kJ/mol is required to translocate an ion through an ATP synthase (Mayer and Müller, 2014; Müller and Hess, 2017), but lower values are debated in the literature (Müller, 2015; Schuchmann and Müller, 2014). The ions exported by the Rnf complex are used to produce ATP by translocating Na^+ or H^+ through ATP synthase, depending on the microorganism. The free energy allowing this translocation comes from the electron transfer from reduced ferredoxin ($E_0' = -450$ mV) to NAD^+ ($E_0' = -320$ mV) (Westphal *et al.*, 2018). However, the free energy obtained is variable, depending on the bacteria, due to the variability of the ferredoxin potential (-300 mV to -700 mV). For example, the electron transfer occurring in the Rnf complex of *A. woodii* generates approximately -25 kJ/mol of free energy (Schuchmann and Müller, 2014), and *A. woodii* needs 11.5 to 9.1 kJ/mol with a membrane potential of approximately -180 mV to translocate one Na^+ across the membrane. According to these values (Schmidt *et al.*, 2009), the oxidation of one mole of reduced ferredoxin allowed 2 Na^+ to cross the membrane (Figure 8).

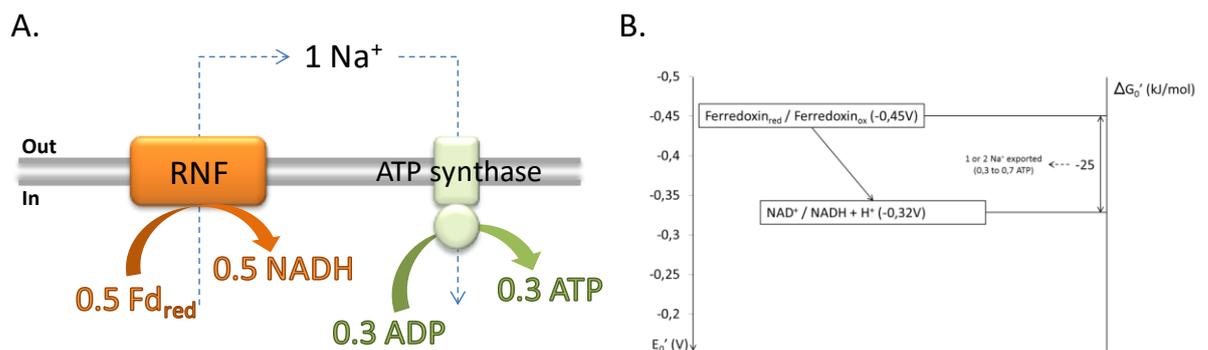


Figure 8: Representation of the oxidation of reduced ferredoxin (Fd_{red}) to NAD^+ by the Rnf complex of *A. woodii*. (A) Schema of the reaction with two sodium translocated per ferredoxin oxidized. (B) Energetic diagram.

The metabolism of organisms using the WLP pathway during lithotrophic growth, such as *A. woodii*, is entirely designed to operate at high ratios of $\text{Fd}_{\text{red}}/\text{Fd}_{\text{ox}}$ and NAD^+/NADH . This ability allows autotrophic growth by generating ATP with energy conservation mechanisms such as the ones linked to the Rnf complex or the Ech hydrogenase mentioned above.

The role of the Rnf complex among ferredoxin:NAD⁺ oxidoreductases was investigated through enzymatic assays to monitor the activity of these reactions in different microorganisms.

Ferredoxin:NAD⁺ oxidoreductase activity assays

Recently, ferredoxin:NAD⁺ oxidoreductase activity was evaluated *in vitro* on the membranes of several microorganisms (Hess *et al.*, 2016) and on inverted vesicles for additional information on the ion specificity (Biegel and Muller, 2010). Ferredoxin was purified from *Clostridium pasteurianum* to perform this enzymatic assay. *In vitro*, Rnf activity was recently demonstrated in *Clostridium tetanomorphum*, *C. ljungdahlii*, *Bacteroides fragilis*, and *Vibrio cholera* (Hess *et al.*, 2016). The first Rnf oxidoreductase activity was demonstrated in *A. woodii*, which was used as a control for the subsequent measurements. *C. tetanomorphum*, *B. fragilis* and *A. woodii* showed Na⁺-dependent activity, whereas the activity in *C. ljungdahlii* and *V. cholerae* was independent of Na⁺ addition (Hess *et al.*, 2016). The strongest activity was found in *C. tetanomorphum*, a strictly anaerobic organism using glutamate as its carbon source (Boiangiu *et al.*, 2006), with 900 ± 29 mU/mg of activity. This activity is 18-fold higher than in *A. woodii*, which was the best characterized organism for Rnf complex activity so far (Hess *et al.*, 2016). A significant activity reduction of 431 ± 16 mU/mg is observed for *C. tetanomorphum* in the absence of Na⁺, showing the Na⁺ dependency of the activity. *B. fragilis* Δrnf mutant was also constructed for this study, and a reduction of 89% in the ferredoxin:NAD⁺ oxidoreductase activity was measured compared to the native strain on crude extracts (Hess *et al.*, 2016). These results show that the Rnf complex is the major source of the ferredoxin:NAD⁺ oxidoreductase activity in *B. fragilis*.

In vitro enzyme assays on the Rnf complex from *Acidaminococcus fermentans*, which is a Na⁺ translocating complex, have shown the possibility of replacing ferredoxin with flavodoxin as the electron donor to NAD⁺ (Chowdhury *et al.*, 2016).

a. Structure/function

The Rnf complex (Figure 7 mentioned before) has, in its simplest form, 6 subunits, RnfA, RnfB, RnfC, RnfD, RnfE and RnfG. The properties of the Rnf subunits were mainly deduced from comparison with known motifs in other proteins, and by comparison with the amino acid sequence of the biochemically proven Na⁺-pumping respiratory enzyme Na⁺-NQR (Hreha *et al.*, 2015). It was reported in the literature that the *rnf* genes were difficult to clone for overexpression, making research in heterologous organisms or the mutant complementation difficult (Tremblay *et al.*, 2012). Some genes were successfully cloned independently, and further analyses were performed. The available knowledge on each subunit is summarized below, using *A. woodii* (*rnfCDGEAB*) as a model organism with additional information from other organisms when data are available.

In *A. woodii*, the subunit RnfC is a soluble protein of 48.7 kDa, but is also membrane-bounded, suggesting a tight association with an Rnf subunit integrated to the membrane (Biegel *et al.*, 2009). Bioinformatics analyses of the potential motifs showed a cysteine pattern (C-XX-C-XX-C-XXX-C-P) specific to a [4Fe4S] cluster and a binding site for NADH. The [4Fe4S] centre was experimentally demonstrated in RnfC from *R. capsulatus* using EPR spectroscopy correlated with spectrophotometric absorption and iron content (Jouanneau *et al.*, 1998). The subunit RnfC seems to be the exit point of electrons transferred through the Rnf complex from ferredoxin to NAD⁺ even if the path of the electron transfer remains unknown. The subunit RnfD in *A. woodii* is a 35 kDa transmembrane protein. Bioinformatics analyses of the potential motifs have shown 6 to 9 transmembrane helices and an FMN binding site. The FMN was found to be covalently attached to RnfD in *V. cholera* at the threonine 187 (Backiel *et al.*, 2008; Nakayama *et al.*, 2000). *In vivo*, in *V. cholera*, this FMN is located in the periplasmic side. Its functions remain unknown. This FMN binding site in RnfD is largely conserved in all organisms expressing an Rnf complex. The subunit RnfG is a 22.8 kDa protein with a soluble part, a membrane anchor (Biegel *et al.*, 2009) and a hydrophobic domain of 30 amino acids on the N-terminus side. An FMN was experimentally demonstrated to be covalently bound to RnfG (Nakayama *et al.*, 2000) in the subunit in *V. cholerae* at the threonine 175 (Backiel *et al.*, 2008). An FMN was also demonstrated to be covalently bound to RnfG in the archaeon *Methanosarcina acetivorans* at the threonine 166 (Suharti *et al.*, 2014). This FMN is also located in the periplasm of *V. cholerae*. In the attempt to heterologously express the RnfG from *T. maritima* in *E. coli* for its *in-vitro* characterisation, no FMN was found to be covalently bound; an enzyme from *T. maritima* that ensures the proper binding of FMN on RnfG may be missing (PDB ID: 3DCZ).

Some organisms have an additional gene in the operon coding for the Rnf complex. This protein, RnfF, contain an ApbE-like domain. ApbE is a flavin transferase enzyme, which catalyses the covalent attachment of FMN to a threonine residue in flavoproteins (Bertsova *et al.*, 2013). Bertsova *et al.* (2013) have analysed the genome of bacteria containing homologous genes for the Rnf complex with putative FMN covalently bound, and they have determined that an *apbE* gene is always present in the chromosome of these organisms. This result suggests that ApbE might be necessary to ensure the proper fixation of the FMN prosthetic group to RnfD and RnfG.

The subunit RnfE is a 21.6 kDa membrane protein. Bioinformatics analyses of the potential motifs have predicted 6 transmembrane helices anchored in the membrane and detected no co-factor binding site or known pattern for an ionic transporter. A fusion between RnfE and PhoA was constructed to understand the orientation of RnfE in the membrane (Sääf *et al.*, 1999). This fusion confirmed all 6 transmembrane helices, and showed that both the C-terminus and the N-terminus are located in the cytoplasm.

The subunit RnfA has a similar structure to RnfE and is a 21.4 kDa membrane protein with 6 transmembrane helices. In contrast to RnfE, the fusion of RnfA and PhoA has shown that both the C-terminus and N-terminus are located in the periplasm (Sääf *et al.*, 1999). Hypotheses have been proposed about the symmetrical orientation of RnfE and RnfA (Rapp *et al.*, 2006; Sääf *et al.*, 1999): this orientation could play an important role in the transfer of electrons or in the creation of an ionic transporter.

The subunit RnfB is a 36.6 kDa protein (Jouanneau *et al.*, 1998) with a soluble part and a membrane anchor with a hydrophobic domain of 30 amino acids at the N-terminus. A polyferredoxin was predicted according to bioinformatics analyses, 6 possible [4Fe4S] clusters were identified: 4 of them have the classic cysteine pattern (C-XX-C-XX-C-XXX-C-P), and 2 of them are not typical, with proline replaced by arginine. Then, the presence of these [4Fe4S] clusters in RnfB were demonstrated in *M. acetivorans* (Suharti *et al.*, 2014). Hess *et al.* hypothesized that RnfB is the ferredoxin-binding site, and suggested that RnfB is the entry point of electrons into the Rnf complex (Hess *et al.*, 2013).

During the past decade, the understanding of the involvement of the Rnf complex in energy conservation has drastically increased for acetogenic organisms such as *A. woodii*.

b. Roles of the Rnf complex in anaerobe organisms

Role of the Rnf complex in *A. woodii* metabolism

In the literature, the most detailed and characterized Rnf complex is *A. woodii*'s so far (Müller *et al.*, 2018; Westphal *et al.*, 2018). *A. woodii* is an acetogenic bacterium having the ability to autotrophically grow by converting hydrogen, in addition of carbon dioxide, to acetate, using the WLP. Acetogen organisms can also use a wide range of organic substrates, and in most of the cases the oxidation of these substrates is coupled with the reduction of carbon dioxide to produce acetate via WLP. An energy conservation mechanism is involved in the WLP, making it the only known pathway for carbon dioxide fixation with a net ATP synthesis. The metabolism of *A. woodii*, for the growth on H_2+CO_2 , leading to the production of acetate, is represented in Figure 9.

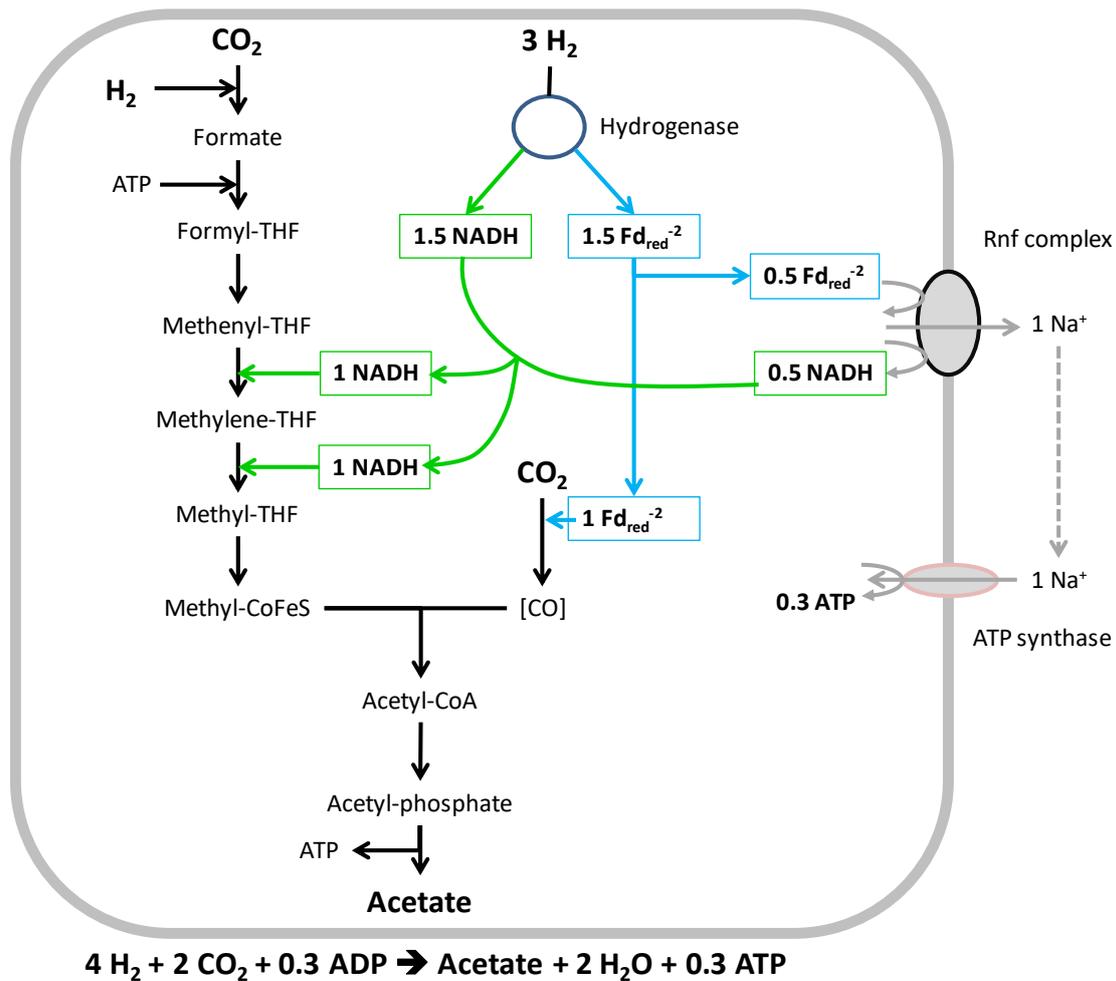


Figure 9: Production of acetate from H₂+CO₂ in *A. woodii*. Blue arrows represent ferredoxin steps and green arrows NADH steps. Adapted from (Bertsch and Müller, 2015a).

A. woodii was investigated to connect the presence of the Rnf complex to the energy conservation mechanism of the WLP (Müller *et al.*, 2018). First, experiments showed that membranes of *A. woodii* have the ability to transfer electrons from reduced ferredoxin to NAD⁺ with a transport of Na⁺ across the cytoplasmic membrane (Hess *et al.*, 2016). This activity was linked to *rnf* genes present in the chromosome of *A. woodii* (Imkamp *et al.*, 2007) and the presence of the Rnf complex integrated in the cytoplasmic membrane was confirmed by Western Blot (Biegel *et al.*, 2009). A study performed by Westphal *et al.* recently revealed the physiologic role of Rnf for *A. woodii* by deleting it from the chromosome (Westphal *et al.*, 2018). The *rnf* mutant of *A. woodii* no longer grows on H₂ in addition of CO₂, and they provided evidences that the Rnf complex is essential for autotrophic growth by being the only active respiratory enzyme in this condition of culture. The authors also demonstrated the *in vivo* reversibility of the complex during heterotrophic growth on low energy substrates such as ethanol and lactate (Westphal *et al.*, 2018). During growth on low energy substrates and in absence of the Rnf complex, the mutant Δrnf showed a reduced production of acetate. The analysis of pathways used for

growth on this low energy substrates showed a lack of reduced ferredoxin in the Δrnf mutant. The electron-bifurcation hydrogenase of *A. woodii* was used to confirm this hypothesis: it generated reduced ferredoxin from molecular hydrogen, and managed to restore the production of acetate. From these results, it was interpreted that the Rnf complex uses NADH as electron donor to generate the reduced ferredoxin needed for the WLP and biomass formation. This transfer of electrons is accompanied by an influx of Na^+ and by the consumption of ATP. Then, the function of energy conservation mechanism of the Rnf complex (Müller *et al.*, 2018) was demonstrated *in vivo* and *in vitro* in *A. woodii*. The transfer of electrons from reduced ferredoxin to NAD^+ and the efflux of Na^+ leading to ATP formation were also demonstrated. Moreover, evidence has shown that the Rnf complex activity in *A. woodii in vitro* is reversible, and could use a transmembrane ion gradient as driving force for ferredoxin reduction (Hess *et al.*, 2013).

Role of the Rnf complex in *Clostridium ljungdahlii* metabolism

C. ljungdahlii is a strictly anaerobic homoacetogenic bacterium that potentially uses the energy conservation mechanism of the Rnf complex during autotrophic growth on inorganic gas (Bengelsdorf *et al.*, 2018). Its putative Rnf complex was first identified by amino acid sequence identity with the Rnf complex of *A. woodii* (operon organization: *rnfCDGEAB*), and its role *in vivo* was experimentally demonstrated through the construction of mutants and the analyses of the phenotype (Köpke *et al.*, 2010; Müller *et al.*, 2018; Tremblay *et al.*, 2012).

The direct evidence for Rnf activity in *C. ljungdahlii* was performed with *in vitro* inverted membrane vesicles (Hess *et al.*, 2016), which resulted in an activity of 256 ± 7 mU/mg for the transfer of electrons from reduced ferredoxin to NAD^+ . In addition, strain engineering was performed to understand the involvement of the Rnf complex in *C. ljungdahlii* metabolism. The impact of the inactivation of the *rnf* operon was evaluated by inactivating the transcription of *rnfA* and *rnfB* using a suicide plasmid integrated into the chromosome by single crossover: in autotrophic growth on syngas, the proton-motive force is entirely depending on the Rnf functionality: the inactivation of the Rnf complex results in a complete absence of proton gradient or ATP synthesis (Tremblay *et al.*, 2012).

The nature of the ion translocated by Rnf in this organism was interpreted from experimental results and bioinformatics analysis: the transmembrane potential is converted to ATP by H^+ -ATP synthase, thanks to an efflux of protons instead of sodium ions. Moreover, the protonophore TCS stimulates the Rnf activity, while the sodium ionophore ETH2120 has no effect on Rnf complex activity (Hess *et al.*, 2016), which supports the interpretation of an Rnf complex using H^+ as coupling ion.

The ion-translocating $\text{Fd}_{\text{red}}:\text{NAD}^+$ oxidoreductase activity encoded by the *rnf* genes was also demonstrated through mutational analyses in the archaea *Methanosarcina acetivorans* and *Bacteroides fragilis* (Müller *et al.*, 2018). In *rnf* mutant of *M. acetivorans*, the growth was no longer possible on acetate, compared to the wild-type. The ferredoxin:heterodisulfide oxidoreductase activity and the Na^+ transport was evaluated by generating inside-out membrane vesicles from both wild-type and *rnf* mutant. The oxidoreductase activity and Na^+ transport were both lost in the *rnf* mutant.

c. Metabolic engineering using overexpression of Rnf complex

The Rnf complex was homologously overexpressed in the thermophilic anaerobic organism *C. thermocellum* (Lo *et al.*, 2017; Thompson *et al.*, 2016), to increase ethanol production. This organism naturally produces ethanol and also lactate and acetate from cellulose. The functionality of its Rnf complex was already demonstrated but no evidence is available to demonstrate protons or sodium translocation (Thompson *et al.*, 2016). Even though the Rnf complex of this organism is not the best known, the metabolic flux analysis suggests that the oxidation of ferredoxin may be coupled with energy conservation mechanisms. The *rnf* genes were completely deleted from *C. thermocellum*, which resulted in lower ethanol production. In contrast, when the *rnf* genes were overexpressed, and the gene encoding hydrogenase was deleted, the production of ethanol reached a titer of 5.1 g/L, meaning the production increased by 30% when using Avicel as the carbon source (Lo *et al.*, 2017; Rydzak *et al.*, 2017). The result seems to be due to the increase in NADH availability for ethanol production, resulting in the increase of the Rnf complex activity. As the promotor used for this experiment was the native one, the production of ethanol may be increased by more than 30%, by replacing the native promotor with a constitutive promotor.

Theoretically, in *C. thermocellum* without an active Rnf, the yield of ethanol production using cellobiose as carbon source is limited to 2 moles per mole of cellobiose (50% of the maximal theoretical yield). With the Rnf complex, the ethanol yield may reach 4 mol/mol of cellobiose (100% of the maximal theoretical yield).

Recently, Schiffels *et al.* successfully expressed the Rnf complex from both *C. ljungdahlii* and *C. difficile* in *E. coli* (Schiffels and Selmer, 2019). The authors built a bacterial testing platform for Rnf complexes based on the production of butyrate by *E. coli*. The ferredoxin dependent butyrate pathway from *C. difficile* was introduced in *E. coli* along with heterologous ferredoxin as electron carriers. An [FeFe]-hydrogenase (Hyd) was also introduced to reoxidize the reduced ferredoxin generated during the production of butyrate and modulate the redox state of the Fd. The Rnf complexes were overexpressed in this platform in presence or in absence of the hydrogenase, to study the physiological impact of the Rnf complex on the redox state of the Fd. The Rnf complex from *C. ljungdahlii* was selected due to the

potential translocation of a proton of the complex (Tremblay *et al.*, 2012) which corresponds to the ion specificity of the respiratory chain of *E. coli*. The sequence of the Rnf complex of *C. difficile* was only deduced by amino acid sequence identity, and was not characterized before. To overcome the toxicity encountered during the cloning of the Rnf complex in *E. coli* (Tremblay *et al.*, 2012), low expression promoters, which respond to internal redox levels, were screened and the fumarate reductase (*frd*) promoter was selected for the expression of the Rnf complex. They also rearranged the genes order, as following – *rnfCBDAEG* – instead of the chromosome derived order *rnfCDGEAB*, to decrease the toxicity. The Rnf complexes from *C. ljungdahlii* and *C. difficile* were first expressed in *E. coli* Rosetta (DE3) cells to determine the enzyme activity *in-vitro*. Activities for both complexes were measured in the membranes of strains expressing Rnf complexes. Higher specific activities were evaluated for the rearranged version of the operon in the membrane fraction, with 1.73 ± 0.21 U/mg for the Rnf complex from *C. difficile*, and 1.49 ± 0.11 U/mg for the Rnf complex from *C. ljungdahlii*. The Rnf complex from *C. ljungdahlii* was also able to use both NAD^+ and NADP^+ as electron acceptors, with a preference for NAD^+ . The Rnf complex from *C. difficile* was able to use NAD^+ only. These results confirmed the presence and the functionality of the Rnf complexes in the membrane of *E. coli*, and suggest that the modification of the genes order has a positive impact on the activities of the Rnf complexes. Then, both complexes were expressed in the platform strain, which produced butyrate, to determine their role *in-vivo*. The expression of an Rnf complex in the butyrate strain caused a decrease of the biomass and the butyrate produced. The co-expression of the hydrogenase and the Rnf complex restored the growth, but the butyrate production remained lower compared to the butyrate strain expressing the hydrogenase only. Based on these results, it was suggested that the Rnf complex generated an electron flow from NADH to oxidize reduced ferredoxin and required F-type ATP synthase to hydrolyse ATP *in-vivo* in *E. coli*.

Despite the lack of information about the mechanism of the complex, the Rnf complex is an interesting tool to be implemented for metabolic engineering, allowing regulation of the redox balance linked to an energy conservation mechanism. The heterologous expression of the Rnf complex in *E. coli* and the demonstration of its activity opens new perspectives for further characterization of this complex.

Conclusion

Ferredoxin nodes play a critical role in anaerobe metabolism, as the $\text{Fd}_{\text{red}}/\text{Fd}_{\text{ox}}$ and $\text{NAD(P)H}/\text{NAD(P)}^+$ redox ratios influence the final end product obtained. Ferredoxin NADP^+ or NAD^+ oxidoreductases are involved in the balance of the redox state. Overexpressions of heterologous FNORs in *C. acetobutylicum* and *C. thermocellum* showed promising results to respectively improve butanol and

ethanol productions in these organisms. The large range of FNORs available and their differences of specificity are an interesting tool for metabolic engineering, and should allow the modulation of the redox balance towards the desired pathway.

Since the discovery of the flavin-based electron-bifurcation (FBEB) mechanism, Nfn has been a model to elucidate it. However, the ferredoxin dependent transhydrogenase activity of the Nfn complex, which is energy independent, remains underexploited in metabolic engineering. Still, the heterologous expression of NfnAB from *C. thermocellum* in *T. saccharolyticum* demonstrated the potential of this complex to be heterologously transferable to anaerobic organisms.

Finally, the implementation of the Rnf complex in metabolic engineering strategies carrying a dual function of influencing the redox balance and the associated energy conservation mechanism is an attractive alternative. However, the mechanism of this complex is still poorly understood, which limits its use. The recent success of functional heterologous expression in *E. coli* represents a critical step forward in the characterization of this complex.

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

Chapitre II : Matériel & Méthodes

1. Souches et amorces PCR

1.1. Liste des souches utilisées

Nom	Génotype/Caractéristiques	Référence
TOP10	<i>F-mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)Φ80lacZ ΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara leu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG</i>	Invitrogen
BL21 (DE3)	<i>F- ompT hsdS_B (r_Bm_B-) gal dcm (DE3)</i>	Invitrogen
ST001	<i>MG1655, ΔldhA::FRT ΔpflAB::FRT Δack-pta::FRT ΔiscR::FRT ΔfrdABCD::FRT ΔaceE::FRT ΔmgsA::FRT melB::TT02 ptrc01/RBS01*2crt-hbd :: ptrc30RBS01*2atoB :: g.3,625,558-3,720,629del :: pCF3*udhA R455L; Spec⁺</i>	(Soucaille <i>et al.</i> , 2015) et cette étude
ST003	<i>MG1655, ΔldhA::FRT ΔpflAB::FRT Δack-pta::FRT ΔiscR::FRT ΔfrdABCD::FRT ΔaceE::FRT ΔmgsA::FRT melB::TT02 ptrc01/RBS01*2crt-hbd :: ptrc30RBS01*2atoB :: ybfD::cat-Ppdc-bglA, lacI* ::lacI-D247A :: g.3,625,558-3,720,629del :: pCF3*udhA R455L; Spec⁺ Cm⁺</i>	Projet Cellutanol
ST023	<i>MG1655, ΔldhA::FRT ΔpflAB::FRT Δack-pta::FRT ΔiscR::FRT ΔfrdABCD::FRT ΔaceE::FRT ΔmgsA::FRT melB::TT02 ptrc01/RBS01*2crt-hbd :: ptrc30RBS01*2atoB :: nadK Y277H :: YqhC G69S(Pro102_Phe103insLysPhe) ::g.3,625,558-3,720,629del :: pCF3*udhA R455L; Spec⁺ ; Clone isolé adapté pour la culture sans supplémentation en extrait de levure et sans nitrate après culture discontinue</i>	Cette étude
ST025	<i>MG1655, ΔldhA::FRT ΔpflAB::FRT Δack-pta::FRT ΔiscR::FRT ΔfrdABCD::FRT ΔaceE::FRT ΔmgsA::FRT melB::TT02 ptrc01/RBS01*2crt-hbd ptrc30RBS01*2atoB :: nadK Y277H YqhC G69S(Pro102_Phe103insLysPhe) :: g.3,625,558-3,720,629del :: pCF3*udhA R455L; Spec⁺ ; Population adaptée pour la culture sans supplémentation en extrait de levure et sans nitrate après culture continue</i>	Cette étude
ST034	<i>MG1655, ΔldhA::FRT ΔpflAB::FRT Δack-pta::FRT ΔiscR::FRT ΔfrdABCD::FRT ΔaceE::FRT ΔmgsA::FRT :: AdhE V360L :: pCF2(<i>pfor_{CE} fd_{CE}</i>); Spec⁺</i>	(Soucaille <i>et al.</i> , 2015) et cette étude

ST037	MG1655, $\Delta ldhA::$ FRT $\Delta pflAB::$ FRT $\Delta ack-pta::$ FRT $\Delta iscR::$ FRT $\Delta frdABCD::$ FRT $\Delta aceE::$ FRT $\Delta mgsA::$ FRT :: AdhE V360L :: pCF2(<i>pfor_{CE} fd_{CE}</i>) PL016 (<i>rnfCDGEAB_{CL}</i> codon harmonisé); Spec ⁺ Kana ⁺	Cette étude
ST040	MG1655, $\Delta ldhA::$ FRT $\Delta pflAB::$ FRT $\Delta ack-pta::$ FRT $\Delta iscR::$ FRT $\Delta frdABCD::$ FRT $\Delta aceE::$ FRT $\Delta mgsA::$ FRT :: AdhE V360L :: pCF2(<i>pfor_{CE} fd_{CE}</i>) PL019 (<i>rnfCDGEAB_{CL}</i>); Spec ⁺ Kana ⁺	Cette étude
ST045	MG1655, $\Delta ldhA::$ FRT $\Delta pflAB::$ FRT $\Delta ack-pta::$ FRT $\Delta iscR::$ FRT $\Delta frdABCD::$ FRT $\Delta aceE::$ FRT $\Delta mgsA::$ FRT :: AdhE V360L :: pCF2(<i>pfor_{CE} fd_{CE}</i>) PL024 (<i>fnor_{CA} udhA_{EC}</i>); Spec ⁺ Kana ⁺	Cette étude
ST059	MG1655, $\Delta ldhA::$ FRT $\Delta pflAB::$ FRT $\Delta ack-pta::$ FRT $\Delta iscR::$ FRT $\Delta frdABCD::$ FRT $\Delta aceE::$ FRT $\Delta mgsA::$ FRT melB::TT02 ptrc01/RBS01*2crt-hbd :: ptrc30RBS01*2atoB :: g.3,625,558-3,720,629del :: PL025; Amp ⁺	Cette étude
ST063	MG1655, $\Delta ldhA::$ FRT $\Delta pflAB::$ FRT $\Delta ack-pta::$ FRT $\Delta iscR::$ FRT $\Delta frdABCD::$ FRT $\Delta aceE::$ FRT $\Delta mgsA::$ FRT melB::TT02 ptrc01/RBS01*2crt-hbd :: ptrc30RBS01*2atoB :: g.3,625,558-3,720,629del :: PL024 (<i>fnor_{CA} udhA_{EC}</i>), PL025; Amp ⁺ Kana ⁺	Cette étude
ST064	MG1655, $\Delta ldhA::$ FRT $\Delta pflAB::$ FRT $\Delta ack-pta::$ FRT $\Delta iscR::$ FRT $\Delta frdABCD::$ FRT $\Delta aceE::$ FRT $\Delta mgsA::$ FRT melB::TT02 ptrc01/RBS01*2crt-hbd :: ptrc30RBS01*2atoB :: g.3,625,558-3,720,629del :: PL016 (<i>rnfCDGEAB_{CL}</i> codon harmonisé), PL025; Amp ⁺ Kana ⁺	Cette étude
ST071-6	MG1655, $\Delta ldhA::$ FRT $\Delta pflAB::$ FRT $\Delta ack-pta::$ FRT $\Delta iscR::$ FRT $\Delta frdABCD::$ FRT $\Delta aceE::$ FRT $\Delta mgsA::$ FRT :: AdhE V360L :: Zwf*(Gly295_Glu491del) :: pCF2(<i>pfor_{CE} fd_{CE}</i>) PL031 (<i>fnor_{CA} udhA_{EC}R455Q</i>); Spec ⁺ Kana ⁺	Cette étude
ST077	MG1655, $\Delta ldhA::$ FRT $\Delta pflAB::$ FRT $\Delta ack-pta::$ FRT $\Delta iscR::$ FRT $\Delta frdABCD::$ FRT $\Delta aceE::$ FRT $\Delta mgsA::$ FRT melB::TT02 ptrc01/RBS01*2crt-hbd :: ptrc30RBS01*2atoB :: g.3,625,558-3,720,629del :: PL019 (<i>rnfCDGEAB_{CL}</i>), PL025; Amp ⁺ Kana ⁺	Cette étude
ST092	MG1655 pKD46; Amp ⁺	
ST093	BW25113,F-, Δ (araD-araB)567, Δ lacZ4787(::rrnB-3), λ -, Δ zwf::kan, rph-1, Δ (rhaD-rhaB)568, hsdR514, Souche Keio	(Baba <i>et al.</i> , 2006)
ST100	MG1655, $\Delta ldhA::$ FRT $\Delta pflAB::$ FRT $\Delta ack-pta::$ FRT $\Delta iscR::$ FRT $\Delta frdABCD::$ FRT $\Delta aceE::$ FRT $\Delta mgsA::$ FRT $\Delta pykA::$ kana melB::TT02 ptrc01/RBS01*2crt-hbd :: ptrc30RBS01*2atoB :: g.3,625,558-3,720,629del :: pCF3*udhA R455L; Spec ⁺ Kana ⁺	Cette étude
ST101	MG1655, $\Delta ldhA::$ FRT $\Delta pflAB::$ FRT $\Delta ack-pta::$ FRT $\Delta iscR::$ FRT $\Delta frdABCD::$ FRT $\Delta aceE::$ FRT $\Delta mgsA::$ FRT $\Delta zwf::$ kana melB::TT02 ptrc01/RBS01*2crt-hbd :: ptrc30RBS01*2atoB :: g.3,625,558-3,720,629del :: pCF3*udhA R455L; Spec ⁺ Kana ⁺	Cette étude
ST115	MG1655, $\Delta ldhA::$ FRT $\Delta pflAB::$ FRT $\Delta ack-pta::$ FRT $\Delta iscR::$ FRT $\Delta frdABCD::$ FRT $\Delta aceE::$ FRT $\Delta mgsA::$ FRT $\Delta zwf::$ kana melB::TT02 ptrc01/RBS01*2crt-hbd :: ptrc30RBS01*2atoB :: g.3,625,558-3,720,629del :: pCF3*udhA R455L;	Cette étude

	Spec ⁺ Kana ⁺ ; Population adaptée pour la culture sans supplémentation en extrait de levure et sans nitrate après culture discontinuée	
ST124	MG1655, $\Delta ldhA::$ FRT $\Delta pflAB::$ FRT $\Delta ack-pta::$ FRT $\Delta iscR::$ FRT $\Delta frdABCD::$ FRT $\Delta aceE::$ FRT $\Delta mgsA::$ FRT :: AdhE V360L :: Zwf*(Gly295_Glu491del) :: pCF2(<i>pfor_{CE} fd_{CE}</i>) PL031 (<i>fnor_{CA} udhA_{EC}R455Q</i>); Spec ⁺ Kana ⁺	Cette étude
ST127	MG1655, $\Delta ldhA::$ FRT $\Delta pflAB::$ FRT $\Delta ack-pta::$ FRT $\Delta iscR::$ FRT $\Delta frdABCD::$ FRT $\Delta aceE::$ FRT $\Delta mgsA::$ FRT :: AdhE V360L :: Zwf*(Gly295_Glu491del) :: pCF2(<i>pfor_{CE} fd_{CE}</i>) PL031 (<i>fnor_{CA} udhA_{EC}</i>); Spec ⁺ Kana ⁺	Cette étude
ST143	MG1655, $\Delta ldhA::$ FRT $\Delta pflAB::$ FRT $\Delta ack-pta::$ FRT $\Delta iscR::$ FRT $\Delta frdABCD::$ FRT $\Delta aceE::$ FRT $\Delta mgsA::$ FRT $\Delta zwf::$ FRT $\Delta mdh::$ kana melB::TT02 ptrc01/RBS01*2crt-hbd :: ptrc30RBS01*2atoB :: g.3,625,558-3,720,629del :: pCF3*udhA R455L; Spec ⁺ Kana ⁺	Cette étude
ST149	MG1655, $\Delta ldhA::$ FRT $\Delta pflAB::$ FRT $\Delta ack-pta::$ FRT $\Delta iscR::$ FRT $\Delta frdABCD::$ FRT $\Delta aceE::$ FRT $\Delta mgsA::$ FRT $\Delta zwf::$ FRT :: AdhE V360L :: pCF2(<i>pfor_{CE} fd_{CE}</i>); Spec ⁺	Cette étude
ST153	MG1655, $\Delta ldhA::$ FRT $\Delta pflAB::$ FRT $\Delta ack-pta::$ FRT $\Delta iscR::$ FRT $\Delta frdABCD::$ FRT $\Delta aceE::$ FRT $\Delta mgsA::$ FRT $\Delta zwf::$ FRT :: AdhE V360L :: pCF2(<i>pfor_{CE} fd_{CE}</i>) PL024 (<i>fnor_{CA} udhA_{EC}</i>); Spec ⁺ Kana ⁺	Cette étude
ST154	MG1655, $\Delta ldhA::$ FRT $\Delta pflAB::$ FRT $\Delta ack-pta::$ FRT $\Delta iscR::$ FRT $\Delta frdABCD::$ FRT $\Delta aceE::$ FRT $\Delta mgsA::$ FRT $\Delta zwf::$ FRT :: AdhE V360L :: pCF2(<i>pfor_{CE} fd_{CE}</i>) PL031 (<i>fnor_{CA} udhA_{EC}R455Q</i>); Spec ⁺ Kana ⁺	Cette étude
ST159	MG1655, $\Delta ldhA::$ FRT $\Delta pflAB::$ FRT $\Delta ack-pta::$ FRT $\Delta iscR::$ FRT $\Delta frdABCD::$ FRT $\Delta aceE::$ FRT $\Delta mgsA::$ FRT :: AdhE V360L :: pCF2(<i>pfor_{CE} fd_{CE}</i>) PL033 (<i>rnfCDGEABF_{DA}</i>); Spec ⁺ Kana ⁺	Cette étude
ST160	MG1655, $\Delta ldhA::$ FRT $\Delta pflAB::$ FRT $\Delta ack-pta::$ FRT $\Delta iscR::$ FRT $\Delta frdABCD::$ FRT $\Delta aceE::$ FRT $\Delta mgsA::$ FRT $\Delta zwf::$ FRT $\Delta mdh::$ kana melB::TT02 ptrc01/RBS01*2crt-hbd :: ptrc30RBS01*2atoB :: g.3,625,558-3,720,629del :: YqhC (Pro102_Phe103insLysPhe) :: pCF3*udhA R455L+ transposon dans <i>udhA</i> plasmidique [(1300_1401)ins(600)]; Spec ⁺ Kana ⁺ ; Clone isolé adapté pour la production en n-butanol par repiqués successives en culture discontinuée.	Cette étude
ST173	BL21 (DE3) PL042 (<i>udhA_{EC}</i>); Amp ⁺	Cette étude
ST174	BL21 (DE3) PL044 (<i>udhA_{EC}R455L</i>); Amp ⁺	Cette étude
ST175	BL21 (DE3) PL043 (<i>udhA_{EC}R455Q</i>); Amp ⁺	Cette étude
ST180	MG1655, $\Delta ldhA::$ FRT $\Delta pflAB::$ FRT $\Delta ack-pta::$ FRT $\Delta iscR::$ FRT $\Delta frdABCD::$ FRT $\Delta aceE::$ FRT $\Delta mgsA::$ FRT :: AdhE V360L :: pCF2(<i>pfor_{CE} fd_{CE}</i>) PL048 (<i>fnor_{CT}</i>); Spec ⁺ Kana ⁺	Cette étude

ST184	MG1655, $\Delta ldhA::$ FRT $\Delta pflAB::$ FRT $\Delta ack-pta::$ FRT $\Delta iscR::$ FRT $\Delta frdABCD::$ FRT $\Delta aceE::$ FRT $\Delta mgsA::$ FRT $\Delta zwf::$ FRT :: AdhE V360L :: pCF2($pfor_{CE} fd_{CE}$) PLO48 ($fnor_{CT}$); Spec ⁺ Kana ⁺	Cette étude
ST191	MG1655, $\Delta ldhA::$ FRT $\Delta pflAB::$ FRT $\Delta ack-pta::$ FRT $\Delta iscR::$ FRT $\Delta frdABCD::$ FRT $\Delta aceE::$ FRT $\Delta mgsA::$ FRT melB::TT02 ptrc01/RBS01*2crt-hbd :: ptrc30RBS01*2atoB PLO25 PLO53 ($fnor_{CT}$ ($\Delta N264$)); Amp ⁺ Kana ⁺	Cette étude
ST192	MG1655, $\Delta ldhA::$ FRT $\Delta pflAB::$ FRT $\Delta ack-pta::$ FRT $\Delta iscR::$ FRT $\Delta frdABCD::$ FRT $\Delta aceE::$ FRT $\Delta mgsA::$ FRT $\Delta zwf::$ FRT :: AdhE V360L :: pCF2($pfor_{CE} fd_{CE}$) PLO53 ($fnor_{CT}$ ($\Delta N264$)); Kana ⁺	Cette étude
ST193	MG1655, $\Delta ldhA::$ FRT $\Delta pflAB::$ FRT $\Delta ack-pta::$ FRT $\Delta iscR::$ FRT $\Delta frdABCD::$ FRT $\Delta aceE::$ FRT $\Delta mgsA::$ FRT :: AdhE V360L :: pCF2($pfor_{CE} fd_{CE}$) PLO53 ($fnor_{CT}$ ($\Delta N264$)); Kana ⁺	Cette étude
ST194	MG1655, $\Delta ldhA::$ $\Delta pflAB::$ $\Delta ack-pta::$ $\Delta iscR::$ $\Delta frdABCD::$ $\Delta aceE::$ $\Delta mgsA::$ AdhE V360L:: pCF2($pfor_{CA} fd_{CA}$); pPLO53 ($fnor_{CT}$ ($\Delta N264$)); Spec ⁺ Kana ⁺ Clone isolé issus de la population ST180A, adapté pour la culture sans supplémentation en extrait de levure et sans nitrate après culture discontinuée	Cette étude
ST195	MG1655, $\Delta ldhA::$ $\Delta pflAB::$ $\Delta ack-pta::$ $\Delta iscR::$ $\Delta frdABCD::$ $\Delta aceE::$ $\Delta mgsA::$ AdhE V360L:: pCF2($pfor_{CE} fd_{CE}$); pPLO31 ($fnor_{CA} udhA_{EC}R455Q$); Spec ⁺ Kana ⁺	Cette étude
EARY 55	MG1655, $\Delta ldhA::$ FRT $\Delta pflAB::$ FRT $\Delta ack-pta::$ FRT $\Delta iscR::$ FRT $\Delta frdABCD::$ FRT $\Delta aceE::$ FRT $\Delta mgsA::$ FRT melB::TT02 ptrc01/RBS01*2crt-hbd :: ptrc30RBS01*2atoB :: g.3,625,558-3,720,629del :: YqhC G69S :: LptG (Trp353_Ser360del) pCF3*udhA R455L; Spec ⁺ Clone isolé à partir de la population Butanol évoluée pendant 4500h pour améliorer la tolérance au butanol d' <i>E. coli</i>	Cette étude

Tableau 13 : Noms et descriptions des souches *E. coli* modifiées. Les abréviations indiquent la source des gènes exprimés: CA, *Clostridium acetobutylicum*; CL, *Clostridium ljungdahlii*; CT, *Chlorobium tepidum*; DA, *Desulfovibrio alaskensis*; EC, *Escherichia coli*. La nomenclature pour la description des variants est réalisée d'après les recommandations de (den Dunnen *et al.*, 2016).

1.2. Liste des plasmides utilisés

Plasmide	Génotype/Caractéristiques	Référence
pACYC184	Donneur pour l'origine p15A; Cm ⁺	(Chang and Cohen, 1978)
pPAL7	P _{T7} ::Profinity eXact tag::T _{T7} ; Amp ⁺	Bio-rad
pCP20	Surexpression de la FLP recombinase de <i>S. cerevisiae</i> ; Amp ⁺	(Cherepanov and Wackernagel, 1995)
pKD46	Surexpression du système de recombinaison du bactériophage λ ; Amp ⁺	(Datsenko and Wanner, 2000)
pKD4	Matrice pour l'amplification de la résistance Kan ⁺ flanquée des sites FRT, FRT-Kan-FRT	(Datsenko and Wanner, 2000)
pUC19	Donneur pour le marqueur de résistance à l'ampicilline ; Amp ⁺	(Norrandar <i>et al.</i> , 1983)
pMA_Rnf_Clj	RBS:: <i>rnfC</i> _{CL} :: RBS:: <i>rnfD</i> _{CL} :: RBS:: <i>rnfG</i> _{CL} :: RBS:: <i>rnfE</i> _{CL} :: RBS:: <i>rnfA</i> _{CL} :: RBS:: <i>rnfB</i> _{CL} ; Amp ⁺ ; codons harmonisés pour <i>E. coli</i>	Cette étude
pMA_CT1 512	RBS:: <i>fnor</i> _{CT} ; Kana ⁺ <i>fnor</i> _{CT} codons harmonisés pour <i>E. coli</i>	Cette étude
pCF2	pSC101 P _{GI1.6} ::RBS:: <i>pfor</i> _{CA} ::RBS:: <i>fd</i> _{CA} ::T _{ADC} ; Spec ⁺ ; codons harmonisés pour <i>E. coli</i>	(Soucaille <i>et al.</i> , 2015)
pCF3*udh A	pSC101 P _{GI1.6} ::RBS:: <i>pfor</i> _{CA} ::RBS:: <i>fd</i> _{CA} :: RBS:: <i>fnor</i> _{CA} :: RBS:: <i>udhA</i> _{EC} :: T _{ADC} ; P _{THI} ::RBS:: <i>adhE2</i> _{CA} ::RBS:: <i>bcd</i> _{CA} ::RBS:: <i>etfA</i> _{CA} ::RBS:: <i>etfB</i> _{CA} :: T _{ADC} ; Spec ⁺ ; codons harmonisés pour <i>E. coli</i>	(Soucaille <i>et al.</i> , 2015)
pCF3*udh A R455L	pSC101 P _{GI1.6} ::RBS:: <i>pfor</i> _{CA} ::RBS:: <i>fd</i> _{CA} :: RBS:: <i>fnor</i> _{CA} :: RBS:: <i>udhA</i> _{EC} R455L :: T _{ADC} ; P _{THI} ::RBS:: <i>adhE2</i> _{CA} ::RBS:: <i>bcd</i> _{CA} ::RBS:: <i>etfA</i> _{CA} ::RBS:: <i>etfB</i> _{CA} :: T _{ADC} ; Spec ⁺ ; codons harmonisés pour <i>E. coli</i>	(Soucaille <i>et al.</i> , 2015)
PL003	pSC101 P _{GI1.6} ::RBS:: <i>pfor</i> _{CA} ::RBS:: <i>fd</i> _{CA} :: T _{ADC} ; P _{THI} ::RBS:: <i>adhE2</i> _{CA} ::RBS:: <i>bcd</i> _{CA} ::RBS:: <i>etfA</i> _{CA} ::RBS:: <i>etfB</i> _{CA} :: T _{ADC} ; Spec ⁺ ; codons harmonisés pour <i>E. coli</i>	Cette étude
PL016	pACYC P _{PRO1} ::RBS:: <i>rnfC</i> _{CL} :: RBS:: <i>rnfD</i> _{CL} :: RBS:: <i>rnfG</i> _{CL} :: RBS:: <i>rnfE</i> _{CL} :: RBS:: <i>rnfA</i> _{CL} :: RBS:: <i>rnfB</i> _{CL} ::T _{ADC} (8_9del); Kana ⁺ codons harmonisés pour <i>E. coli</i>	Cette étude

PL019	pACYC P _{PRO1} :: <i>rnfCDGEAB</i> _{CL} :: T _{ADC} (8_9del);; Kana ⁺	Cette étude
PL024	pACYC P _{PRO1} ::RBS:: <i>fnor</i> _{CA} ::RBS:: <i>udhA</i> _{EC} :: T _{ADC} (8_9del);; Kana ⁺ <i>fnor</i> _{CA} codons harmonisés pour <i>E. coli</i>	Cette étude
PL025	pSC101 P _{GI1.6} ::RBS:: <i>pfor</i> _{CA} ::RBS:: <i>fd</i> _{CA} :: T _{ADC} ; P _{THI} ::RBS:: <i>adhE2</i> _{CA} ::RBS:: <i>bcd</i> _{CA} ::RBS:: <i>etfA</i> _{CA} ::RBS:: <i>etfB</i> _{CA} :: T _{ADC} ; Amp ⁺ ; codons harmonisés pour <i>E. coli</i>	Cette étude
PL031	pACYC P _{PRO1} ::RBS:: <i>fnor</i> _{CA} ::RBS:: <i>udhA</i> _{ECR455Q} :: T _{ADC} (8_9del);; Kana ⁺ <i>fnor</i> _{CA} codons harmonisés pour <i>E. coli</i>	Cette étude
PL042	pPAL7 P _{T7} ::Profinity eXact tag:: <i>udhA</i> _{EC} ::T _{T7} ; Amp ⁺	Cette étude
PL043	pPAL7 P _{T7} ::Profinity eXact tag:: <i>udhA</i> _{ECR455Q} ::T _{T7} ; Amp ⁺	Cette étude
PL044	pPAL7 P _{T7} ::Profinity eXact tag:: <i>udhA</i> _{ECR455L} ::T _{T7} ; Amp ⁺	Cette étude
PL048	pACYC P _{PRO1} ::RBS:: <i>fnor</i> _{CT} :: T _{ADC} (8_9del);; Kana ⁺ <i>fnor</i> _{CT} codons harmonisés pour <i>E. coli</i>	Cette étude
PL049	pACYC P _{PRO1} ::RBS:: <i>fnor</i> _{CT} :: RBS:: <i>udhA</i> _{EC} :: T _{ADC} (8_9del);; Kana ⁺ <i>fnor</i> _{CT} codons harmonisés pour <i>E. coli</i>	Cette étude
PL053	pACYC P _{PRO1} ::RBS:: <i>fnor</i> _{CT} (ΔN264):: T _{ADC} (8_9del);; Kana ⁺ <i>fnor</i> _{CT} codons harmonisés pour <i>E. coli</i>	Cette étude

Tableau 14 : Nom et description des plasmides utilisés pour transformer les souches *E. coli*. Les abréviations indiquent la source des gènes exprimés: CA, *Clostridium acetobutylicum*; CL, *Clostridium ljungdahlii*; CT, *Chlorobium tepidum*; DA, *Desulfovibrio alaskensis*; EC, *Escherichia coli*. La nomenclature pour la description des variants est réalisée d'après les recommandations de (den Dunnen *et al.*, 2016).

1.3. Liste des RBS optimisés

Gène	Séquence	Description
rnf _{CL}	CGCTGTAAAAATTATTGAAAGAGGTGTTTAAG	Complexe Rnf de <i>C. ljungdahlii</i>
rnf _{DCL}	ACTAAAAACCAGTTCACGTAGGATTAATA	
rnf _{GCL}	AGAAGTCATCAAGATTAAGGAGGAACCGACT	
rnf _{ECL}	ACGTAATACACGTTTCCTAAGGAGAGAAGCTAC	
rnf _{ACL}	AGATATCTTACTCATCAGGAGATAACCAT	
rnf _{BCL}	AGCTAATAAGAAATAATAGGACGGCGGAAAAT	
Fno _{rCT} ou Fno _{rCA}	GCTCATTATATACAAGGAGGAAACAGCT	PL024 ou PL048
udh _{AEC}	CATTATATACAAGGAGGAAACAGCT	
Pfo _{rCA}	CCCATGGTGACGTCACCGGTTCTAGTAAGGAGGAAAATTCC	<i>pCF2</i> ou <i>pCF3</i>
Fd _{CA}	ATTATATACAAGGAGGAAATAGTC	
AdhE _{2CA}	ATTATATACAAGGAGGAAACAGCT	
bcd _{CA}	TTATATACAAGGAGGAAACAGCT	
etf _{B_{CA}}	ATTATATACAAGGAGGAAACAGCT	
etf _{A_{CA}}	ATTATATACAAGGAGGAAACAGCT	

Tableau 15 : Séquences des RBS optimisés utilisés dans cette étude. Les abréviations indiquent la source des gènes: CA, *Clostridium acetobutylicum*; CL, *Clostridium ljungdahlii*; CT, *Chlorobium tepidum*; EC, *Escherichia coli*

1.4. Liste des amorces PCR utilisées

Nom	Séquence	Description
OL3	CGACGTGCGTCCTCAAGCTG	Vérification de routine du <i>pACYC</i>
OL4	ATAATTTTCACCGGTTCCCTC	Amorces pour le séquençage de l'opéron Rnf de <i>C. ljungdahlii</i> codon-harmonisé
OL5	TGTTAACCGGTCGCGAAGTG	
OL6	CATCGCCTTGATAACGCAC	
OL7	TTATGGTGTCATGGCCGGTG	
OL8	TAAAGCCGTTACCGCGGTG	
OL9	GCGTGAAAGAAGCGGTGGAG	
OL10	CCTAAGAACGCTAGCGCCAG	
OL11	TTGCGACCAATTGCATAGTG	
OL12	ACTGGAAAGCGGGCAGTGAG	
OL13	GGTACATGCGTGAGCGCTTG	
OL14	ACCGCCTACATACCTCGCTC	
OL15	GTGGCGCTTTTCATAGCTC	
OL16	TGAAGATCAGTTGGGTGCAC	
OL24	CTATACCTAGGTTATGAGCT	Linker pour la suppression de la <i>fnor</i> de <i>C. acetobutylicum</i> dans le <i>pCF3*udhA</i>
OL25	CATAACCTAGGTATAG	
OL29	GAAGCAGCTCCAGCCTAC	Vérification insertion <i>crt-hbd</i>
OL30	GCATTACATTAAGACGTGGCCTG	
OL39	CTCTAAAGCTTCGCTCGAGC	Amorces pour le séquençage du PL024
OL40	CACTTCTAAGTGACGGCTGC	

OL41	CAACTGTCCAATTAACACCCC	
OL42	GCTGTTAGAAGATAGCTATAAAGCC	
OL43	TTGAGTGCGATAGCGTGGTG	
OL45	TCAACAAACGCGCATGCGTC	
OL46	CCGGTAATACCGATTGCTG	
OL47	AGTCGACATTCGCCATTCAG	
OL65	GCGCACTAGTGCTCATTATATACAAGGAGGAAACAGC	
OL66	GTACCCCGGGATTTTATAGGCCATGACTATTTCTCC	
OL69	GTACCCGGGATATACAAGGAGGAAACAGCTATGCCAC	Clonage d' <i>udhA</i> d' <i>E.coli</i> en opéron avec la <i>fnor</i> de <i>C. acetobutylicum</i> dans le pACYC
OL70	GTACCCGGGATAATTTTAAAACAGGC	
OL71	GCGTTTGTTGATTAATCACG	Vérification du sens de l'insertion d' <i>udhA</i> lors du clonage dans le pACYC
OL78	CGCGCACTAGTATTGAAAGAGGTGTTTAAGAGTG	Amplification de l'opéron Rnf à partir du génome de <i>C. ljungdahlii</i> DSM 13528
OL79	ATATACCCGGGCCATTATGAATTTGCAGCAGC	
OL80	AATGGTGCTGAGTGTGAACC	Amorces pour le séquençage de l'opéron Rnf de <i>C. ljungdahlii</i>
OL81	GGACCTATGATGGGATTTGC	
OL82	TTAGCACTAACTCCAGCTGC	
OL83	TACAAGGCAATGTTCTTAGG	
OL84	GCAGTTTATTATATAACATCACC	
OL85	GATTGATTGCAGAAAACCCC	
OL86	GGAGGATTCATACTCATAGG	
OL87	AGTGTTGTTAATGCGATAGG	

OL88	GAGTTGCACATGTAAGATGC	
OL96	GTTGTTAGAGAAAACGTATAAATTAGGGGGATCCCATCCAGCCGGCGTCCCGGAAAACG	Changement du marqueur de résistance du <i>pMA_Rnf_Clj</i> par un marqueur Kana ⁺
OL97	TGGCGAAAATGAGACGTTGATCGGCGAATTCCTGGGCGGTTTTATGGACAGCAAGC	
OL100	CGCTTAAAATAATAAAAAGCAGACTTGACCGTTAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGG	
OL125	ATGGCAATTCTGGAAGAAATAGCGCTTCAAGGCCTGGGGAAAATGTGCGCGGAACCCC	Changement du marqueur de résistance du PL003 par Amp ⁺
OL126	CTTAATTTAAGTGACGATCGC	
OL127	AAAGCCTCTCGCGAGGAGAGG	Validation délétion locus <i>pykA</i>
OL128	GCCGATTGTCTGTTGTGCC	Vérification de routine du <i>pACYC</i>
OL158	CGTAAAAGCAGTACAGTGCACC	Validation délétion locus <i>zwf</i>
OL159	AAAAAGCCTCGTGGGTGAATCC	
OL191	CGCGCACTAGTGGTCCAAAGCGGCCCTTTGAAAAGAGTC	Amplification de l'opéron Rnf à partir du génome de <i>Desulfovibrio alaskensis</i> G20 DSM 17464
OL192	CGCGCGTTTAAACGGACTTTAATGCTCCCGGGCAGCAG	
OL193	ATCATCAACGGGCTGAATCC	Amorces pour le séquençage de l'opéron Rnf de <i>D. alaskensis</i>
OL194	TTTGTGGTGCCTGCCGGCAC	
OL195	TGGTTATAGAGGCCGTGTGC	
OL196	ACGCCATAGACAGCAGCCAG	
OL197	GGCCAAAAAAGGCGGCAAGC	
OL198	AGGCTGGTTCTGGGGCTGTG	
OL200	TGTGCAGGCCAAGCGCAAGG	
OL201	CTTTTACGCGTTTGCGGCAG	
OL202	GGGTGAGCTTCCGGCAAGG	

OL203	GGTGAAGCCTGTGTGGAAGC	
OL204	TGAACTTAAGGAAGTGATGG	
OL205	TGTACAGCCATCTGGTAAGC	
OL206	CCAACTCAGCTTCCTTTCGGGCTTAAAACAGGCGGTTTAAACCGTTTAAC	Clonage d' <i>udhA</i> d' <i>E.coli</i> dans le <i>pPAL7</i>
OL224	AGAAGACAAGCTCTTCAAAGCTTTGACTAGTCCACATTCTACGATTACGATG	
OL221	GCGCGGATCCCATTATATACAAGGAGGAAACAGCTATGCC	Clonage d' <i>udhA</i> d' <i>E.coli</i> en opéron avec la <i>fnor</i> de <i>C. tepidum</i> dans le <i>pACYC</i>
OL222	GTACCCCGGGTTAAAACAGGCGGTTTAAACCGTTTAAACGC	
OL227	GTACAATCCCGATGTTGTGC	Amorces pour le séquençage de la <i>fnor</i> de <i>C. tepidum</i>
OL228	TGCGCTCTAGTGATGGTTCG	
OL28	GCTTCGCTCATTAGATCCTG	Vérification de routine du <i>pCF3*</i>
OL106	CAATCCGGTTGTTGCAGAAATG	
T7P	TAATACGACTCACTATAGGG	Séquençage du <i>pPAL7</i> contenant <i>udhA</i>
T7rev	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	
CI857-FW	TTTACAGCGAGCTCGACTAGTGACATGCAACCATTATCACCGCCA	Introduction CI857-PRO dans le <i>pMA_Rnf_Clj</i>
CI857-Rv	CTTCGCTCGAGCTGCGCGGCCGCTCGAAGCAGCTCCAGCCTACAG	
Tadc-FW	TTAAGAGGTACCTAGTGGATCCTACGGGGTAACAGAT	Introduction Tadc dans le <i>pMA_Rnf_Clj</i>
Tadc-Rv	AAATTATAGGCCTGGCTTAAGTATCCCGGGTAAAAATAAGAGTTACC	
pACYC-cm f	GATTGAAATGGTTTATCTGTTACCCCGTAGGATCCGCGTTTAAAGGGCACCAATAACTGCC	Changement origine de répllication et marqueur dans le <i>pMA_Rnf_Clj</i>
pACYC-p15A rv	CGAGCGAAGCTTTAGAGCTCATGGCGCGCCTAGGAGCAATTTAACTGTGATAAACTACCGC	

95kdelbutanolstrain-F	TCACTTTTTCTGGGATGAGCT	Validation de la perte des 95 kb dans la souche ST001 par PCR, obtention d'une bande de 2200pb si délétion
95kdelbutanolstrain-R	GCCTTTATGGAGGTTCTGCAA	
pflAB1	AGACATTAATAATATACGTGCAGCTACCCG	Validation délétion locus <i>pflAB</i>
pflAB2	GTGAAAGCTGACAACCCTTTTGATCTTTTA	
adhEs	GGCTCATTGCACCACCATCCAG	Validation délétion locus <i>adhE</i>
adhErv	GAAAAGACGCGCTGACAATACGCC	
hsIJC	GCCATCAGCAGGCTTAGCCG	Validation délétion locus <i>ldhA</i>
ldhAC2	GGGTATTGTGGCATGTTTAACCG	
B2295f	GCATGGGTAAACTTAAGGCG	Validation délétion locus <i>ack-pta</i>
YfcCr	TAATCACCAACGTATCGGGC	
iscR1s	CGCCGCATCCGACAACAGG	Validation délétion locus <i>iscR</i>
iscR1rv	TGCTGGTGATGATGTGCTTGCCT	
frdABCD1s	CTGGCTCATACAAGGCGTCTCC	Validation délétion locus <i>frdABCD</i>
frdABCD1rv	TCCATTCCACTGTTTAGCGGTA	
aceEs	GAGAGCCGCCGTGAGCGTTC	Validation délétion locus <i>aceE</i>
aceErv	CTGCACCGTCGGCGGAATCG	
mgsAs	CCCAGTCATCAACCAGGTC	Validation délétion locus <i>mgsA</i>
mgsArv	GGAGTCGATTATGGAAGAGGCG	
atoBs	GCGCGGCAGCACGCAGTAC	Vérification par PCR du locus <i>atoB</i>
atoBrv	CGCACATCAGGCCATCGCGC	

Tableau 16 : Noms et séquences des amorces de PCR utilisées dans cette étude

2. Milieux de culture

2.1. Milieux solides

Les cultures en milieu solide sont utilisées essentiellement pour l'isolement de colonies. Ces cultures sont effectuées soit sur un milieu riche de type Luria-Bertani broth (LB solide)(Bertani, 1951), soit sur milieu minéral (MM)(Meynial-Salles *et al.*, 2005b). Leurs compositions respectives sont présentées dans les tableaux 17 et 18.

Tryptone	10 g/L
Extrait de levure	5 g/L
Chlorure de sodium	10 g/L
Agar	15 g/L

Tableau 17 : Composition du milieu LB agar.

K ₂ HPO ₄	6 mM	Acide citrique	0.2 mM
NTA	1.1mM	MnSO ₄	0.2 mM
MgSO ₄	1.7 mM	NaCl	0.2 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	8 mM	CaCl ₂	9 µM
NaCl	3.5 mM	ZnSO ₄	6 µM
NaHCO ₃	2.5 mM	CuSO ₄	0.6 µM
FeSO ₄	0.3 mM	H ₃ BO ₃	1.6 µM
HEPES	105 mM	NaMoO ₄	0.5 µM
Agar	15g/L		

Tableau 18 : Composition du milieu MMcoli agar

Le milieu MMcoli solide est complété en fonction des besoins, après stérilisation, avec du glucose (20 g/L), de la thiamine (10 mg/L), de l'extrait de levure (4g/L) et des nitrate (5 mM) (stérilisés séparément par filtration). Les concentrations indiquées sont les concentrations finales.

2.2. Milieux liquides

Différents types de milieux liquides sont utilisés, incluant des milieux riches ou synthétiques. Quatre milieux riches différents sont employés : LB, TB et SOC et MAC (Gauquelin *et al.*, 2018; Hofnung, 1993; Sambrook *et al.*, 1989). Le milieu LB (Luria and Delbrück, 1943) sert à effectuer les inoculations à partir des souches conservées dans du glycérol (20%) à -80°C, les précultures, et la préparation des cellules compétentes. Le milieu SOC est utilisé pour la croissance des transformants après électroporation. Le milieu TB sert à la culture des souches utilisées pour la production de protéine recombinante. Le milieu MAC est utilisé pour la culture des souches pour la production des Ferrédoxines NAD(P)⁺ oxydoréductases afin de réaliser les tests d'activité enzymatique sur extrait acellulaire (Gauquelin *et al.*, 2018). La composition de ces milieux est présentée dans les tableaux 19 et 20.

	LB	SOC	TB
Tryptone	10 g/L	20 g/L	12 g/L
Extrait de levure	5 g/L	5 g/L	24 g/L
Chlorure de sodium	10 g/L	0.58 g/L	
KCl		0.19 g/L	
MgCl ₂		0.95 g/L	
K ₂ PO ₄			12.47 g/L
Glycerol			4 g/L
Glucose		3.66 g/L	

Tableau 19 : Composition des milieux LB, SOC et TB.

	MAC
Tryptone	10 g/L
Extrait de levure	5 g/L
Chlorure de sodium	2 g/L
HEPES	23 g/L
FeSO ₄	50 mg/L
NTA	200 mg/L
K ₂ HPO ₄	0.5 g/L
NaNO ₃	85 mg/L
Glucose	20 g/L

Tableau 20 : Composition du milieu MAC à pH 7.3

Le milieu minimal synthétique, appelé MM, est utilisé pour réaliser les précultures et les cultures des différentes souches de production (Meynial-Salles and Soucaille, 2012). Le MM (Tableau 21) est complété, sauf indication contraire, après stérilisation, avec de la thiamine (10 mg/L), du glucose stérile (20 g/L), de l'extrait de levure (4 g/L) et des nitrate (5 mM). Les concentrations indiquées sont les concentrations finales.

K ₂ HPO ₄	6 mM	Acide citrique	0.2 mM
NTA	1.1mM	MnSO ₄	0.2 mM
MgSO ₄	1.7 mM	NaCl	0.2 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	8 mM	CaCl ₂	9 µM
NaCl	3.5 mM	ZnSO ₄	6 µM
NaHCO ₃	2.5 mM	CuSO ₄	0.6 µM
FeSO ₄	0.3 mM	H ₃ BO ₃	1.6 µM
HEPES	105 mM	NaMoO ₄	0.5 µM

Tableau 21 : Composition du milieu minimum synthétique de culture dit « MM » à pH 6.8.

2.3. Utilisation d'antibiotiques

Lorsque la souche mise en culture possède un ou plusieurs marqueurs de résistance aux antibiotiques, qu'ils soient génomiques ou plasmidiques, le milieu de culture, solide ou liquide, est complété avec le ou les antibiotiques correspondants. La concentration finale de chaque antibiotique dans le milieu de culture, solide ou liquide, est indiquée dans le Tableau 22.

Antibiotique	Concentration ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Ampicilline/Carbeniciline	100
Chloramphénicol	30
Kanamycine	50
Spectinomycine	100

Tableau 22 : Concentrations finales des antibiotiques utilisés

3. Conditions de cultures

3.1. Conservation des souches d'*E. coli*

Les souches d'*E. coli* sont conservées à -80°C dans une solution stérile de glycérol à 20% (concentration finale v/v).

3.2. Conditions de croissance des souches *E. coli* TOP10, et des souches de production pour leur construction

Le milieu LB, défini ci-dessus, est utilisé pour la croissance des souches *E. coli* TOP10 et pour la construction des souches de production. Le milieu est supplémenté avec des antibiotiques si nécessaire, voir Tableau 22 pour les concentrations utilisées. Les cultures sont incubées à 37°C à 170 rpm, sauf celles qui comportent le plasmide thermoinductible, qui sont incubées à 30°C .

3.3. Conditions de croissance des souches de production d'*E.coli*

Les souches *E. coli* MG1655 pour la production d'éthanol ou de butanol en anaérobiose sont cultivées selon le protocole suivant : des précultures anaérobies sont inoculées à partir des stocks de cellules à -80°C avec une oeuze stérile (environ $10\mu\text{L}$) pour 5mL de milieu MM anaérobie. Les antibiotiques adéquats et les ajouts en extrait de levure et nitrate sont effectués si nécessaire, et les cultures sont placées à 37°C sous une agitation de 170 rpm pendant 48h. Après 48h, les précultures anaérobies sont utilisées pour inoculer 30mL de milieu minéral (MM) anaérobie à une $\text{DO}_{550\text{nm}}$ initiale de 0.1. Les fioles anaérobies sont ensuite placées dans l'incubateur à 37°C avec une agitation de 170 rpm pour une durée de 300h.

Les cultures des souches *E. coli* BL21 pour la production de protéines recombinantes sont réalisées dans le milieu Terrific Broth (TB), supplémenté avec 0.5 % de glucose et 5mM de nitrate, en culture discontinue dans un volume de 400mL, en anaérobiose. La production est induite par l'ajout d'IPTG, pour une concentration finale de 0.5 mM, quand la $\text{DO}_{550\text{nm}}$ atteint 0.6. Les cultures sont stoppées 4h après l'induction.

Les souches *E. coli* MG1655 utilisées pour la préparation des extraits acellulaires sont cultivées en anaérobiose dans 50mL de milieu MAC supplémenté avec 20g/L de glucose et 5mM de nitrate. Les cellules sont récoltées dans une boîte à gants en anaérobiose lorsque la DO_{550nm} atteint 1,0 unité, puis centrifugées à 8500 g pendant 10min à 4°C.

3.4. Cultures continues en fermenteur

Les cultures en chémostat sont effectuées en réacteur en verre de 400 mL, munis d'un système d'agitation magnétique et d'une régulation de pH (sonde FermProbe F-635 autoclavable de chez Broadley James, reliée à un ensemble de régulation). Les réacteurs possèdent une double enveloppe qui permet une régulation de la température. Tous les tuyaux utilisés sont en butyl ou en Norprène MASTERFLEX, imperméables à l'oxygène et autoclavables.

Après autoclavage (120°C, 20 min), le réacteur, contenant le milieu synthétique employé dans les cultures en fioles anaérobies, est dégazé stérilement, à chaud, sous flux d'azote pendant 30 minutes. Le bidon d'alimentation stérile est également dégazé sous flux d'azote, jusqu'à atteindre la température ambiante, puis les 20L de milieu sont stérilisés par filtration (0.22 μ m) et dégazés 24h avant utilisation. L'ensemencement du réacteur à une DO_{550nm} initiale de 0.1 est réalisé à l'aide d'une seringue et aiguille, à partir d'une culture en fioles anaérobies inoculée 48h avant. La fermentation est d'abord effectuée en discontinu et sans régulation de pH, jusqu'à ce que la phase exponentielle de croissance soit atteinte (DO_{550nm} d'environ 1,0 unité). La culture est alors alimentée en continu avec le milieu de culture, à un taux de dilution de 0,03 h⁻¹ à l'aide d'une pompe péristaltique. Le soutirage est séquentiel, et effectué grâce à une régulation de niveau. Le volume de culture est maintenu à 300 mL. Le pH de la culture est régulé à 6,4 par ajout d'ammoniaque 3N. La vitesse d'agitation est de 150 rpm et la température est régulée à 37°C. Le bidon d'alimentation (20 L) est maintenu sous un flux continu d'azote tout au long de l'expérience, afin d'éviter l'entrée d'oxygène, et son contenu est constamment agité à l'aide d'un agitateur magnétique. Les prélèvements se font à travers un septum prévu à cet effet, à l'aide de seringues et aiguilles stériles.

4. Techniques de génie génétique

4.1. Isolement et manipulation des acides nucléiques

4.1.1. Mini et Midi-préparations d'ADN plasmidique d'*E. coli*

Les mini-préparations d'ADN plasmidique sont réalisées à partir de 1 à 5 mL d'une culture sur la nuit en milieu LB additionné d'antibiotique(s) à l'aide du kit Omega bio-tek, E.Z.N.A Plasmid DNA mini kit selon les recommandations du fournisseur.

Les midi-préparations d'ADN plasmidique sont réalisées à l'aide du kit Sigma GenElute HP Plasmid midiprep kit selon les recommandations du fournisseur.

Les préparations d'ADN plasmidique ainsi obtenues peuvent ensuite être utilisées pour la biologie moléculaire (digestion, ligation, etc) et également pour la transformation des souches d'*E. coli*.

4.1.2. Détermination de la concentration en ADN

La qualité et la quantité des ADN extraits et purifiés sont évaluées par lecture de l'absorbance UV à trois longueurs d'onde 260 nm, 280 nm et 230 nm par spectrophotométrie à microvolume avec le NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer (Thermofisher). Les rapports DO_{260nm}/DO_{280nm} (estimation de la présence de protéines) et DO_{260nm}/DO_{230nm} (estimation de la présence de solvants) doivent être supérieurs à 1.8 pour une préparation d'ADN de bonne qualité.

4.1.3. Techniques de clonage

Les techniques de digestion par des enzymes de restriction et de clonage par ligation, en utilisant la T4 DNA ligase, sont réalisées selon les procédures standard (Ausubel Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A. and Struhl K., 2001; Hofnung, 1993; Sambrook *et al.*, 1989) et les recommandations des fournisseurs (New England Biolabs :« NEB »).

La séparation et l'analyse des tailles de fragments d'ADN sont réalisées par électrophorèse sur gel d'agarose, de 0.8 à 2 % d'agarose selon la taille des fragments, dans un tampon TAE 0.5X : 0.02M Tris acetate +0.5 mM EDTA. L'ADN est visualisé aux ultraviolets ($\lambda = 254$ ou 312 nm) après coloration du gel dans une solution de bromure d'éthidium (BET) à $0.5 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1} \pm 10\%$.

Les fragments d'ADN ou les produits issus de réactions de polymérisation en chaîne (PCR) sont purifiés à partir de gels d'agarose avec les kits de purification sur gel Nucleospin Gel & PCR cleanup (Machery-Nagel) selon les recommandations du fournisseur. Du tampon de charge (Gel loading Dye purple - NEB)

(1X final) est ajouté aux échantillons avant dépôt. Les marqueurs de taille 1 kb (NEB) et 100 bp (NEB) sont couramment employés. Pour la purification, l'ADN est visualisé avec de la lumière bleue ($\lambda = 470$ nm) en utilisant un Safe Imager (ThermoFisher) après mélange du gel avec une solution de Sybr Safe (ThermoFischer) à une dilution 1 :10 000 avant électrophorèse.

4.1.4. Amplification de fragments d'ADN par réaction de PCR

L'amplification de fragments d'ADN est réalisée par PCR (réactions de polymérisation en chaîne). La polymérase utilisée varie en fonction de l'application. Pour la vérification des clonages et des transformations, la polymérase One Taq 2X Master Mix with Standard Buffer (NEB) est utilisée selon les recommandations du fournisseur. La température d'hybridation (T_m) est calculée en utilisant le logiciel T_m Calculator (NEB). L'ADN est ensuite amplifié pendant 30 cycles dans un ThermoCycler Bio-rad MJ Mini. Lorsque l'ADN amplifié est utilisé dans une nouvelle construction ou reséquéncé, la polymérase de haute-fidélité Q5 High-Fidelity DNA polymerase (NEB) est utilisée selon les recommandations du fournisseur. La température d'hybridation (T_m) est calculée en utilisant le logiciel T_m Calculator (NEB). L'ADN est ensuite amplifié pendant 20 cycles dans un ThermoCycler Bio-rad MJ Mini.

4.2. Construction des plasmides

4.2.1. Construction des plasmides exprimant les gènes codant pour les protéines des complexe Rnf (PL016, PL019 et PL033)

Les gènes codant pour les protéines du complexe Rnf de *C. ljungdahlii* ont été codon-harmonisés selon la méthode développée par Angov *et al.* (Angov *et al.*, 2008), afin d'améliorer l'expression du complexe protéique chez *E. coli*. L'opéron harmonisé a été synthétisé par la société Geneart (ThermoFisher), et cloné dans le vecteur *pMA_Rnf_Clj*. Ce vecteur a servi de matrice pour l'introduction d'un promoteur thermo-inductible et d'un terminateur. Le promoteur CI857-PRO1 a été amplifié par PCR (Amorces CI857-Fw/rv) à partir d'un plasmide développé par Aliprandi *et al.* (Aliprandi *et al.*, 2017), et introduit dans le *pMA_Rnf_Clj* par la technologie GeneArt® Seamless Cloning & Assembly kit (Life Technologies). Le terminateur *adc* a été amplifié par PCR à partir du *pCF2* (Amorces Tadc-Fw/rv), et introduit dans le vecteur par la même méthode. Suite à ces modifications, l'origine de répllication du plasmide et le marqueur de résistance ont été remplacés par ceux issus du vecteur *pACYC184* (Amorces *pACYC_Cm f/ pACYC_p15A rv*). Le vecteur *pMA_Rnf_Clj*, contenant le promoteur PRO1 et le terminateur *adc*, a été digéré par les enzymes *BamHI* et *AvrII*. La bande d'intérêt, contenant $P_{PRO1}::RBS::rnfC_{CL} :: RBS::rnfD_{CL} :: RBS::rnfG_{CL} :: RBS::rnfE_{CL} :: RBS::rnfA_{CL} :: RBS::rnfB_{CL} :: T_{ADC}$, a été purifiée sur gel. L'origine de répllication p15A et le marqueur de résistance au chloramphénicol ont été amplifiés par PCR avec

les oligonucléotides pACYC-cm f et pACYC-p15A rv, en utilisant le *pACYC184* comme matrice. Le fragment PCR a ensuite été digéré par les enzymes *BamHI* et *AvrII* et assemblé par ligation avec l'opéron Rnf. Ensuite, le marqueur de résistance au chloramphénicol a été remplacé par un marqueur de résistance à la kanamycine (Amorces OL96/OL97). Le marqueur de résistance à la kanamycine a été amplifié par PCR à partir du plasmide pKD4, et introduit dans le vecteur avec la technologie GeneArt® Seamless Cloning & Assembly kit (Life Technologies). Ce vecteur, contenant l'opéron Rnf de *C. ljungdahlii* codon-harmonisé pour l'expression chez *E. coli*, est nommé PL016.

L'opéron natif du complexe Rnf de *C. ljungdahlii* a été exprimé dans le même vecteur, afin de comparer les performances entre le complexe natif et le complexe codon-harmonisé. L'opéron Rnf natif a été amplifié par PCR en utilisant les amorces OL78 et OL79 à partir de l'ADN génomique de la souche *C. ljungdahlii* DSM 13528 qui a été utilisé comme matrice. Ces amorces permettent de créer deux sites de restriction en amont et en aval de l'opéron, respectivement *SpeI* et *SmaI*. Le vecteur PL016 a été digéré par les enzymes de restriction *SpeI* et *SmaI*, puis purifié sur gel d'agarose. La T4 DNA ligase (NEB) a été utilisée pour effectuer la construction selon les recommandations du fournisseur. Le plasmide obtenu a été vérifié par digestion et par séquençage puis nommé *PL019*.

L'opéron natif du complexe Rnf de *Desulfovibrio alaskensis* G20 a également été exprimé dans ce vecteur. L'opéron a été amplifié par PCR, en utilisant les oligonucléotides OL191 et OL192 à partir de l'ADN génomique de *Desulfovibrio alaskensis* G20 DSM 17464 comme matrice. Ces amorces permettent de créer deux sites de restriction en amont et en aval de l'opéron, respectivement *SpeI* et *SmaI*. Le vecteur PL016 a été digéré par les enzymes de restriction *SpeI* et *SmaI* puis purifié sur gel d'agarose. La T4 DNA ligase (NEB) a été utilisée pour effectuer la construction selon les recommandations du fournisseur. Le plasmide obtenu a été vérifié par digestion et par séquençage puis nommé PL033.

4.2.2. Construction des plasmides exprimant les *fnor* (PL024 et PL048)

Les gènes codant pour la ferrédoxine NADP⁺ oxydoréductase *Fnor* de *Clostridium acetobutylicum* (Soucaille *et al.*, 2015) et la transhydrogénase *UdhA* de *E. coli* ont été clonés dans le vecteur PL016. Le gène *fnor* dont la séquence a été codon harmonisée pour l'expression chez *E. coli* a été amplifié par PCR à partir du plasmide *pCF3*udhA*, en utilisant les amorces OL65 et OL66. Ces deux amorces permettent d'ajouter les sites de restriction, respectivement *SpeI* et *SmaI*, utilisés pour le clonage dans le vecteur PL016, sous le contrôle du promoteur PRO1, à la place de l'opéron Rnf. Ce plasmide a été vérifié par digestion et séquençage et nommé PL021. Le plasmide PL021 a ensuite été digéré avec l'enzyme de restriction *SmaI* et déphosphorylé pour le clonage d'*udhA*. Le gène *udhA* a été amplifié

par PCR à partir du plasmide *pCF3*udhA*, en utilisant les amorces OL69 et OL70. Ces amorces ajoutent un site *SmaI* à chaque extrémité du gène, pour effectuer le clonage dans le PL021. L'orientation de l'insertion du gène *udhA* a été vérifiée par PCR en utilisant le primer OL71, puis les clones positifs ont été validés par digestion et séquençage. Ce plasmide, nommé PL024, contient les gènes *fnor* et *udhA* sous le contrôle du promoteur PRO1.

La ferrédoxine NAD(P)⁺ oxydoréductase Fnor de *Chlorobium tepidum* (Muraki *et al.*, 2010) a été clonée dans le vecteur PL016. Le gène *fnor* a été codon-harmonisé pour son expression chez *E. coli*, selon la méthode décrite précédemment, et synthétisé par la société Geneart (ThermoFisher), puis cloné et livré dans le vecteur *pMA_CT1512*. Les sites *SpeI* et *SmaI*, utilisés pour le clonage dans le vecteur PL016, ont été introduits lors de la synthèse du gène. La T4 DNA ligase (NEB) a été utilisée pour effectuer la construction selon les recommandations du fournisseur. Le plasmide obtenu a été vérifié par digestion et par séquençage, puis nommé PL048. Un site *BamHI* a été ajouté en amont du site *SmaI* lors de la synthèse du gène, afin de permettre le clonage d'*udhA*. Le gène *udhA* a été amplifié par PCR, en utilisant les amorces OL221 et OL222, avec le PL024 comme matrice. Le fragment PCR et le PL048 ont été digérés par les enzymes *BamHI* et *SmaI*, puis les fragments d'intérêt ont été purifiés sur gel d'agarose. La T4 DNA ligase (NEB) a été utilisée pour effectuer la construction selon les recommandations du fournisseur. Le plasmide obtenu a été vérifié par digestion et par séquençage, puis nommé PL049.

4.2.3. Construction des plasmides pour la production de la transhydrogénase UdhA

La technologie Profinity eXact™ system, développée par Bio-rad, a été utilisée pour la purification d'UdhA. Cette technologie permet d'avoir une protéine pure et sans tag à l'issue de la purification. Cependant, afin d'optimiser le clivage entre UdhA et le tag, les résidus Thr-Ser ont été rajoutés à l'extrémité N-terminale d'UdhA. Les amorces OL224 et OL206 ont été utilisées pour amplifier les différentes versions du gène *udhA*, natif ou avec les mutations d'intérêt. Le gène *udhA* natif a été amplifié à partir du plasmide PL024, le gène *udhA arg455glu* à partir du plasmide PL031, et le gène *udhA Arg455Leu* à partir du *pCF3*udhA* contenu dans la souche évoluée ST001. Les amorces utilisées pour amplifier *udhA* créent deux zones d'homologie avec le vecteur *pPAL7*, de 25 bp chacune, permettant le clonage par homologie avec le kit GeneArt® Seamless Cloning & Assembly kit (Life Technologies). L'amorce OL224 ajoute également les résidus Thr-Ser en N-terminale d'UdhA, afin d'améliorer la coupure du tag de la protéine lors de la purification. Le plasmide *pPAL7* a été digéré avec les enzymes de restriction *SpeI* et *NotI*, et purifié sur gel d'agarose. L'assemblage entre le fragment d'ADN contenant *udhA* et le vecteur *pPAL7* a été réalisé selon les recommandations du fournisseur. Les plasmides obtenus ont été vérifiés par PCR et par séquençage, et nommés PL042 pour

UdhA natif, PL043 pour UdhA R455Q, et PL044 pour UdhA R455L. Ces plasmides ont ensuite été transformés dans des souches *E. coli* One Shot® BL21 (DE3) pour l'expression des protéines recombinantes. Ces souches ont été vérifiées par PCR et par séquençage, puis nommées ST173 pour UdhA natif, ST174 pour UdhA Arg455Leu, et ST175 pour UdhA arg455glu. Ces souches ont été stockées à -80°C en milieu LB contenant 100 µg/mL carbenicilline, 0.5 % glucose et 20 % (v/v) glycérol jusqu'à leur utilisation.

4.2.4. Modification du plasmide *pCF3**

Le vecteur *pCF3** a été digéré avec les enzymes de restriction *StuI* et *SacI*, afin d'éliminer le gène *fnor* de *C. acetobutylicum*, puis le vecteur résiduel d'intérêt, contenant les gènes *pfor*, *fd*, *adhE2*, *bcd*, *etfAB*, a été purifié sur gel d'agarose. Un adaptateur a ensuite été construit avec les amorces OL24 et OL25 pour recirculariser le vecteur. La ligation entre le vecteur et l'adaptateur a été effectuée avec la T4 DNA ligase (NEB) en présence de 10 µM de chaque amorce. Le plasmide obtenu a été vérifié par digestion et par séquençage, puis nommé PL003. Le marqueur de résistance à la spectinomycine du PL003 a ensuite été remplacé par un marqueur de résistance à l'ampicilline, pour faciliter le remplacement du vecteur dans les souches d'*E. coli* produisant du butanol. Le gène de résistance à l'ampicilline a été amplifié par PCR en utilisant les amorces OL100/OL125, et le vecteur *pUC19* comme matrice. Le vecteur PL003 a été digéré par *NaeI*, puis le fragment d'intérêt, contenant les gènes *pfor*, *fd*, *adhE2*, *bcd*, *etfAB*, a été purifiée sur gel d'agarose. Le clonage par homologie a été réalisé avec le kit GeneArt® Seamless Cloning & Assembly kit (Life Technologies), et le plasmide obtenu est appelé PL025.

4.3. Transformation des souches d'*E. coli*

4.3.1. Transformation par choc thermique

Les cellules *E. coli* OneShot Top10 (Life Technologies), sont utilisées selon les recommandations du fournisseur. Pour la construction d'un vecteur par ligation, 8 µL du produit de ligation sont transformés dans les cellules compétentes afin d'obtenir le plasmide d'intérêt. Pour l'amplification d'un vecteur, 100 ng de vecteur purifié sont utilisés pour transformer les cellules compétentes.

Pour l'expression de protéines recombinantes, les cellules *E. coli* OneShot BL21 (DE3) (Life Technologies), sont utilisées selon les recommandations du fournisseur avec 100ng de vecteur par transformation.

Protocole de transformation par choc thermique :

- Ajouter l'ADN aux 50 μ L de cellules compétentes
- Incuber 30min dans la glace
- Faire un choc thermique à 42°C pendant 30 secondes sans agitation
- Incuber 2 min dans la glace
- Ajouter 250 μ L de milieu SOC
- Incuber 1 heure à 37°C avec une agitation de 170 rpm (ou 2h à 30°C)
- Etaler les cellules sur le milieu de sélection

4.3.2. Transformation par électroporation

Les souches d'*E. coli* utilisées pour la production de butanol ou d'éthanol sont transformées par électroporation selon le protocole suivant : une culture sur la nuit en milieu LB, avec les antibiotiques adéquats si besoin, est réalisée. Le matin de la transformation, une culture de 10 mL de LB est inoculée, en l'inoculant avec la préculture sur la nuit afin d'obtenir une DO_{550nm} initiale de 0.1. Après 4 à 5 heures de culture à 37°C (250 rpm), afin d'obtenir une DO_{550nm} entre 0.4 et 0.6, 2 mL de culture sont centrifugés (12000G – 1min). Les cellules sont ensuite lavées avec 1mL d'eau stérile glacée puis 1mL de glycérol 10% stérile glacé. Enfin, les cellules sont reprises dans un volume final de 50 μ L de glycérol 10% stérile glacé. Toutes ces étapes se déroulent sur glace afin d'améliorer l'efficacité de transformation. Le plasmide est ajouté, entre 0.5 μ g et 1 μ g de plasmide, dans la préparation contenant les cellules compétentes. Les cellules sont ensuite transférées dans une cuve d'électroporation, et électroporées selon les paramètres suivants : 2.5 KV, 200 ohms, 25 μ F. Les cellules sont ensuite reprises avec 900 μ L de milieu SOC et incubées à 37°C sauf pour celles comportant le plasmide thermoinductible qui sont incubées à 30°C, pendant 3 à 5h sous agitation (170rpm). Après la période d'expression phénotypique, les cellules transformées sont concentrées par centrifugation (8000 g – 2min) et reprises dans un volume final de 100 μ L. La totalité des cellules transformées est ensuite étalée sur boîte LB complémentée par l'antibiotique approprié.

4.4. Construction de simples mutants par remplacement du gène d'intérêt par une cassette de résistance à un antibiotique

Les simples mutants de délétion construits lors de cette étude sont obtenus par la technique de remplacement de gènes par une cassette de résistance à un antibiotique mise au point par (Datsenko and Wanner, 2000). Les cellules *E. coli* MG1655 pKD46 compétentes (ST092) sont transformées par un fragment d'ADN linéaire qui possède des zones d'homologie avec des séquences nucléotidiques sur le

chromosome flanquant le gène cible et une cassette de résistance à un antibiotique flanquée des sites FRT. Le plasmide *pkD46* porte les gènes codant le système de recombinaison du bacteriophage λ , constitué de 3 enzymes : Gam qui inhibe le système RecBCD, et Beta et Exo qui favorisent la recombinaison de l'ADN linéaire. L'expression des gènes nécessite une induction à l'arabinose durant la culture, avant transformation avec le fragment linéaire d'ADN. La souche est ensuite vérifiée par PCR, afin de valider le remplacement du gène cible par la cassette de résistance à un antibiotique. Un lysat de phages P1 est ensuite préparé à partir du simple mutant construit pour permettre l'introduction de la mutation dans les souches de production par transduction. Le lysat de phage P1 utilisé pour la délétion du gène *zwf* a été préparé à partir de la souche issues de la collection Keio (Baba *et al.*, 2006; Yamamoto *et al.*, 2009).

4.5. Délétion de gènes par transduction généralisée à l'aide du phage P1

Le remplacement du gène sauvage est effectué par transduction, grâce à des phages P1 lysogéniques. Le lysat de phages est préparé à l'aide d'une souche possédant le gène cible remplacé par un marqueur de résistance à un antibiotique. La construction de cette souche est décrite au chapitre précédent.

4.5.1. Préparation d'un lysat de phages P1

Une colonie unique de cette souche est ensuite utilisée afin de préparer un lysat de phages P1. Une culture de 5 mL de LB avec l'antibiotique correspondant est inoculée et incubée à 37 °C sur la nuit. Cette préculture est utilisée pour inoculer 10 mL de milieu LB + Glucose 2 g/L + CaCl₂ 5 mM, qui est incubé à 37 °C avec agitation. Après une heure d'incubation, 200 μ L de lysat P1_{vir} (environ 5.10⁸ phages/mL) réalisés sur une souche sauvage MG1655 sont ajoutés, et l'incubation est poursuivie à 37 °C pendant 2 à 3 heures jusqu'à la lyse cellulaire de la culture. Au moins une demi-heure après l'observation de la lyse complète, la culture lysée est transférée dans un tube de 15 mL, où sont ajoutés 200 μ L de chloroforme. Après agitation vigoureuse, le mélange diphasique est centrifugé 10 minutes à 4500 g. Le surnageant est délicatement transféré dans un nouveau tube stérile de 15 mL et mélangé avec 200 μ L supplémentaires de chloroforme. Le lysat peut ainsi être stocké à 4°C pendant plusieurs mois.

4.5.2. Transduction en utilisant un lysat de phages

Une colonie unique de la souche réceptrice est utilisée pour inoculer la préculture. La préculture de 5 mL de la souche réceptrice est incubée à 37°C sur la nuit (environ 15 h) et 1.5 mL de la préculture sont centrifugés à 15000 g pendant 2 minutes, puis le culot cellulaire est resuspendu dans 500 μ L de MgSO₄ 10 mM + CaCl₂ 5 mM. 5 tubes de 1.5 mL sont préparés selon les volumes indiqués dans le tableau 23.

Tube n°	Suspension cellulaire (μL)	Lysat de phage P1 (μL)	H2O stérile (μL)
1	100	/	100
2	100	10	90
3	100	50	50
4	100	100	/
5	/	100	100

Tableau 23 : Préparation des tubes pour la transduction généralisée avec le phage P1

Les tubes 1 et 5 sont des contrôles. La variation du volume de lysat de phage permet d'évaluer la force d'infection du lysat de phages et d'optimiser le nombre de transductants.

Les tubes sont incubés à 30°C pendant 30 min sans agitation, puis 100 μL de citrate de sodium 1M sont ajoutés pour stopper l'infection en décrochant les phages des cellules. Une phase d'expression phénotypique d'une heure à 37°C sous agitation est ensuite effectuée après l'addition de 1mL de milieu LB dans chaque tube. Les cellules sont ensuite centrifugées à 4000 g pendant 5min et reprises dans un volume minimal de 100 μL d'eau stérile afin d'être étalées sur le milieu LB solide, dont la concentration d'antibiotique est divisée par deux par rapport aux concentrations d'usage. Les boîtes sont ensuite incubées sur la nuit à 37°C. Dix colonies isolées sont repiquées sur milieu LB solide avec une concentration normale en antibiotique. Les transductants sont ensuite vérifiés par PCR afin de valider le remplacement du gène cible par la cassette de résistance à un antibiotique.

4.6. Elimination des marqueurs de résistance grâce à l'expression de la FLP recombinase portée par le plasmide pCP20

Deux marqueurs de résistance aux antibiotiques, chloramphénicol et kanamycine, ont été utilisés pour l'introduction de modifications chromosomiques chez *E. coli*. Pour l'introduction de modifications supplémentaires, les cassettes de résistance intégrées dans le chromosome de la souche à modifier sont éliminées par recombinaison homologue entre deux régions FRT flanquant la cassette de résistance, à l'aide de la recombinase Flp. La cassette est excisée sous forme d'ADN circulaire incapable de répllication.

Le plasmide *pCP20* exprime la recombinase Flp de façon constitutive à partir d'un vecteur avec une origine de répllication thermosensible (Cherepanov and Wackernagel, 1995). Ce plasmide est transformé dans la souche d'intérêt par électroporation selon le protocole décrit précédemment, avec la particularité d'une expression phénotypique à 30°C. Les transformants sont sélectionnés sur milieu LB solide + Carbeniciline à 30 °C.

Deux colonies indépendantes sont ensuite utilisées pour être cultivées en milieu LB liquide, et incubées à 42°C sur la nuit pour induire la recombinase F1p et perdre le plasmide *pCP20*. Un isolement sur milieu solide LB à 42°C est ensuite réalisé afin d'obtenir des colonies isolées. Dix clones sont repiqués sur milieu solide sur trois boîtes chacun, dans l'ordre suivant : LB+ antibiotique de la cassette à éliminer, LB+ Carbeniciline, et LB sans antibiotique. Les clones devenus sensibles pour les antibiotiques ont effectivement perdu la cassette de résistance et le plasmide *pCP20*. Ces clones sont ensuite vérifiés par PCR pour valider la perte du marqueur de résistance d'intérêt. Si la souche présente déjà des délétions de gènes ou des modifications chromosomiques, l'ensemble des autres loci modifiés est également revalidé par PCR après chaque étape, afin de vérifier que le génotype complet de la souche est correct.

5. Méthodes de biochimie

5.1. Préparation des extraits acellulaires pour les tests d'activité sur la transhydrogénase

Les cellules utilisées pour la préparation des extraits acellulaires ont été cultivées en anaérobiose dans 50 mL de milieu MM en présence ou en absence d'extrait de levure et de nitrate selon les souches analysées. Les cellules ont été récoltées en anaérobiose pendant la phase exponentielle de croissance (DO_{550nm} d'environ 1,0 unité) puis centrifugées à 4000 g pendant 10 min à 4°C. Le culot est lavé deux fois avec 30 mL de tampon de sonication (50mM Tris-HCl à pH7.5 et DTT 2 mM). Le culot est resuspendu dans 2.5 mL de tampon de sonication. Les cellules sont éclatées par sonication avec 4 cycles de 30s, avec 2 min de repos dans la glace entre chaque cycle. L'appareil de sonication (Appareil Bioblock, muni d'une micro-sonde) est réglé à 30% de la puissance maximale pour l'ensemble des cycles. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation 10 minutes à 8500 g à 4°C. Le surnageant est séparé délicatement du culot et considéré comme extrait acellulaire. L'extrait acellulaire est conservé dans la glace et utilisé extemporanément pour le dosage des activités enzymatiques ainsi que la concentration en protéines.

5.2. Préparation des extraits acellulaires pour les tests d'activité FNOR (Ferredoxin NAD(P)⁺ oxydoreductase)

Les cellules utilisées pour la préparation des extraits acellulaires ont été cultivées en anaérobiose dans 50 mL de milieu MAC supplémenté avec 20 g/L de glucose et 5 mM de nitrate. Les cellules ont été récoltées en anaérobiose pendant la phase exponentielle de croissance (DO_{550nm} d'environ 1,0 unité) puis centrifugées à 8500 g pendant 10min à 4°C. Le culot est lavé deux fois avec 30 mL de tampon de sonication (100 mM Tris-HCl à pH7.6, 2 mM DTT). Le culot est resuspendu dans 2,5 mL de tampon de sonication. Les cellules sont éclatées par sonication avec 4 cycles de 30s avec 2min de repos dans la

glace entre chaque cycle. L'appareil de sonication (Appareil Bioblock, muni d'une micro-sonde) est réglé à 30% de la puissance maximale pour l'ensemble des cycles. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation 10 minutes à 8500 g à 4°C. Le surnageant est séparé délicatement du culot et considéré comme extrait acellulaire. L'extrait acellulaire est conservé dans la glace et utilisé pour le dosage des activités enzymatiques en anaérobiose ainsi que pour la détermination de la concentration en protéine.

5.3. Purification de la transhydrogénase d'*E. coli*

Les cultures des différentes souches d'*E. coli* BL21 contenant les vecteurs d'expression des transhydrogénases, sauvage et mutées, sont réalisées en anaérobiose dans 400 mL milieu TB supplémenté avec 0.5 % glucose, 5 mM nitrate et 100µg/mL carbenicilline. Une préculture aérobie de 10 mL en milieu LB est utilisée pour inoculer la culture anaérobie avec une DO_{550nm} d'environ 0.1. Les cultures sont incubées à 37°C et agitées à 170 rpm. Lorsque la DO_{550nm} atteint 0.6 unité, l'expression des protéines recombinantes est induite par l'ajout d'IPTG à une concentration finale de 0.5mM. Les cultures sont ensuite incubées à 37°C pendant 4h.

Les cultures contenant les protéines recombinantes sont récoltées dans l'enceinte anaérobie par centrifugation à 8500 g pendant 10 minutes. Les cellules sont ensuite lavées par 50 mL de tampon 100 mM phosphate de sodium (NaH_2PO_4/Na_2HPO_4) avec 10 µM FAD à pH 7.2 préalablement dégazé à l'azote pur et introduit dans l'enceinte anaérobie. Les cellules sont centrifugées une nouvelle fois à 8500 g pendant 10 min et reprises dans 4 mL de tampon 100 mM phosphate de sodium pH7.2, 10% glycérol, 10µM FAD et 2mM dithiothréitol (DTT). Les cellules peuvent être conservées en fioles anaérobies à -80°C. En vue de la sonication, les cellules sont resuspendues dans un volume final de 12 mL de tampon 100mM phosphate de sodium pH7.2 contenant des inhibiteurs des protéases (cOmplete Tablets, Mini EDTA-free, EASYpack – Roche). Les cellules sont soniquées 4 fois 30 secondes dans la glace avec 2 minutes de pause entre chaque sonication puis centrifugées 10 minutes à 8500 g à 4°C. Une fraction du surnageant issue de la centrifugation est conservée pour tester l'activité enzymatique initiale. Ensuite une étape de précipitation de l'ADN est réalisée, avec l'ajout de streptomycine sulfate à une concentration finale de 13mg/mL. L'extrait est incubé 20 min dans la glace puis centrifugé à 4800 g pendant 20min à 4°C. Le surnageant est collecté, et une fraction est conservée pour tester l'activité enzymatique. Le reste du surnageant est chargé sur la colonne Profinity eXact™ purification cartridge selon les recommandations du fournisseur en utilisant un Akta Purifier 10 (GE). L'ensemble des fractions est conservé afin de tester l'activité enzymatique. Les fractions d'élution sont ensuite concentrées avec une membrane Vivaspin 15R concentrator avec une membrane 10kDa MWCO HY

(Sartorius Stedim Biotech). Durant la concentration, le tampon est également changé afin de conserver l'enzyme purifiée dans un tampon 50 mM Tris-HCl avec 2 mM DTT et 10 µM FAD pH 7.5.

5.4. Analyse des protéines

5.4.1. Concentration en protéines

La concentration en protéines des extraits acellulaires et des protéines purifiées est déterminée par la méthode de Bradford (Bradford, 1976) (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate), en effectuant une dilution des échantillons si nécessaire pour se placer dans la gamme de linéarité de la courbe étalon. L'absorbance est mesurée à 595nm, à l'aide d'un spectrophotomètre (Biochrom Libra), dans des cuves de 1 cm de trajet optique. Les concentrations en protéines sont déterminées à l'aide d'une courbe-étalon (2.5 -20 µg/ml) réalisée à partir d'une solution mère d'albumine bovine (BSA) à 100 µg/mL.

5.4.2. Détermination du poids moléculaire des protéines par chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

Le poids moléculaire natif d'UdhA est estimée, sur la protéine non étiquetée, par chromatographie d'exclusion stérique en utilisant une colonne Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE) sur un Akta Purifier 10 (GE). La colonne est équilibrée avec un tampon PBS (Phosphate Buffered Saline) à pH 7.4 contenant 0.15 M NaCl, 37 mM Na₂HPO₄.2H₂O et 12 mM NaH₂PO₄. La colonne est calibrée avec les standards GE (Gel Filtration Cal Kit High Molecular Weight -GE) qui contiennent les protéines indiquées dans le Tableau 24.

Protéine	Poids moléculaire (kDa)	Concentration (mg/mL)	Volume de rétention (mL)
Thyroglobuline	669	3	9.159
Ferritin	440	0.3	10.28
Aldolase	158	3	12.303
Conalbumin	75	3	13.766
Ovalbumin	44	3	14.731

Tableau 24 : Calibration de la colonne pour détermination de la masse molaire par chromatographie d'exclusion stérique

Le poids moléculaire natif d'UdhA est déterminé en utilisant l'équation obtenue en traçant la courbe du log de la masse molaire des protéines utilisées pour calibrer la colonne en fonction du volume de rétention observé. La calibration de la colonne a été effectuée avant chaque détermination du poids moléculaire d'UdhA. A titre d'exemple, l'équation suivante a été obtenue à partir des standards utilisés : $M = 10^{(-2141 \times V_r + 7.8163)}$, où :

- M correspond à la masse molaire en Da.
- Vr est le volume de rétention en mL déterminé pour UdHA.

5.4.3. Analyse sur gel dénaturant de polyacrylamide (SDS-PAGE) des protéines

Les échantillons mélangés au tampon de dénaturation Laemmli (Tableau 25) sont incubés à 95°C pendant 10 minutes avant le dépôt sur gel de polyacrylamide prêts à l'emploi Mini-PROTEAN TGX 4-15% (Bio-rad). 20µL d'échantillons protéiques sont déposés par puits. Le marqueur de poids moléculaire utilisé est le PageRuler Prestained protein ladder (ThermoFisher Scientific).

Composé	Concentration finale
Tampon Tris-HCl 1M (pH 6.8)	0,0625M
Glycérol	10%
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	10%
β-mercaptoéthanol	5%
Bleu de bromophénol	0,05%

Tableau 25 : Composition du tampon de dénaturation Laemmli (5X)

La migration des gels est réalisée à 120 V pendant 80 min dans du tampon de migration, Tableau 26:

Composé	Concentration finale
Tris base pH 8.3	3 g/L
Glycine	14.4 g/L
SDS	1 g/L

Tableau 26 : Composition du tampon de migration

Après migration, les protéines sont détectées par coloration avec une incubation d'une heure dans la solution InstantBlue Protein Stain (Expedeon), et visualisées sur le système Chemidoc Touch Imaging System (Bio-Rad).

5.5. Mesure des activités enzymatiques

5.5.1. Détermination de l'activité transhydrogénase sur extrait acellulaires et protéines purifiées

Les dosages enzymatiques *in vitro* de l'activité transhydrogénase sont effectués en suivant la réduction directe du thionicotinamide adenine dinucleotide (Thio-NAD⁺) et sont adaptés de la publication de Cao

et al. (2011)(Cao *et al.*, 2011). Les réactions enzymatiques sont effectuées dans des cuves en quartz thermostatées à 35°C. Le milieu réactionnel final est composé de 0,2 mM NADPH, 0,2 mM Thio-NAD⁺, 10 µM FAD, 2 mM DTT et du tampon 50 mM Tris-HCl pH7.5. Un volume variable d'échantillon protéique est ajouté au mélange afin de tester l'activité transhydrogénase. Dans un premier temps, la cuve est complétée avec le volume adéquat de tampon 50 mM Tris-HCl pH7.5, préalablement incubé à 35°C. Ensuite, la quantité souhaitée d'extrait protéique est ajoutée puis laissée à incuber 1 min afin d'atteindre la température souhaitée pour effectuer le test. La dernière étape, qui initie la réaction, consiste à ajouter simultanément le NADPH et le Thio-NAD⁺. L'augmentation de l'absorbance à 400 nm est suivie à l'aide d'un spectrophotomètre SAFAS HP8453A UV/Visible (Hewlett-Packard Chemstation) placé dans l'enceinte anaérobie. Le coefficient d'extinction molaire utilisé est de 11 300 L.Mol⁻¹.cm⁻¹ (Cohen and Kaplan, 1970).

L'activité enzymatique spécifique est calculée de la façon suivante :

$$AS = \frac{\frac{\Delta DO}{min}}{11.3 \cdot l \cdot vol \cdot [prot]}$$

Avec :

- « AS » : activité spécifique exprimée en U/mg
- « l » : trajet optique = 1cm
- « vol » : volume d'échantillon protéique utilisé dans 1ml de milieu réactionnel en mL
- « [prot] » : concentration de l'échantillon protéique en mg/ML
- « ΔDO » variation de l'absorbance à 400 nm

Une unité d'activité enzymatique est définie comme étant la quantité d'enzyme qui catalyse la réduction de 1 µmole de thio-NAD⁺ par minute. (1U/mg= 1µmolThio-NAD⁺/min/mg).

5.5.2. Détermination de l'activité FNOR sur extrait acellulaire

Les dosages enzymatiques *in vitro* de l'activité FNOR sont effectués selon la méthode développée par (Soucaille *et al.*, 2015). Les dosages suivent la réduction directe du méthyl viologène en utilisant soit le NADH soit le NADPH comme donneur d'électrons. Les réactions enzymatiques sont effectuées en anaérobiose dans des cuves en quartz thermostatées à 37°C. Le milieu réactionnel final est composé de 0,25 mM NADPH ou NADH, 10 µM FAD, 3 % EtOH, 45 unités de l'alcool déshydrogénase *S. cerevisiae*, et 10 mM de méthyl viologène dans du tampon 100 mM Tris-HCl pH7,6 avec 2 mM DTT. Un volume

variable d'échantillon protéique est ajouté au mélange afin de déterminer l'activité FNOR. Dans un premier temps, la cuve est complétée avec le volume adéquat de tampon 100 mM Tris-HCl pH7,6 avec 2 mM DTT, préalablement incubé à 37°C. Ensuite, la quantité souhaitée d'extrait protéique est ajoutée puis laissée à incuber 1 min afin d'atteindre la température souhaitée pour effectuer le test. Le FAD, l'éthanol, l'alcool déshydrogénase et le NADPH ou NADH sont ajoutés. La dernière étape, qui initie la réaction, consiste à ajouter du méthyl viologène. L'augmentation de l'absorbance à 560 nm est suivie à l'aide avec un spectrophotomètre SAFAS HP8453A UV/Visible (Hewlett-Packard Chemstation) placé dans l'enceinte anaérobie. Le coefficient d'extinction molaire du méthyl viologène utilisé est $7,71 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

La densité cellulaire des cultures est estimée par mesure de l'absorbance à 550 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre (Biochrom Libra), dans des cuves de 1 cm de trajet optique. Des dilutions sont parfois nécessaires pour rester dans la gamme de linéarité (0,05-0.8 UDO) du spectrophotomètre.

5.6. Dosage des substrats et des produits de fermentation

Les surnageants contenant les produits de fermentation extracellulaires lors des cultures en anaérobiose sont filtrés à l'aide d'un filtre 0.2 μm et analysés par chromatographie liquide à haute pression (HPLC). Le système HPLC utilisé (Agilent 1260 Infinity) est équipé d'un passeur automatique (Agilent Technologies), d'une précolonne (Biorad Microguard), et d'une colonne Biorad Aminex HPX-87H (300nm x 7.8mm). La séparation est réalisée à 14 °C avec un débit d'éluant (H_2SO_4 0.5 mM) de 0.5 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$. La détection des molécules est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre UV (Agilent series 1200 G1362A) à une longueur d'onde de 210 nm pour les acides organiques tels que le pyruvate, et par un réfractomètre (Agilent series 1200 G1314B) pour les sucres et les alcools tels que le glucose, éthanol et le butanol. Les concentrations des composés suivants sont déterminées par réfractométrie : glucose, éthanol, butanol, lactate, succinate, acétate et le butyrate. Les concentrations des différents composés dans les échantillons analysés sont déterminées à l'aide d'une courbe de calibration établie à partir de solutions étalons (Tableau 27).

Produit	Concentration produit d'intérêt (g/L)	
Etalon :	S1	S2
Glucose	15,03	40,05
Ethanol	1,00	4,00
Butanol	6,00	12,00
Etalon :	S3	S4
Acide acétique	0,50	1,00
Acide lactique	0,47	0,95
Acide pyruvique	0,60	1,20
Acide butyrique	1,00	2,00
Acide succinique	0,51	1,02

Tableau 27 : Solutions étalon utilisées pour la calibration de l'HPLC

5.7. Analyse de l'expression des gènes Rnf par immunodétection

Afin de vérifier que les différentes protéines du complexe Rnf de *C. ljungdahlii* sont bien produites chez *E. coli* et identifier la localisation des 6 sous-unités, des anticorps ont été synthétisés par la société GenScript (Hong Kong) Limited. Les sous-unités Rnf B, C et G étant partiellement solubles, des anticorps polyclonaux ont été produits pour ces sous-unités. Les sous-unités Rnf A, D et E étant membranaires, les anticorps ont été générés à partir de séquences peptidiques ayant la probabilité d'être à la surface de la membrane. Les anticorps utilisés sont listés dans le Tableau 28 ainsi que le type d'antigène utilisé (peptide ou protéine soluble) et la séquence de l'antigène.

Anticorps	Type d'antigène	Séquence de l'antigène
RnfA	Peptide	CREKLRLADVPKPLE
RnfE-1	Peptide	CIKMQKLEKANGGEA
RnfE-2	Peptide	MKNLWNIFKKGLIAC
RnfE-3	Peptide	CRAETFASKNPVPS
RnfD-1	Peptide	CIDKFTQPVKFGTRR
RnfD-2	Peptide	CTSLIRLKGGYPEGV
RnfG	Protéine soluble	55-185aa VNDADKFNKVNKGDWYAAQKGNKTIAYVVPAESKGYGGAIPELLVAVTP DGKVIDFSIVSHNETPGLGANASKDSFRGQFKDKKADALTVVKDKSNTKNI QAMTGATITSKAVTKGVKEAVEQVTTFTGGK*
RnfB	Protéine soluble	30-284aa AMEVNPLVDLVEDVLPKGGCGGCFAGCKAYAEAVLDESVPNLCVPG KAAVAEQVAKLTGKSAPPIEPRVAHVRCGGDCTKAVKNFEYEGIHDCVAA NLLEGPKACKYGCLGFGTCVKSCPGAMAMGSNGLPIIDTICTGCGTC VSACPKQVLGFRPVGSKVMVNCNSKNKGGAVRKACSVGCLGCLCAKNC PNDIAKVENNLAVVDQSCASCSEATCLAKCPTGAIKAIVSGTDLQQQSKN EAAANS*
RnfC	Protéine soluble	73-420aa ASTSGKVVDIGDYHPGFGKCAIVIEKDGKDEWVEGIPTSRNWKELSVKE MLGIIREAGIVGMGGATFPVHVKLAPPPDKKVDVIFLNGAECEPYLTADYR SMLENSDKVVAGVQIIMKILNVEKAFVGIEDNKPKAIEAMKKAFFEGTKVQ VVGLPTKYPQGAEKMLINVLTRVPSGGLPADVGAUVQNVGTCIAISDA VERGIPLIQRVTTISGGAIKEPKNILVRIGTTFKDAIDFCGGFKEEPVKIISGGP MMGFAQSNLDIPIMKGSSGILGLTKNDVNDGKESSCIRCGRCLKACPMHL NPSMLSILGQKDLYQEAKEEYNLLDCVECGSCVYTCPARKKI

Tableau 28 : Liste des anticorps dirigés contre les sous-unités du complexe Rnf de *C. ljungdahlii* et séquences des antigènes utilisés pour la production des anticorps.

5.7.1. Préparation des échantillons pour le Western-blot

Le protocole utilisé pour la préparation des échantillons et la réalisation du Western-Blot est adapté à partir de la littérature (Imkamp *et al.*, 2007; Marani *et al.*, 2006). Les souches exprimant le complexe Rnf sont cultivées en anaérobiose dans 200 mL de milieu liquide MM, supplémenté avec 4 g/Ld'extrait de levure et 5 mM de nitrate. Les cellules sont récoltées, après 48h de culture en anaérobiose, durant la phase exponentielle de croissance, et centrifugées à 5000 g pendant 10 min à 4°C. Le culot est lavé deux fois avec 30 mL de tampon de sonication composé de 50 mM Tris-HCl, MgSO₄ 20mM, DTT 2mM, glycerol 20%, et le cocktail inhibiteur des protéases (cOmplete Tablets, Mini EDTA-free, EASYpack - Roche) à pH 7. Le culot est resuspendu dans 2.5mL de tampon de sonication. Les cellules sont éclatées par sonication avec 4 cycles de 30s avec 2min de repos dans la glace entre chaque cycle. L'appareil de sonication (Appareil Bioblock, muni d'une micro-sonde) est réglé à 30% de la puissance maximale

pour l'ensemble des cycles. Les débris cellulaires et les corps d'inclusion sont séparés du surnageant par centrifugation 15 minutes à 5000 g à 4°C. Le surnageant est ensuite ultra-centrifugé à 100 000 g pendant 2 h à 4°C afin de séparer la fraction cytoplasmique de la fraction membranaire.

5.7.2. Western-blot des protéines composant le complexe Rnf

Les trois fractions, débris cellulaires/corps d'inclusion, cytoplasmique, et membranaire, sont ensuite chargées sur un gel SDS-PAGE (Mini-PROTEAN TGX 4-15% (Bio-rad)). Après séparation sur le gel de polyacrylamide, les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose par application d'un champ électrique. L'électrotransfert semi-sec s'effectue pendant 15min à 15V dans du tampon de transfert avec le Trans-Blot® semi-dry (Biorad, 1703940). La composition des tampons utilisés lors du Western-blot sont présentés dans les Tableaux 29, 30 et 31. Le marqueur de taille utilisé est le PageRuler Prestained protein ladder (ThermoFisher Scientific), il est visible sur la membrane de nitrocellulose après transfert.

Composé	Concentration Finale
Glycine	192mM
Tris	25mM
Ethanol	20%

Tableau 29 : Composition du tampon de transfert

Après l'électrotransfert, la membrane de nitrocellulose est saturée avec une solution de PBST (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄, 0.5% Tween 20, pH 7,4) contenant 2% de BSA pendant 1h30 à température ambiante sous une faible agitation (30 rpm). Trois lavages sont ensuite effectués pendant 5 minutes avec le tampon de rinçage (Tableau 31). Après lavage, la membrane est incubée pendant 1h30 à température ambiante sous une faible agitation (30 rpm) en présence de l'anticorps primaire dirigé contre l'une des sous unités du complexe Rnf. L'anticorps primaire est dilué 5000 fois dans 20mL d'une solution de PBS -tween 0.1%. Trois lavages de 5min sont effectués avec la solution de rinçage. Après lavage, la membrane est incubée pendant 1h30 à température ambiante sous une faible agitation (30 rpm) en présence de l'anticorps secondaire anti-lapin, conjugué à la peroxydase (HRP). L'anticorps secondaire est dilué 10000 fois dans 20 mL d'une solution de PBS -tween 0.1%. Deux lavages de 5min sont effectués avec la solution de rinçage, suivis de 2 lavages de 5 minutes avec une solution de PBS. La membrane est révélée, en utilisant le kit ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent (GE) selon les recommandations du fournisseur, et visualisée sur le système Chemidoc Touch Imaging System (Bio-Rad).

Composé	Concentration finale
NaCl	137 mM
KCl	2.7 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
KH ₂ PO ₄	2 mM

Tableau 30 : Composition du tampon PBS à pH 7.4

Tampon de saturation	Tampon de rinçage
Tampon PBS + tween 0.5 % + BSA 3 %	Tampon PBS + tween 0.1 %

Tableau 31 : Composition des tampons de saturation et de rinçage

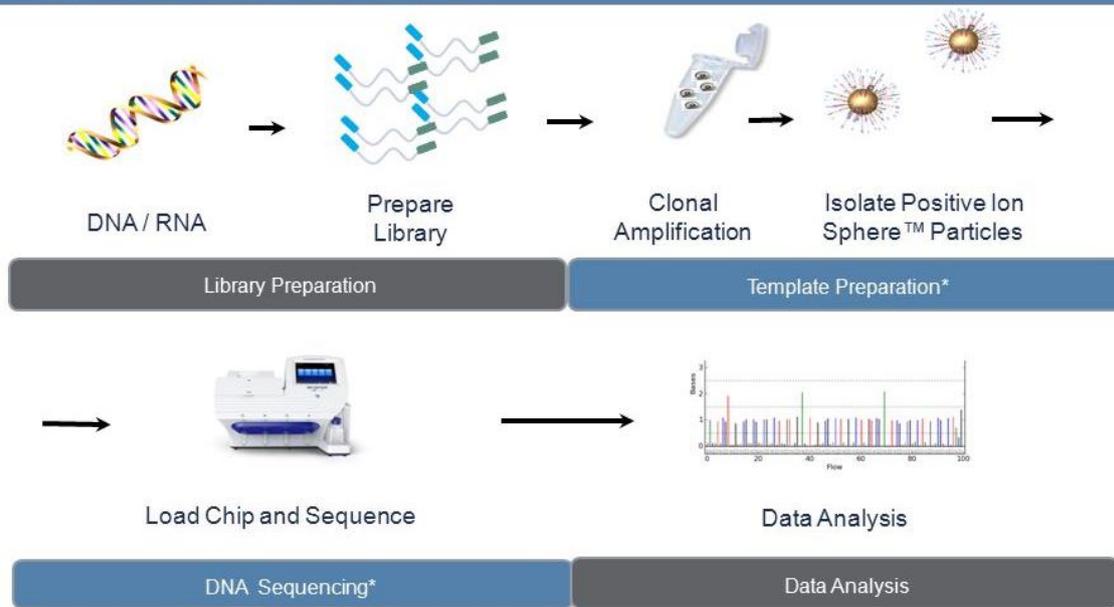
6. Modélisation moléculaire

Le modèle moléculaire 3D de la transhydrogénase soluble d'*E. coli* UdhA a été construit par méthode de Threading à l'aide du serveur I-TASSER [(Roy *et al.*, 2010), (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>)] . La structure cristallographique de la lipoamide déshydrogénase de *Thermus thermophilus* (Code PDB : 2YQU, 32% d'identité en acides aminés avec UdhA) a été principalement utilisée comme support structural de référence pour la modélisation d'UdhA et la construction d'un dimère structural. L'introduction des mutations ponctuelles ainsi que l'analyse visuelle des modèles et structures moléculaires a été réalisée à l'aide du logiciel Pymol (DeLano Scientific).

7. Séquençage complet du génome d'*E. coli*

Un reséquençage complet de génome est effectué pour identifier les mutations survenues lors de l'adaptation des souches en milieu minéral à l'aide de La technologie Ion torrent (ThermoFischer, Plateforme GET-Biopuces (Génopole -Toulouse). Cette méthode de séquençage repose sur la libération de protons lors de la fixation des dNTP sur l'ADN matrice. Les modifications de pH sont mesurées à l'issue de la libération des protons grâce à des capteurs semi-conducteurs placés dans chaque puits contenant une bille avec un fragment d'ADN à séquencer (Figure 27). Ce système permet d'analyser des millions de puits simultanément, et ainsi déterminer la séquence de chaque fragment d'ADN présent par bille.

Ion Workflow Overview



5

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Figure 27 : Déroulement des opérations lors du séquençage Ion torrent (ThermoFisher) (<https://www.youtube.com/watch?v=WYBzbxIfuKs>)

7.1. Préparation de l'ADN génomique

Les ADN génomiques des souches d'*E. coli* sont extraits avec le kit Sigma GenElute Bacterial Genomic DNA kit selon les recommandations du fournisseur en procédant au traitement avec la RNase. La qualité et la quantité des ADN extraits et purifiés sont évaluées par lecture de l'absorbance UV à trois longueurs d'onde 260 nm, 280 nm et 230 nm par le NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer (ThermoFisher). Pour satisfaire les exigences de qualité requises par la plateforme, les rapports DO_{260nm}/DO_{280nm} (estimation de la présence de protéines) et DO_{260nm}/DO_{230nm} (estimation de la présence de solvants) doivent être supérieurs à 1.8. De plus, la concentration de l'ADN purifié doit être supérieure à 50 ng/μL. L'ADN purifié est également déposé sur gel d'agarose 0.8% afin de vérifier la présence d'une bande unique de taille élevée et l'absence de « smear », signe d'une dégradation de l'échantillon. Si l'extraction d'ADN remplit l'ensemble de ces conditions, il est ensuite transmis à la plateforme. La qualité de l'ADN est de nouveau vérifiée, à l'aide d'un fluoromètre Qubit2.0 (ThermoFisher). Ensuite, les librairies d'ADN sont préparées à l'aide du kit NEBNext® Fast DNA Fragmentation & Library Prep selon les recommandations du fournisseur. Les librairies sont ensuite quantifiées et leurs qualités vérifiées à l'aide du 2100 Bioanalyzer (Agilent) et du Qubit2.0

(Thermofischer). A partir d'une quantité équimolaire d'ADN de chaque librairie, l'ADN est amplifié par EmPCR, directement sur les billes. Les billes sont ensuite injectées sur une puce Ion530, et séquencées avec un Ion S5 (Ion Torrent Technology - Thermofischer) selon les recommandations du fournisseur.

7.2. Analyse des résultats

Cette méthode de séquençage va générer environ 1,600,000 séquences d'une taille comprise entre 150 à 240 paires de bases qui sont ensuite alignées par rapport au génome de référence d'*E. coli* MG1655 par le logiciel Torrent Suite software (5.0.4) afin de reconstruire le génome de la souche. La détection des SNP, des insertions, et des délétions, est effectuée par le logiciel Torrent Variant Caller (5.0-13).

7.3. Validations des mutations par séquençage de Sanger

Les mutations identifiées par le reséquençage global sont ensuite vérifiées par séquençage direct (Sanger) du gène où la mutation a été détectée, afin d'écartier les faux positifs. Des amorces sont dessinées, afin d'effectuer le séquençage direct du gène ayant une mutation potentielle.

CHAPITRE III

DEVELOPPEMENT D'UNE SOUCHE D'*E. COLI* CHASSIS POUR LE CRIBLAGE *IN VIVO* DE FERREDOXINE NAD(P)⁺ OXYDOREDUCTASES FONCTIONNELLES

Chapitre III : Développement d'une souche d'*E. coli* châssis pour le criblage *in vivo* de ferrédoxine NAD(P)⁺ oxydoréductases fonctionnelles

1.1. Introduction

Comme présenté au chapitre I 2.2.2.4., la souche d'*E. coli* MG1655, ΔdhA , $\Delta pflAB$, $\Delta ack-pta$, $\Delta iscR$, $\Delta frdabcd$, $\Delta aceE$, $\Delta mgsA$, $\Delta adhE$ $\Delta melB::TT02$ $ptrc01/RBS01^*2crt-hbd$ $ptrc30RBS01^*2atoB$ $pCF3^*udhA$ précédemment construite dans l'équipe d'Ingénierie et d'Evolution des Voies Métaboliques chez les procaryotes est la souche de base utilisée pour ces travaux. Le métabolisme de cette souche d'*E. coli* a été rationnellement modifié de telle sorte qu'en anaérobiose, les vitesses de croissance et de consommation de glucose soient couplées à la vitesse de production de n-butanol, la production de n-butanol étant nécessaire pour maintenir l'équilibre redox cellulaire. Cette souche est capable de produire du butanol comme produit principal de fermentation ($3,3 \pm 0,2$ g/L de n-butanol), lors de cultures anaérobies discontinues, sans régulation du pH, en utilisant le glucose comme source de carbone, dans un milieu minéral supplémenté avec 4 g/L d'extrait de levure et 5mM de nitrate, à un rendement de 0,23 g/g, soit 56% du rendement théorique maximum. Toutefois, l'addition de nitrate dans le milieu de culture pour la production d'ATP, nécessaire à la croissance anaérobie, a pour conséquence de consommer du NADH. Cette consommation de NADH pour la production d'ATP se fait au détriment de la production de butanol. En effet, la voie de conversion du pyruvate en n-butanol consomme 5 moles de NADH et 3 moles de ferrédoxine réduite pour produire une mole de n-butanol. L'expression la Ferrédoxine NADP⁺ oxydoréductase de *C. acetobutylicum* permet la réoxydation de la ferrédoxine réduite en générant 3 moles de NADPH converties en 3 moles de NADH par la surexpression de la transhydrogénase UdhA d'*E. coli*. La consommation de NADH par la respiration nitrate a pour conséquence de diminuer le rendement de conversion butanol au profit de la production de butyrate, qui ne consomme pas de NADH.

Une alternative pour restaurer l'équilibre redox en faveur de la production de butanol serait d'exprimer le complexe Rnf dans la souche productrice de butanol. Celui-ci catalyserait la réoxydation de la ferrédoxine réduite et la réduction du NAD⁺, générant un gradient d'ions transmembranaires conduisant à la génération d'ATP. Ainsi, la réoxydation de la ferrédoxine réduite serait couplée à la production d'ATP, ce qui devrait permettre de s'affranchir de l'addition de nitrate dans le milieu de culture. Toutefois, la fonctionnalité *in vivo* de ce type de complexe chez *E. coli* n'ayant jamais été démontrée, une souche spécifique a tout d'abord été développée pour valider que ce complexe est bien fonctionnel *in vivo* chez *E. coli*. Une souche génétiquement modifiée d'*E. coli* chez laquelle la croissance et la production d'éthanol sont couplées et dépendantes de la fonctionnalité d'une

Ferrédoxine NAD(P)⁺ oxydoréductase a été construite. Pour démontrer la faisabilité de l'approche, trois types de Ferrédoxine NAD(P)⁺ oxydoréductases ont été testées : i) la ferrédoxine NADP⁺ oxydoréductase de *C. acetobutylicum*, couplée à l'expression de la transhydrogénase UdhA ; ii) la ferrédoxine NAD(P)⁺ oxydoréductase de *C. tepidum*, capable d'utiliser le NAD⁺ et le NADP⁺ ; et iii) les complexes Rnf de *C. ljungdahlii* et *Desulfovibrio alaskensis*. De façon plus générale, cette souche constitue un outil de criblage pour sélectionner et faire évoluer *in vivo* des Ferrédoxine NAD(P)⁺ oxydoréductases. Les résultats obtenus au cours de cette étude sont présentés ci-dessous. Ils ont été rédigés sous la forme d'un article scientifique intitulé « **Development of a new engineered *E. coli* strain for *in vivo* functional screening and directed evolution of Ferredoxin NAD(P)⁺ oxidoreductases** » afin de pouvoir le soumettre à un journal scientifique.

1.2. Résultats

Abstract:

Ferredoxin NAD(P)⁺ oxidoreductases catalyze the reduction of NADP⁺ or NAD⁺ by reduced ferredoxin to NAD(P)⁺, and are widely distributed in anaerobic metabolism. In this study, a novel engineered *E. coli* strain for the *in vivo* selection and directed evolution of functional ferredoxin NAD(P)⁺ oxidoreductases (FNOR) was developed. Growth and ethanol production in the engineered strain were strictly dependent of the functionality of an FNOR. Through this study, we showed that: i) the *E. coli* chassis strain was unable to grow on glucose mineral medium in the absence of a functional FNOR; ii) the engineered *E. coli* strain led to select and evolve FNOR enzymes *in vivo*; iii) the improved phenotype of the evolved engineered *E. coli* strain was caused by the genetic mutations identified by genome resequencing; and iv) the biochemical characterization of the selected evolved enzyme variants explained the observed phenotypes.

Keywords: ferredoxin NAD(P)⁺ oxidoreductase, Rnf complex, growth-based selection, Ferredoxin dependent pathway, homoethanol pathway, *E. coli* platform, enzyme variants characterization, transhydrogenase

A. Introduction

Ferredoxin (Fd) is a soluble iron sulfur protein able to transfer electrons in biochemical reactions (Bruschi, 2002; Mortenson *et al.*, 1962). First isolated from the anaerobic bacterium *Clostridium pasterianum* (Valentine, 1964), Fd is a widespread molecule, from plants to bacteria and archaea, and ubiquitous among clostridia (Jones and Woods, 1986). The Clostridial Fds are small (55 residues) and contain two [4Fe-4S] clusters. They act as a low potential electron carriers ($E^\circ \approx -450$ mV) achieving the

[4Fe-4S]^{2+,+} redox transition. *In-vivo*, they are involved in anaerobic metabolic pathways, such as hydrogen production (Gauquelin *et al.*, 2018; Girbal *et al.*, 2005), alcohol production (Lo *et al.*, 2017; Qi *et al.*, 2018; Tian *et al.*, 2017, 2016), steroid hydroxylation (Bruschi, 2002) and more rarely in aerobic and photosynthetic electron transfer chains (Meyer, 2008). In anaerobic microorganisms, ferredoxin dependent pathways are specifically involved in the production of industrially valuable biochemicals, such as n-butanol (Qi *et al.*, 2018; Yoo *et al.*, 2015), isopropanol (Dusséaux *et al.*, 2013), 1,3-propanediol (González-Pajuelo *et al.*, 2005; Nakamura and Whited, 2003) and ethanol (Lo *et al.*, 2017; Tian *et al.*, 2017, 2016). The carbon distribution between the different metabolic pathways, and consequently, the yield of production of these compounds, is directly linked to the NAD(P)H availability in the cells. In anaerobes, there are specific enzymes called the ferredoxin NAD(P)⁺ reductases (FNOR) (EC 1.18.1.2/ EC 1.18.1.3) which play a crucial role by connecting NADH and NADPH dependent pathways to ferredoxin dependent pathways (Jones and Woods, 1986; Mulo and Medina, 2017; Petitdemange *et al.*, 1976; Yoo *et al.*, 2015). In the literature, the overexpression of native or heterologous FNOR enzymes in metabolic engineering strategies has shown a great potential to improve the production of valuable biochemicals (Crépin *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2016; Lo *et al.*, 2017; Qi *et al.*, 2018; Tian *et al.*, 2016).

In the recent years, the development of system biology tools for the metabolism analysis led to an improved knowledge of the anaerobic metabolism and its regulation (Yoo *et al.*, 2015). On the other hand, fast complete genome sequencing of various microorganisms could enable to identify genes potentially encoding for an FNOR. However, it is further necessary to validate that the encoded protein possesses the expected catalytic activities, which could be time-consuming and labor-intensive tasks involving production purification and *in vitro* enzymatic assays (Tian *et al.*, 2016).

Heterologous expression in model organisms such as *E. coli* represents an interesting alternative to the native producer, to increase the production of industrial biochemicals (Meynial-Salles *et al.*, 2005b). However, the expression of heterologous enzymes from anaerobes in *E. coli* raises several challenges to obtain functional enzymes. The expression of these enzymes can be toxic for the host, proteins could be poorly soluble and/or conformed. The transfer of a complete heterologous pathway is a huge task and requires modifying the metabolism of the host to sustain the new pathway. To maximize the chances of success, it is interesting to know if an enzyme is effective in the new host before the assembly of the complete pathway.

The development of screening platforms in model organisms is a powerful tool to accelerate the construction of synthetic pathways (Zhang *et al.*, 2018). These platforms allow to rapidly screen a large

amount of candidate proteins, and determine the functionality of the enzymes *in vivo*. *E. coli* has been massively used for the development of such platforms, using various methods of detection to screen libraries. Such screening platforms, based on growth selection, have been used to select heterologous pathways and adjust the expression and the enzymes activities for an optimal production of the product of interest (Wilbanks *et al.*, 2018). These platforms are also used to select enzymes with a specific activity, such as NADPH dependent reactions. They also force the direct evolution of enzymes to change the substrate specificity (Zhang *et al.*, 2018).

In this work, we developed a growth-based selection platform with an *E. coli* strain, named ST034, for the direct *in vivo* selection of functional ferredoxin NAD(P)⁺ reductases (Figure 1). The selection platform operates according to the fermentative redox balance principles. The native mixed-acid fermentation pathways are disrupted, and the decarboxylation of pyruvate is ensured by the *pfor* and the *fd* from *Clostridium acetobutylicum*. Cell growth depends on the heterologously introduced FNOR enzyme to form a closed redox cycle with the ferredoxin node, and ensure the conduct of the glycolysis with a production of ethanol as a result.

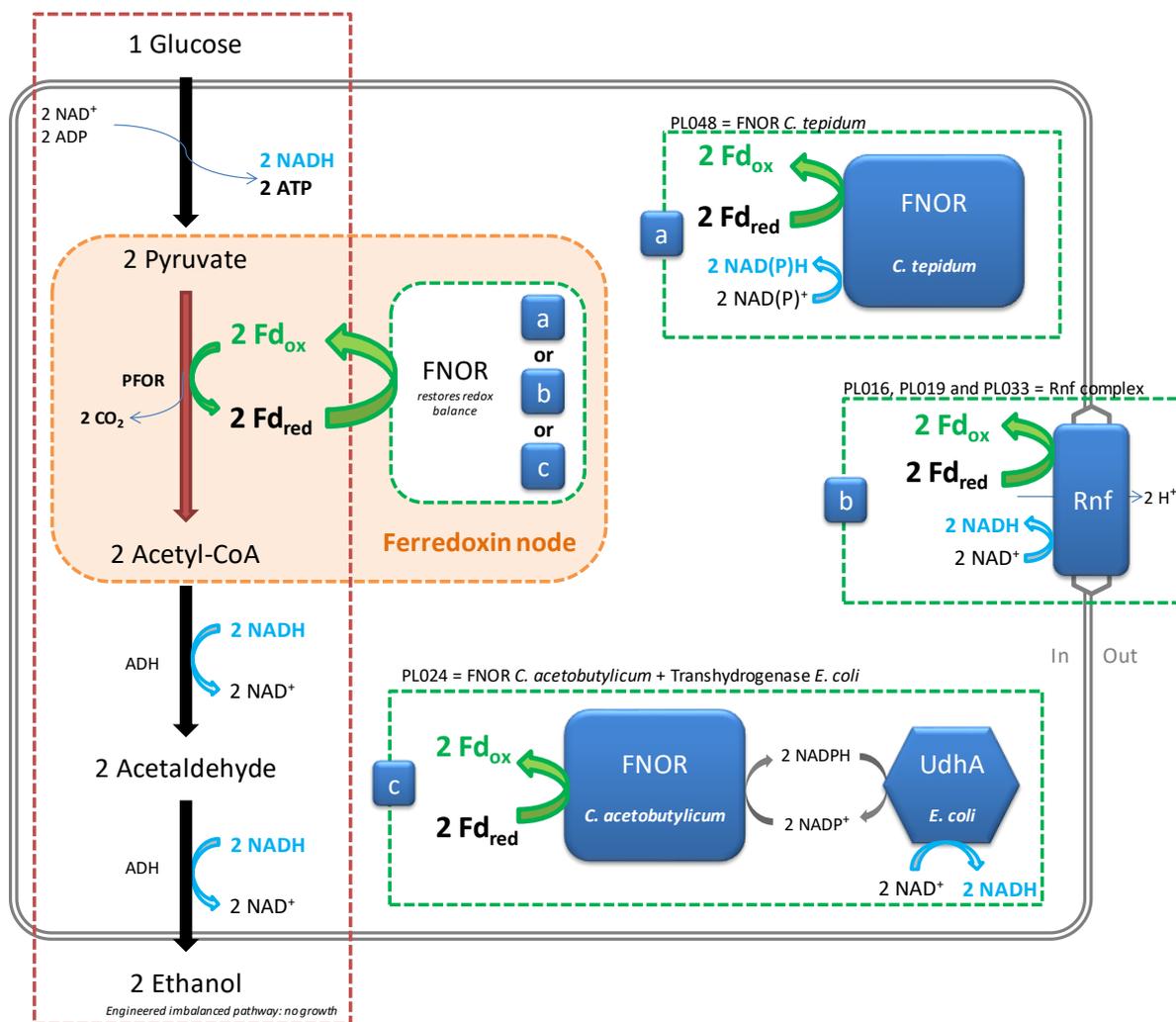


Figure 1: Ferredoxin dependent pathway for ethanol production under strict anaerobic conditions in the growth based selection platform ST034 with an unbalanced redox state in anaerobic conditions. 3 potential FNOR modules were expressed in different strains to evaluate their ability to equilibrate the redox balance and produce ethanol: the Rnf complex, the FNOR from *C. tepidum*, or the FNOR from *C. acetobutylicum*. The black arrows represent the native metabolism of *E. coli*, the red arrow corresponds to the ferredoxin node of *C. acetobutylicum* with the Pfor and the ferredoxin. The electron transfers of Fd are represented with green arrows and the ones of NADH in blue arrows. The red square corresponds to the unbalanced redox pathway, and the green squares correspond to the possible FNOR modules which allow balancing de redox state when expressed in the chassis strain. The orange square represents the ferredoxin node with the Pfor/Fd associated with a functional FNOR.

We selected three distinct kinds of FNOR to validate the functionality of the platform: i) the ferredoxin NADP⁺ reductase from *C. acetobutylicum*, already characterized, and able to catalyze the reduction of NADP⁺ with reduced ferredoxin in *E. coli* (Soucaille *et al.*, 2015). As the production of ethanol needs 4 moles of NADH, the transhydrogenase Udha of *E. coli* was co-expressed with the FNOR, to convert the NADPH formed by the ferredoxin NADP⁺ reductase to NADH; ii) the ferredoxin NAD(P)⁺ reductase from *C. tepidum*, already described to efficiently catalyze the reduction of both NADP⁺ and NAD⁺ with

reduced ferredoxin in a heterologous host *C. acetobutylicum* (Qi *et al.*, 2018; Seo *et al.*, 2016). iii) the Rnf complex, a membrane-associated complex composed of six to seven subunits harboring a ferredoxin:NAD⁺ oxidoreductase activity, able to reoxidize reduced ferredoxin with the reduction of NAD⁺ coupled to an electron transport chain with an ionic channel (Biegel *et al.*, 2011). There are two types of ion transporters (Hess *et al.*, 2016) for the Rnf complex: sodium transporters (Boiangiu *et al.*, 2006; Imkamp *et al.*, 2007) and proton transporters (Tremblay *et al.*, 2012). Both of these transports create a gradient of ions, generating a membrane potential that is then used by ATP synthase (Fritz *et al.*, 2008; Suzuki *et al.*, 2002) to produce ATP (Biegel and Muller, 2010; Hess *et al.*, 2013). Two Rnf complexes were selected here, the Rnf complex of *C. ljungdahlii* and of *D. alaskensis* G20, for their putative ability of proton transporter adapted for overexpression in *E. coli*, as ATP synthases are only proton dependent. The choice of the putative Rnf complex from *D. alaskensis* was based on the presence of an additional gene in the native operon, *rnfF*, encoding a Flavin transferase that catalyses the transfer of the FMN moiety of FAD and the covalent binding to the hydroxyl group of a threonine residue in a target flavoprotein (Bertsova *et al.*, 2013). RnfF might be necessary to have the proper cofactors attached to the subunits D and G: subunits RnfD and G require the FMN covalently bound to particular threonines (Backiel *et al.*, 2008).

Here, we successfully built and demonstrated the functionality of the engineered *E. coli* strain for the *in vivo* selection of a functional FNOR, which is only able to grow in glucose mineral medium when associated to a functional FNOR. The expression of the FNOR from *C. acetobutylicum* or *C. tepidum* in the platform strain restored its growth in glucose mineral medium, producing ethanol as the only fermentation product. The applied strategy led to the independent selection of the evolved transhydrogenase UdhA and FNOR of *C. tepidum*. The evolved enzyme variants were never described before, and were biochemically characterized *in vitro* to understand the effect of the mutations identified.

B. Material and methods

a) Strains and Plasmids

The strains and plasmids used in this study are summarized in Table 1.

Plasmid/ Strain	Description	Reference/Source
Strains		
TOP10	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara leu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen
BL21 (DE3)	F- <i>ompT hsdS_B</i> (<i>r_BM_B⁻</i>) <i>gal dcm</i> (DE3)	Invitrogen
ST034	MG1655, Δ <i>ldhA</i> :: Δ <i>pflAB</i> :: Δ <i>ack-pta</i> :: Δ <i>iscR</i> :: Δ <i>frdABCD</i> :: Δ <i>aceE</i> :: Δ <i>mgsA</i> :: <i>AdhE V360L</i> :: <i>pCF2(pfor_{CA} fd_{CA})</i> ; <i>Spec⁺</i>	(Soucaille <i>et al.</i> , 2015)
ST037	MG1655, Δ <i>ldhA</i> :: Δ <i>pflAB</i> :: Δ <i>ack-pta</i> :: Δ <i>iscR</i> :: Δ <i>frdABCD</i> :: Δ <i>aceE</i> :: Δ <i>mgsA</i> :: <i>AdhE V360L</i> :: <i>pCF2(pfor_{CA} fd_{CA})</i> ; <i>pPL016 (rnfCDGEAB_{CL} harmonized)</i> ; <i>Spec⁺ Kana⁺</i>	this study
ST040	MG1655, Δ <i>ldhA</i> :: Δ <i>pflAB</i> :: Δ <i>ack-pta</i> :: Δ <i>iscR</i> :: Δ <i>frdABCD</i> :: Δ <i>aceE</i> :: Δ <i>mgsA</i> :: <i>AdhE V360L</i> :: <i>pCF2(pfor_{CA} fd_{CA})</i> ; <i>pPL019 (rnfCDGEAB_{CL})</i> ; <i>Spec⁺ Kana⁺</i>	this study
ST045	MG1655, Δ <i>ldhA</i> :: Δ <i>pflAB</i> :: Δ <i>ack-pta</i> :: Δ <i>iscR</i> :: Δ <i>frdABCD</i> :: Δ <i>aceE</i> :: Δ <i>mgsA</i> :: <i>AdhE V360L</i> :: <i>pCF2(pfor_{CA} fd_{CA})</i> ; <i>pPL024 (fnor_{CA} udhA_{EC})</i> ; <i>Spec⁺ Kana⁺</i>	this study
ST071-6	MG1655, Δ <i>ldhA</i> :: Δ <i>pflAB</i> :: Δ <i>ack-pta</i> :: Δ <i>iscR</i> :: Δ <i>frdABCD</i> :: Δ <i>aceE</i> :: Δ <i>mgsA</i> :: <i>AdhE V360L</i> :: <i>Zwf*(Gly295_Glu491del)</i> :: <i>pCF2(pfor_{CA} fd_{CA})</i> ; <i>pPL031 (fnor_{CA} udhA_{EC}R455Q)</i> ; <i>Spec⁺ Kana⁺</i>	this study
ST122	MG1655, Δ <i>ldhA</i> :: Δ <i>pflAB</i> :: Δ <i>ack-pta</i> :: Δ <i>iscR</i> :: Δ <i>frdABCD</i> :: Δ <i>aceE</i> :: Δ <i>mgsA</i> :: <i>AdhE V360L</i> :: <i>Zwf*(Gly295_Glu491del)</i> :: <i>pCF2(pfor_{CA} fd_{CA})</i> ; <i>Spec⁺</i>	this study
ST124	MG1655, Δ <i>ldhA</i> :: Δ <i>pflAB</i> :: Δ <i>ack-pta</i> :: Δ <i>iscR</i> :: Δ <i>frdABCD</i> :: Δ <i>aceE</i> :: Δ <i>mgsA</i> :: <i>AdhE V360L</i> :: <i>Zwf*(Gly295_Glu491del)</i> :: <i>pCF2(pfor_{CA} fd_{CA})</i> ; <i>pPL031 (fnor_{CA} udhA_{EC}R455Q)</i> ; <i>Spec⁺ Kana⁺</i>	this study
ST127	MG1655, Δ <i>ldhA</i> :: Δ <i>pflAB</i> :: Δ <i>ack-pta</i> :: Δ <i>iscR</i> :: Δ <i>frdABCD</i> :: Δ <i>aceE</i> :: Δ <i>mgsA</i> :: <i>AdhE V360L</i> :: <i>Zwf*(Gly295_Glu491del)</i> :: <i>pCF2(pfor_{CA} fd_{CA})</i> ; <i>pPL024 (fnor_{CA} udhA_{EC})</i> ; <i>Spec⁺ Kana⁺</i>	this study
ST149	MG1655, Δ <i>ldhA</i> :: Δ <i>pflAB</i> :: Δ <i>ack-pta</i> :: Δ <i>iscR</i> :: Δ <i>frdABCD</i> :: Δ <i>aceE</i> :: Δ <i>mgsA</i> :: <i>AdhE V360L</i> :: Δ <i>zwf</i> :: <i>pCF2(pfor_{CE} fd_{CE})</i> ; <i>Spec⁺</i>	this study
ST153	MG1655, Δ <i>ldhA</i> :: Δ <i>pflAB</i> :: Δ <i>ack-pta</i> :: Δ <i>iscR</i> :: Δ <i>frdABCD</i> :: Δ <i>aceE</i> :: Δ <i>mgsA</i> :: <i>AdhE V360L</i> :: Δ <i>zwf</i> :: <i>pCF2(pfor_{CE} fd_{CE})</i> ; <i>pPL024 (fnor_{CA} udhA_{EC})</i> ; <i>Spec⁺ Kana⁺</i>	this study
ST154	MG1655, Δ <i>ldhA</i> :: Δ <i>pflAB</i> :: Δ <i>ack-pta</i> :: Δ <i>iscR</i> :: Δ <i>frdABCD</i> :: Δ <i>aceE</i> :: Δ <i>mgsA</i> :: <i>AdhE V360L</i> :: Δ <i>zwf</i> :: <i>pCF2(pfor_{CE} fd_{CE})</i> ; <i>pPL031 (fnor_{CA} udhA_{EC}R455Q)</i> ; <i>Spec⁺ Kana⁺</i>	this study
ST159	MG1655, Δ <i>ldhA</i> :: Δ <i>pflAB</i> :: Δ <i>ack-pta</i> :: Δ <i>iscR</i> :: Δ <i>frdABCD</i> :: Δ <i>aceE</i> :: Δ <i>mgsA</i> :: <i>AdhE V360L</i> :: <i>pCF2(pfor_{CA} fd_{CA})</i> ; <i>pPL033 (rnfCDGEABF_{DA})</i> ; <i>Spec⁺ Kana⁺</i>	this study
ST173	F- <i>ompT hsdS_B</i> (<i>r_BM_B⁻</i>) <i>gal dcm</i> (DE3) <i>pPL042 (udhA_{EC})</i> ; <i>Amp⁺</i>	this study
ST175	F- <i>ompT hsdS_B</i> (<i>r_BM_B⁻</i>) <i>gal dcm</i> (DE3) <i>pPL043 (udhA_{EC}R455Q)</i> ; <i>Amp⁺</i>	this study

ST180	MG1655, $\Delta ldhA:: \Delta pflAB:: \Delta ack-pta:: \Delta iscR:: \Delta frdABCD:: \Delta aceE:: \Delta mgsA:: AdhE V360L:: pCF2(pfor_{CA} fd_{CA}); pPL048 (fnor_{CT}); Spec^+ Kana^+$	this study
ST184	MG1655, $\Delta ldhA:: \Delta pflAB:: \Delta ack-pta:: \Delta iscR:: \Delta frdABCD:: \Delta aceE:: \Delta mgsA:: AdhE V360L:: \Delta zwf:: pCF2(pfor_{CE} fd_{CE}); pPL048 (fnor_{CT}); Spec^+ Kana^+$	this study
ST192	MG1655, $\Delta ldhA:: \Delta pflAB:: \Delta ack-pta:: \Delta iscR:: \Delta frdABCD:: \Delta aceE:: \Delta mgsA:: AdhE V360L:: \Delta zwf:: pCF2(pfor_{CE} fd_{CE}); pPL053 (fnor_{CT} (Asn264del)); Spec^+ Kana^+$	this study
ST193	MG1655, $\Delta ldhA:: \Delta pflAB:: \Delta ack-pta:: \Delta iscR:: \Delta frdABCD:: \Delta aceE:: \Delta mgsA:: AdhE V360L:: pCF2(pfor_{CA} fd_{CA}); pPL053 (fnor_{CT} (Asn264del)); Spec^+ Kana^+$	this study
ST194	MG1655, $\Delta ldhA:: \Delta pflAB:: \Delta ack-pta:: \Delta iscR:: \Delta frdABCD:: \Delta aceE:: \Delta mgsA:: AdhE V360L:: pCF2(pfor_{CA} fd_{CA}); pPL053 (fnor_{CT} (Asn264del)); Spec^+ Kana^+$	This study
ST195	MG1655, $\Delta ldhA:: \Delta pflAB:: \Delta ack-pta:: \Delta iscR:: \Delta frdABCD:: \Delta aceE:: \Delta mgsA:: AdhE V360L:: pCF2(pfor_{CE} fd_{CE}); pPL031 (fnor_{CA} udhA_{EC}R455Q); Spec^+ Kana^+$	This study

Plasmids

<i>pACYC184</i>	p15A ori; Cm ⁺	(Chang and Cohen, 1978)
<i>pPAL7</i>	P _{T7} ::Profinity eXact tag::T _{T7} ; Amp ⁺	Bio-rad
<i>pSC101</i> - <i>pGI</i> 1.6 - <i>cac2229</i> - <i>cac0303</i>	P _{GI1.6} :: <i>pfor</i> _{CA} :: <i>fd</i> _{CA} ::T _{ADC} ; Spec ⁺ codon harmonized for <i>E. coli</i>	(Soucaille <i>et al.</i> , 2015)
<i>pPL016</i>	P _{PRO1} :: <i>rnfC</i> _{CL} :: <i>rnfD</i> _{CL} :: <i>rnfG</i> _{CL} :: <i>rnfE</i> _{CL} :: <i>rnfA</i> _{CL} :: <i>rnfB</i> _{CL} ::T _{ADC} ; Kana ⁺ codon harmonized for <i>E. coli</i>	this study
<i>pPL019</i>	P _{PRO1} :: <i>rnfCDGEAB</i> _{CL} ::T _{ADC} ; Kana ⁺	this study
<i>pPL024</i>	P _{PRO1} :: <i>fnor</i> _{CA} :: <i>udhA</i> _{EC} ::T _{ADC} ; Kana ⁺ <i>fnor</i> _{CA} codon harmonized for <i>E. coli</i>	this study
<i>pPL031</i>	P _{PRO1} :: <i>fnor</i> _{CA} :: <i>udhA</i> _{EC} R455Q::T _{ADC} ; Kana ⁺ <i>fnor</i> _{CA} codon harmonized for <i>E. coli</i>	this study
<i>pPL033</i>	P _{PRO1} :: <i>rnfCDGEAB</i> _{DA} ::T _{ADC} ; Kana ⁺	this study
<i>pPL042</i>	P _{T7} ::Profinity eXact tag:: <i>udhA</i> _{EC} ::T _{T7} ; Amp ⁺	this study
<i>pPL043</i>	P _{T7} ::Profinity eXact tag:: <i>udhA</i> _{EC} R455Q::T _{T7} ; Amp ⁺	this study
<i>pPL048</i>	P _{PRO1} :: <i>fnor</i> _{CT} ::T _{ADC} ; Kana ⁺ <i>fnor</i> _{CT} codon harmonized for <i>E. coli</i>	this study
<i>pPL053</i>	P _{PRO1} :: <i>fnor</i> _{CT} (Asn264del)::T _{ADC} ; Kana ⁺ <i>fnor</i> _{CT} codon harmonized for <i>E. coli</i>	this study

Table 1: Strains and Plasmids. Abbreviations indicate source of the genes: CA, *Clostridium acetobutylicum*; CL, *Clostridium ljungdahlii*; CT, *Chlorobaculum tepidum*; DA, *Desulfovibrio alaskensis*; EC, *Escherichia coli*

b) Plasmid/pathway construction

i) Construction of Rnf vectors pPL016, pPL019 and pPL033

The genes coding for the Rnf complex from *C. ljungdahlii* were codon harmonized according to the method developed by Angov *et al.* (Angov *et al.*, 2008). The harmonized sequence was synthesized by Geneart (ThermoFischer). The vector obtained (*pMA_Rnf_Clj*) was used as backbone for the introduction of a thermo-inducible promoter and a terminator. The C1857-PRO1 promoter was amplified by PCR from a plasmid developed by Aliprandi *et al.* (Aliprandi *et al.*, 2017), and inserted into the vector backbone using Geneart Seamless cloning and assembly method. The terminator *adc* was amplified by PCR from the *pCF2* and inserted into the vector backbone using Geneart Seamless cloning and assembly method. The origin of replication and the marker of resistance to the ampicillin were replaced in this vector by their counterpart from the vector pACYC184. The *pMA_Rnf_Clj* was digested by BamHI/AvrII and the band containing $P_{PRO1}::RBS::rnf_{C_{CL}}::RBS::rnf_{D_{CL}}::RBS::rnf_{G_{CL}}::RBS::rnf_{E_{CL}}::RBS::rnf_{A_{CL}}::RBS::rnf_{B_{CL}}::T_{ADC}$; was purified on gel. The p15A origin and the chloramphenicol marker were amplified by PCR using the primers pACYC-cm f and pACYC-p15A rv from the pACYC184 vector. The PCR fragment was digested by BamHI/AvrII and assembled by ligation with the *rnf* operon. Then, the chloramphenicol marker was replaced by a kanamycin resistance marker. The kanamycin marker was amplified by PCR from pKD4 vector and inserted into the vector backbone using Geneart Seamless cloning and assembly method, resulting the plasmid pPL016.

The native Rnf operon from *C. ljungdahlii* was amplified by PCR from the genome of *Clostridium ljungdahlii* DSM 13528 with the primers OL78 and OL79. These primers respectively introduced the cloning sites *SpeI* and *SmaI* for the cloning in the pPL016 backbone. The PCR product and the pPL016 were digested by *SpeI* and *SmaI* according to the manufacturer's recommendations, and purified by gel extraction. The native operon was inserted in the vector backbone using the T4 DNA ligase, resulting the pPL019.

The native Rnf operon from *Desulfovibrio alaskensis* G20 was amplified by PCR from the genome of *Desulfovibrio alaskensis* G20 DSM 17464 with the primers OL191 and OL192. These primers respectively introduced the cloning sites *SpeI* and *PmeI* for the cloning in the pPL016 backbone. The PCR product was purified, digested by *SpeI* and *PmeI* according to the manufacturer's recommendations, and cloned into the pPL016 backbone, resulting the pPL033.

ii) Construction of pPL024

The ferredoxin NADP⁺ oxidoreductase *fnor* from *C. acetobutylicum* (Soucaille *et al.*, 2015) was amplified by PCR from the plasmid *pCF3* udhA* (Soucaille *et al.*, 2015), using the primers OL65 and OL66. These two primers respectively added the *SpeI* and *SmaI* restriction sites used for the cloning inside the pPL016 backbone. The gene *udhA* was amplified from the plasmid *pCF3* udhA* using the primers OL69 and OL70. Each of these primers added a *SmaI* restriction site used for the cloning inside the pPL016 backbone in operon with the *fnor*. The orientation of the insertion was verified by PCR (OL71) and then verified by digestion and sequencing. The correct plasmid was called pPL024.

iii) Construction of pPL048

The ferredoxin NAD(P)⁺ oxidoreductase *FdNR* from *Chlorobium tepidum* (CT1512) (Seo and Sakurai, 2002) was cloned in the pPL016 backbone. Before cloning, the sequence of *FdNR* was codon harmonized according to the method developed by Angov *et al.* (Angov *et al.*, 2008). For the cloning, a *SpeI* site was added upstream of the gene and *BamHI* and *SmaI* sites were added downstream of the gene during the synthesis. The harmonized sequence was synthesized by Geneart (ThermoFischer). The assembly between the *FdNR* and the pPL016 backbone was performed by ligation with the T4 DNA ligase (NEB) according to the manufacturer's recommendations, resulting the pPL048.

iv) Construction of *pPAL7 UdhA* vectors

The tag-free Profinity eXact™ system (Bio-Rad) was used to express *UdhA* Wild-type and Mutant. The primers OL224 and OL206 were used to amplify *udhA*, from the vector pPL024 for the Wild-type *udhA*, and from the vector pPL031 for the mutant *udhA*. These primers were designed to create a homologous region of 25bp with the *pPAL7* for cloning using GeneArt® Seamless Cloning & Assembly kit (ThermoFisher Scientific). The primer OL224 generates a residue Thr-Ser in N-terminal of *UdhA* to increase the cleavage rate between the tag and the protein during the purification. DNA fragments were amplified using the Q5 high-fidelity DNA polymerase (NEB) and purified before cloning. The supercoiled *pPAL7* was linearized by double digestion with *SpeI* and *NotI* according to the manufacturer's instructions (NEB), and purified. The assembly was performed according to the manufacturer's instructions (ThermoFisher Scientific), resulting the plasmids pPL042 and pPL043. These two plasmids were transformed into *E. coli* One Shot® BL21 (DE3) for protein expression according to the manufacturer's protocol. The successful clones were confirmed afterwards by colony PCR and sequencing. The *E. coli* clones were respectively named ST173 for Wild-type *UdhA* and ST175 for the mutant *UdhA*. They were stored in LB broth containing 100 µg/mL ampicillin, 0.5% glucose and 20% (v/v) glycerol and stocked at -80°C until further application.

c) Medium and cell culturing

Culture media. For molecular biology, cultures were grown in Luria broth (Luria and Delbrück, 1943) containing 10g/L yeast extracts, 5g/L tryptone and 5g/L NaCl in aerobic conditions. The medium is supplemented with the indicated levels of antibiotic when necessary: carbenicilline (carb), 100µg/mL; spectinomycine (Spec), 100µg/mL; kanamycine (Kana), 50µg/mL. The anaerobic culture of *E. coli* was performed in the minimal medium described by (Meynial-Salles *et al.*, 2005b) at pH 6.8. For the production of recombinant protein with *E. coli* BL21, the Terrific Broth (TB) medium was used containing 1.2% tryptone, 2.4% yeast extracts, 72mM K₂HPO₄, 0.4% of glycerol, 5mM of nitrate and 0.5% of glucose, in anaerobic batch cultures of 400mL. For the preparation of cell extracts, cells were cultivated in rich medium MAC described by Gauquelin *et al.* (Gauquelin *et al.*, 2018), unless otherwise specified.

Anaerobic growth. Validations of FNOR functionality were performed by growing cells during 48h at 37°C in 30mL of anaerobic medium with appropriate antibiotics to adapt the cells to a defined environment. Then, the cells were subcultured into fresh anaerobic medium to an initial OD_{550nm} 0.10 at a working volume of 30mL. Cells were grown in anaerobic vials in a INFORS Multitron incubator at 37°C and 170 rpm. Supernatants were collected and stored at -20°C for subsequent metabolite analyses. All experiments were performed with at least three biological replicates.

d) Enzymology and protein purification

Preparation of cell extracts. For transhydrogenase assays, cells were cultivated in mineral medium supplemented with yeast extracts and nitrate. For FNOR and AdhE assays, cells were cultivated in rich medium MAC. Cells were harvested in exponential phases by centrifugation in anaerobic conditions. The cell pellets were resuspended in 2.5mL of sonication buffer, respectively 50mM Tris-HCl at pH7.5 with 2 mM DTT for transhydrogenase assay and 100mM Tris-HCl at pH7.6 with 2 mM DTT for FNOR and AdhE assay. The cell suspensions were sonicated and centrifuged. The supernatant was used as cell extract for enzyme transhydrogenase and FNOR assays. For AdhE assay, the supernatant was desalted using PD-10 desalting column (GE) before use. The total protein concentration of the cell-free extracts was determined using the Bradford method (Bradford, 1976) with bovine serum albumin as the standard.

Assay of transhydrogenase from *E. coli*. Transhydrogenase activity from UdhA was determined as previously described by Boonstra *et al.* (1999) (Boonstra *et al.*, 1999). The reduction of thionicotinamide adenine dinucleotide (Thio-NAD⁺) was monitored at 400nm in a reaction mixture

composed of 0.2 mM of NADPH, 0.2 mM thio-NAD⁺ and 10 μ M FAD in 50mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) at 35°C. The molar extinction coefficient taken for thio-NAD⁺ at 400 nm was 11,300 L.mol⁻¹.cm⁻¹(Cohen and Kaplan, 1970). One unit of enzyme activity was defined as the amount of activity reducing 1 μ mol of thio-NAD⁺ per min under these conditions.

Heterologous expression of protein in *E. coli*. Cells of *E. coli* BL21 containing transhydrogenase vectors were grown in anaerobic conditions in TB medium at 37°C with a stirring speed of 170 rpm. When the OD_{550nm} reached 0.6, 0.5mM of IPTG (isopropyl- β - D -thiogalactopyranoside) was added to induce the expression of transhydrogenase genes. Cultures were supplemented with 0.5% glucose and 5mM of nitrate as electron acceptor(Stewart, 1988). The cells were grown anaerobically for 4h before harvest by centrifugation in anaerobic conditions. The cell pellet was washed with 30mL of a buffer containing 100mM sodium phosphate pH7.2, 10% glycerol, 10 μ M FAD and 2mM DTT. The cell extracts were prepared as described above. All steps of purification were performed at room temperature in a Jacomex anaerobic chamber. Profinity eXact™ purification cartridges were used to purify the proteins according to the manufacturer's instructions using an Akta Purifier 10(GE). The elution fraction was concentrated using a Vivaspin 15R concentrator fitted with 10kDa MWCO HY membrane (Sartorius Stedim Biotech) according to the manufacturer's protocol. During the concentration, the buffer containing the purified protein was exchanged for a 50mM Tris-HCl with 2 mM DTT and 10 μ M FAD at pH7.5. The total protein concentration of the cell-free extract was determined using the Bradford method(Bradford, 1976) with bovine serum albumin as the standard

Determination of the native size of UdhA by gel filtration. The native size of UdhA was estimated by gel filtration on tag-free protein by gel filtration on an Akta Purifier 10 (GE) with a column Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE). The column was equilibrated with Phosphate Buffered Saline solution at pH7.4 containing NaCl at 0.15 M, Na₂HPO₄.2H₂O at 36.86mM and NaH₂PO₄ at 12.25mM. The column was calibrated with appropriated standards (thyroglobulin, ferritin, aldolase, conalbumin, ovalbumin [from GE high mass weight gel filtration standard] 100 μ L of 0.3 to 3 mg/mL solutions) and UdhA (100 μ L at a concentration of 1.0mg/mL) were loaded, all at a flow rate of 0.5mL/min.

Assay of methyl viologen based FNOR. The FNOR assay were performed as described previously by Soucaille *et al.* (2015) (Soucaille *et al.*, 2015).The reaction mixture contained 100mM Tris-HCl (pH 7.6), 2 mM DTT, 0.25 mM NADH or NADPH, 10 μ M FAD, 3% EtOH, 45U of ADH, 10mM methyl viologen and the crude extract. The reaction was started with the addition of methyl viologen and maintained at 37°C during the assay. The methyl viologen reduction was monitored at 560 nm with a molar extinction coefficient of 7.71 mM⁻¹.cm⁻¹.

Assay of alcohol dehydrogenase from *E. coli*. The acetaldehyde reductase and acetyl-CoA reductase activities from AdhE were determined as previously described by Membrillo-Hernandez *et al.* (2000)(Membrillo-Hernandez *et al.*, 2000). The disappearance of NADH was monitored at 340nm in a reaction mixture composed of 0.25 mM of NADH and 1mM acetyl-CoA or 100mM acetaldehyde in 100mM Tris-HCl buffer (pH 7.6) at 37°C . The molar extinction coefficient taken for NADH at 340 nm was 6,22 mM⁻¹.cm⁻¹.

e) Protein 3D modelling

The sequence of the soluble transhydrogenase of *E. coli*, UdhA, was submitted to the I-TASSER server to predict the structure of the protein (Roy *et al.*, 2010) using mainly as template the crystallographic structure of the lipamide dehydrogenase from *Thermus thermophilus* (PDB ID: 2YQU) which is the closest structure available, with 32% identity with UdhA. A 3D-model of UdhA dimer was derived from crystallographic dimer of 2YQU. 3D models of R455Q mutant were obtained by introducing punctual mutation in UdhA using Pymol software (Schrodinger).

f) Genomic sequencing with Ion torrent

After validation of the DNA quality (Qubit and agarose gel), the libraries were done with 10ng of DNA using the NEBNext® Fast DNA Fragmentation & Library Prep, following the manufacturer's instructions. The libraries were qualified and quantified using 2100 Bioanalyzer (Agilent) and Qubit2.0 (Thermofischer).An equimolar pool of the libraries was made for the EmPCR (amplification on beads) and the amplified beads were injected in an Ion530 chip before being sequenced in an Ion S5 (Ion Torrent Technology - Thermofischer) following the manufacturer's instructions. The reads were aligned with the Torrent Suite software (5.0.4) and the SNP analysis was done with Torrent Variant Caller (5.0-13).

g) Analytical methods

Cell growth was monitored by measuring optical density at 550nm (OD₅₅₀). An experimentally derived correlation factor of 0.25 g cellular dry weight per OD_{550nm} was used for biomass concentration calculations. Solvent and acid production as well as glucose consumption in cell-free supernatant samples were determined based on high-performance liquid chromatography (HPLC) (Dusséaux *et al.*, 2013) using H₂SO₄ at 0.5 mM, as mobile phase.

h) Immunodetection of Rnf complexes by Western blot

Cells expressing the Rnf complex were cultivated in mineral medium. Cells were harvested in the exponential growth phase by centrifugation (5000 g, during 10 min at 4°C) in N₂ environment. The cells pellets were resuspended in a buffer 50mM Tris-HCl, MgSO₄ 20mM, DTT 2mM, glycerol 20%, pH 7 in presence of a protease inhibitor (complete Tablets, Mini EDTA-free, EASYpack from Roche). The cell extracts were prepared as described above, the supernatant was carefully removed and the cytoplasmic and the membrane fractions were separated by ultracentrifugation (100,000g, during 2h, at 4°C). Sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) was performed in 12.5% (wt/vol) acrylamide gels, using the Page ruler Ladder (Thermoscientific) as mass reference. The proteins were electrotransferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were blocked by incubation for 1h30 at room temperature in PBST (137 mM NaCl, 2.7mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 0.5% Tween 20) containing 2% bovine serum albumin (BSA). Immunodetection of the six units of the Rnf complex from *C. ljungdahlii* in total cell lysates or in membrane fractions was performed with polyclonal antisera (diluted 1/5,000) obtained from GenScript (Hong Kong) Limited. Peroxidase conjugated antibodies from goat directed against rabbit antibodies were used as secondary antibodies in combination with ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE) substrate kit, as recommended by the manufacturer, to develop the chemiluminescence for visualization on a Chemidoc (Biorad).

C. Results and discussion

a) Construction of the growth-based selection engineered *E. coli* strain platform for the screening *in vivo* of functional Ferredoxin NAD(P)⁺ reductases screening under anaerobic conditions

The central metabolism of *E. coli* was rationally engineered to redirect the carbon flux from glycolysis to pyruvate production first, and then, to ethanol production. All competing pathways leading to the synthesis of lactate, succinate, formate and acetate were eliminated by deleting key enzymes catalyzing the respective reactions. The growth of this engineered strain is depending on the production of ethanol to ensure a balanced electron flux, in anaerobic conditions. A ferredoxin:pyruvate oxidoreductase (Pfor) from *C. acetobutylicum* was heterologously expressed from a plasmid in a single operon with the ferredoxin (Fd) from *C. acetobutylicum* to create a synthetic ferredoxin node in *E. coli*. The functionality of the ferredoxin node created a driving force to select functional FNOR enzymes, needed to balance the electron flux in anaerobic conditions and restored growth in glucose mineral medium. The *E. coli* strain MG1655, $\Delta IdhA$, $\Delta pflAB$, $\Delta ack-pta$, $\Delta iscR$, $\Delta frdABCD$, $\Delta aceE$, $\Delta mgsA$, containing the pCF2(*pfor*_{CA} *fd*_{CA}) (Soucaille *et al.*, 2015), designated as ST034,

was adapted for *in vivo* selection and evolution of functional ferredoxin NAD(P)⁺ oxidoreductases under anaerobic conditions.

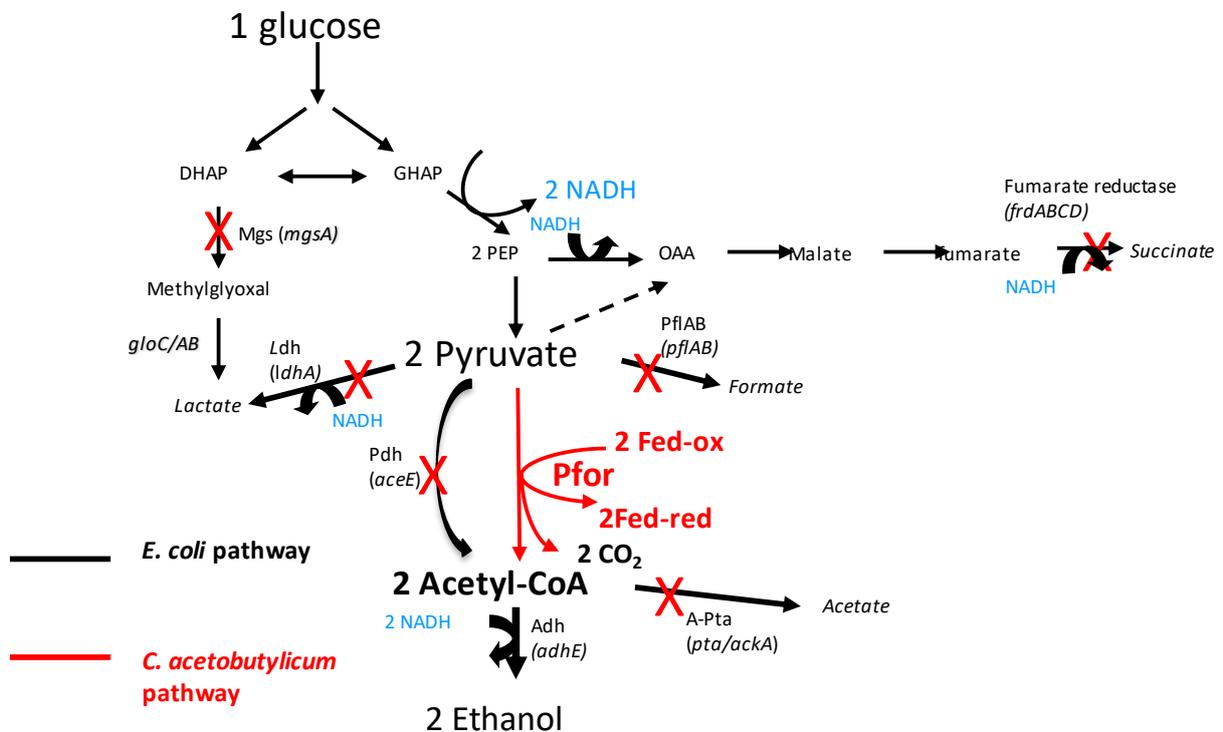


Figure 2: Rational engineering of *E. coli*'s central metabolism for the construction of a growth-based selection platform for FNOR.

Since ST034 has a redox imbalance, pathway details in Figure 2, the strain is unable to grow anaerobically on a glucose mineral medium. Only 2 NADH are generated through the glycolysis but 4 NADH are requested for the production of ethanol. The engineered ferredoxin node for pyruvate decarboxylation represents the bottleneck of the pathway. Without the expression of a FNOR to reoxidize the reduced ferredoxin (Fd) and generate the 2 missing NADH, the metabolism is blocked, and the strain is unable to grow on mineral medium in anaerobic condition. This situation is represented in the redox balance equation in Figure 3.

Molécules :	Glucose	NADH	Pyruvate	Fd _{ox}	NAD ⁺	Fd _{red}	Ethanol	CO ₂
functional FNOR		2		2	-2	-2		
ST034		-4	-2	-2	4	2	2	2
Glycolysis	-1	2	2		-2			
Total	-1	0	0	0	0	0	2	2

Figure 3: Redox balance of the ethanologenic strain with a functional FNOR

b) Phenotype characterization of the ST034 strain expressing different FNORs from a plasmid grown on glucose mineral medium with yeast extract and nitrate under strict anaerobic conditions

The phenotype of the growth based selection platform, ST034, was characterized on glucose mineral medium with yeast extract and nitrate under strict anaerobic conditions. The result was compared to the platform expressing the FNOR modules to restore the growth in strict anaerobic conditions, which is presented in Figure 4 and analyzed in Table 2.

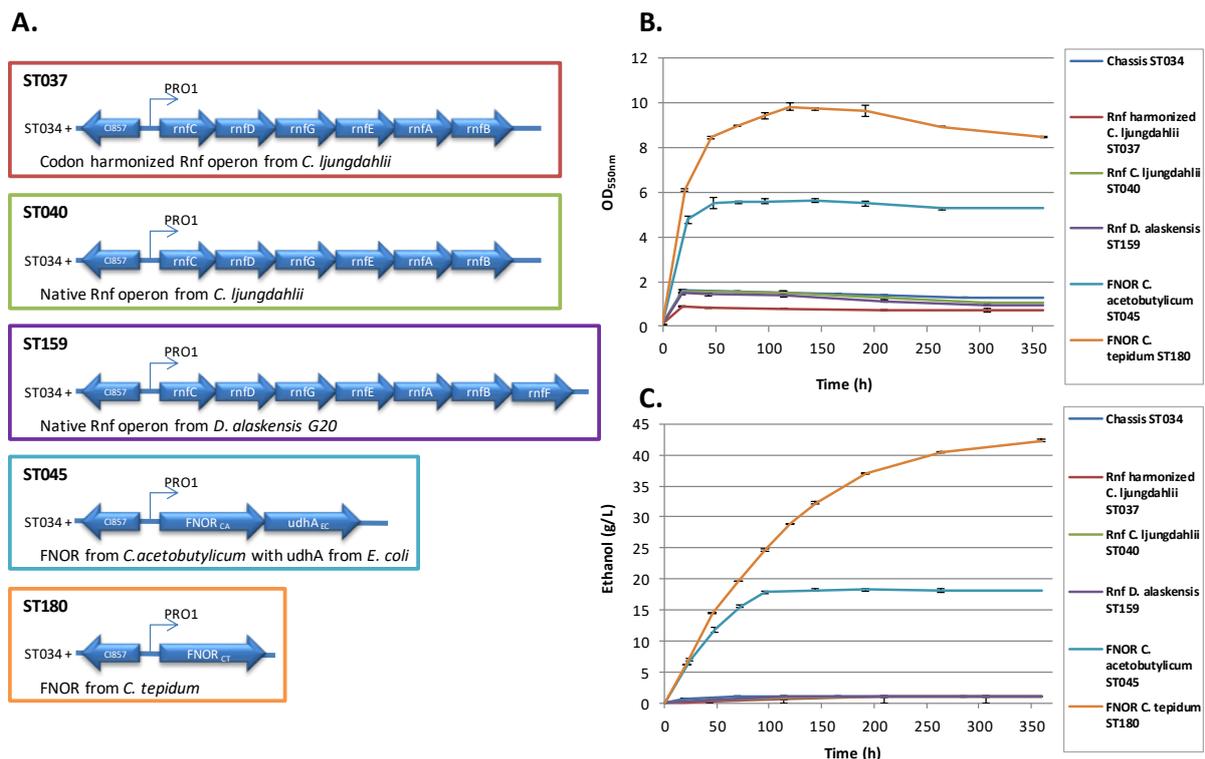


Figure 4: Expression of FNOR modules in the chassis strain ST034 cultivated in anaerobic conditions in medium supplemented with yeast extracts and nitrate. (A) Assembly of the chassis strain ST034 with the FNOR modules to produce ethanol, (B) Cell growth, (C) Ethanol production.

During anaerobic cultures in glucose mineral medium supplemented with 4 g/L of yeast extracts and 5 mM nitrate (Figure 4B and 4C), a poor growth of the chassis strain ST034 was observed despite the redox imbalance. A maximum optical density (OD, measured at 550nm) of 1.6 ± 0.05 , an accumulation of pyruvate ($1.8 \text{ g/L} \pm 0.01$) and the production of ethanol ($1.1 \text{ g/L} \pm 0.07$) were observed, resulting from the growth on yeast extract. Despite the ability of the chassis strain to grow on yeast extracts, an important difference was visible when a functional FNOR was expressed: The strain ST045, expressing the ferredoxin NADP⁺ reductase from *C. acetobutylicum* in operon with the transhydrogenase UdhA from *E. coli*, grew until a maximum optical density (OD, measured at 550nm) of 5.6 ± 0.1 and produced $18.2 \text{ g/L} \pm 0.2$ of ethanol at a yield 0.49 (g ETOH/g GLC) (>97% of the theoretical limit, 0.51 g ETOH/g GLC). The strain ST180, expressing the ferredoxin NAD(P)⁺ oxidoreductase from *C. tepidum*, grew until a maximum optical density (OD, measured at 550nm) of 9.6 ± 0.3 and produced $42.3 \text{ g/L} \pm 0.2$ of ethanol at a yield 0.49 (g ETOH/g GLC) (>97% of the theoretical limit, 0.51 g ETOH/g GLC). The growths of strains ST037, ST040, and ST159, expressing Rnf complexes, were slightly lower or equivalent to the chassis strain ST034, with weak growths reaching respective maximum optical densities (OD, measured at 550nm) of 0.9 ± 0.02 , 1.6 ± 0.07 , and 1.5 ± 0.07 . They also accumulated pyruvate (1.8 ± 0.01 , 1.9 ± 0.08 , and 2.1 ± 0.08 respectively) and produced a small amount of ethanol (1.0 ± 0.02 , 1.1 ± 0.03 , and 1.1 ± 0.01 respectively).

Strain	Description	Ethanol (g/L)	Pyruvate (g/L)	Maximum OD _{550nm}	Glucose consumed (g/L)	Yield g ethanol/g glucose	Carbone balance (%)
ST034	Chassis – negative control	1.1 ± 0.07	1.8 ± 0.01	1.6 ± 0.05	3.7 ± 0.9	0.28	114%
ST037	Rnf <i>C. ljungdahlii</i> harmonized	1.0 ± 0.02	1.8 ± 0.01	0.9 ± 0.02	3.3 ± 0.1	0.30	115%
ST040	Rnf <i>C. ljungdahlii</i>	1.1 ± 0.03	1.9 ± 0.08	1.6 ± 0.07	4.4 ± 0.1	0.26	107%
ST159	Rnf <i>D. alaskensis</i>	1.1 ± 0.01	2.1 ± 0.08	1.5 ± 0.07	4.2 ± 0.2	0.25	114%
ST045	FNOR <i>C. acetobutylicum</i> + UdhA	18.1 ± 0.3	0 ± 0.0	5.6 ± 0.1	37.3 ± 0.5	0.49	101%
ST180	FNOR <i>C. tepidum</i>	42.3 ± 0.2	0 ± 0.0	9.8 ± 0.2	86.9 ± 0.1	0.49	100%

Table 2: Dosage and analysis of the fermentation products at the end of the fermentation from Figure 2

These results suggested that the three different Rnf complexes expressed in the chassis ST034 did not have enough FNOR activity to restore the growth of the strain, despite the absence of mutation in the sequences of the encoding genes, which were verified after the cultures. To understand better the reasons of this non-functionality of the Rnf complex in *E. coli*, Western Blot analyses (Figure 5) were performed on crude extracts from cells expressing the two forms of the Rnf complex of *C. ljungdahlii*. We managed to obtain signals corresponding to each subunit, demonstrating their expression.

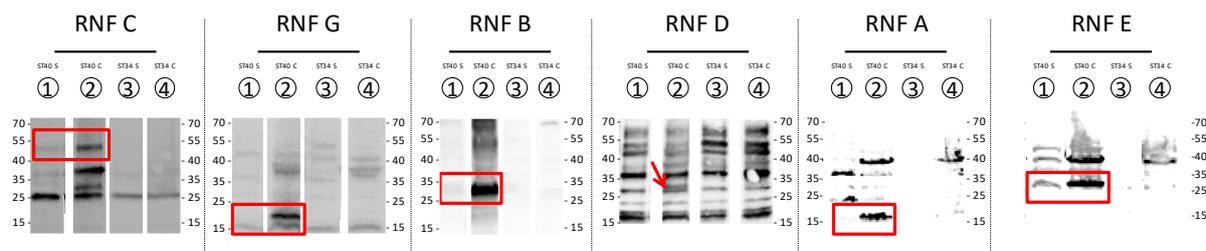


Figure 5: Western blot analysis of the native Rnf complex from *C. ljungdahlii* overexpressed in *E. coli*. 1: Supernatant from ST040; 2: Pellet from ST040; 3: Supernatant from ST034; 4: Pellet from ST034.

As shown in Figure 5, the signals were not found in the cellular membrane fractions, and their localization suggests potential aggregates. This suggests that the expression of the thermo-inducible promoter Pro1, used to express the *rnf* operon, could be too high and poorly appropriate. Recently, Schiffels *et al.* successfully expressed the Rnf complex from *C. ljungdahlii* in *E. coli* (Schiffels and Selmer, 2019). To overcome the toxicity encountered during the cloning of the Rnf complex in *E. coli* (Tremblay *et al.*, 2012), low expression promoters, which respond to internal redox levels, were screened and the fumarate reductase (*frd*) promoter was selected as the most adapted for the expression of the Rnf complex. They also rearranged the genes order – as following: *rnfCBDAEG*, instead of the genome derived order *rnfCDGEAB* – to decrease the toxicity. The authors expressed the Rnf complex in *E. coli* engineered for butyrate production, using the ferredoxin dependent pathway from *C. difficile*. The growth of this strain was severely impaired by the expression of the Rnf complex until the expression of the [FeFe] hydrogenase to oxidize the reduced ferredoxin generated during butyrate production. From their results, they suggested that the Rnf complex generated an electron flow from NADH to oxidize ferredoxin, and required an F-type ATP synthase to hydrolyse ATP *in-vivo* in *E. coli*. Based on the *in vivo* test that we developed in the ST034 strain, the Rnf complex from *C. ljungdahlii* should reoxidize the reduced ferredoxin and reduce NAD⁺ to finally generate ATP. Therefore, if the activity was reverse, the Rnf complex could have a negative effect, by increasing the redox imbalance through additional NADH consumption and hampering the growth with the ATP hydrolysis.

Based on the phenotype characterization of the different strains, the results validated that the engineered *E. coli* strain ST034, with the applied strategy, could be used as a screening platform strain for *in vivo* selection of functional ferredoxin NAD(P)⁺ reductases. The redox imbalance in the chassis strain ST034 creates a driving force coupling the ferredoxin NAD(P)⁺ reductase functionality to the cells growth, and the ethanol production. A difference of ethanol production and growth between ST045 and ST180 strains was observed, suggesting that the catalytic efficiency of the ferredoxin NAD(P)⁺ reductase could play a crucial role in redox balance and could influence the performance of the strain.

c) *In-vivo* adaptive evolution of the growth-based selection platform expressing a functional FNOR

In the previous test, the addition of yeast extract to the glucose mineral medium is disturbing, as *E. coli* is already able to grow on yeast extract alone. Therefore, to increase the selection pressure and discard the addition of yeast extract, an adaptive evolution was performed by gradually decreasing yeast extract and nitrate concentrations from the medium, by series subcultures. Cells were maintained in exponential phase, according to the method described in Figure 6.

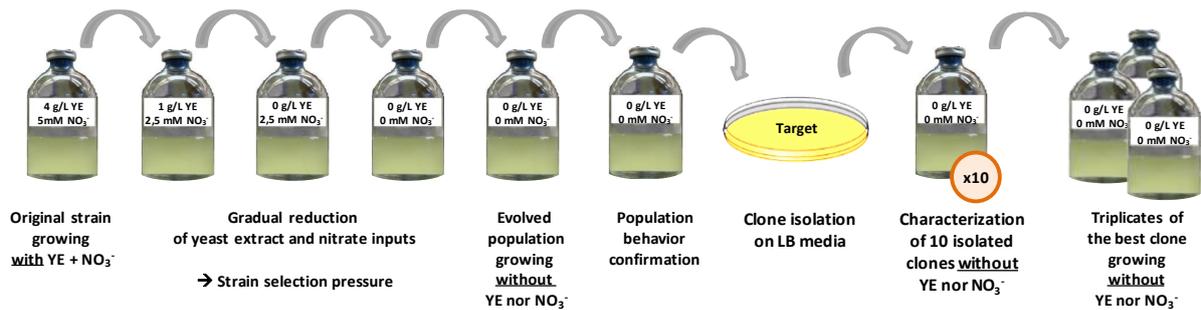


Figure 6: Schematic procedure for the adaptation of strains for growth in glucose mineral medium without supplementation of yeast extracts and nitrate.

The chassis strain ST034 was unable to grow in glucose mineral medium without supplementation of yeast extracts and nitrate, which validates the rational engineering of the metabolic pathway to create a redox imbalance.

When the ferredoxin NADP⁺ reductase from *C. acetobutylicum* in operon with the transhydrogenase UdhA from *E. coli* (ST045) were overexpressed, a population able to grow in glucose mineral salts medium was selected. This population was subcultured several times to ensure the absence of yeast extracts and nitrate in the medium, from the inoculum. This population grew until a maximum optical density (OD, measured at 550nm) of 2.3 ± 0.03 and produced $9.3 \text{ g/L} \pm 0.6$ of ethanol in glucose mineral salts medium, Figure 7A. Clones were isolated as colonies from the population and the growth on glucose mineral medium of 10 randomly selected clones was analyzed. From these clones, the one having performances close to the adapted population was selected. This clone, called ST071-6, grew until a maximum optical density (OD, measured at 550nm) of 2.7 ± 0.06 and produced $13.2 \text{ g/L} \pm 0.3$ of ethanol at a yield $0.50 \text{ (g ETOH/g GLC)}$ (>98% of the theoretical limit, $0.51 \text{ g ETOH/g GLC}$) (Figure 7A).

According to the same method, the strain expressing the FNOR from *C. tepidum* (ST180) was adapted to grow in glucose mineral salts medium. The strain was subcultured several times to confirm this result and ensure the absence of yeast extracts and nitrate in the medium brought by the inoculum. The selected population ST180A, cultivated in glucose mineral salts medium, was able to grow until a

maximum optical density (OD, measured at 550nm) of 2.5 and produced 17.4 g/L of ethanol at a yield 0.50 (g ETOH/g GLC) (>98% of the theoretical limit, 0.51 g ETOH/g GLC), Figure 7B. In comparison with the population ST045A, expressing the FNOR of *C. acetobutylicum*, the growth of the strain ST180A was 1.1 time higher and the final ethanol production was 1.9 fold higher than in ST045A. Clones were isolated as colonies from the population ST180A and the growth on glucose mineral medium of 10 randomly selected clones was analyzed. The most representative clone selected, called ST194-10, was able to grow until a maximum optical density (OD, measured at 550nm) of 3.3 and produce 17.3 g/L of ethanol at a yield 0.50 (g ETOH/g GLC) (>98% of the theoretical limit, 0.51 g ETOH/g GLC) (Figure 7B). In comparison with the isolated clone ST071-6, containing the FNOR of *C. acetobutylicum*, the biomass of the strain ST194-10 increased by 1.2 fold, and the final ethanol concentration by 1.3 fold.

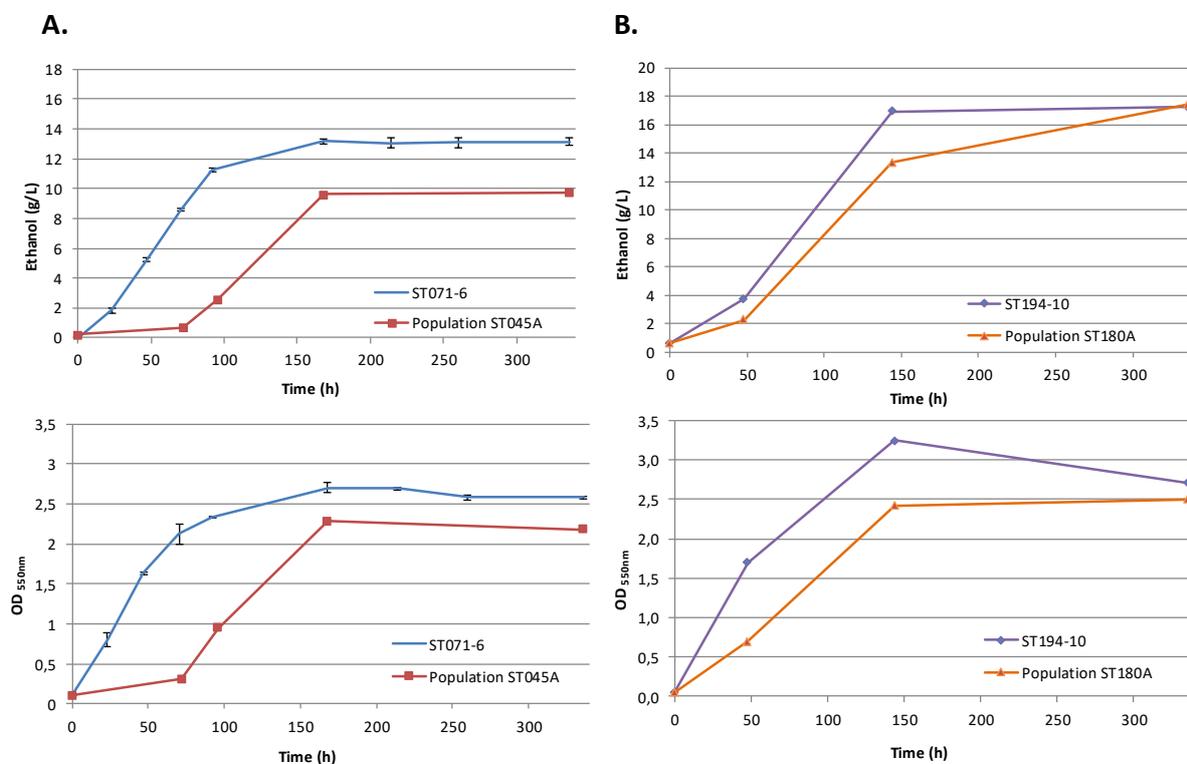


Figure 7: Evolution of metabolic pathway enhanced growth and ethanol production. (A) Comparison of cell growth and ethanol production between the adapted population of ST045A, after 6 subcultures in glucose mineral salts medium, and a clone isolated from this population (ST071-6), expressing the FNOR module of *C. acetobutylicum*. (B) Comparison of cell growth and ethanol production between the population expressing the FNOR module of *C. tepidum* (ST180) in glucose mineral salts medium and a clone isolated from this population (ST194-10).

Strain	Description	Ethanol (g/L)	Maximum OD _{550nm}	Glucose consumed (g/L)	Yield g ethanol/ g glucose	Carbone balance (%)
ST071-6	FNOR <i>C. acetobutylicum</i> –isolated clone adapted	13.2 ± 0.3	2.6 ± 0.02	26.5 ± 0.5	0.50	102%
ST045A	FNOR <i>C. acetobutylicum</i> – population adapted	9.7 ± 0.0	2.3 ± 0.0	20.7 ± 0.0	0.47	94%
ST180A	FNOR <i>C. tepidum</i> – population adapted	17.4	2.5	33.4	0.50	101%
ST194-10	FNOR <i>C. tepidum</i> – isolated clone adapted	17.3	3.3	33.4	0.50	101%

Table 3: Comparison of the strain performances at the end of the fermentation when all cells were grown on glucose mineral medium.

The applied strategy to select strains expressing FNORs able to grow on glucose mineral medium was effective. Moreover, as expected, the chassis strain (ST034) was unable to grow, due its inability to reoxidize reduced ferredoxin. Finally, the nature and the biochemical properties of the expressed FNOR module seems to impact the growth and the final ethanol concentration.

d) Identification of genetic targets responsible for *E. coli* adaptive evolution using genome-wide analysis

Before the adaptive evolution in glucose mineral medium, both ST045 and ST180 strains were unable to grow in glucose mineral medium. It suggested that the *in vivo* evolution of the strain took place. To determine the genetic basis of the adaptation, the evolved strains, respectively expressing the FNOR from *C. acetobutylicum* and *C. tepidum* (ST071-6 and ST180A), were selected to identify the genetic targets responsible for the growth in mineral medium. Genomic DNA was extracted and sequenced by using the Ion Torrent sequencing system. The comparison of the genomes of the evolved clone expressing the FNOR from *C. acetobutylicum* (ST071-6) and the chassis strain (ST034) revealed two putative mutations found in the evolved clone. These two mutations were confirmed by PCR amplification and Sanger sequencing. The first mutation was located in the *zwf* gene (*zwf**), encoding the Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), and led to a change of the glycine at position 295 by a stop codon, leading to the synthesis of a truncated protein of 294 amino acids instead of 491. The results of the truncated protein might be a loss of the Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity, causing the inactivation of the first step of the pentose phosphate pathway. The second mutation was located in the *udhA* gene (UdhA R455Q) overexpressed in the vector *pPL024*, encoding the soluble transhydrogenase, and led to a change in one amino acid residue: arginine at position 455 was replaced by glutamine. This mutation is located in the dimerization domain of the protein and may affect the

quaternary structure of the enzyme. The small amount of mutations observed after adaptive evolution strongly suggests that these mutations must be involved in the ability to grow on mineral medium without supplementation of yeast extract nor nitrate.

The comparison of the genomes of the evolved population expressing the FNOR from *C. tepidum* (ST180A) and the chassis strain (ST034) revealed only one putative mutation found in the genomic DNA of the evolved clone. This mutation was confirmed by PCR amplification and Sanger sequencing. The single mutation was located in the *fnor* gene from *C. tepidum* overexpressed in the vector *pPLO48*, encoding the ferredoxin NAD(P)⁺ reductase, and led to the deletion of the asparagine residue in position 264 (Fnor (Δ N264)). Further genomic analyses revealed that this mutation appeared during the first culture of the strain, on glucose mineral medium with yeast extract and nitrate under strict anaerobic conditions, and suggest that this mutation is essential to ensure the proper function of the enzyme with the ferredoxin node from *C. acetobutylicum*.

The complete sequencing of genomic DNA from both strains also showed that an SNP in the alcohol dehydrogenase *adhE* was already present in the chassis strain (ST034), and consequently in all the related strains. This mutation led to the modification of the valine in position 360 by a leucine (AdhE V360L). Therefore, the specific acetaldehyde and acetyl-CoA reductase activities were measured *in-vitro* in anaerobic conditions from crude extracts, and compared to the AdhE Wild-type from the MG1655 strain. The results are presented in Table S3 in the supplementary material. We concluded that this mutation in *adhE* seems to lead to an enhanced specific activity.

e) Role of the mutations in the adaptation for the growth in mineral medium

The involvement of the mutations in *zwf* and *udhA* in the adaptation for the growth in mineral medium was demonstrated by mutant complementation. To confirm that the truncated *zwf*^{*} protein was inactivated, the *zwf* gene was completely deleted in the chassis strain (ST034) using the method described by Datsenko *et al.* (Datsenko and Wanner, 2000), generating the strain ST149.

The plasmid pPLO31, containing the FNOR of *C. acetobutylicum* and the evolved transhydrogenase (UdhA R455Q), was transformed either in the chassis strain (ST034), or in the strain with the truncated *zwf*^{*} (ST122), or in the strain with *zwf* deleted (ST149). As shown in table 4, the chassis strain expressing the FNOR of *C. acetobutylicum* and the UdhA R455Q (ST195) was unable to grow in glucose mineral salts medium. The strain with the truncated *zwf*^{*} (ST124) and the strain with *zwf* deleted (ST154), expressing the FNOR of *C. acetobutylicum* and the UdhA R455Q, were able to grow in glucose mineral salts medium and the yield of ethanol produced determined was similar to the evolved strain

(ST071-6). These results indicated that the mutation in the transhydrogenase alone is not responsible for the adaptation. Therefore, these results clearly confirmed that the deletion of 197 amino acids *zwf** inactivated the G6PDH and was mainly responsible for ST071-6 ability to grow in glucose mineral medium.

Strain	Description	Ethanol (g/L)	Yield g ethanol/ g glucose	Carbone balance (%)
ST045	Chassis strain + FNOR _{ca} /UdhA Wild-type	No growth	N/A	N/A
ST071-6	Evolved strain + <i>zwf*</i> UdhA R455Q	14.7	0.49	101%
ST124	Reconstructed strain + <i>zwf*</i> FNOR _{ca} UdhA R455Q	16.9	0.49	100%
ST154	Chassis strain Δzwf + FNOR _{ca} +UdhA R455Q	16.1	0.49	100%
ST195	Chassis strain + FNOR _{ca} +UdhA R455Q	No growth	N/A	N/A
ST194-10	Evolved strain + CT1512 ($\Delta N264$)	17.2	0.50	101%
ST193	Chassis strain + CT1512 ($\Delta N264$)	19.3	0.50	100%

Table 4: Analysis of the fermentation products at the end of the fermentation from reconstructed strains compared to the evolved strains

To demonstrate that the deletion of the asparagine residue in position 264 in the FNOR of *C. tepidum* is the only mutation in the evolved strain (ST194-10) responsible for the growth in glucose mineral salts medium, the plasmid pPL053 containing the mutant FNOR ($\Delta N264$) of *C. tepidum* was isolated. Then, this plasmid was retransformed in the chassis strain (ST034). As shown in table 4, the reconstructed strain (ST193) was able to grow in glucose mineral salts medium and the yield of produced ethanol was similar to the yield measured with the evolved strain (ST194-10). This result confirmed that the mutation in the FNOR of *C. tepidum* is the unique mutation responsible for the growth in glucose mineral medium. This unique mutation was essential to reoxidize the reduced ferredoxin and generate the NADH needed for ethanol production.

f) Functional characterization of the mutation found in the transhydrogenase UdhA

The transhydrogenase activity was measured on crude extracts from both un-evolved (ST045) and evolved (ST071-6) strains after culture in anaerobic condition in glucose mineral salts medium supplemented with yeast extracts and nitrate. The chassis strain ST034, which is not overexpressing UdhA, was used as a negative control for basal transhydrogenase activity. The results obtained are presented in Table 5: no activity was detected in the control strain (ST034), 10.4 U/mg \pm 0.93 was measured in the un-evolved strain ST045 and 3.4 U/mg \pm 0.16 was measured in the evolved ST071-6

strain in the same conditions of culture. The mutation UdhA R455Q seemed to reduce the specific activity of UdhA.

Strain	Description	Transhydrogenase specific activity (U/mg) on crude extract
ST034	Chassis strain	0.00 ± 0.00
ST045	ST034 UdhA Wild-type	10.45 ± 0.93
ST071-6	ST034 <i>zwf</i> [*] UdhA R455Q	3.4 ± 0.16

Table 5: Specific transhydrogenase activity tests determined from crude extracts, performed at 35°C in aerobic conditions, in Tris-HCl +10µM FAD buffer at pH 7.5. Values are expressed ± standard deviation.

g) Purification and characterization of UdhA and UdhA R455Q proteins

Both native UdhA and UdhA R455Q were overexpressed from a plasmid, produced in *E. coli* and purified under strict anaerobic conditions using the Profinity eXact™ purification technique from Biorad. The protein molecular weight of the purified proteins was determined by size-exclusion chromatography. The purity of the purified proteins was confirmed by a single band in the SDS-PAGE gel (Figure 8) and the loss of the exact-tag is also visible on gel with the difference of size before and after purification.

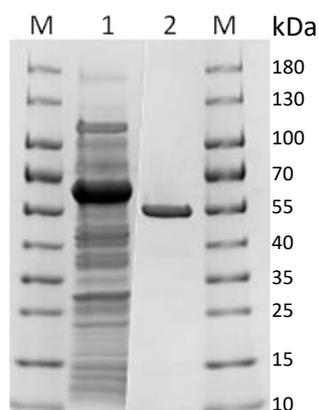


Figure 8: SDS-PAGE gel of the purified native UdhA. Lane “M”: protein molecular weight markers; lane “1”: crude extract from *E. coli* BL21 containing the recombinant vector pPAL7 (UdhA) with IPTG induction; lane “2”: purified native UdhA.

Produced and purified under anaerobic conditions, a specific activity of 24.62 U/mg ± 1.39 for the purified native UdhA, and 10.66 U/mg ± 0.66 for the purified mutant UdhA R455Q were measured at 35°C, which represents a decrease of 2.3 fold of the specific activity for the evolved enzyme (Table 6).

Purified enzyme:	Specific activity (U/mg)	Molecular weight (kDa)
UdhA Wild-type	24.62 ± 1.39	445.8 ± 4.4
UdhA R455Q	10.66 ± 0.66	617.4 ± 28.1

Table 6: Characterization of the native and the mutant purified transhydrogenase UdhA. Values are expressed ± standard deviations.

The molecular mass of UdhA was determined by the size-exclusion chromatography method, with a weight of 445.8 kDa ± 4.4 for the native UdhA, which is consistent with a structure of eight monomers described in the literature (Boonstra *et al.*, 1999). For the mutant, a weight of 617.4 kDa ± 28.1 was determined for UdhA R455Q, which would indicate a structure of eleven to twelve monomers. The substrate inhibition of NADPH on UdhA specific activity was carried out under anaerobic conditions (Figure 9). At high concentrations of NADPH, a similar substrate inhibition was observed, from 0.5mM to 1.5mM of NADPH, for both the native and the R455Q. A similar profile was already presented for the native UdhA(Cao *et al.*, 2011). However, at a low concentration of NADPH (between 0.01 and 0.05mM), a difference between the native enzyme and the R455Q was observed. The maximum activity observed for the native UdhA, at 50µM of NADPH, was 1.3 fold higher than in standard conditions, at 200µM. For UdhA R455Q, the maximum activity was observed with 20µM of NADPH, and was 1.5 fold higher than in the standard conditions (200µM). These results showed a difference of sensitivity for NADPH between the native UdhA and the mutant R455Q. The mutant R455Q is more active than the native transhydrogenase at low NADPH concentrations in anaerobic conditions.

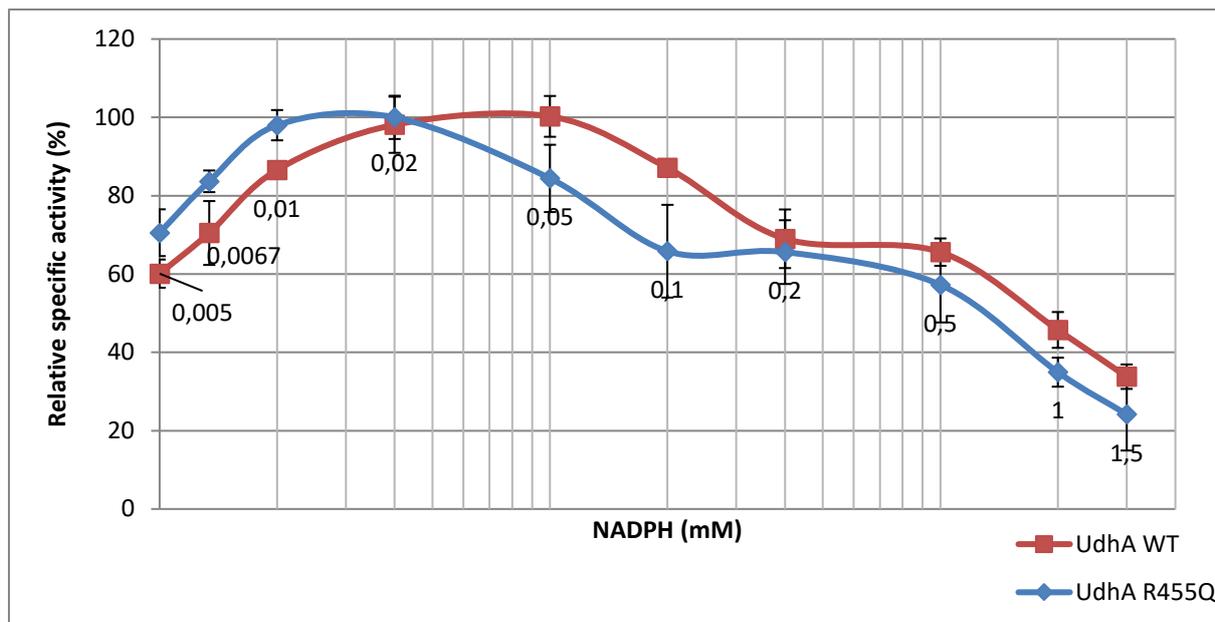


Figure 9: NADPH inhibition on the native and mutant UdhA. Activity measured in anaerobic conditions at 35°C in buffer Tris-HCl with 10 μ M FAD at pH 7.5. The concentration of Thio-NAD⁺ was fixed at 0.2mM.

The comparative biochemical characterization of the UdhA R455Q mutant of the transhydrogenase UdhA confirmed the impact of its mutation on the enzyme specific activity. Indeed, an increase in the molecular weight of the R455Q mutant was observed accompanied by a decrease of the specific activity in standard *in-vitro* conditions. However, the substrate inhibition experiment interestingly showed that in presence of low concentrations of NADPH, this mutant had an enhanced affinity for NADPH than the native enzyme.

h) Insight into the dimerization interaction of UdhA

With the aim of understanding better the role of the Arg 455 in the dimer interface stabilization of the native UdhA, a three-dimensional (3D) model of UdhA was predicted using I-TASSER server (Roy *et al.*, 2010) and the crystallographic structure *Thermus thermophilus* lipoamide dehydrogenase as template. A model of the dimer form of UdhA was then derived from the available crystallographic structure (Figure 10A).

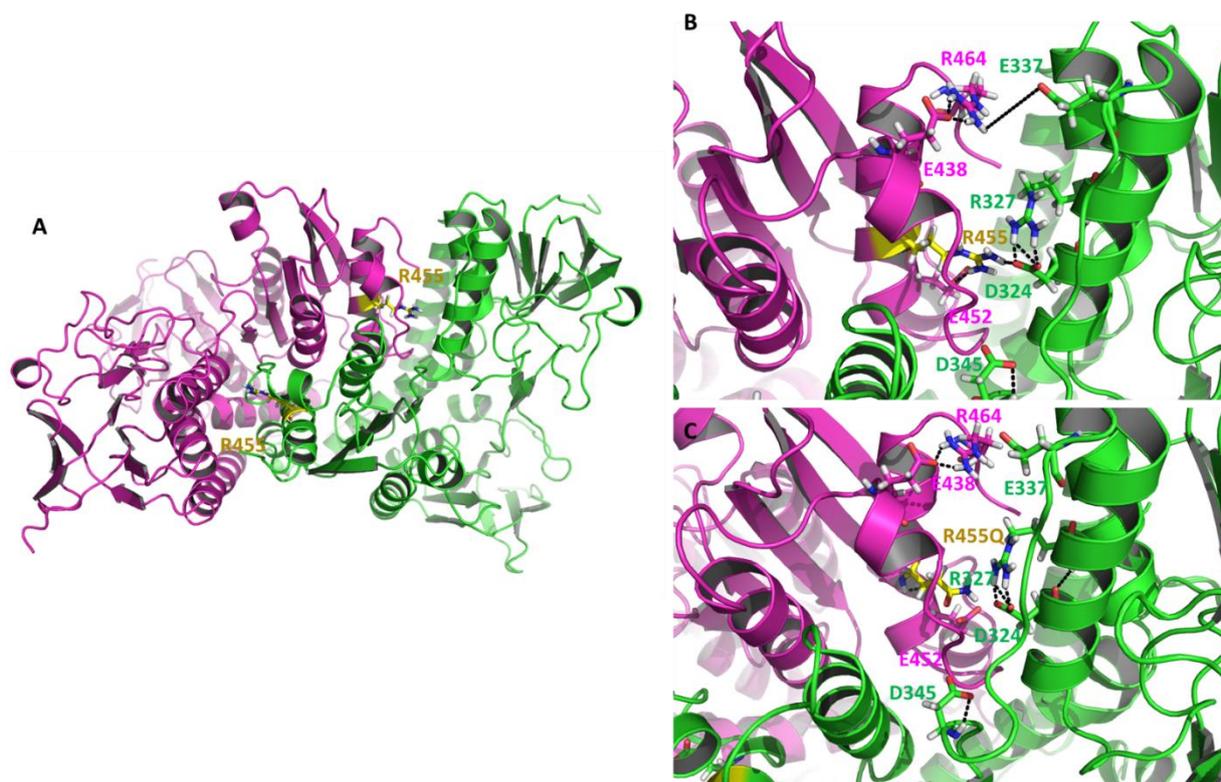


Figure 10: 3D models of Udha. A: Proposed model of Udha dimer; B: View of amino acid residues involved in salt bridge interaction network at the interface of two protein subunits in parental wild-type Udha ; C: View of the dimer interface of mutant Udha R455Q.

The visual inspection of the dimer interface of Udha 3D model revealed that Arg 455 is located at the protein surface, away from enzyme active site. Residue Arg 455 is part of a highly conserved region amongst Pyr-redox-dim superfamily that has been shown to be involved in protein dimerization (Boonstra *et al.*, 2000). Interestingly, Arg 455 is located at the interface of 2 protein subunits, in close vicinity to charged residues such as Glu452 from the same chain and Asp 324 and Arg 327 from the adjacent subunit (Figure 10B). These residues could likely be involved in the formation of an extensive salt bridge interaction network stabilizing the interface of Udha dimer. Introduction of R455Q mutation could thus disturb this ionic interaction network, and consequently the quaternary assembly of the mutant which showed decreased catalytic activity compared to parental enzyme (Figure 10C). This could suggest that R455Q mutation would not have a direct impact on substrate recognition in catalytic site but rather a long distance effect on the stabilization of the quaternary assembly or induce conformational rearrangements of the enzyme that could affect productive catalysis. Of course, the role of Q455 in Udha catalytic activity remains to be elucidated by experimental means.

i) Functional characterization of the (Δ N264) Ferredoxin NAD(P)⁺ oxidoreductase variant from *C. tepidum*

To determine the impact of the deletion of the asparagine at the position 264 onto the enzymatic activity of the FNOR from *C. tepidum*, enzyme assays were performed under strict anaerobic conditions on crude extracts. The control strain ST034, the strain ST180 (native FNOR *C. tepidum*), the strain ST180A (evolved FNOR *C. tepidum*) and the strain ST045 (native FNOR of *C. acetobutylicum*) were all cultured in the same conditions, and NADH and NADPH ferredoxin reductases activities were determined on crude extracts. As shown in Table 7, the FNOR activities were only measured in crude extracts when a FNOR was overexpressed from a plasmid.

Strain:	Description:	FNOR specific activity (U/mg)	
		NADH	NADPH
ST034	Negative control - No FNOR	0	0
ST045	Native FNOR of <i>C. acetobutylicum</i>	NC	1.23 ± 0.23
ST180	Native FNOR from <i>C. tepidum</i>	0.12 ± 0.05	5.07 ± 0.11
ST180A	FNOR (Δ N264) from <i>C. tepidum</i>	0.26 ± 0.05	5.56 ± 0.28

Table 7: Specific FNOR activity determined from crude extracts performed at 37°C in anaerobic conditions using methyl viologen as electron acceptor. Values are expressed ± standard deviation and normalized with the negative control ST034.

As expected, the native FNOR from *C. tepidum* was able to use both NADH and NADPH to reduce ferredoxin, as previously reported (Seo *et al.*, 2016), with a stronger activity with NADPH in comparison with NADH. As expected too, the reduction of ferredoxin by the FNOR from *C. acetobutylicum* was strictly NADPH dependent (Soucaille *et al.*, 2015). Moreover, NADH ferredoxin reductase activity of the FNOR (Δ N264) from *C. tepidum* was twofold higher than the NADH ferredoxin activity of the native enzyme, with no significant difference for the specific activity on NADPH. Therefore, the adaptive evolution led to the selection of an evolved FNOR enzyme harboring a higher NADH ferredoxin activity than the native one, which perfectly deals with the *in vivo* requirement of a Ferredoxin NAD⁺ reductase to reoxidize the reduced ferredoxin and generate NADH for ethanol production.

D. Conclusion

In this work, the central metabolism of *E. coli* was restructured around a ferredoxin node controlling the conduct of the fermentation pathways. The ferredoxin node, composed of the Pfor and the Fd from *C. acetobutylicum*, ensures the conversion of pyruvate to acetyl-CoA, generating reduced ferredoxin. This synthetic pathway must be balanced, and requires a functional FNOR able to reoxidize reduced ferredoxin and generate NADH, to sustain growth and produce ethanol. This strain should be a relevant tool for functional FNOR screening and *in vivo* evolution. To demonstrate the feasibility of the approach, several types of putative FNOR were overexpressed in the engineered platform strain: i) Rnf complexes, ii) Ferredoxin NAD(P)⁺ reductase from *C. tepidum* iii) Ferredoxin NADP⁺ reductase from *C. acetobutylicum* coupled with the soluble transhydrogenase UdhA. The applied strategy demonstrated that i) the activity of the Rnf complexes was not high enough to restore the growth ii) the introduction of either the FNOR from *C. acetobutylicum* coupled with UdhA or of the FNOR from *C. tepidum* re-established the growth and the ethanol production, balancing the redox state in the cells when grown in glucose mineral medium supplemented by yeast extract and nitrate. An adaptive evolution was further performed on glucose mineral medium, increasing the selection pressure applied on the FNOR, to favor the *in vivo* evolution. Results illustrated that both strains were able to evolve rapidly to sustain such growth and ethanol production. The genetic targets responsible for this fast-adaptive evolution were identified for both strains and, as expected, were related to enzymes involved in the reoxidation of reduced ferredoxin and the generation of NADH needed for the equilibration of the redox state. The strain ST045, expressing the ferredoxin NADP⁺ reductase from *C. acetobutylicum* in operon with the transhydrogenase UdhA from *E. coli*, revealed two mutations impacting the NADPH/NADP⁺ ratio in the cell. The first mutation lead to the inactivation of the glucose-6-phosphate dehydrogenase, well known supplier of NADPH for the metabolism and biomass formation. The reduction of NADPH availability was balanced by a second mutation in the overexpressed transhydrogenase UdhA, increasing its activity at low concentrations of NADPH, to respond to the new ratio of NADPH/NADP⁺ in the cell. These mutations create a unique redox balance in the strain allowing the conduct of the fermentation metabolism in glucose mineral medium.

The second strain took another path during adaptive evolution, leading to the direct evolution of the ferredoxin NAD(P)⁺ reductase from *C. tepidum*. The ferredoxin NAD⁺ reductase activity of the native FNOR seems to be insufficient to create a redox cycle with the ferredoxin node from *C. acetobutylicum*. The selection pressure, by expressing this FNOR in the platform strain, led to the selection of an evolved enzyme, which increases the ferredoxin NAD⁺ reductase activity and establishes a suitable redox balance for anaerobic growth and ethanol production in glucose mineral medium.

The strategy applied to couple the growth on glucose mineral medium and ethanol production with the functionality of the FNOR module led to the direct selection of enzyme variants which were never described in nature, and which present interesting features to be implemented in metabolic engineering strategies.

Therefore, the strain developed here could be widely used for screening and selecting functional ferredoxin NAD(P)⁺ oxidoreductases. It is an original and efficient tool for the characterization of FNOR, and it has the capacity to become a valuable tool for the discovery of new FNOR, for the characterization of known FNOR, and for the generation of interesting mutants. Future studies will explore these strategies and establish a library of functional FNOR in *E. coli* by evaluating the potential of several other FNOR such as *yumC* from *Bacillus subtilis* (Komori *et al.*, 2010; Seo *et al.*, 2004) or *tsac_1705* from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* (Tian *et al.*, 2016).

Acknowledgments

This research was funded by the ‘Agence Nationale de la Recherche’, grants number ANR 08 Bioenergy 0 and ANR 14-CE05-0019-01. We would like to thank the Professor Isabelle André for the analysis of the dimerization interaction of the transhydrogenase. We would also like to thank the platform GET-Biopuces at the Genopole in Toulouse for the sequencing experiments and the associated bioinformatics analysis.

E. Supplementary material

Primers are listed in the Table S1 below. One *Taq* Master Mix with Standard Buffer from New England Biolabs (NEB) was used for analysis. The Q5 high-fidelity DNA polymerase (NEB) was used to amplify the functional genes for plasmid constructions and gene deletions. Chromosomal constructions were verified by PCR analyses and phenotype.

Primer name	Sequence	Description
OL3	CGACGTGCGTCCTCAAGCTG	Routine PCR checking for <i>pPL016</i> , <i>pPL019</i> , <i>pPL024</i> , <i>pPL031</i> , <i>pPL033</i> <i>pPL048</i> and <i>pPL053</i> (Promotor)
OL65	GCGCACTAGTGCTCATTATATA CAAGGAGGAAACAGC	Cloning of <i>fnr</i> from <i>C. acetobutylicum</i> in thermo-inducible vector
OL66	GTACCCCGGGATTTTATAGGC CATGACTATTTCTCC	
OL69	GTACCCGGGATATACAAGGAG GAAACAGCTATGCCAC	Cloning of <i>udhA</i> from <i>E. coli</i> in operon with the <i>fnr</i> from <i>C. acetobutylicum</i> in thermo-inducible vector

OL70	GTACCCGGGATAATTTTAAAA CAGGC	
OL71	GCGTTTGTGATTAATCACG	Validation of correct insertion of <i>udhA</i> in operon with the <i>fnr</i> from <i>C. acetobutylicum</i> in thermo-inducible vector
OL78	CGCGCACTAGTATTGAAAGAG GTGTTAAGAGTG	
OL79	ATATACCCGGGCCATTATGA ATTTGCAGCAGC	Cloning of Rnf from <i>C. ljungdahlii</i> DSM 13528 genome
OL96	GTTGTTAGAGAAAACGTATAA ATTAGGGGGATCCCATCCAGC CGGCGTCCCGGAAAACG	Modification of the resistance cassette of the thermo-inducible vector for Kana ⁺
OL97	TGGCGAAAATGAGACGTTGAT CGGCGAATTCCTGGGCGGTTT TATGGACAGCAAGC	
OL128	GCCGATTGTCTGTTGTGCC	Routine PCR checking for <i>pPL016</i> , <i>pPL019</i> , <i>pPL024</i> , <i>pPL031</i> , <i>pPL033</i> <i>pPL048</i> and <i>pPL053</i> (Terminator)
OL191	CGCGCACTAGTGGTCCAAAGC GGCCCTTTGAAAAGAGTC	Cloning of Rnf from <i>Desulfovibrio alaskensis</i> G20 DSM 17464
OL192	CGCGCGTTTAAACGGACTTTA ATGCTCCCGGGCAGCAG	
OL206	CCAACCTCAGCTTCCTTTGCGGC TTAAAACAGGCGGTTTAAACC GTTTAAAC	Cloning of UdhA in the <i>pPAL7</i> vector
OL224	AGAAGACAAGCTCTTCAAAGC TTTGACTAGTCCACATTCCTAC GATTACGATG	
T7P	TAATACGACTCACTATAGGG	
T7rev	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	Sequencing of the <i>pPAL7</i> vector
pACYC-cm f	GATTGAAATGGTTTATCTGTTA CCCCGTAGGATCCGCGTTTAA GGGCACCAATAACTGCC	Modification of the origin of replication in the thermo-inducible vector with <i>pACYC184</i>
pACYC-p15A rv	CGAGCGAAGCTTTAGAGCTCA TGCGCGCCTAGGAGCAATTT AACTGTGATAAACTACCGC	
CI857_FW W	TTTACAGCGAGCTCGACTAGT GTACATGCAACCATTATCACCG CCA	Cloning of the thermo-inducible promoter (PRO1) with de CI857 cassette
CI857_R V	CTTCGCTCGAGCTGCGCGGCC GCTCGAAGCAGCTCCAGCCTA CAG	
Tadc_FW	TTAAGAGGTACCTAGTGGATC CTACGGGGTAACAGAT	Cloning of the terminator <i>adc</i>

AAATTATAGGCCTGGCTTAAG
Tadc_RV TATCCCGGGTAAAAATAAGAG
TTACC

Table S1 : List of primers

Antibody	Type of antigens	Expected size (kDa)	Results	Sequence of the antigens synthesized
RnfA	Peptide	20.85	Detected in aggregates	CREKLRLADVPKPLE
RnfE-1	Peptide	22.91	ND	CIKMQKLEKANGGEA
RnfE-2	Peptide	22.91	Detected in aggregates	MKNLWNIFKKGLIAC
RnfE-3	Peptide	22.91	ND	CRAETFASKNPVVPS
RnfD-1	Peptide	35.27	Detected in aggregates	CIDKFTQPVKFGTRR
RnfD-2	Peptide	35.27	Detected in aggregates	CTSLIRLKGYPEGV
RnfG	Soluble protein	19.81	Detected in aggregates	55-185aa VNDADKFNKVNKGDWYAAQKGNKTIAYVVAESKGYGGAIPELLVAVT PDGKVIDFSIVSHNETPGLGANASKDSFRGQFKDKKADALTVVKDSNT KNIQAMTGATITSAVTKGVKEAVEQVTTFTGGK*
RnfB	Soluble protein	29.12	Detected in aggregates	30-284aa AMEVNPLVDLVEDVLPKGQCGGCGFAGCKAYAEAVVLDESVPNLCVP GKAAVAEQVAKLTGKSAPPIEPRVAHVRCGGDCTKAVKNFEYEGIHDCV AANLEGGPKACKYGLGFGTCVKSCPFAMAMGSNGLPIIDTDICTGC GTCVSACPKQVLGFRPVGSKVMVNCNSKNKGGAVRKACSVGLGCGL CAKNCPNDAIKVENNLAVVDQSICASCSEATCLAKCPTGAIKAIVSGTDL QQQSKNEAANS*
RnfC	Soluble protein	49.43	Detected in aggregates	73-420aa ASTSGKVVDIGDYPHPGFGKCAIVIEKDGKDEWVEGIPTSRNWKELSV KEMLGIIEAGIVGMGGATFPVHVKLAPPPDKKVDVFLNGAECEPYLTA DYRSMLENSDKVVAGVQIIMKILNVEKAFVGIEDNPKAIEAMKKAFFG TKVQVVGLPTKYPQGAEKMLINVLTVREVPSSGLPADVAVVQNVGTC IAISDAVERGIPLIQRVTTISGGAIKEPKNILVRIGTTFKDAIDFCGGFKEEP VKIISGGPMMGFAQSNLDIPIMKGSSGILGLTKNDVNDGKESSCIRCGRC LKACPMHLNPSMLSILGQKDLYQEAKKEEYNLLDCVECGSVYTCPAKRKI

Table S2: Summary of the Western blot performed on the Rnf complex of *C. ljungdahlii*

Strain:	Description:	Specific activity (U/mg)	
		Acetaldehyde reductase	Acetyl-CoA reductase
MG1655	Native AdhE	0.021 ± 0.001	0.047 ± 0.001
ST045	AdhE V360L	0.320 ± 0.002	0.573 ± 0.014
ST180A	AdhE V360L	0.382 ± 0.004	0.650 ± 0.009

Table S3: Specific AdhE activity determined from crude extracts performed at 37°C in anaerobic conditions using acetaldehyde or acetyl-coA as substrate. Values are expressed ± standard deviation.

1.3. Discussion

Les travaux présentés ci-dessus ont conduit au développement d'une souche génétiquement modifiée d'*E. coli* chez laquelle le métabolisme central a été modifié afin que la croissance en anaérobiose et la production d'éthanol soient dépendants de la fonctionnalité d'une Ferrédoxine NAD(P)⁺ oxydoréductase. Cette souche constitue un outil performant pour la sélection directe *in vivo* d'enzymes à activité FNOR. La fonctionnalité de l'approche a été démontrée à travers l'évolution *in vivo* de deux enzymes, respectivement la FNOR de *C. tepidum* et la FNOR de *C. acetobutylicum* couplée à la transhydrogénase. Dans les deux exemples, il a été montré que des mutations sont apparues dans le module à activité ferrédoxine NAD(P)⁺ réductase implémenté, qui permet de restaurer la croissance anaérobie de la souche en milieu minimum sur glucose. L'identification des mutations et la caractérisation biochimique des enzymes évoluées ont montré que les activités des enzymes cibles ont évolué afin de rétablir un équilibre redox cellulaire.

CHAPITRE IV

PRODUCTION HETEROLOGUE DE N-BUTANOL
CHEZ *E. COLI* A L'AIDE LA VOIE COMPLETE DE
CONVERSION DU PYRUVATE EN N-BUTANOL DE *C.*
ACETOBUTYLICUM

Chapitre IV : Production hétérologue de n-butanol chez *E. coli* à l'aide la voie complète de conversion du pyruvate en n-butanol de *C. acetobutylicum*

1. Evaluation *in-vivo* des performances de la souche *E. coli* MG1655 Δ ldhA, Δ pflAB, Δ ack-pta, Δ iscR, Δ frdabcd, Δ aceE, Δ mgsA, Δ adhE Δ melB::TT02 p

La souche d'*E. coli* MG1655, Δ ldhA, Δ pflAB, Δ ack-pta, Δ iscR, Δ frdabcd, Δ aceE, Δ mgsA, Δ adhE Δ melB::TT02 pet al., 2015). Le métabolisme cette souche d'*E. coli* nommée ST001 (Figure 28) a été rationnellement modifié de telle sorte qu'en anaérobiose, les vitesses de croissance et de consommation de glucose soient couplées à la vitesse de production de n-butanol, la production de n-butanol étant nécessaire pour maintenir l'équilibre redox cellulaire.

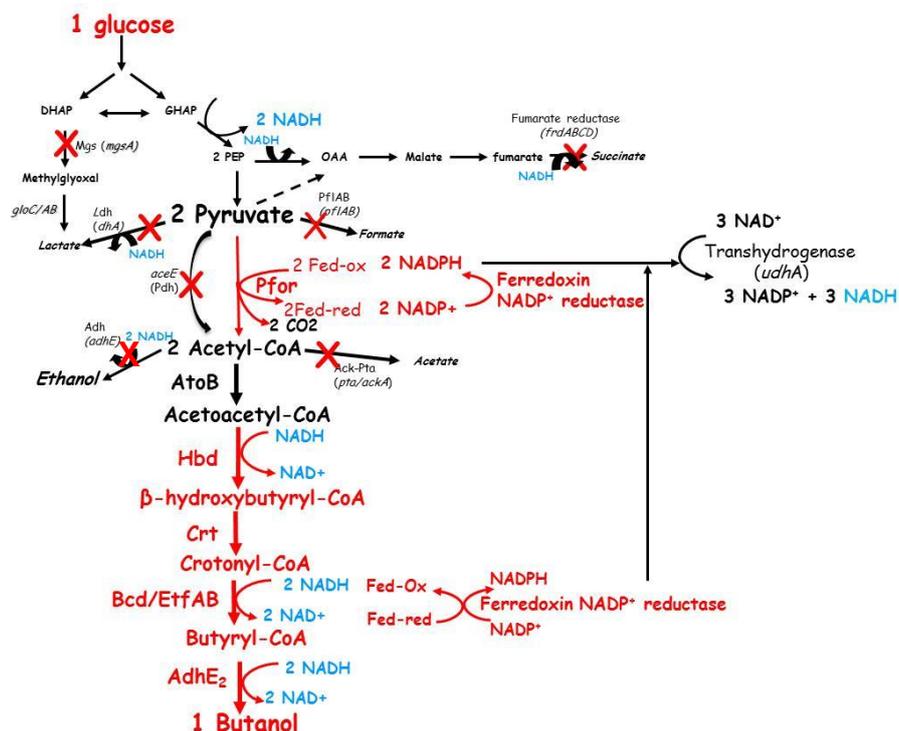
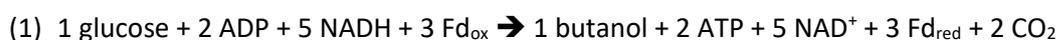


Figure 28 : Représentation du métabolisme anaérobie de la souche *E. coli* ST001, réorienté vers la production de n-butanol, utilisant la voie complète CoA-dépendante de *C. acetobutylicum*. Les flèches en noir correspondent au métabolisme natif d'*E. coli* et les flèches en rouge correspondent à la voie hétérologue CoA-dépendante de *C. acetobutylicum* (Soucaille *et al.*, 2015).

La production de n-butanol par la souche ST001 est résumée par l'équation (1), et détaillée dans le bilan redox en Figure 29.



Molécules:	Glucose	NADH	Pyruvate	NADPH	Fd _{ox}	NAD ⁺	NADP ⁺	Fd _{red}	Butanol	CO ₂
Transhydrogénase		+3		-3		-3	+3			
FNOR <i>C. Acetobutlicum</i>				+3	+3		-3	-3		
ST001		-5	-2		-3	+5		+3	+1	+2
Glycolyse	-1	+2	+2			-2				
Total	-1	0	0	0	0	0	0	0	+1	+2

Figure 29 : Bilan redox de la production de n-butanol dans la souche ST001

Les performances de la souche ST001 ont été évaluées *in-vivo* en culture discontinue dans un milieu de culture chimiquement défini, supplémenté avec 4g/L d'extrait de levure, 5mM de nitrate et 2% de glucose. Les performances de la souche ST001 sont présentées dans le Tableau 32.

Souche	Glucose consommé (g/L)	Ethanol (g/L)	Butanol (g/L)	Butyrate (g/L)	Lactate (g/L)	Acétate (g/L)	Succinate (g/L)	DO _{550nm}	Butanol /Ethanol	Rdt. Butanol /Glucose (g/g)	Carbone balance %
ST001	14,5 ± 1,9	2,2 ± 0,1	3,3 ± 0,2	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,2	0,1 ± 0,03	0,2 ± 0,2	1,8 ± 0,1	1,52 ± 0,04	0,23 ± 0,02	99% ± 1%

Tableau 32 : Performances de la souche ST001 après 300h de croissance en culture discontinue en fiole sans régulation de pH dans un milieu de culture chimiquement défini sur 2% glucose supplémenté par 4 g/L d'extrait de levure, 5 mM de nitrate

Dans ces conditions de culture, la souche ST001 produit 3,3 ± 0,2 g/L de n-butanol comme produit de fermentation majoritaire, ainsi que quelques coproduits : 2,2 ± 0,1 g/L d'éthanol, 0,6 ± 0,1 g/L de butyrate, 0,6 ± 0,2 g/L de lactate 0,2 ± 0,2 g/L de succinate, et 0,1 ± 0,03 g/L d'acétate. La production d'éthanol est catalysée par l'aldéhyde/alcool déshydrogénase AdhE2 de *C. acetobutylicum*, qui est capable d'utiliser l'acétyl-CoA et le butyryl-CoA, conduisant respectivement à la production d'éthanol et de n-butanol. Un ratio butanol/éthanol de 1,52 ± 0,04, montrant la production préférentielle de butanol, a été observé et un rendement de production de 0,23 ± 0,02 g butanol/g de glucose a été calculé, correspondant à 56% du rendement théorique maximum (0,41 g butanol/ g glucose).

La cinétique de la croissance de la souche ST001 lors de la culture discontinue dans un milieu de culture chimiquement défini supplémenté avec 4g/L d'extrait de levure, 5mM de nitrate et 2% de glucose est représenté en Figure 30. Lors de ce suivi de croissance, on observe 4 phases de culture : une phase de latence de 0 à 18h, la phase exponentielle de croissance de 18 à 30h, la phase de ralentissement de 30 à 70h et une phase stationnaire à partir de 70h. A partir de ces données, le taux de croissance maximal (μ_{\max}) a été estimé à 0.038 h^{-1} lors de la phase exponentielle de croissance et la densité optique maximum mesurée à 550 nm ($DO_{\max 550\text{nm}}$) est de $2,1 \pm 0,1$.

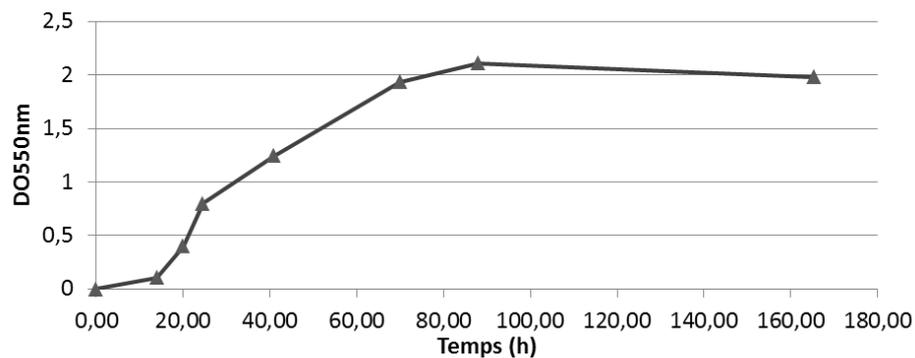


Figure 30 : Cinétique de la croissance de la souche ST001 lors de la culture discontinue dans un milieu de culture chimiquement défini supplémenté avec 4g/L d'extrait de levure, 5mM de nitrate et 2% de glucose

L'analyse de la répartition du carbone lors de la culture de la souche ST001, représentée en Figure 31, montre que la production de n-butanol représente seulement 37% du carbone utilisé, la production d'éthanol représente 17% du carbone utilisé, et l'ensemble des autres coproduits minoritaires représente 12% du carbone utilisé. La formation de biomasse correspond à 4% du carbone utilisé et 30% du carbone est perdu sous forme de CO_2 lors de la décarboxylation oxydative du pyruvate en acétyl-CoA.

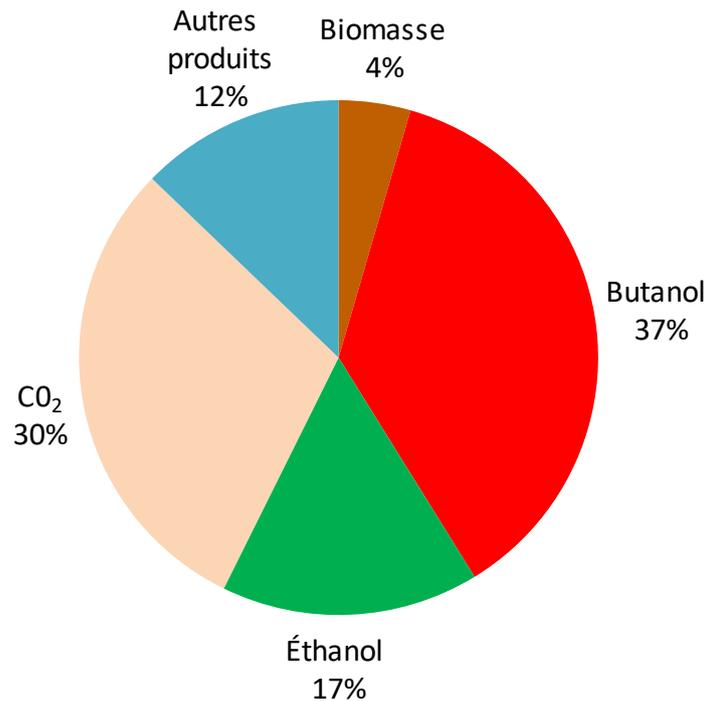


Figure 31 : Analyse de la répartition du carbone lors de la culture de la souche ST001 en culture discontinue dans un milieu chimiquement défini supplémenté avec 4g/L d'extrait de levure, 5mM de nitrate et 2% de glucose

Cette analyse de la répartition du carbone montre que 29% du carbone est perdu dans la formation des coproduits (éthanol, butyrate, succinate, lactate et acétate). La production d'acétate, de succinate et de lactate reste inattendue, car les voies métaboliques de production correspondantes décrites comme fonctionnelles en anaérobiose ont été inactivées, ce qui questionne sur les voies métaboliques impliquées dans la synthèse de ces coproduits. La présence de ces coproduits suggère un déséquilibre redox lors de la production de n-butanol, malgré l'approche rationnelle de réorientation du métabolisme qui a été réalisée. Cependant, il est à considérer qu'*E. coli*, étant une bactérie anaérobie facultative, l'addition d'un accepteur final d'électrons, en remplacement de l'oxygène dans le milieu de culture anaérobie, favorise la croissance en anaérobiose. Aussi, un ajout de 5mM de nitrate dans le milieu de culture est systématiquement effectué lors des croissances de la souche ST001. Ces nitrates sont utilisés pour réaliser la respiration anaérobie, qui permet une production additionnelle d'ATP, mais qui consomme également du NADH. D'après Uden et Bongaerts, l'utilisation de NADH comme donneur d'électrons et du nitrate comme accepteur final va permettre la translocation de trois protons par électron transféré ; Deux protons sont transférés par la NADH:quinone oxydoréductase NuoA-N, et un proton est transféré par la nitrate réductase NarGHI (Uden and Bongaerts, 1997). Cette force proton-motrice peut ensuite être convertie en ATP au travers des ATP synthases.

L'addition de nitrate, nécessaire à la respiration anaérobie, consomme donc du NADH pour la production d'ATP, qui devient alors non disponible pour les deux dernières réactions de la voie de synthèse du n-butanol, et favorisant la production de butyrate, qui n'est pas NADH dépendante. Ainsi, le rendement de conversion du glucose en butanol est limité.

1.1. Reséquençage complet de l'ADN génomique de la souche ST001

Les premières cultures de la souche ST001, en anaérobiose dans un milieu de culture chimiquement défini supplémenté avec 4g/L d'extrait de levure, 5mM de nitrate et 2% de glucose, ont montré que le phénotype observé correspondait bien à celui attendu, à l'exception de la production de coproduits tels que le succinate, l'acétate ou le lactate. La construction la souche ST001 ayant nécessité la délétion de nombreux gènes chromosomiques et la surexpression de 11 gènes, il a été décidé d'extraire l'ADN génomique de la souche ST001 produisant du butanol comme produit de fermentation majoritaire à partir d'une culture en anaérobiose, afin de le reséquencer pour comparer cette séquence à la séquence d'une souche sauvage, et ainsi confirmer le génotype. Le séquençage des deux souches a été effectué en utilisant la technologie Ion torrent (décrite dans le Chapitre II, partie 7), et analysée par la Plateforme GET-Biopuces (Génopole -Toulouse).

Le séquençage de l'ADN génomique issu de la souche ST001 a permis de confirmer l'ensemble des délétions/insertions réalisées dans la souche ST001 (*ΔldhA*, *ΔpflAB*, *Δack-pta*, *ΔiscR*, *Δfrdabcd*, *ΔaceE*, *ΔmgsA*, *ΔadhE* *ΔmelB::TT02* *ptrc01/RBS01*2crt-hbd* *ptrc30RBS01*2atoB*). Toutefois, deux modifications du génotype théorique ont été observées :

i) une perte de 95 071 paires de bases a été constatée dans l'ADN génomique des deux clones séquencés (3,625,558-3,720,629). La région excisée est représentée en Figure 32.

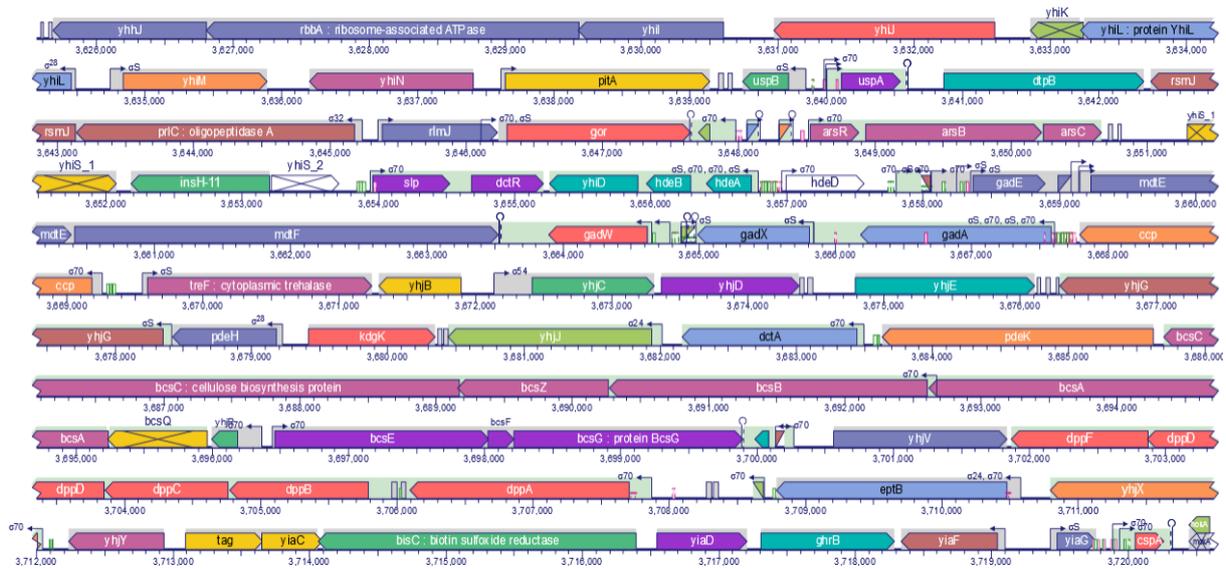


Figure 32 : Région génomique déléetée (3,625,558-3,720,629) au cours de la construction de la souche d'*E. coli* MG1655 Δ ldhA, Δ pfIAB, Δ ack-pta, Δ iscR, Δ frdabcd, Δ aceE, Δ mgsA, Δ adhE Δ melB::TT02 ptrc01/RBS01*2crt-hbd ptrc30RBS01*2atoB pCF3* udhA R455L (ST001).

La perte de cette région chromosomique a été validée par PCR, en utilisant un couple d'oligonucléotides situé en amont et en aval de la région manquante, et formant un produit PCR de 2264bp lorsque la région est manquante (Figure 33).

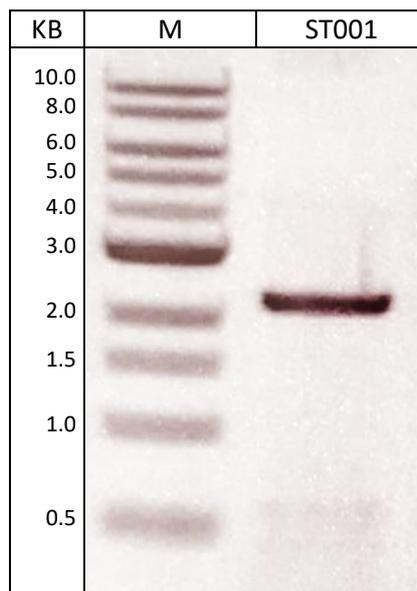


Figure 33 : Validation par PCR de la perte de la région chromosomique (3,625,558-3,720,629) dans la souche ST001. Piste M : marqueur de taille 1kb ; Piste ST001 : taille attendue 2264 pb (amorces : 95kdelbutanolstrain-F/-R).

Comme la souche ST001 produit du n-butanol comme produit de fermentation majoritaire, correspondant au phénotype attendu, il semble que la délétion de cette région n'impacte pas la production de n-butanol. Afin de confirmer cette hypothèse, il aurait été nécessaire de réintroduire cette région dans la souche ST001. A l'aide des différentes souches intermédiaires stockées (génération en amont de la souche ST001), nous avons pu identifier que la délétion de cette région est intervenue après la délétion du gène *mgsA* : la souche MG1655 $\Delta ldhA$, $\Delta pf1AB$, $\Delta ack-pta$, $\Delta iscR$, $\Delta frdabcd$, $\Delta aceE$, $\Delta mgsA$ ne possède pas la délétion. Il aurait donc été nécessaire de déléter à nouveau le gène *adhE* de cette souche, et de réintroduire les surexpressions de *atoB* et *crt-hbd* chromosomiques. Ce travail n'a pas été jugé opportun aux vues des circonstances et des délais.

ii) une mutation dans le gène *udhA* codant pour la transhydrogénase d'*E. coli* surexprimée sur le vecteur *pCF3* udhA*. Cette mutation provoque le remplacement de l'arginine en position 455 par une leucine (UdhA R455L). La présence de cette mutation a été confirmée par un séquençage de Sanger du plasmide *pCF3* udhA Arg455Leu* contenu dans la souche ST001. On retrouve cette mutation dans l'ensemble des souches Butanol qui dérivent de la souche ST001, mais elle est absente de la souche initialement construite. Dans le chapitre III, une mutation dans UdhA avait déjà été identifiée à la même position, lors de l'évolution adaptative de la souche éthanol dans un milieu chimiquement défini sur glucose en absence d'extrait de levure et de nitrate. Cependant, l'acide aminé de remplacement était une glutamine. De plus, l'arginine située en position 455 et les acides aminés qui l'entourent semblent être fortement conservés chez d'autres organismes tels qu'*A. vinelandii* et *P.*

fluorescens (Alignement des séquences protéiques présenté en Figure 13 dans le chapitre I partie 1.2.4.2). Il semblerait que cette position au sein de la protéine soit une position importante impliquée dans le mécanisme de l'enzyme, lorsque celle-ci est exprimée chez *E. coli* en anaérobiose.

1.2. Etude de l'impact de la mutation Arg455Leu sur l'activité catalytique d'UdhA identifiée lors du reséquençage de l'ADN génomique de la souche ST001 après culture en anaérobiose

1.2.1. Purification et caractérisation d'UdhA Arg455Leu

Afin d'évaluer l'impact de la mutation UdhA Arg455Leu sur l'activité catalytique de l'enzyme, les enzymes, native et mutante, ont été surexprimées sur un vecteur afin de permettre leur expression puis leur purification en anaérobiose stricte chez *E. coli*. Les protéines ont été exprimées et purifiées en anaérobiose en utilisant le système Profinity eXact™, développé par Bio-rad sur un Akta Purifier 10 comme décrit dans le chapitre II, partie 5.3. L'activité enzymatique spécifique a été déterminée en anaérobiose stricte pour les deux enzymes dans les conditions décrites dans le Chapitre II, partie 5.5.1 (à 35°C dans le tampon Tris -HCl avec 10µM FAD et à pH 7.5). La concentration de thio-NAD⁺ et de NADPH étaient fixées à 0,2 mM et la réaction est suivie par la réduction du Thio NAD⁺ à 400nm. Les résultats sont présentés dans le Tableau 33. D'après ces résultats, la mutation UdhA R455L provoque une augmentation de l'activité spécifique d'environ 2.2 fois par rapport à l'enzyme native. La masse molaire des deux protéines purifiées (native et mutante) a été estimée par chromatographie d'exclusion stérique. On constate que la masse molaire de l'enzyme native correspond bien à celle décrite dans la littérature, avec environ 8 sous-unités protéiques (Boonstra *et al.*, 1999). Cependant, l'enzyme mutante présente une variation dans sa masse molaire par rapport à cette référence. Le mutant UdhA R455L a une masse molaire légèrement supérieure à celle de l'enzyme native, avec une structure potentielle d'environ 9 sous-unités protéiques.

Enzyme purifiée:	Activité spécifique (U/mg)	Masse molaire (kDa)	Nombre de sous-unités protéiques estimé
UdhA	24,62 ± 1,39	445,8 ± 4,4	8,6
UdhA Arg455Leu	54,69 ± 2,35	484,6 ± 3,7	9,4

Tableau 33: Détermination de l'activité enzymatique spécifique *in vitro* des enzymes UdhA sauvage et UdhA Arg455Leu mutante. Les valeurs moyennes d'activités spécifiques et les écarts-types ont été déterminées sur trois mesures indépendantes à partir de deux purifications indépendantes pour chaque enzyme. Les valeurs moyennes des masses molaires et les écarts-types ont également été déterminées à partir de deux purifications indépendantes pour chaque enzyme.

Afin de caractériser plus finement ces mutants, un test d'inhibition de l'activité enzymatique par le NADPH a été réalisé en anaérobiose, en faisant varier la concentration de NADPH entre 0,005 et 1,5 mM et en maintenant la concentration en Thio-NAD⁺ à 0,2 mM. Les résultats sont représentés en Figure 34.

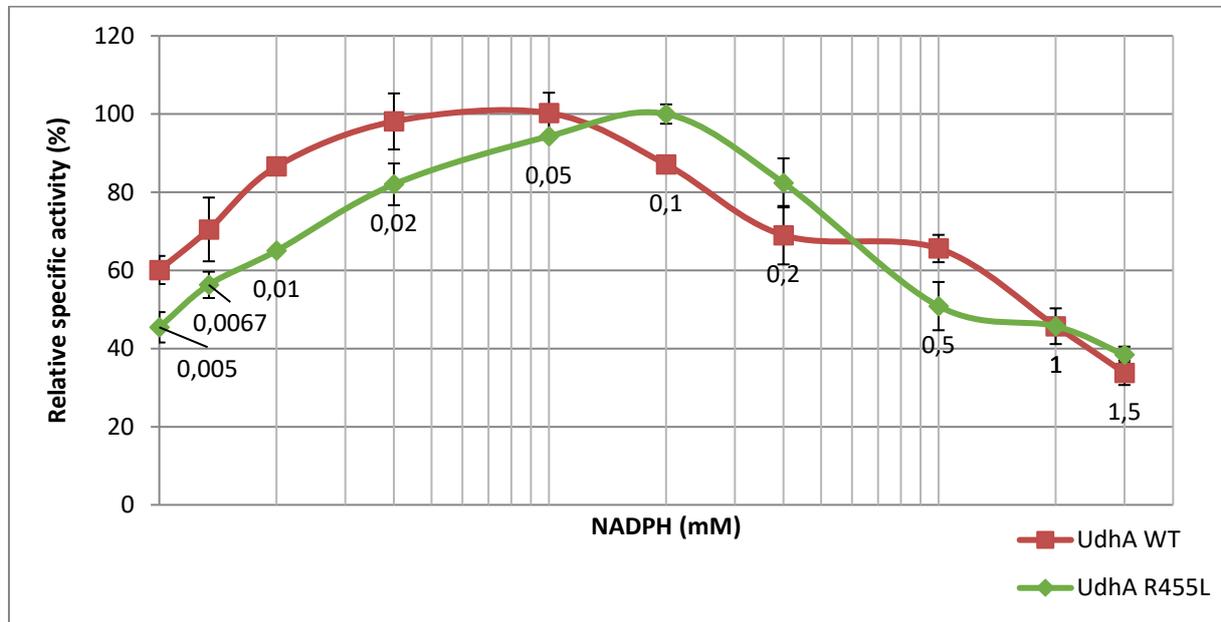


Figure 34 : Comparaison de l'inhibition de l'activité transhydrogénase entre l'enzyme native et le mutant R455L en fonction de la concentration en NADPH à partir de tests d'activité enzymatique réalisés en anaérobiose à 35°C dans le tampon Tris -HCl avec 10µM FAD à pH 7.5. La concentration de thio-NAD⁺ était fixée à 0,2 mM.

Les résultats obtenus pour l'enzyme native sont en corrélation avec ceux présentés dans la littérature, avec une diminution de l'activité spécifique de l'enzyme en présence de concentrations de NADPH supérieures à 0,5 mM (Cao *et al.*, 2011). La comparaison des profils d'inhibition de l'enzyme native et du mutant UdhA R455L par le NADPH montre une allure similaire pour les deux enzymes. Les courbes sont cependant décalées, montrant que l'enzyme mutante R455L garde une activité enzymatique maximale pour une concentration de 0,1 mM de NADPH, alors que l'activité de l'enzyme sauvage n'est que de 87 % par rapport à l'activité spécifique maximale. Il semble donc que l'enzyme mutante soit moins sensible aux concentrations plus élevées en NADPH, ce qui est probablement dû au fait que l'enzyme mutante a été sélectionnée *in vivo* dans un milieu intracellulaire où le ratio NADPH/NADP⁺ pourrait être plus élevée par rapport à *E. coli* MG1655 sauvage, dont le ratio NADPH/NADP⁺ est d'environ 1 (Fuhrer and Sauer, 2009).

1.2.2. Modélisation de la structure d'UdhA Arg455Leu

Comme précédemment, un modèle moléculaire de la structure tridimensionnelle de la transhydrogénase UdhA a été construit afin d'essayer de mieux comprendre à l'échelle moléculaire l'effet de la mutation UdhA Arg455Leu sur l'activité enzymatique ainsi que le mécanisme d'oligomérisation des sous-unités protéiques. En absence de la structure cristalline d'UdhA, les modèles moléculaires ont été générés par méthode de Threading à l'aide du serveur I-TASSER (Roy *et al.*, 2010) en utilisant principalement comme référence, la structure cristallographique de la lipoamide déshydrogénase (E3s) de *Thermus thermophilus* (Code PDB : 2YQU), possédant 32% d'identité avec UdhA. Un modèle du dimère d'UdhA construit à partir de la structure 2YQU est présenté en Figure 35A.

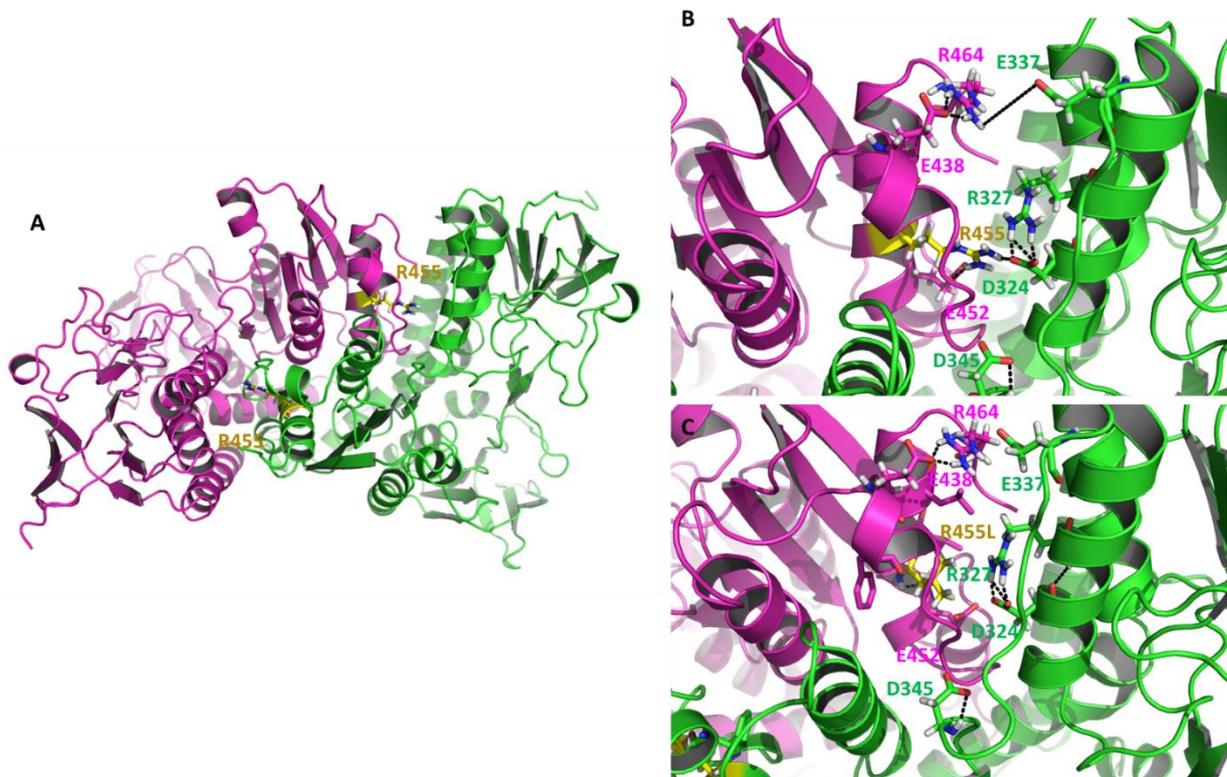


Figure 35: Modèle 3D de la transhydrogénase UdhA. A : vue globale de dimère d'UdhA sauvage ; B : vue des résidus impliqués dans un réseau de ponts salins à l'interface entre deux sous-unités protéiques de l'enzyme sauvage impliquant Glu 452, Arg 455 d'une sous-unité et l'Asp 324 et le R327 de la seconde sous-unité; C : Vue de l'interface entre deux sous-unités du mutant UdhA Arg455Leu.

L'analyse visuelle du modèle d'UdhA a révélé que le résidu arginine en position 455 était éloigné du site actif de l'enzyme et situé à la surface de la protéine (Figure 35A), dans une région en C-terminal composée d'une centaine de résidus d'acides aminés hautement conservée dans la superfamille Pyr-redox-dim. L'implication de cette région dans la dimérisation des transhydrogénase a été démontrée

dans la littérature (Boonstra *et al.*, 2000). De façon intéressante, ce résidu apparaît ainsi situé à l'interface entre les 2 sous-unités protéiques et à proximité spatiale de résidus chargés tels Glu 452 appartenant à la même chaîne que Arg 455 et de Asp 324 et Arg 327 appartenant à la sous-unité adjacente (Figure 35B). Ainsi ces résidus pourraient permettre la formation d'un réseau de ponts salins stabilisant l'interface du dimère de la transhydrogénase UdhA. L'introduction de la mutation Arg455Leu dans UdhA, représentée en Figure 35C, viendrait alors possiblement perturber ce réseau d'interactions ioniques et de ce fait l'assemblage quaternaire du mutant dont l'activité catalytique a été améliorée 2,2 fois par rapport à l'enzyme native. Ceci laisserait penser que l'effet de la mutation Arg455Leu sur l'activité catalytique de l'enzyme ne serait donc pas lié à une interaction avec le substrat dans la poche catalytique, mais plutôt un effet longue distance conduisant à une stabilisation de l'assemblage quaternaire ou à des réarrangements conformationnels pouvant favoriser la réaction catalytique. Bien évidemment, ces hypothèses sur l'effet de la mutation restent à vérifier expérimentalement.

2. Évaluation et évolution *in-vivo* des performances de la souche ST001 en culture continue à pH régulé dans un milieu chimiquement défini à base de glucose supplémenté avec 4g/L d'extrait de levure et 5 à 10mM de nitrate.

Les performances de la souche ST001 en culture discontinue semblent indiquer la présence d'un élément limitant la production de n-butanol. Une hypothèse est que l'accumulation de n-butanol, qui est reconnu comme un produit toxique inhibant la croissance des bactéries, et en particulier celle de *E. coli* (Liu *et al.*, 2017), pourrait être l'un des éléments limitant la production. Afin d'améliorer les performances de la souche ST001, la souche a été cultivée en culture continue (chémostat) en anaérobiose dans le milieu chimiquement défini supplémenté avec 4 g/l d'extrait de levure et 5 à 10mM de nitrate avec un pH maintenu à 6,4. La culture en continu de cette souche permet de limiter l'accumulation du butanol, grâce au soutirage constant du milieu, et le taux de dilution choisi permet également de contrôler le taux de croissance de la souche. Comme décrit précédemment, le métabolisme de la souche ST001 a été conçu de telle sorte que la vitesse de croissance et de consommation de glucose soient liées à la vitesse de production de n-butanol, donc la sélection de cellules ayant un taux de croissance supérieur à la souche initiale devrait conduire à une augmentation de la vitesse production en n-butanol. Le contrôle du taux de croissance force l'évolution de la souche, grâce à l'augmentation progressive du taux de dilution, ce qui permet de sélectionner les cellules avec un taux de croissance plus élevé.

Une première évolution de la souche ST001 en culture continue a été conduite sur une période de 3100h. Les Figures 36 et 37 représentent respectivement la cinétique de production des produits de fermentation, et les cinétiques de consommation en glucose et de croissance.

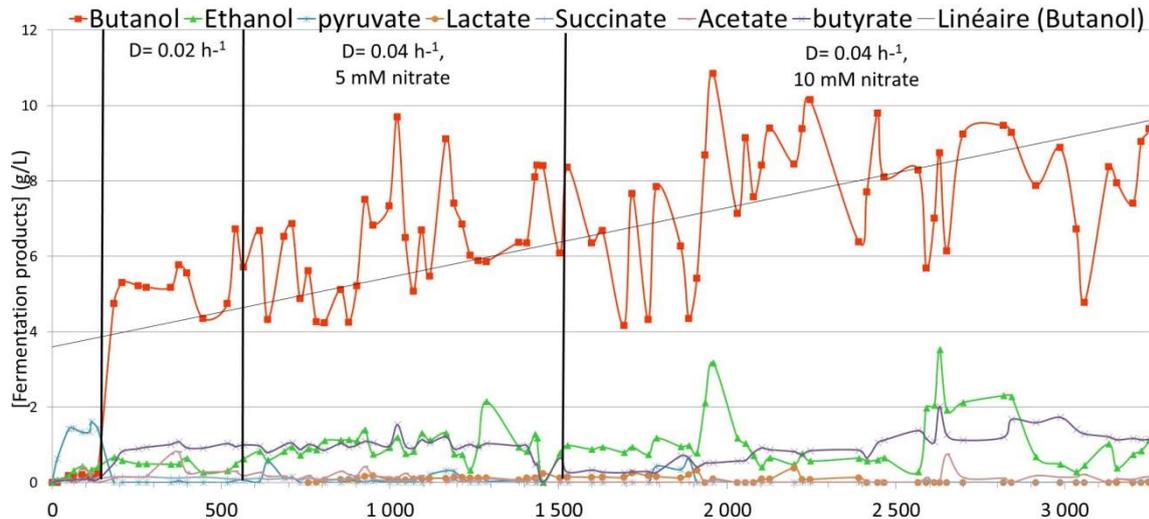


Figure 36 : Cinétique de production des produits de fermentation formés lors de la première culture en continu de la souche Butanol ST001 en milieu chimiquement défini supplémenté avec 4 g/l d'extrait de levure et 5 à 10mM de nitrate à pH 6,4.

Après une phase de culture discontinue à pH régulé (pH 6,4), la culture a été alimentée en continu à un taux de dilution de $0,02h^{-1}$. Durant cette période, la concentration de n-butanol présent dans le fermenteur oscille entre 4,5 et 6,5 g/L avec une concentration moyenne d'environ 5g/L. Lors de cette période, la concentration en glucose consommé oscille entre 12,5 et 15g/L, et la croissance est reflétée par une variation de la densité optique (DO_{550nm}) entre 2,5 et 3. Dans l'objectif d'accroître la vitesse de production en butanol, le taux de dilution a été multiplié par deux ($0,04h^{-1}$) après 500h de culture continue. Lors de cette période, la concentration en butanol augmente, en oscillant entre 4,5 et 9,5 g/L avec une concentration moyenne d'environ 7 g/L. Associé à l'augmentation du titre en butanol présent dans le fermenteur, on observe une augmentation de la concentration de glucose consommé, allant de 12,5 g/L à 27 g/L, confirmant bien le couplage entre vitesse de consommation de glucose et vitesse de production en butanol. On observe également de forte fluctuation dans la croissance avec une densité optique (DO_{550nm}) variant de 2,5 à 5 unités. Après 1000h de culture continue dans ces conditions, la quantité de nitrate supplémentés a été multipliée par 2 (10mM) afin d'évaluer l'impact d'une augmentation de la production d'ATP pour les cellules au travers de la respiration anaérobie. Ce surplus d'ATP se traduit par une augmentation de la croissance avec une augmentation de la DO_{550nm} jusqu'à 6 unités de densité optique. En conséquence, une augmentation de la concentration en glucose

consommé (entre 12,5 et 32 g/L) et du titre maximal en butanol produit (11g/L) sont observés. La concentration moyenne en butanol est également plus élevée, avec une valeur d'environ 8 g/L.

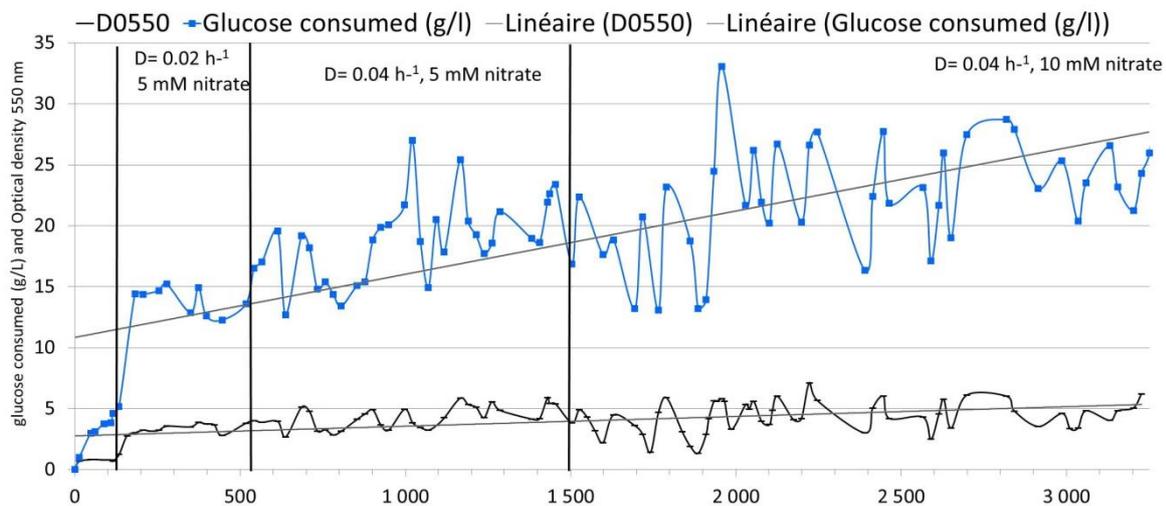


Figure 37 : Cinétiques de la consommation du glucose et de croissance lors de la première culture en continu de la souche Butanol ST001 en milieu chimiquement défini supplémenté avec 4 g/l d'extrait de levure et 5 à 10mM de nitrate à pH 6,4

Au cours de cette culture continue de la souche ST001, le butyrate est resté un produit de fermentation minoritaire. L'analyse de la concentration en butyrate indique une moyenne de 0,8 g/L de butyrate en présence de 5mM de nitrate, et une moyenne de 1 g/L de butyrate en présence de 10mM de nitrate. La concentration maximale de butyrate atteinte a été de 2,0 g/L en présence de 10mM de nitrate. La faible différence dans la concentration en butyrate observée, entre 5 et 10mM, suggère que la respiration nitrate impacte peu le NADH disponible lorsque la souche est cultivée en culture continue.

L'analyse des résultats obtenus lors de la 3^{ème} phase de cette culture continue pour l'évolution de la souche butanol ST001 montre que cette stratégie a conduit à la sélection d'une population évoluée dont les performances ont été améliorées en cours de culture :

i) le ratio Butanol/Ethanol moyen est d'environ 11,2 par rapport au ratio initial d'environ 8.

ii) le rendement de production du butanol en grammes de butanol produit par gramme de glucose consommé moyen est de 0,34 g/g soit 83% du rendement théorique maximum (0,41 g butanol/g glucose)

iii) La productivité moyenne de butanol a été calculée à 0,32 g/L/h et la vitesse de consommation moyenne du glucose à 0,95 g/L/h.

Cependant, lors de la réalisation de cette culture en continu, la formation progressive d'un biofilm a été observée sur les parois du fermenteur. La formation de ce biofilm pourrait être la raison de l'augmentation de la concentration en butanol. Afin de vérifier cette hypothèse, et confirmer que l'amélioration des performances de la population évoluée est bien liée à une évolution de la souche ST001 au cours de la culture continue durant plus de 3000h, un second chémostat a été inoculé à partir de la population de ce premier chémostat. Les Figures 38 et 39 représentent respectivement la cinétique des produits de fermentation, et les cinétiques de la consommation en glucose et de la croissance lors de cette seconde culture en continu.

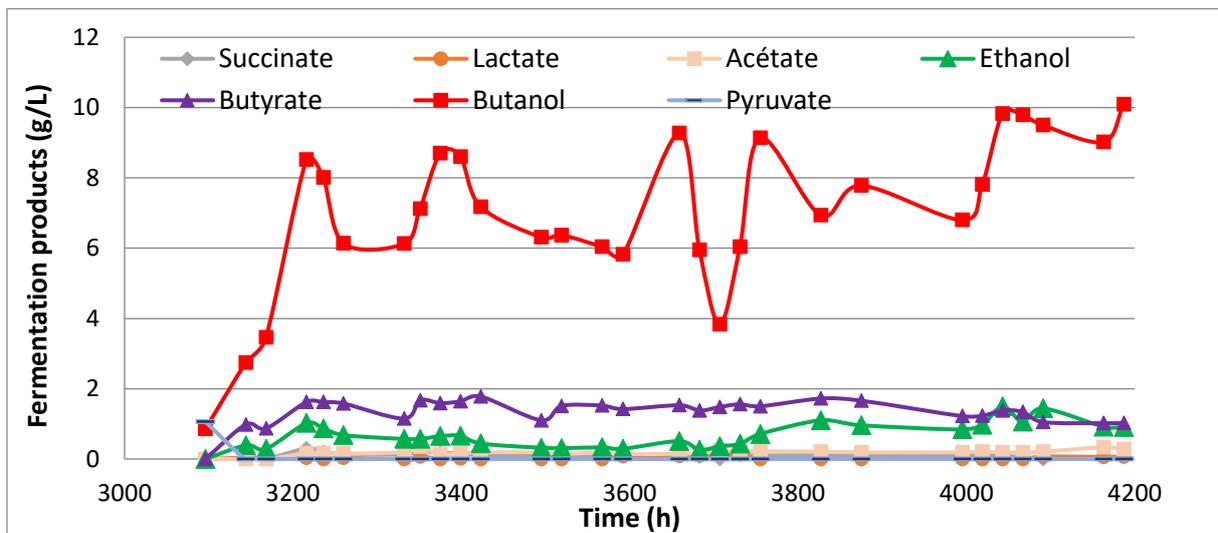


Figure 38 : Cinétique des produits de fermentation formés lors de la seconde culture en continu de la souche Butanol inoculée à partir de la population du premier chémostat en milieu chimiquement défini à base de glucose supplémenté avec 4 g/l d'extrait de levure et 10mM de nitrate à pH 6,4.

Ce second chémostat, inoculé à partir de la population du précédent chémostat après 3100h d'évolution, a été réalisé dans le milieu chimiquement défini supplémenté avec 4 g/l d'extrait de levure et 10 mM de nitrate avec un pH maintenu à 6,4 et un taux de dilution de $0,036 \text{ h}^{-1}$. Lors de la conduite de ce chémostat, on observe une concentration en butanol qui oscille entre 4 et 10 g/L avec une valeur moyenne d'environ 7,5 g/L. La consommation de glucose oscille entre 12 et 30 g/L et la densité optique fluctue entre 2,5 et 8 unités ($\text{DO}_{550\text{nm}}$).

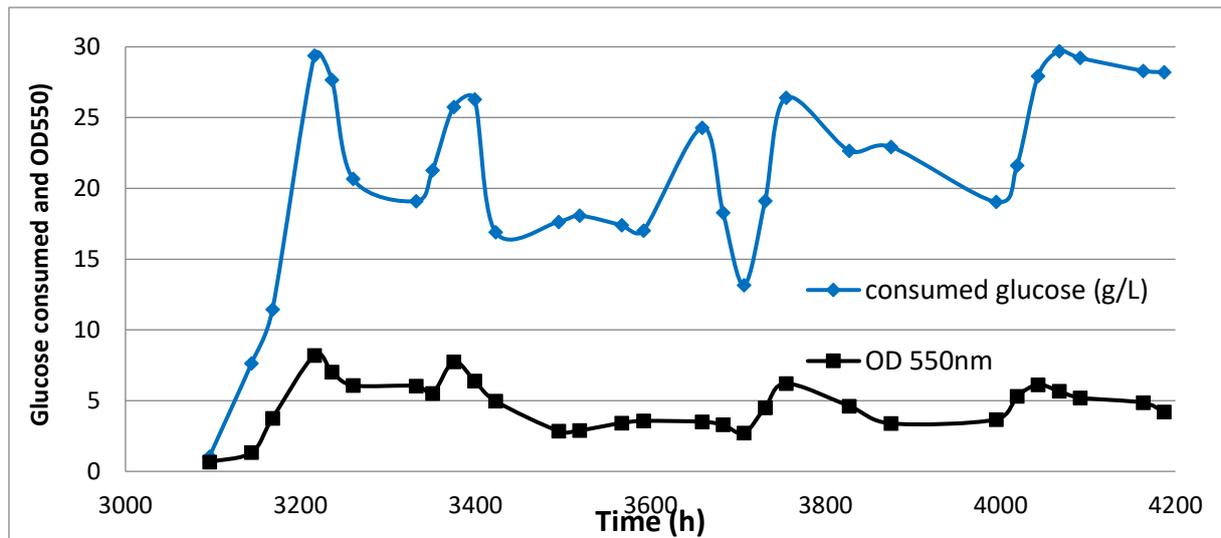


Figure 39 : Cinétiques de la consommation du glucose et de croissance lors de la seconde culture en continu de la souche Butanol, inoculée à partir de la population du premier chémostat en milieu chimiquement défini à base de glucose supplémenté avec 4 g/l d'extrait de levure et 10mM de nitrate à pH 6,4

Ces valeurs sont similaires à celles observées précédemment, lors du premier chémostat. Cette seconde culture en continu, réalisée sur 1000h, permet de confirmer que les performances améliorées obtenues à la fin du précédent chémostat sont bien liées à une évolution des propriétés des souches constituant la population évoluée, et non liées à la formation d'un biofilm, qui n'a pas été observé sur cette deuxième culture.

Un ratio Butanol/Ethanol de 12,2 et un rendement moyen de 0,34 g/g glucose consommé ont été déterminés au cours de cette culture, correspondant aux mêmes valeurs que celles déterminées au cours de la précédente culture, démontrant donc la stabilité des performances de la population évoluée sélectionnée.

La stratégie d'évolution *in-vivo* en culture continue mise en place a conduit à la sélection d'une population de bactéries évoluées dont les performances sont améliorées par rapport à la souche initiale. Cette population est capable de produire une concentration en n-butanol d'environ 11 g/L, associée à une augmentation de la croissance avec un rendement de conversion correspondant à 83 % du rendement théorique maximum. Le ratio Butanol/Ethanol (12,2) en culture continue montre que le n-butanol est bien le produit de fermentation majoritaire. Cependant, aucun régime permanent n'a pu être maintenu lors de la réalisation de ces cultures en continu. L'hypothèse que les oscillations du titre en butanol et de la valeur de la densité optique étaient dues à la toxicité du butanol produit, provoquant une lyse des cellules présentes dans le fermenteur, a été formulée. Toutefois, on peut observer que les variations entre la quantité de butanol basale et la quantité de butanol maximale

augmentent au cours du temps, avec un titre maximal de plus en plus élevé, ce qui suggère une adaptation de la souche au cours du temps, qui augmenterait sa tolérance au butanol.

2.1. Ré-isolement et caractérisation de clones à partir de la population évoluée : identification des cibles de l'évolution :

Les performances de la population évoluée à l'issue des 4500h d'évolution *in-vivo* en culture continue ont été comparées avec celles de la souche ST001 dans les mêmes conditions de cultures. Pour cela, des cultures discontinues ont été réalisées en fioles sans régulation de pH en milieu chimiquement défini supplémenté avec 4 g/l d'extrait de levure et 5 mM de nitrate avec un pH initial de 6,8.

De plus, afin de caractériser le phénotype des bactéries composant cette population évoluée, un isolement sur boîte LB en aérobie a été réalisé, pour obtenir des clones isolés issus de la population. 10 clones ont été sélectionnés aléatoirement et cultivés lors de cultures discontinues en anaérobiose dans le milieu chimiquement défini à base de glucose supplémenté avec 4 g/l d'extrait de levure et 5 mM de nitrate avec un pH initial de 6,8. Sur les 10 clones isolés, aucune croissance en anaérobiose n'a été observée pour les clones « 1 », « 2 », et « 3 ». La croissance et les titres finaux en butanol et éthanol des clones restants ont été comparés à la population évoluée et à la souche ST001, présentés dans le Tableau 34.

Souche	Glucose consommé (g/L)	Ethanol (g/L)	Butanol (g/L)	Butyrate (g/L)	Lactate (g/L)	Acétate (g/L)	Succinate (g/L)	DO _{550nm}	Butanol /Ethanol	Rdt. Butanol /Glucose (g/g)	Carbone balance %
ST001	14,5	2,2	3,3	0,6	0,6	0,1	0,2	1,8	1,5	0,23	99%
Pop. évoluée	18,6	3,1	5,1	0,6	0,5	0,1	0,4	3,4	1,7	0,27	116%
Clone 4	21,6	3,2	6,1	0,5	0,3	0,1	0,4	3,7	1,9	0,28	112%
Clone 5	19,1	3	5,5	0,5	0,3	0,1	0,5	3,4	1,8	0,29	116%
Clone 6	23,1	4,5	5,8	0,6	0,2	0,1	0,3	3,6	1,3	0,25	111%
Clone 7	19,1	3,1	5	0,5	0,3	0,1	0,3	3,8	1,6	0,26	109%
Clone 8	20,6	2,9	5,7	0,6	0,3	0,1	0,5	3,7	2	0,28	111%
Clone 9	18,8	2,8	5,2	0,7	0,3	0,1	0,5	3,6	1,8	0,27	113%
Clone 10	19,1	2,9	4,7	0,5	0,3	0,1	0,4	4,5	1,6	0,24	116%

Tableau 34 : Comparaison des performances entre la souche ST001, la population évoluée, et 7 clones ré-isolés à partir de la population évoluée, en culture discontinue en fiole sans régulation de pH dans le milieu de culture chimiquement défini sur glucose supplémenté par 4 g/L d'extrait de levure, 5 mM de nitrate. Les lignes surlignées en rouge correspondent aux clones retenus pour la suite de l'étude.

Dans ces conditions de croissance, la population évoluée produit du butanol à un titre maximum de 5,1 g/L soit 1,5 fois plus que la souche ST001 avant évolution (3,3 g/L de butanol par la souche ST001) et de l'éthanol à une concentration de 3,1 g/L soit 1,4 fois plus que la souche ST001 (2,2 g/L). On observe également une augmentation de la densité optique de la population évoluée, par rapport à la souche ST001, avec respectivement 3,4 unités de densité optique et 1,8 unités (DO_{550nm}). Le rendement de production du n-butanol est également amélioré de 1,2 fois dans la population évoluée, avec un rendement à 0,27 g/g par rapport à 0,23 g/g pour la souche ST001. De plus, le ratio Butanol/Ethanol est légèrement plus favorable dans la population évoluée par rapport à la souche ST001, avec des valeurs respectives de 1,7 et 1,5.

On observe une variabilité dans les résultats obtenus avec les clones isolés à partir de la population évoluée, avec un titre final en butanol compris entre 4,7 et 6,1 g/L (Population évoluée : 5,1 g/L), d'éthanol compris entre 2,8 et 4,5 g/L (population évoluée : 3,1 g/L) et une densité optique (DO_{550nm}) entre 3,4 et 4,5 unités (Population évoluée : 1,8). On observe également des variations dans le ratio Butanol/Ethanol avec des valeurs entre 1,3 et 2,0 (Population évoluée : 1,7) et dans le rendement de production du butanol avec des valeurs entre 0,24 et 0,29 g/g (Population évoluée : 0,28g/g). Ces résultats montrent que les performances obtenues (Titre en n-butanol, densité optique et rendements) à partir de la population évoluée correspondent aux performances moyennes observées entre les différents clones, on peut donc conclure que les clones sélectionnés sont bien représentatifs de la population évoluée.

Pour le clone « 4 », on observe une augmentation de 1,8 fois du titre final en butanol (6,1 g/L) par rapport à la souche ST001 avant évolution (3,3 g/L). La concentration en éthanol dans le clone « 4 » (3,2 g/L) est 1,4 fois supérieure à celle de la souche ST001 (2,2 g/L), et la croissance du clone « 4 » (3,7 unités) est 2 fois supérieure à celle de la souche ST001 (1,8 unités, DO_{550nm}). Le ratio Butanol/Ethanol est de 1,9 pour le clone « 4 », soit 1,3 fois supérieur à la souche ST001. Enfin, le rendement de production du butanol du clone 4 (0,28 g/g) est 1,2 fois supérieur à celui déterminé avec la souche ST001 (0,23g/g).

Pour le clone « 8 », on observe également une augmentation de 1,7 fois du titre final en butanol (5,7 g/L) par rapport à la souche ST001 avant évolution. Par rapport à la souche ST001, la concentration en éthanol dans le clone « 8 » (2,9 g/L) est 1,3 fois supérieure, et la croissance est 2 fois supérieure (3,7 unités, DO_{550nm}). Le ratio Butanol/Ethanol est de 2,0 pour le clone « 8 », soit 1,3 fois supérieur à celui de la souche ST001. Le rendement de production du butanol du clone « 8 » (0,28 g/g) est 1,2 fois supérieur à celui de la souche ST001 (0,23g/g). Suite à cette caractérisation phénotypique, il a été montré que les clones isolés « 4 » et « 8 » possèdent des propriétés améliorées par rapport à la souche initiale ST001, et sont représentatifs de la population évoluée. Ils ont été respectivement nommés EARY 55-1 et EARY 55-2, et ont été sélectionnés pour la suite de l'étude.

Afin d'identifier les cibles génétiques susceptibles d'être impliquées dans les meilleures performances, en termes de croissance et de production de n-butanol, de la population évoluée et des clones ré-isolés, les ADN génomiques des clones ré-isolés EARY55-1 et EARY-55 2 ont été extraits et complètement séquencés.

2.1.1. Séquençage complet des ADN génomiques extraits des clones ré-isolés EARY-55-1 et EARY-55-2

Afin d'identifier les mutations génétiques susceptibles d'être responsables de l'augmentation de la tolérance au butanol et/ou de l'augmentation du titre final, le génome et les plasmides contenus dans les 2 clones sélectionnés, EARY 55-1 et EARY 55-2, ont été complètement séquencés. Le séquençage des deux clones a été effectué en utilisant la technologie Ion torrent (décrite dans le Chapitre II, partie 7) et analysé par la Plateforme GET-Biopuces (Génopole -Toulouse). Les résultats ont été comparés au génome initial de la souche ST001. Cette analyse a révélé 5 mutations potentielles dans le chromosome des clones EARY 55-1 et EARY 55-2, dans les gènes *rpsA*, *yqhC*, *yhgE*, *lptG* et *waal*. Cependant, le reséquençage des mutations potentielles par la méthode de Sanger n'a permis que de confirmer 2 des 8 mutations. Pour les 2 clones, on observe des mutations similaires dans les gènes *yqhC* et *lptG*.

A la suite de l'évolution *in-vivo*, on observe une mutation d'un nucléotide dans le gène *yqhC* pour les souches EARY 55-1 et EARY 55-2. Cette mutation provoque le remplacement de la glycine en position 69 par une sérine dans la protéine (YqhC G69S).

YqhC est un activateur transcriptionnel, qui appartient à la famille AraC/XylS, et se fixe directement à l'ADN pour stimuler la transcription de l'opéron adjacent composé des gènes *yqhD* et *dkgA*, (Figure 40) (Lee *et al.*, 2010; Turner *et al.*, 2011).

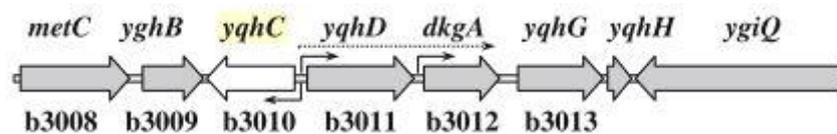


Figure 40 : Organisation des gènes *yqhC*, *yqhD* et *dkgA* chez *E. coli*. D'après (Turner *et al.*, 2011).

Les gènes *yqhD* et *dkgA* codent pour des aldéhydes réductases NADPH dépendantes peu spécifiques, capables d'utiliser une large gamme de substrats (Jarboe, 2011). Par exemple, il a été démontré que YqhD est capable de convertir le butanaldehyde en butanol au travers d'une activité NADPH dépendante (Lee *et al.*, 2010). D'après les travaux réalisés par Lee *et al.* (2010) (Lee *et al.*, 2010) sur des mutants YqhC, qui ont permis de démontrer le rôle d'YqhC comme activateur transcriptionnel d'YqhD, les auteurs ont observé des mutations en position 63, P63S et P63Q. Les auteurs ont obtenu ces mutants en isolant des souches mutantes capables de résister à la présence de glyoxal et de methylglyoxal dans le milieu de culture. Afin de démontrer le rôle d'activateur transcriptionnel d'YqhC, les auteurs ont analysé la transcription du gène *yqhD* en présence du gène natif *yqhC* des mutants isolés au cours de leur étude, ainsi que d'une souche dont le gène *yqhC* a été tronqué afin d'être non-fonctionnel. Afin de mesurer la transcription d'*yqhD* les auteurs ont utilisé la RT-qPCR ainsi qu'un système de fusion entre YqhC et un rapporteur β -galactosidase. Les auteurs ont observé que, suite à l'inactivation d'*yqhC*, *yqhD* n'était plus transcrit, et que les mutations observées dans les mutants résistants au glyoxal permettaient d'accroître la transcription d'*yqhD* par rapport à une souche exprimant *yqhC* sans mutation. De plus, les auteurs ont conduit une analyse de la séquence protéique d'YqhC et ont déterminé que les mutations en position 63 étaient potentiellement situées dans le domaine de régulation de la transcription d'YqhC. Cependant, une analyse de la séquence protéique d'YqhC présentée dans la publication de Lee *et al.* (2010) montre une erreur dans la numérotation, et leurs mutations sont situées en position 68 dans la protéine. De plus, les acides aminés 68 et 69 chez YqhC sont homologues à ceux de l'activateur de transcription AraC. A partir de ces résultats, on peut donc émettre l'hypothèse que la mutation observée dans les souches EARY 55 a potentiellement un effet similaire à celle observée par Lee *et al.* (2010), et que la mutation observée dans les souches EARY

55 est potentiellement responsable d'une augmentation de la transcription des gènes *yqhD* et *dkgA*. En raison de la capacité d'YqhD à convertir le butanaldehyde en butanol, il est donc possible que l'augmentation potentielle de l'expression d'YqhD soit impliquée dans l'augmentation de 1.8 fois du titre en butanol, observée après l'évolution *in-vivo* dans les souches EARY 55-1 et EARY 55-2 par rapport à la souche Butanol avant évolution (ST001). De plus, l'activité NADPH dépendante de cette enzyme permet l'utilisation du NADPH formé par la FNOR de *C. acetobutylicum* lors de la réoxydation de la ferrédoxine réduite, indépendamment de la transhydrogénation du NADPH en NADH par la transhydrogénase Udha, qui pourrait être limitante dans la souche Butanol. Cependant, pour valider cette hypothèse il est nécessaire de réintroduire la mutation YqhC G69S dans la souche ST001 afin de démontrer son implication dans la synthèse de butanol.

Une mutation d'un nucléotide dans le gène *lptG* a été identifiée dans le chromosome extrait des souches EARY 55-1 et EARY 55-2, qui provoque le remplacement du tryptophane en position 353 par un codon stop en position 353 dans la protéine, créant une protéine tronquée de 7 acides aminés coté C-terminal, possédant 353 acides aminés au lieu de 360. Cependant, aucune étude n'a mis en évidence le rôle de cette extrémité C-terminale, qui est située dans le cytoplasme.

LptG est une protéine intégrée à la membrane interne chez *E. coli*, qui fait partie du système de transport des lipopolysaccharides (LPS) LptABCDEFG (Daley *et al.*, 2005). LptG forme un complexe avec LptF, LptB et LptC, au sein de la membrane interne (Narita and Tokuda, 2009) impliqué dans le transport des lipopolysaccharides de la membrane interne vers la membrane externe (Ruiz *et al.*, 2008). Le transporteur LptABCDEFG est représenté en Figure 41.

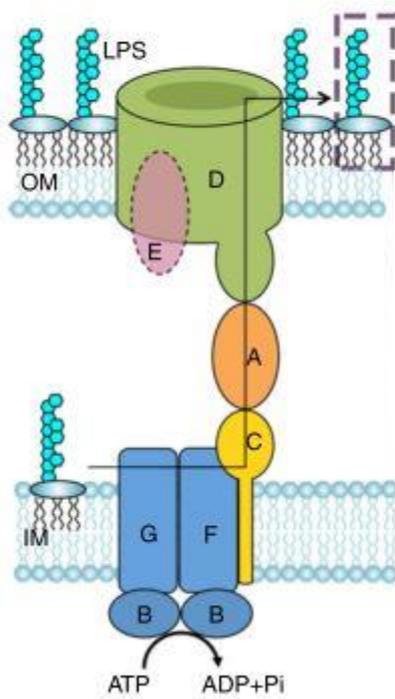


Figure 41 : Représentation schématique du transporteur LptABCDEFGF impliqué dans le transport des lipopolysaccharides de la membrane interne vers la membrane externe. D'après (Dong *et al.*, 2017).

Le transporteur LptABCDEFGF fait partie de la famille des transporteurs de type ABC (**A**T**P** **B**inding **C**assette). Ces transporteurs sont impliqués dans le transport unidirectionnel de composés divers, dans notre cas les LPS, entre les membranes interne et externe. Ces transporteurs utilisent l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie pour effectuer le transport, il s'agit donc d'un transporteur actif.

Il a été démontré que les résidus de la position 77 à 92 pour la sous-unité LptF et les résidus de la position 81 à 96 pour la sous-unité LptG coordonnent l'activité ATPase du complexe avec le transport des LPS, en interagissant avec les 2 sous-unités LptB impliquées dans l'hydrolyse de l'ATP (Simpson *et al.*, 2016). L'interaction entre LptB₂FG est représentée en Figure 42.

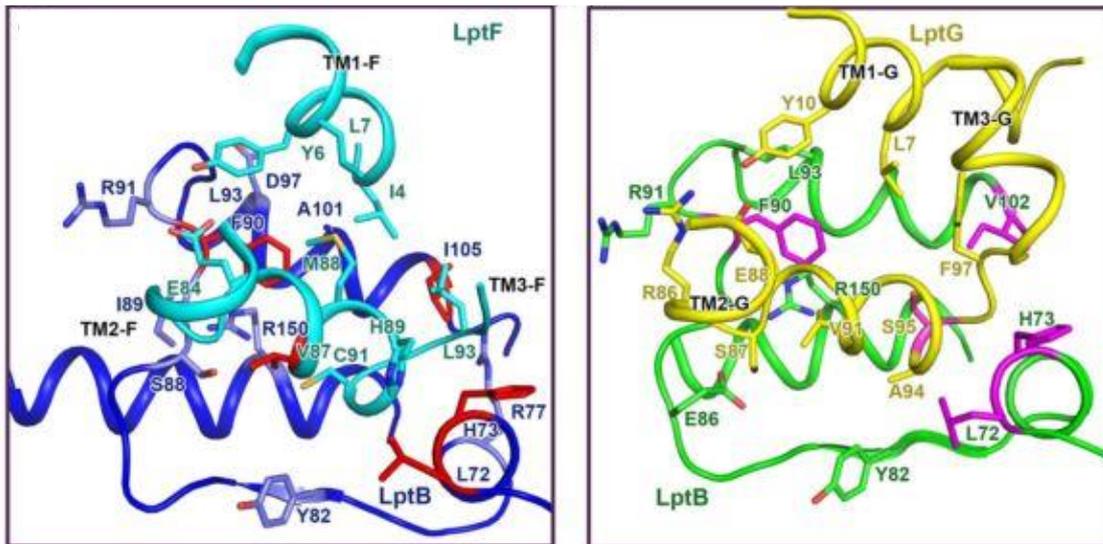


Figure 42 : Interaction des sous-unités LptFG avec LptB. D'après (Dong *et al.*, 2017).

Les sous-unités LptFG forment une cavité impliquée dans la reconnaissance et dans l'extraction des LPS présents dans la membrane interne, afin de les transférer vers la membrane externe via les différentes sous-unités du transporteur (Bertani *et al.*, 2018; Luo *et al.*, 2017). L'analyse de la structure du transporteur Lpt, réalisée par Luo *et al.* (2017), indique que les 6 hélices transmembranaires, présentes dans les sous unités LptF et LptG, sont impliquées dans la structure de la cavité qui sélectionne et transfère les LPS (Luo *et al.*, 2017). La structure du transporteur LptB₂FG avec les hélices transmembranaires impliquées dans la sélection et le transfert des LPS est représentée en Figure 43.

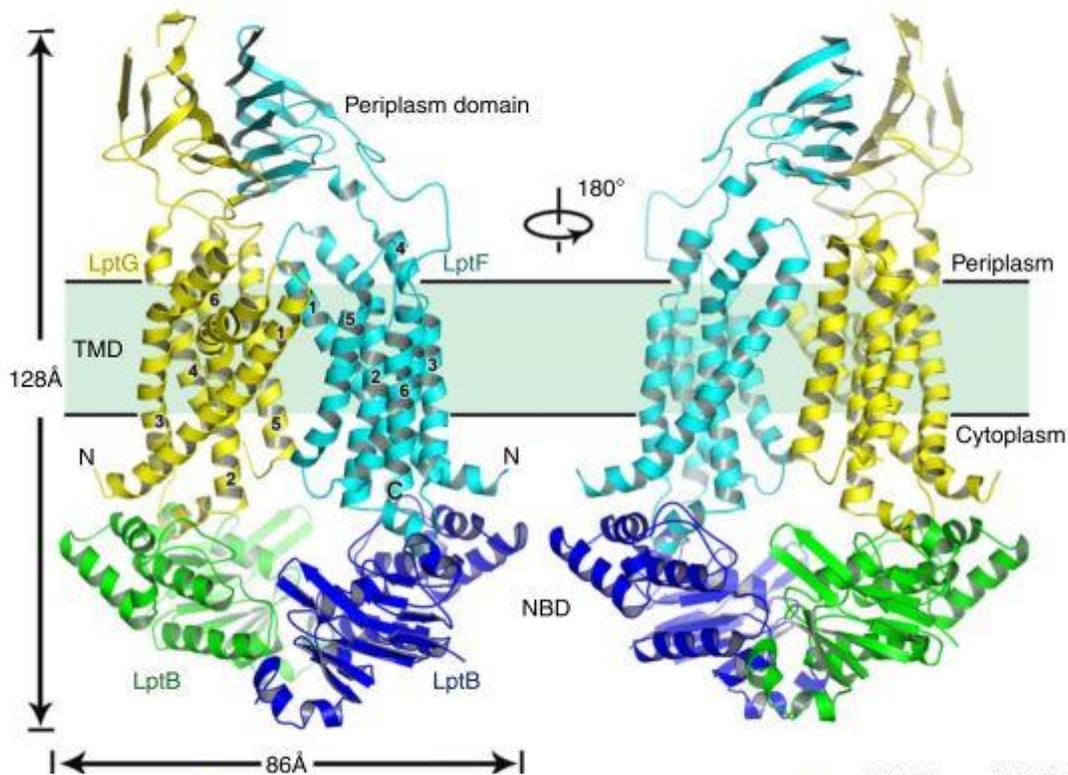


Figure 43 : Structure du transporteur LptB₂FG. D'après (Dong *et al.*, 2017).

Des travaux d'ingénierie de cette cavité formée par LptFG ont été réalisés par Bertani *et al.* (2018) (Bertani *et al.*, 2018). Ces travaux ont mis en évidence que la modification de la structure de la cavité LptFG avait un impact sur la composition en LPS présents dans la membrane externe, et modifiait la fluidité de la membrane.

On retrouve plusieurs études dans la littérature traitant de l'augmentation de la tolérance au butanol chez *E. coli*, où la diminution de la fluidité de la membrane externe d'*E. coli* est l'une des stratégies employées pour augmenter la tolérance au butanol (He *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2011; Liu and Qureshi, 2009; Reyes *et al.*, 2012). De plus, Reyes *et al.* (2012) ont observé une augmentation de l'expression de *lptA* lors d'une évolution adaptative pour augmenter la tolérance au butanol (Reyes *et al.*, 2012). Les auteurs ont conclu que leur souche MG6 était potentiellement plus tolérante au butanol, en raison d'une modification de l'hydrophobicité de la membrane externe. Une augmentation des LPS contenus dans la membrane externe permet de diminuer l'hydrophobicité de la surface des cellules et limite la pénétration des composés hydrophobiques dans le cytosol. A partir de ces données, nous pouvons émettre une première hypothèse que l'absence de partie C-terminale de la sous-unité LptG dans la souche EARY 55 affecte potentiellement l'activité du transporteur LptABCDEFG et que cette modification permettrait d'améliorer la tolérance au butanol d'*E. coli* en modifiant la fluidité de la membrane externe. Nous pouvons également émettre une seconde hypothèse, dans laquelle cette

mutation aurait un impact sur l'activité ATP synthase du complexe, et pourrait permettre à la cellule d'économiser de l'ATP afin de favoriser la production de n-butanol. Cependant, afin de valider l'impact de cette mutation il est nécessaire de réintroduire cette mutation dans la souche ST001.

La nature des mutations identifiées dans les gènes *yqhC* et *lptG* dans les chromosomes issus des clones EARY 55-1 et 2 isolés laisse donc penser que ces deux mutations pourraient être responsables de l'amélioration des performances de ces deux clones, en termes de concentration en butanol produit, de croissance, et de rendement de production en butanol par rapport à la souche ST001. Toutefois, ces hypothèses doivent être validées en réalisant des tests de complémentation, dont l'objectif est de réintroduire les deux mutations *YqhC G69S* et *LptG (Trp353_Ser360del)* dans la souche ST001. Une fois réintroduite, une caractérisation phénotypique des clones obtenus permettra de démontrer l'implication de ces cibles génétiques dans l'amélioration des performances des clones évolués EARY55-1 et 2. Il restera ensuite à caractériser le mécanisme impliqué suite à la génération de ces deux mutants. Pour cela, le niveau de transcription d'*YqhD* pourrait être mesuré par RT-qPCR dans les souches EARY 55 et dans la souche reconstruite afin de valider l'augmentation de la transcription d'*YqhD* en présence de la mutation dans *yqhC*. Une alternative serait le dosage de l'activité aldéhyde réductase NADPH dépendante à partir des extraits bruts de la souche EARY-55 et de la souche ST001, afin de quantifier l'activité d'*YqhD*. Concernant la mutation *LptG (Trp353_Ser360del)* et son implication dans la modification de la composition en LPS de la membrane externe, il est possible d'effectuer un test de sensibilité à la bacitracine. Si la fluidité de la membrane externe est réduite dans les souches EARY 55, ces souches devraient être moins sensibles à la bacitracine que la souche non-évoluée. Un test de survie à la suite d'un choc thermique peut également permettre de déterminer si la fluidité de la membrane externe a été modifiée dans la souche évoluée. Ce test pourrait être réalisé en incubant les souches EARY 55 et ST001 à 55°C pendant 2h puis en effectuant un étalement sur boîte pour évaluer la mortalité. Si la membrane externe est moins fluide le taux de mortalité sera moindre.

3. Simplification du milieu de culture : adaptation de la croissance de la souche Butanol dans un milieu de culture chimiquement défini à base de glucose sans extrait de levure et sans nitrate

Toutes les cultures présentées dans les parties 1 et 2 du chapitre 4 sont réalisées en anaérobiose dans le milieu chimiquement défini à base de glucose supplémenté avec 4 g/l d'extrait de levure et 5 à 10mM de nitrate. Ces supplémentations sont nécessaires afin d'assurer la croissance des souches en anaérobiose. Cependant, l'addition d'extrait de levure dans le milieu de culture représente un point limitant lors de la culture de cette souche, car il impacte le couplage entre la croissance et la production de n-butanol, *E. coli* étant capable de se multiplier directement sur des sources complexes d'azote.

Dans un milieu chimiquement défini sur glucose en absence de source complexe d'azote, la productivité en butanol est directement liée à la vitesse de consommation de glucose et au taux de croissance de la souche. Plus le taux de croissance est important, plus la vitesse de production en butanol est élevée. Or, l'ajout d'extrait de levure dans le milieu de culture perturbe le couplage « croissance/production en butanol », favorisant la croissance indépendamment de la production de n-butanol. De plus, l'apport de nitrate dans le milieu de culture déstabilise l'équilibre redox et favorise la production de butyrate. Afin de pallier ces problèmes, nous avons décidé d'essayer de forcer la croissance de la souche Butanol dans le milieu chimiquement défini à base de glucose sans supplémentation en extrait de levure et sans nitrate, à l'aide d'une stratégie d'évolution adaptative *in vivo* en anaérobiose.

3.1. Evolution adaptative *in vivo* de la souche Butanol en culture discontinue sans régulation de pH dans le milieu chimiquement défini sans supplémentation en extrait de levure ni nitrate

Une évolution adaptative a été conduite sur la souche Butanol, à partir de la population évoluée, en continu, dans le premier chémostat présenté dans la partie 2 du Chapitre IV. Les cellules issues de cette culture ont été prélevées après 500h d'évolution. La culture de ces cellules a été effectuée en fiole sans régulation de pH et en anaérobiose dans le milieu chimiquement défini supplémenté avec 4 g/l d'extrait de levure et 5mM de nitrate. Cette culture a servi de point initial pour l'évolution adaptative, pour permettre la croissance et la production de n-butanol en anaérobiose dans le milieu chimiquement défini sans supplémentation en extrait de levure ni nitrate.

L'évolution adaptative de la population évoluée isolée issue du chémostat a été réalisée par repiquages successifs de cultures discontinues sans régulation de pH après 48 à 72h de culture, dans le milieu chimiquement défini avec, dans un premier temps, aucune supplémentation en extrait de levure mais l'apport de 5mM de nitrate. Puis, à partir de la 5^{ème} sous-culture, l'apport en nitrate a également été supprimé. Les repiquages sont effectués à une densité optique initiale de 0,1 unité (DO_{550nm}) afin de maintenir les cellules en phase exponentielle de croissance et favoriser l'adaptation. Les étapes réalisées sont présentées en Figure 44.

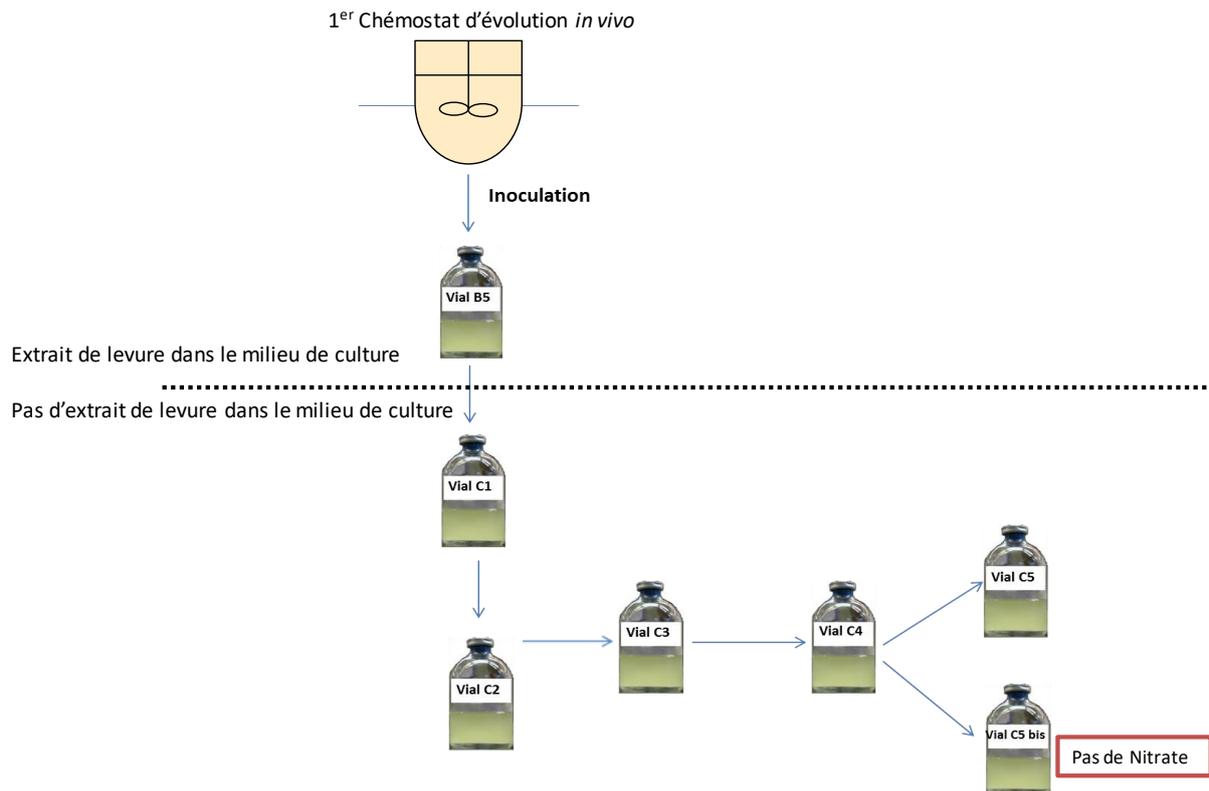


Figure 44 : Schéma de la procédure d'évolution adaptative de la souche Butanol pour obtenir une culture en anaérobiose en absence de supplémentation en extrait de levure et nitrate. Les cultures C1 à C5 sont réalisées en anaérobiose dans le milieu chimiquement défini à base de glucose supplémenté avec 5mM de nitrate et sans apport d'extrait de levure. La culture C5 bis est réalisée en anaérobiose dans le milieu chimiquement défini à base de glucose sans supplémentation en nitrate et sans apport en extrait de levure.

La culture B5 a servi à inoculer la culture C1 qui ne contient pas d'extrait de levure, mais avec toujours 5mM de nitrate. Afin de garantir l'absence d'extrait de levure, les cellules issues de la culture C1 ont été repiquées successivement dans les cultures C2, C3, C4 et C5 qui ont été réalisées en anaérobiose dans le milieu chimiquement défini à base de glucose supplémenté avec 5mM de nitrate et sans apport d'extrait de levure. On considère que l'extrait de levure est totalement absent à partir de la culture C2. Les résultats de ces cultures sont présentés et analysés dans le Tableau 35.

Souche	Glucose consommé (g/L)	Ethanol (g/L)	Butanol (g/L)	Butyrate (g/L)	Lactate (g/L)	Acétate (g/L)	Succinate (g/L)	DO _{550nm}	Butanol /Ethanol	Rdt. Butanol /Glucose (g/g)	Carbone balance %
ST001	14,5	2,2	3,3	0,6	0,6	0,1	0,2	1,8	1,52	0,23	99%
C1	12,1	2,7	3,5	0,2	0,3	0,1	0,1	1,6	1,3	0,29	102%
C2	12,4	2,2	3,6	0,3	0,3	0,2	0,1	1,8	1,6	0,29	102%
C3	13,1	1,7	3,8	0,4	0,2	0,1	0,1	1,8	2,2	0,29	102%
C4	12,9	1,1	4	0,1	0,1	0,1	0,1	1,9	3,6	0,31	105%
C5	13,2	1	4,1	0,1	0,1	0,1	0,1	2,1	4,1	0,31	105%

Tableau 35 : Analyse des cultures discontinues réalisées au cours de l'évolution adaptative pour permettre la croissance de la souche Butanol en anaérobiose sans apport en extrait de levure dans le milieu de culture. Ces performances sont comparées à ST001 cultivée en culture discontinue en fiole sans régulation de pH dans un milieu de culture chimiquement défini sur 2% glucose supplémenté par 4 g/L d'extrait de levure, 5 mM de nitrate. La ligne surlignée en rouge correspond au clone le plus performant.

Au cours de l'évolution adaptative pour supprimer l'apport en extrait de levure nécessaire pour la croissance, on observe une augmentation progressive des performances de la souche Butanol au fur et à mesure des repiquages. La culture initiale, sans extrait de levure, C1, produit 3,5 g/L de n-butanol, accompagné d'une production de 2,7 g/L d'éthanol et une croissance de 1,6 unités de densité optique (DO_{550nm}), à un rendement de production de 0,29 gramme de butanol produit par gramme de glucose consommé, et un ratio Butanol/Ethanol de 1,3. A l'issue de l'évolution adaptative, la culture C5 produit 4,1 g/L de n-butanol, soit 1,2 fois plus que la culture C1. La production d'éthanol a été 2,7 fois moindre dans la culture C5 (1,0 g/L) par rapport à la culture C1, et la densité optique 1,3 fois supérieure (DO_{550nm} : 2,1) par rapport à la culture C1. En conséquence, une augmentation du rendement de production du butanol à 0,31 gramme de butanol produit par gramme de glucose consommé (soit 76% du rendement théorique maximum) a été observée, ainsi qu'une augmentation du ratio Butanol/Ethanol à 4,1. Il semble donc que l'évolution adaptative en culture discontinue dans le milieu de culture sans extrait de levure a conduit à la sélection d'une population évoluée capable de produire du butanol avec des performances équivalentes voire supérieures à celle déterminées pour la souche initiale ST001.

La souche C5, obtenue suite à l'évolution adaptative de la souche Butanol permettant la croissance en anaérobiose dans le milieu de culture chimiquement défini sans supplémentation en extrait de levure, a ensuite été utilisée afin de réaliser une seconde évolution adaptative, pour permettre la croissance en absence de nitrate dans le milieu de culture. Une culture discontinue dans le milieu chimiquement défini à base de glucose sans supplémentation en extrait de levure et sans nitrate a été inoculée à

partir de la culture C5, donnant la culture C5 bis. Les résultats obtenus pour cette culture C5 bis sont présentés et analysés dans le Tableau 36.

Souche	Glucose consommé (g/L)	Ethanol (g/L)	Butanol (g/L)	Butyrate (g/L)	Lactate (g/L)	Acétate (g/L)	Succinate (g/L)	DO _{550nm}	Butanol /Ethanol	Rdt. Butanol /Glucose (g/g)	Carbone balance %
ST001	14,5	2,2	3,3	0,6	0,6	0,1	0,2	1,8	1,5	0,23	99%
C5	13,2	1	4,1	0,1	0,1	0,1	0,1	2,1	4,1	0,31	105%
C5 bis	8,9	1	2,5	0,1	0,1	0,1	0,1	1,1	2,5	0,28	103%

Tableau 36 : Analyse de la culture discontinue C5 bis réalisée au cours de l'évolution adaptative pour permettre la croissance de la souche Butanol en anaérobiose sans apport en extrait de levure et sans nitrate dans le milieu de culture. Ses performances sont comparées à ST001, cultivée en culture discontinue en fiole sans régulation de pH dans un milieu de culture chimiquement défini sur 2% glucose supplémenté par 4 g/L d'extrait de levure, 5 mM de nitrate, et à C5, cultivée en fiole sans régulation de pH dans un milieu de culture chimiquement défini sur 2% glucose supplémenté par 5 mM de nitrate et sans apport en extrait de levure.

Les performances observées dans la culture C5 bis montrent que l'élimination de l'apport en nitrate dans le milieu de culture a un impact important sur les performances de la souche. Pour la culture C5 bis (sans nitrate), une production de butanol de 2,5 g/L est mesurée, soit 1,6 fois moins que le titre en butanol de la culture C5 (en présence de nitrate). La croissance est également 1,9 fois moindre (1,1 unités de densité optique (DO_{550nm})) dans la culture C5 bis par rapport à la culture C5. Pour la culture C5 bis, un rendement de production du butanol de 0,28 gramme de butanol produit par gramme de glucose consommé, et un ratio Butanol/ Ethanol de 2,5 sont déterminés.

Pour conclure, cette évolution adaptative en culture discontinue a permis de sélectionner une population (C5 bis) capable de croître et de produire du butanol en anaérobiose lors de la culture dans le milieu chimiquement défini sans supplémentation en extrait de levure et sans apport en nitrate. Cette adaptation permet d'obtenir une population capable de produire du butanol à un rendement de production du butanol 1,2 fois supérieur par rapport à celui de la souche ST001 et un ratio Butanol/Ethanol 1,7 fois supérieur par rapport à celui de la souche ST001, alors que l'extrait de levure et les nitrates ont été éliminés du milieu de culture.

3.1.1. Ré-isolement de clones à partir de la population évoluée capable de croître et de produire du butanol en anaérobiose lors de la culture dans le milieu chimiquement défini à base de glucose sans supplémentation en extrait de levure et sans apport de nitrate

Des clones ont été isolés sur boîte LB en aérobiose à partir de la population évoluée (C5 bis) sélectionnée *in vivo* lors de l'évolution adaptative en culture discontinue dans le milieu chimiquement défini sans supplémentation en extrait de levure et en nitrate. Une caractérisation phénotypique de 8 clones a été réalisée en anaérobiose dans le milieu chimiquement défini sans supplémentation en extrait de levure ni nitrate. Les résultats de ces cultures sont présentés le Tableau 37.

Souche	Glucose consommé (g/L)	Ethanol (g/L)	Butanol (g/L)	Butyrate (g/L)	Lactate (g/L)	Acétate (g/L)	Succinate (g/L)	DO _{550nm}	Butanol /Ethanol	Rdt. Butanol /Glucose (g/g)	Carbone balance %
Pop. évoluée	7,2	0,8	2,2	0,1	0,2	0,0	0,1	0,5	2,8	0,31	98%
Clone 1	3,8	0,5	1,3	0,1	0,0	0,0	0,0	0,3	2,4	0,34	98%
Clone 2	3,8	0,4	1,4	0,0	0,1	0,0	0,0	0,4	3,7	0,37	95%
Clone 3	2,7	0,4	1,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,2	2,4	0,36	101%
Clone 4	3,5	0,5	1,2	0,1	0,1	0,0	0,0	0,3	2,3	0,35	99%
Clone 5	6,0	0,4	2,2	0,0	0,2	0,0	0,1	0,4	5,4	0,37	96%
Clone 6	3,2	0,4	1,2	0,1	0,0	0,0	0,0	0,3	2,7	0,37	100%
Clone 7	4,5	0,3	1,6	0,1	0,1	0,0	0,1	0,3	5,2	0,35	90%
Clone 8	2,7	0,4	1,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,2	2,7	0,35	95%

Tableau 37 : Analyse des cultures discontinues en anaérobiose lors de la culture dans le milieu chimiquement défini à base de glucose sans supplémentation en extrait de levure et sans apport en nitrate des clones isolés par rapport à la population évoluée C5 bis. La ligne surlignée en rouge correspond au clone le plus performant.

Les caractérisations phénotypiques (Tableau 37) montrent une importante variabilité entre les clones ré-isolés sélectionnés, avec un titre en butanol qui oscille entre 1,0 et 2,2 g/L, et des rendements de production en butanol compris entre 0,34 et 0,37 g/g. Globalement, la croissance varie entre 0,2 et 0,4 unités de densité optique (DO_{550nm}) pour les clones isolés, ce qui est inférieur à la croissance observée pour la population C5 bis (0,5 unités).

Parmi les clones ré-isolés, il semble que le clone n°5, issu de cet isolement, ait des performances similaires et donc représentatives de la population C5 bis, en produisant 2,2 g/L de butanol. La croissance est légèrement inférieure, avec 0,4 unité de densité optique (DO_{550nm}) pour le clone 5, par rapport à 0,5 unités pour la population C5 bis. Le ratio Butanol/Ethanol semble plus favorable dans le clone 5 avec une valeur de 5,4 par rapport à 2,8 pour la population C5 bis. Le rendement de production

du n-butanol est de 0,37 gramme de butanol produit par gramme de glucose consommé, soit 90% du rendement théorique maximal. Cependant, ces cultures ont été réalisées directement à partir des colonies isolées sur boîte, il est donc possible que la variabilité observée entre les clones et la population évoluée soit due à la variabilité de l'état physiologique des cellules lors de leur inoculation en anaérobiose. Cependant, la différence de titre en butanol entre le clone 5 et le reste des clones isolés en font le meilleur candidat pour la poursuite de cette étude.

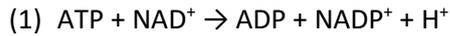
La caractérisation phénotypique du Clone 5, nommé ST023-5 pour la suite de ce chapitre, montre que ce clone évolué est capable de croître en anaérobiose dans le milieu chimiquement défini à base de glucose sans supplémentation, en produisant du butanol à une concentration et un rendement représentatif de la population évoluée C5 bis.

3.1.2. Séquençage complet de l'ADN génomique extrait du clone ré-isolés ST023-5

Afin d'identifier les mutations génétiques susceptibles d'être responsables de l'adaptation de la souche butanol pour la croissance en anaérobiose dans le milieu chimiquement défini à base de glucose sans supplémentation, le génome et le plasmide contenus dans le clone ST023-5 sélectionné ont été complètement séquencés. Le séquençage a été effectué en utilisant la technologie Ion torrent (décrite dans le Chapitre II, partie 7) et analysé par la Plateforme GET-Biopuces (Génopole -Toulouse). Les résultats ont été comparés au génome initial de la souche ST001. Cette analyse a révélé 4 mutations potentielles dans le chromosome du clone ST023-5 qui sont absentes de la souche ST001. Ces mutations touchent les gènes *tyrV*, *nimT*, *nadK* et *yqhC*. Cependant, le reséquençage des mutations potentielles par la méthode de Sanger n'a permis que de confirmer que les mutations dans les gènes *nadK* et *yqhC*.

La première mutation observée dans *yqhC* est identique à celle retrouvée dans les souches EARY55, présentées dans la partie 2.1.1 du Chapitre IV. Cette mutation provoque le remplacement de la glycine en position 69 par une sérine dans la protéine (YqhC G69S). De plus, une seconde mutation est présente dans *yqhC* : elle provoque une insertion de 6 nucléotides dans le gène *yqhC*, introduisant une lysine et une phénylalanine entre les positions 102 et 103 dans la protéine YqhC (Pro102_Phe103insLysPhe).

La mutation dans la NAD Kinase (*nadK*) observée dans l'ADN génomique extrait à partir de la souche ST023, conduit au changement de la tyrosine en position 277 par une histidine dans la protéine (NadK Y277H). Cette NAD Kinase transfère le groupement phosphate de l'ATP au NAD⁺ pour former du NADP⁺ d'après l'équation (1).



La NAD Kinase reconnaît spécifiquement le NAD^+ (Kawai *et al.*, 2001). Cette enzyme est impliquée dans la régulation de l'équilibre intracellulaire entre le NAD^+ et le NADP^+ . Son activité dépend des ratios $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ et NADH/NAD^+ . La NAD Kinase joue un rôle clé dans la biosynthèse du NADP^+ (Zerez *et al.*, 1987). Lors de la construction de la collection Keio, le gène *nadK* a été défini comme étant un gène essentiel pour la croissance en aérobiose sur LB (Baba *et al.*, 2006). Bien que le milieu et les conditions de culture soient différents au cours de cette étude, nous pouvons émettre l'hypothèse que la mutation NadK Y277H présente dans l'enzyme de la souche ST023 conduise à une protéine fonctionnelle.

Dans la littérature, on retrouve la construction de mutants de la NAD Kinase (*nadK*), qui, avec la mutation R175G, permet de lever la spécificité au NAD^+ et de transformer l'enzyme en NADH Kinase, capable d'utiliser le NAD^+ et le NADH pour la formation respective du NADP^+ et du NADPH (Mori *et al.*, 2005). Ces mutants ont été construits par ingénierie enzymatique, suite à l'étude des différences entre les sites catalytiques des NAD kinases et des NADH kinases. Cependant, d'après cette étude, la mutation NadK Y277H présente dans la souche ST023 n'est pas située dans une région affectant le site catalytique de l'enzyme ou sa spécificité de cofacteur. Afin de déterminer l'impact de cette mutation sur l'activité de la NAD Kinase, il faudrait réaliser la purification de l'enzyme native et de l'enzyme mutée afin de comparer les propriétés des deux enzymes. Cependant, cette validation n'a pas pu être effectuée lors de cette étude. De plus, pour démontrer le rôle de NadK Y277H dans le phénotype de la souche ST023, il serait intéressant de réintroduire cette mutation dans les souches ST001 et EARY55, puis de faire la culture des souches en anaérobiose dans le milieu chimiquement défini sans supplémentation en extrait de levure et en nitrate.

3.2. Évaluation des performances de la souche ST023-5 en culture continue en anaérobiose dans le milieu chimiquement défini à base de glucose sans supplémentation en extrait de levure et en nitrate

Afin de déterminer les performances de la souche ST023-5 à pH régulé, et de comparer ses performances avec la souche ST001 initiale, incapable de se développer dans un milieu de culture chimiquement défini sans addition d'extrait de levure et nitrate, la souche adaptée a été cultivée en culture continue en anaérobiose dans le milieu chimiquement défini sans supplémentation en extrait de levure et sans nitrate avec un pH régulé à 6,0. L'objectif de cette culture continue était d'augmenter progressivement le taux de dilution de la culture, afin de sélectionner une population ayant un taux de croissance supérieur à celui de la souche avant évolution, car la vitesse de production en butanol est couplée à la vitesse de consommation de glucose et la vitesse de croissance. Les résultats de l'évolution *in-vivo* de la souche ST023-5 en culture continue sont présentés en Figure 45.

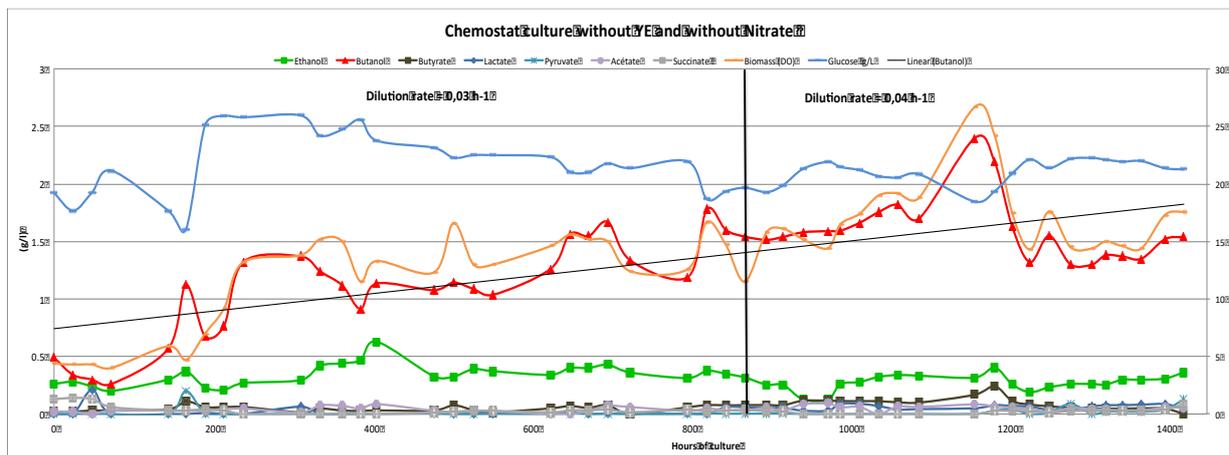


Figure 45 : Suivi de l'évolution *in-vivo* de la culture continue de la souche ST023-5 en anaérobiose dans le milieu chimiquement défini sans supplémentation en extrait de levure et sans nitrate avec un pH régulé à 6,0.

Lors de cette évolution *in-vivo*, une première phase a été réalisée à un taux de dilution de $0,03\text{h}^{-1}$ durant environ 900h. Lors de cette première phase de culture, le titre en butanol varie de 0,3 g/L à 1,8 g/L avec une augmentation progressive du titre au cours du temps. On observe une tendance similaire de la croissance, avec une densité optique ($\text{DO}_{550\text{nm}}$) variant de 0,4 à 1,6 unités au cours des 900h de cette première phase. L'analyse des résultats montre une forte corrélation entre le titre en butanol et la densité optique, avec un rapport proche de 1:1. La concentration en éthanol reste stable au cours du temps avec une concentration variant entre 0,2 et 0,6 g/L. Afin d'accroître la pression de sélection, le taux de dilution a été augmenté à $0,04\text{h}^{-1}$. Sur cette seconde période, on observe un effet bénéfique sur la densité optique et sur le titre en butanol avec l'obtention du titre maximum en butanol de 2,4 g/L pour une densité optique d'environ 2,6 unités ($\text{DO}_{550\text{nm}}$). Globalement, lors de cette culture en

chémostat, à un taux de dilution de $0,04 \text{ h}^{-1}$ sur la période entre 900 et 1400h, une production moyenne de $1,65 \text{ g/L}$ de butanol est mesurée, à un rendement d'environ $0,19$ grammes de butanol produit par gramme de glucose consommé, et un ratio Butanol/Ethanol moyen de $6,3$. La vitesse de production moyenne du butanol est de $0,06 \text{ g/L/h}$ et la vitesse de consommation moyenne du glucose de $0,20 \text{ g/L/h}$.

Pour conclure, cette évolution *in-vivo* de 1400h a permis d'obtenir une population capable de maintenir une croissance dans un milieu chimiquement défini à base uniquement de glucose et de produire du butanol à une concentration supérieure par rapport au début de la culture continue. La population obtenue a été nommée ST025. Cependant, le titre en butanol obtenu reste faible, ce qui suggère que la souche est limitée dans sa capacité à produire du butanol. De plus, il n'a pas été possible d'augmenter graduellement le taux de dilution de la culture continue comme prévu initialement.

Une seconde évolution *in-vivo* a été réalisée par une culture en continu en anaérobiose à partir de la population ST025 dans le milieu chimiquement défini à base de glucose sans supplémentation en extrait de levure et sans nitrate avec un pH régulé, et un taux de dilution fixé à $0,04 \text{ h}^{-1}$, avec pour objectif d'identifier les éléments limitant la production de n-butanol. Deux paramètres ont été étudiés : le pH de la culture et la composition du milieu de culture. La première évolution *in-vivo* ayant conduit à la sélection de la population ST025 a été réalisée à un pH de $6,0$ alors que le milieu de culture utilisé en fiole est tamponné à pH $6,8$. Au cours de cette seconde évolution en continu, deux pH ont été étudiés : pH $6,8$ et pH $6,4$. Concernant l'étude du milieu de culture, le calcium contenu dans le milieu de culture ($9 \mu\text{M}$ de CaCl_2) a été remplacé par du CoCl_2 ($9 \mu\text{M}$), qui pourrait être nécessaire à l'activité de certaines enzymes. Les résultats de cette seconde évolution *in-vivo* sont présentés en Figure 46.

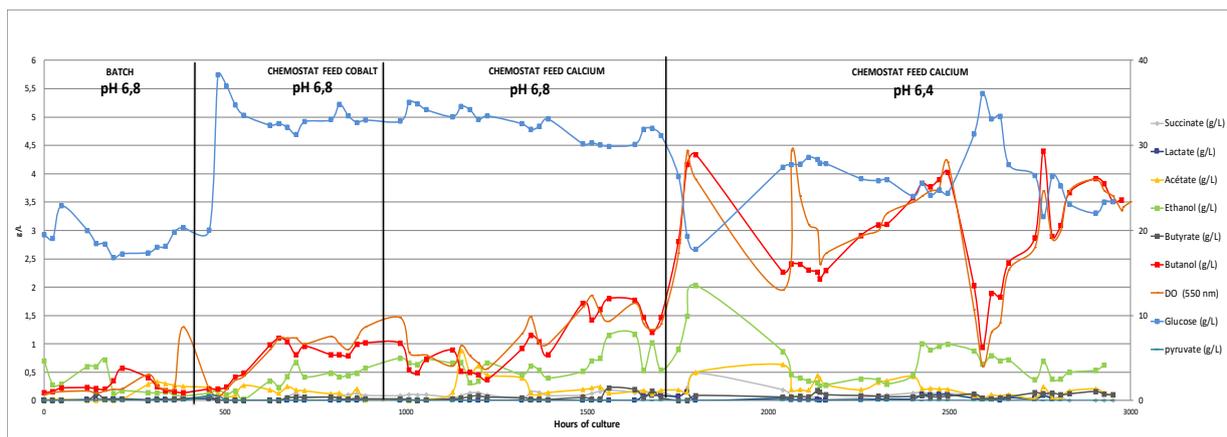


Figure 46: : Suivi de la seconde évolution *in-vivo* de la culture continue à partir de la population ST025 en anaérobiose dans le milieu chimiquement défini à base de glucose sans supplémentation en extrait de levure et sans nitrate avec un pH régulé à 6,8 ou 6,4 et un taux de dilution de $0,04\text{h}^{-1}$.

Cette seconde évolution *in-vivo* a montré que le remplacement du calcium présent dans le milieu de culture par du cobalt ne permet pas d'améliorer les performances de la souche Butanol lors de sa culture en continu. Cependant, on observe une variation des performances en fonction du pH de la culture. La culture en continu de la souche ST025 à un pH régulé à 6,4 a conduit à la sélection d'une population capable de produire transitoirement jusqu'à 4,5 g/L de n-butanol, avec une densité optique de 3,9 unités ($\text{DO}_{550\text{nm}}$). Sur la période entre 1700h et 3000h d'évolution, on observe une concentration moyenne de butanol de 2,9 g/L, de 0,6 g/L d'éthanol, de 0,1 g/L de butyrate et une densité optique moyenne de 3,0 unités de densité optique ($\text{DO}_{550\text{nm}}$). Sur cette période, la concentration en succinate moyenne est de 0,1 g/L, en acétate de 0,2 g/L, et la concentration en lactate est inférieure à 0,1 g/L. Sur la même période, le rendement moyen de production de n-butanol au cours de cette culture en continu est de 0,29 gramme de butanol produit par gramme de glucose consommé avec un ratio Butanol/Ethanol moyen de 4,8. La vitesse de production moyenne du butanol est de 0,13 g/L/h et la vitesse de consommation moyenne du glucose est de 0,59 g/L/h. Le génome de la population ST025, issue de ce chémostat a ensuite été complètement séquencé, et le résultat a été comparé à la souche Butanol initiale (ST001).

3.2.1. Séquencage complet de l'ADN génomique extrait de la population évolué ST025

Afin d'identifier les mutations génétiques susceptibles d'être responsables de l'évolution de la croissance en anaérobiose dans le milieu chimiquement défini à base de glucose sans supplémentation de la population ST025, le génome et le plasmide issus de la population ont été complètement séquencés. Le séquençage a été effectué en utilisant la technologie Ion torrent (décrite dans le Chapitre II, partie 7) et analysé par la Plateforme GET-Biopuces (Génopole -Toulouse). Les résultats ont

été comparés à la séquence de l'ADN génomique de la souche ST001 initiale et de la souche ST023-5. Cette analyse a révélé 6 mutations potentielles dans le chromosome de la population ST025 qui sont absente de la souche ST001. Ces mutations touchent les gènes *ynfK*, *valV*, *valW*, *rpoB*, *nadK* et *yqhC*. Cependant, le reséquençage des mutations potentielles par la méthode de Sanger n'a pas encore été effectué. Comme attendu, on retrouve les mutations dans les gènes *nadK* et *yqhC* qui étaient déjà présentes dans l'ADN génomique de la souche ST023-5 dans la population évoluée ST025.

Le gène *ynfK* code pour une potentielle dethiobiotin synthase, les gènes *valV* et *valW* codent pour des ARNt de la valine et *rpoB* code pour la sous-unité β de l'ARN polymérase.

Les travaux devront être poursuivis, en confirmant la présence de ces mutations par un séquençage de Sanger dans le génome de la population ST025, puis en réintroduisant les mutations dans la souche ST001, pour étudier leur(s) effet(s) sur la production de n-butanol en milieu chimiquement défini à base de glucose.

4. Identification de voies métaboliques susceptibles de favoriser la production de succinate, lactate, et acétate dans la souche ST001

Comme montré précédemment, la souche d'*E. coli* MG1655 Δ *ldhA*, Δ *pf1AB*, Δ *ack-pta*, Δ *iscR*, Δ *frdabcd*, Δ *aceE*, Δ *mgsA*, Δ *adhE* Δ *melB::TT02 ptrc01/RBS01*2crt-hbd ptrc30RBS01*2atoB* (*g.3,625,558-3,720,629del*) *pCF3*udhA* Arg455Leu (ST001), produit du butanol comme produit de fermentation majoritaire, en présence de quelques coproduits : acétate, succinate, et lactate, malgré la délétion des gènes codant les enzymes connues des voies métaboliques de production de ces coproduits en anaérobiose. Une production de butyrate est également observée, favorisée par l'addition de nitrate dans le milieu de culture, nécessaire pour la respiration anaérobie qui consomme du NADH pour la production d'ATP. Une approche rationnelle d'ingénierie métabolique a été réalisée afin d'identifier les voies métaboliques impliquées dans la production de ces coproduits.

4.1. Inactivation de la pyruvate kinase II: PykA

La pyruvate kinase (Pyk) catalyse la conversion du PEP en pyruvate en générant de l'ATP. Il existe deux isoformes chez *E. coli* : PykA et PykF, PykF étant la forme majoritaire. Les paramètres cinétiques entre les 2 isoformes varient, notamment pour les cofacteurs utilisés. PykF n'utilise que l'ADP, alors que PykA peut également utiliser le GDP (Zhao *et al.*, 2017) ce qui a pour conséquence de générer du GTP à la place de l'ATP. Afin de favoriser la production d'ATP à la place d'un mélange GTP et ATP, le gène *pykA* a été délété dans la souche ST001, ne contenant pas le plasmide *pCF3*udhA* Arg455Leu, par transduction généralisée avec le phage P1, selon le protocole décrit dans le Chapitre II, partie 4.5. Les

phages ont été préparés à partir de la souche Keio contenant une cassette de résistance à la kanamycine à la place du gène *pykA*, selon le protocole décrit dans le Chapitre II, partie 4.5. Le *pCF3*udhA* a été réintroduit dans la souche $\Delta pykA$ selon le protocole de transformation par électroporation, décrit dans le Chapitre II, partie 4.3.2. Le plasmide *pCF3*udhA* utilisé pour la transformation ne contient pas le mutant *UdhA Arg455Leu*, car l'impact de cette mutation sur la production de n-butanol n'avait pas encore été identifié lors de la construction de cette souche.

La souche d'*E. coli* *MG1655* $\Delta pykA$ $\Delta ldhA$, $\Delta pflAB$, $\Delta ack-pta$, $\Delta iscR$, $\Delta frdabcd$, $\Delta aceE$, $\Delta mgsA$, $\Delta adhE$ $\Delta melB::TT02 ptrc01/RBS01*2crt-hbd ptrc30RBS01*2atoB$ (*g.3,625,558-3,720,629del*) *pCF3*udhA* a été nommée ST100, et son génotype a été validé par PCR, en vérifiant les loci *adhE*, *ldhA* et *pykA*. Les résultats des vérifications par PCR de 3 clones sont présentés en Figure 47.

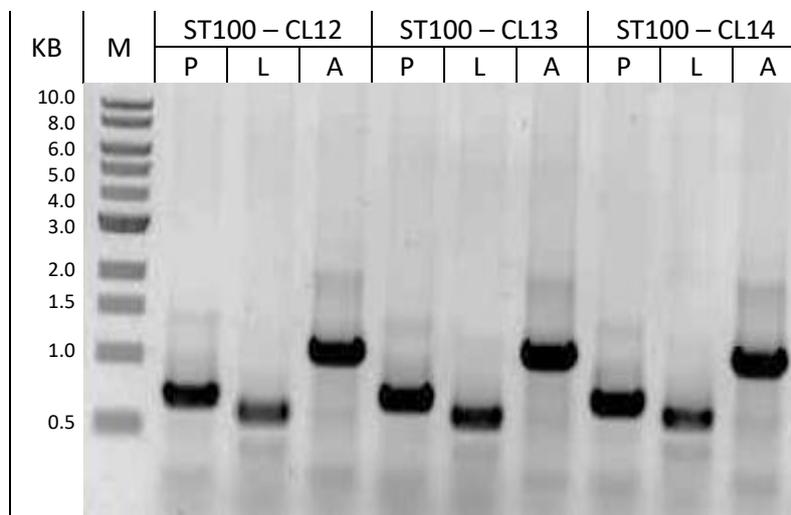


Figure 47 : Validation par PCR des loci *pykA*, *ldhA* et *adhE* dans la souche ST100. Piste M : marqueur de taille 1kb ; Piste P : *pykA*, taille attendue 669pb (amorces : OL126/127) ; Piste L : *ldhA*, taille attendue 576 pb (amorces : hslJC/ldhAC2) ; Piste A : *adhE*, taille attendue 984pb (amorces : adhEs/adhErv).

La souche ST100 a ensuite été cultivée en anaérobiose dans le milieu chimiquement défini supplémenté en extrait de levure et en nitrate afin de caractériser son phénotype (Figure 48).

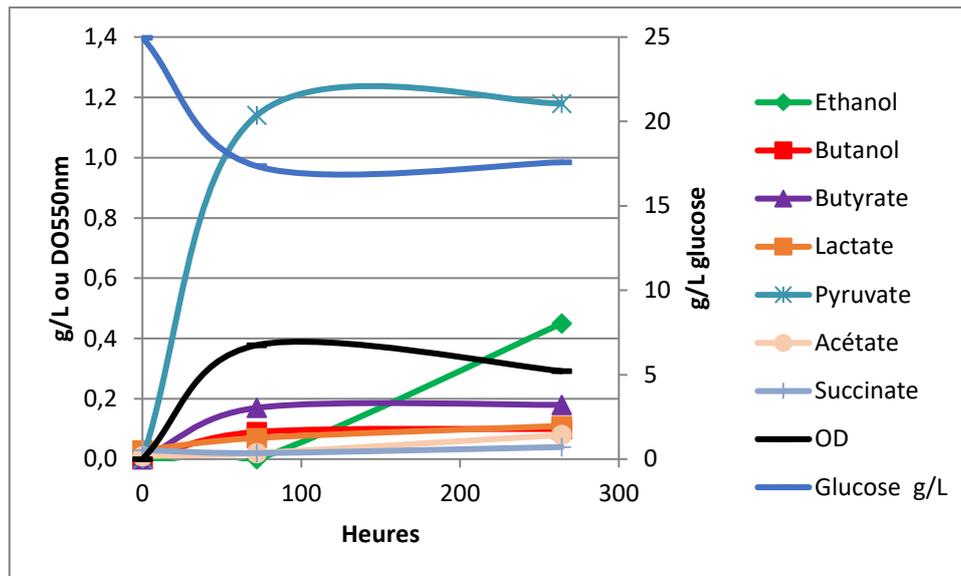


Figure 48 : Cinétiques de croissance et des produits de fermentation de la souche ST100 lors de la culture discontinue en anaérobiose dans le milieu chimiquement défini à base de glucose supplémenté avec 4g/L d'extrait de levure et 5mM de nitrate.

Au cours de la culture discontinue de la souche ST100 en anaérobiose dans le milieu chimiquement défini supplémenté avec 4g/L d'extrait de levure et 5 mM de nitrate, une accumulation de pyruvate (1,2 g/L) dans le milieu de culture est observée, associée à une faible croissance (0,4 unité de densité optique (DO_{550nm})) et de butanol (0,1 g/L). Le métabolisme est bloqué par l'accumulation de pyruvate, vraisemblablement causé par une incapacité de la souche à réoxyder le NADPH généré suite à la réoxydation de la ferrédoxine réduite par la Ferrédoxine NADP⁺ oxydoréductase. Plusieurs tentatives de repiquage de cette souche ont été effectuées, afin d'essayer de forcer l'évolution de la transhydrogénase et de rétablir l'équilibre rédox, mais il n'a pas été possible de surmonter le blocage et convertir le pyruvate accumulé en butanol. A ce stade, il n'est pas possible de conclure sur l'intérêt de la délétion du gène *pykA* sur la production de n-butanol chez *E. coli* dans la souche ST100, car l'absence de la mutation Arg455Leu dans *UdhA* pourrait être la raison du blocage du métabolisme : l'activité transhydrogénase de l'enzyme native pourrait ne pas être suffisante. Il serait nécessaire d'introduire le plasmide *pCF3* udhA Arg455Leu* dans cette souche, et de caractériser à nouveau le phénotype de la souche obtenue. De plus, il faudrait vérifier l'absence de mutation dans le *pCF3* udhA* exprimé dans la souche ST100, ainsi que l'ensemble du génotype de la souche.

4.2. Inactivation de la voie des pentoses phosphates

Comme détaillé dans le Chapitre 1, la voie des pentoses phosphates est la source principale de NADPH chez *E. coli*. Cependant, chez *Clostridium acetobutylicum*, la voie des pentoses phosphates est inactive (Yoo *et al.*, 2015) et ce sont les ferrédoxine NADP⁺ oxydoréductases qui assurent la réduction du NADP⁺ en NADPH. Chez la souche ST001, le métabolisme est plus proche de celui de *Clostridium acetobutylicum*, puisque la voie complète de conversion du pyruvate en butanol y est surexprimée. Dans la souche ST001, la production de NADPH peut être réalisée soit par la voie des pentoses phosphate soit par la voie du butanol, à travers la ferrédoxine NADP⁺ oxydoréductase, pour satisfaire les besoins de la cellule. Ces deux voies pourraient donc être en compétition pour assurer la réduction du NADP⁺, ce qui pourrait diminuer la disponibilité en NADP⁺ nécessaire à la ferrédoxine NADP⁺ oxydoréductase pour réoxyder la ferrédoxine réduite, et en conséquence diminuer le rendement de conversion en butanol.

De plus, il a été montré que, dans la souche productrice d'éthanol présentée dans le Chapitre 3, la combinaison de l'inactivation de *zwf* et d'une mutation dans UdhA permettait à une souche d'acquérir la capacité de croître dans le milieu chimiquement défini sans supplémentation en extrait de levure et sans nitrate.

La voie des pentoses phosphate a été inactivée dans la souche ST001, en délétant le gène *zwf*, codant pour la glucose-6-phosphate déshydrogénase, première enzyme de la voie des pentoses phosphate, par transduction généralisée avec le phage P1, selon le protocole décrit dans le Chapitre II, partie 4.5. Les phages ont été préparés à partir de la souche Keio contenant une cassette de résistance à la kanamycine à la place du gène *zwf*, selon le protocole décrit dans le Chapitre II, partie 4.5. Le pCF3* *udhA* a été réintroduit dans la souche Δzwf selon le protocole de transformation par électroporation décrit dans le Chapitre II, partie 4.3.2. Comme décrit précédemment, le plasmide pCF3* *udhA* utilisé pour la transformation ne contient pas le mutant UdhA Arg455Leu. La souche d'*E. coli* MG1655 $\Delta zwf \Delta ldhA, \Delta pflAB, \Delta ack-pta, \Delta iscR, \Delta frdabcd, \Delta aceE, \Delta mgsA, \Delta adhE \Delta melB::TT02 ptrc01/RBS01*2crt-hbd ptrc30RBS01*2atoB (g.3,625,558-3,720,629del)$ pCF3* *udhA* ainsi construite a été nommée ST101. Le génotype de la souche ST101 a été validé par PCR, en vérifiant les loci *adhE*, *ldhA* et *zwf*. Les résultats des vérifications par PCR de 2 clones sont présentés en Figure 49.

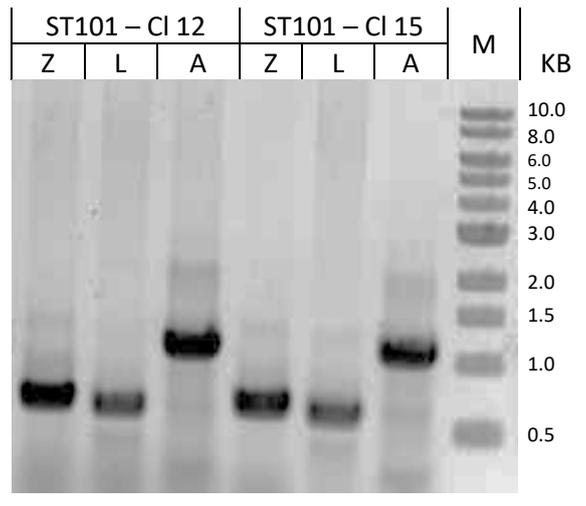


Figure 49 : Validation par PCR des loci *zwf*, *ldhA* et *adhE* dans la souche ST101. Piste M : marqueur de taille 1kb ; Piste Z : *zwf*, taille attendue 605pb (amorces : OL158/159) ; Piste L : *ldhA*, taille attendue 576 pb (amorces : hslJC/ldhAC2) ; Piste A : *adhE*, taille attendue 984pb (amorces : adhEs/adhErv) .

Le phénotype de la souche ST101 a été analysé en anaérobiose dans le milieu chimiquement défini à base de glucose supplémenté avec 4g/L d'extrait de levure et 5mM de nitrate, dans un premier temps. Les résultats sont présentés en Figure 50 et analysés dans le Tableau 38.

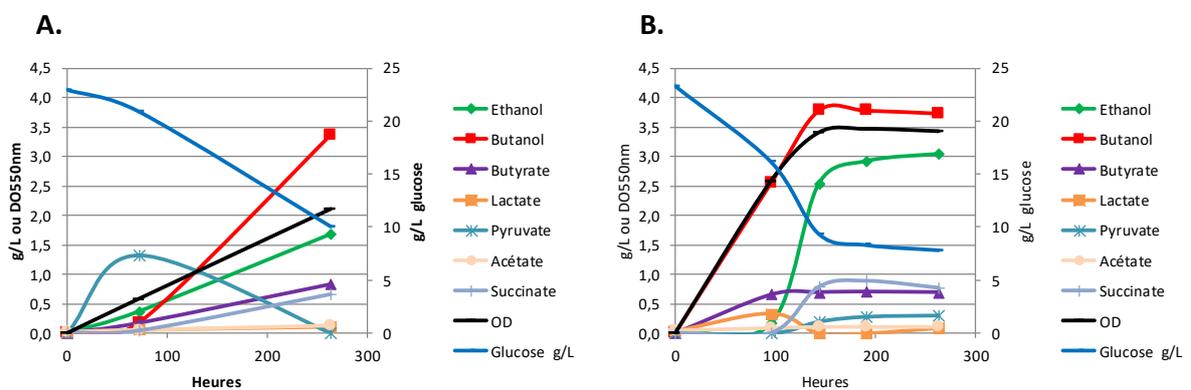


Figure 50 : Cinétique de croissance et de production des métabolites lors de la culture de la souche ST101. A : Première culture en anaérobiose de la souche ST101 dans le milieu chimiquement défini à base de glucose supplémenté avec de l'extrait de levure et des nitrate; B: deuxième sous-culture de la souche ST101 à partir de la culture A dans les mêmes conditions, inoculée à partir de cellules en phase exponentielle de croissance.

Les résultats obtenus lors de la 1ère culture de la souche ST101, anaérobiose dans un milieu chimiquement défini supplémenté avec 4 g/L d'extrait de levure et 5mM de nitrate, sont représentés en Figure 50A. Lors de cette culture, deux phases de croissance sont distinguées : la 1ère correspond à une période d'adaptation aux conditions de culture en anaérobiose, car la souche a été construite en

aérobiose en utilisant du milieu LB. Cette 1^{ère} phase de culture se traduit par une faible croissance (environ 1 unité de densité optique, DO_{550nm}) et une accumulation en pyruvate d'environ 1g/L, accompagnées d'une faible production en butanol. Lors de la seconde phase de croissance, une forte augmentation de la densité optique est observée (2.5 unités, DO_{550nm}), ainsi qu'une re-consommation du pyruvate accumulé, et une production de n-butanol. A l'issue de cette culture, une production de 3,4 g/L de butanol est mesurée dans la souche ST101, soit une production équivalente à celle observée dans la souche initiale ST001. Le rendement de production du butanol dans la souche ST101 est de 0,26 gramme de butanol produit par gramme de glucose consommé ce qui est légèrement supérieur à celui de la souche ST001 (0,23 g/g dans la souche ST001) et le ratio Butanol/Ethanol est également plus favorable dans la souche ST101 (2,0) par rapport à la souche ST001 (1,6).

Souche	Glucose consommé (g/L)	Ethanol (g/L)	Butanol (g/L)	Butyrate (g/L)	Lactate (g/L)	Acétate (g/L)	Succinate (g/L)	DO _{550nm}	Butanol /Ethanol	Rdt. Butanol /Glucose (g/g)	Carbone balance %
ST001	14,5	2,2	3,3	0,6	0,6	0,1	0,2	1,8	1,5	0,23	99%
1 ^{ère} culture ST101	12,9	1,7	3,4	0,8	0,1	0,1	0,7	2,1	2	0,26	114%
2 ^{nde} culture ST101	15,4	3,0	3,7	0,7	0,1	0,1	0,8	3,4	1,2	0,24	121%

Tableau 38 : Analyse des cultures discontinues réalisées à partir de la souche ST101 lors de la croissance en anaérobiose dans le milieu chimiquement défini à base de glucose supplémenté avec 4g/L d'extrait de levure et 5mM de nitrate. Les résultats sont comparés à la souche initiale (ST001)

La souche ST101 a été repiquée à l'issue de cette première culture discontinue en anaérobiose (après 250h de culture), dans du milieu frais et avec une densité optique initiale de 0,1 unité (DO_{550nm}). Les cinétiques de croissance et de production de cette seconde culture sont présentés dans la Figure 50B. Dans cette seconde culture, aucune accumulation de pyruvate n'est observée, et la production en butanol et la densité optique sont corrélées. La souche ST101, après adaptation au milieu chimiquement défini supplémenté avec 4 g/L d'extrait de levure et 5mM de nitrate, produit 3.7g/L de n-butanol, et atteint une densité optique maximale de 3.4 unités (DO_{550nm}), soit une production de n-butanol 1,1 fois supérieure et une croissance 1,9 fois supérieure à la souche ST001, chez laquelle le gène *zwf* n'est pas délété. Un rendement de production du butanol de 0,24 gramme de butanol produit par gramme de glucose consommé et un ratio Butanol/Ethanol de 1,2 ont été déterminés.

Pour conclure, la délétion de *zwf* dans la souche ST001 conduit à une augmentation de la densité optique, accompagnée d'une légère augmentation de la concentration en butanol, mais ne conduit

pas à une amélioration significative du rendement de production en n-butanol par rapport à la souche initiale ST001.

La délétion du gène *zwf* dans la souche ST001 semble favoriser la production de n-butanol lors de la croissance en anaérobiose. Cependant, l'ajout d'extrait de levure dans le milieu de culture semble perturber le couplage « croissance/production en butanol », favorisant la croissance indépendamment de la production de n-butanol, car la souche ST101 peut atteindre une densité optique plus importante que la souche ST001, mais sans augmentation significative de la concentration en butanol. D'après les résultats obtenus dans le chapitre IV, partie 3, une évolution adaptative de la souche ST101 semble une bonne stratégie pour permettre la croissance dans le milieu chimiquement défini à base de glucose sans supplémentation en extrait de levure et en nitrate tout en favorisant la production de butanol. De plus, il a été montré que, dans la souche productrice d'éthanol présentée dans le chapitre 3, la combinaison de l'inactivation de *zwf* et d'une mutation dans *UdhA* permettait à une souche d'acquérir la capacité de croître dans le milieu chimiquement défini sans supplémentation en extrait de levure et sans nitrate. L'adaptation de la souche ST101 va permettre de déterminer si l'inactivation de la voie des pentoses phosphate facilite l'adaptation de la souche pour la croissance et la production de butanol en anaérobiose dans le milieu chimiquement définie sans supplémentation en extrait de levure et en nitrate.

La stratégie d'évolution adaptative, pour permettre la croissance et la production de butanol en anaérobiose dans le milieu chimiquement défini sans supplémentation en extrait de levure et en nitrate, de la souche ST101, est présentée en Figure 51.

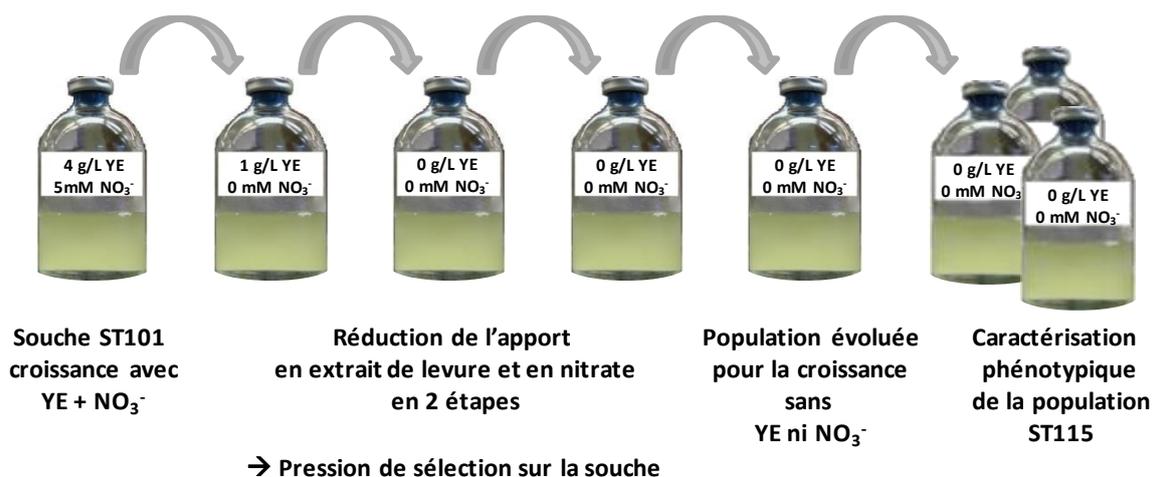


Figure 51 : Schéma de l'évolution adaptative de la souche ST101 pour permettre la croissance et la production de butanol en anaérobiose dans le milieu chimiquement défini sans supplémentation en extrait de levure et en nitrate

L'évolution adaptative de la souche ST101 a été réalisée à partir de la culture présentée dans la Figure 50B après 150h de culture, pour inoculer une culture contenant le milieu chimiquement défini à base de glucose supplémenté avec 1 g/L d'extrait de levure et sans supplémentation en nitrate à une densité optique initiale de 0,1 unité (DO_{550nm}). Ensuite, l'évolution adaptative a été réalisée en repiquant les cultures dans du milieu frais sans apport en extrait de levure et sans nitrate à une densité optique initiale de 0,1 unité (DO_{550nm}) après 100h de culture en anaérobiose. Les résultats de ces cultures sont présentés en Figure 52 et analysés dans le Tableau 39.

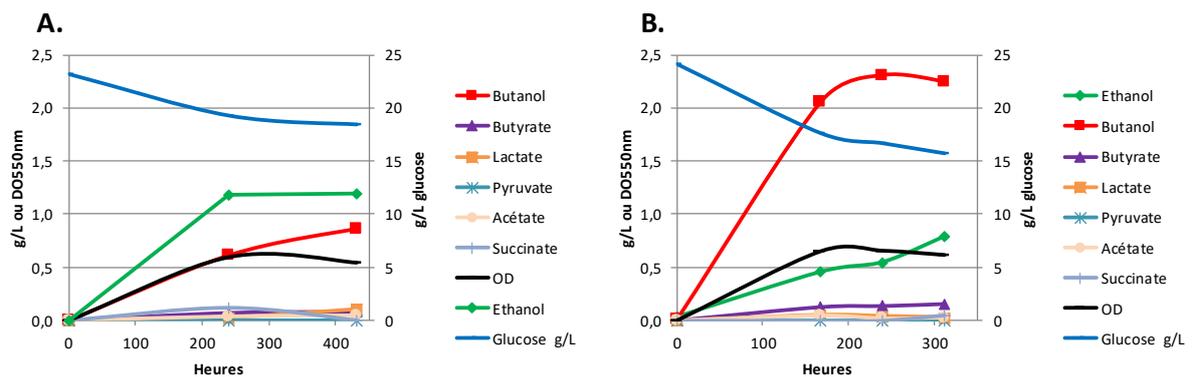


Figure 52 : Cinétiques de croissance et de production des métabolites lors de l'adaptation de la souche ST101 pour la culture en anaérobiose dans le milieu chimiquement défini à base de glucose sans supplémentation en extrait de levure et sans nitrate. A : Adaptation de la souche ST101 dans le milieu chimiquement défini à base de glucose sans nitrate, avec 1g/L d'extrait de levure; B : Première culture de la souche ST101 dans le milieu chimiquement défini à base de glucose sans nitrate et sans extrait de levure

La caractérisation phénotypique de la souche ST101, en anaérobiose dans le milieu chimiquement défini supplémenté avec uniquement 1g/L d'extrait de levure et sans nitrate, montre une diminution de la croissance (densité optique maximum de 0.6 unités (DO_{550nm})) et de la concentration en butanol (0.9g/L) produit. Un rendement de production du butanol de 0,18 g/g et un ratio Butanol/Ethanol de 0,7 sont calculés (Tableau 39). Cependant, la consommation de glucose (4.7 g/L) reste plus faible que dans les cultures précédentes. Malgré ces performances réduites, la souche est capable de croître et de produire du butanol. Pour augmenter la pression de sélection et favoriser l'apparition de mutations bénéfiques, une croissance de la souche ST101 a été réalisée en milieu chimiquement défini en absence de supplémentation, et donc en absence totale d'extrait de levure. Les résultats de cette culture sont présentés en Figure 52B et analysés dans le Tableau 39.

Souche	Glucose consommé (g/L)	Ethanol (g/L)	Butanol (g/L)	Butyrate (g/L)	Lactate (g/L)	Acétate (g/L)	Succinate (g/L)	DO _{550nm}	Butanol /Ethanol	Rdt. Butanol /Glucose (g/g)	Carbone balance %
Pop. C5 bis	8,9	1	2,5	0,1	0,1	0,1	0,1	1,1	2,5	0,28	103%
ST101 1g/L YE	4,7	1,2	0,9	0,1	0,1	0,1	0	0,6	0,7	0,18	107%
ST101 -YE	8,3	0,8	2,3	0,2	0	0	0,1	0,6	2,9	0,27	91%
ST115	7,1	0,8	2,1	0,1	0	0,1	0,1	0,6	2,5	0,29	99%

Tableau 39 : Analyse des cultures discontinues de la souche Butanol *Δzwf* en anaérobiose sans apport en extrait de levure et sans nitrate dans le milieu de culture. Les résultats sont comparés à la population C5 bis issue de l'adaptation in-vivo de la souche Butanol pour la culture en anaérobiose sans apport en extrait de levure et sans nitrate dans le milieu de culture

Lors de cette culture, la souche ST101 a été capable de produire 2.3g/L de butanol, mais l'absence d'extrait de levure et de nitrate a toujours un impact important sur la densité optique, qui a atteint 0,7 unités à son maximum (DO_{550nm}). On observe également la production de 0,8g/L d'éthanol, conduisant à un ratio Butanol/Ethanol de 2,9 et un rendement de production du butanol de 0,27 gramme de butanol produit par gramme de glucose consommé. La souche ST101, adaptée pour la croissance en milieu chimiquement défini à base de glucose, a ensuite été repiquée en milieu chimiquement défini à base de glucose sans supplémentation en extrait de levure et en nitrate, afin de confirmer ce résultat. A l'issue de ces cultures, la population adaptée a été renommée ST115.

La population évoluée, ST115, a été cultivée en anaérobiose avec du milieu chimiquement défini à base de glucose sans supplémentation. Les résultats obtenus sont présentés en Figure 53 et analysés dans le Tableau 39. La souche ST115 a produit 2,1g/L ± 0,1 de butanol avec une densité optique maximum de 0,6 ± 0,04 unités. On observe également une production notable de 0,8g/L ± 0,1 d'éthanol. Cette population est comparable à la population C5 bis, présentée dans le chapitre 4 partie 3.1, qui correspond à la souche Butanol initiale (ST001) adaptée pour la croissance en anaérobiose dans le milieu chimiquement défini à base de glucose en absence de supplémentation en extrait de levure et en nitrate. Les titres en butanol entre la population ST115 et C5 bis sont similaires, avec 2,1 g/L pour ST115 et 2,5 g/L pour C5 bis. Le rendement de production du butanol est légèrement supérieur dans la population ST115, avec une valeur de 0,29 gramme de butanol produit par gramme de glucose consommé, par rapport à 0,28 g/g pour la population C5 bis. Le rendement du butanol produit par rapport à la densité optique formée est également largement en faveur de la population ST115, avec un ratio Butanol/DO de 3,5 par rapport à 2,3 pour la population C5 bis.

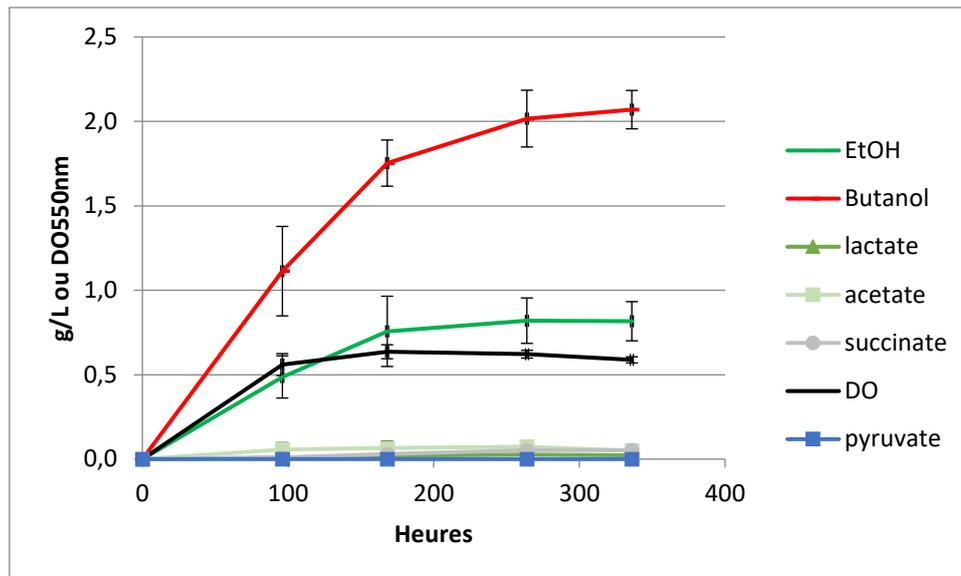


Figure 53 : Cinétiques de croissance et de production des métabolites lors de la culture discontinue de la souche ST115 en anaérobiose dans le milieu chimiquement défini à base de glucose sans supplémentation en extrait de levure et sans nitrate

Pour conclure, l'inactivation de la voie des pentoses phosphates dans la souche Butanol semble faciliter l'adaptation de la souche Butanol pour la croissance dans le milieu chimiquement défini sans supplémentation. Cependant, il pourrait être intéressant de mener une évolution de la population ST115 en culture continue dans le milieu chimiquement défini sans supplémentation, afin d'accroître les performances de la population, en sélectionnant une souche dont la croissance est améliorée. On peut également souligner que, dans la littérature, la production de n-butanol par *E. coli*, dans un milieu chimiquement défini sans supplémentation avec une source complexe d'azote, est de 0,6 g/L de butanol par la souche BP1 (Pontrelli *et al.*, 2018b). En comparant avec ce résultat, la population ST115 est capable de produire 3,5 fois plus de butanol que la meilleure souche présentée dans la littérature.

4.3. Inactivation de la malate déshydrogénase : Mdh

Comme expliqué précédemment, lors de la production de n-butanol par la souche ST001, on observe également une faible production d'acétate, de succinate, et de lactate, malgré l'inactivation des voies métaboliques connues pour la production de ces coproduits. La délétion de la malate déshydrogénase (*mdh*), conduisant à la synthèse de malate à partir d'oxaloacétate, intermédiaire de la voie de production du succinate et consommant du NADH, a été étudiée afin de voir si la production transitoire de malate pourrait être liée à la production soit de succinate, soit de lactate observés dans la souche ST001.

De plus, comme détaillé dans le Chapitre I partie 2.2.2.2.2, l'inactivation de *mdh* dans la souche EB216 a déjà permis d'augmenter le titre en butanol chez *E. coli* (H. Dong *et al.*, 2017), ce qui en fait une cible d'intérêt dans l'optimisation du métabolisme de la souche ST001. La délétion de ce gène dans la souche Butanol ST001 a été réalisée en complément de l'inactivation de la voie des pentoses phosphates décrite précédemment. La délétion du gène *mdh* a été réalisée par transduction généralisée avec le phage P1, selon le protocole décrit dans le Chapitre II, partie 4.5. Les phages ont été préparés à partir de la souche Keio contenant une cassette de résistance à la kanamycine à la place du gène *mdh*, selon le protocole décrit dans le Chapitre II, partie 4.5. La délétion des gènes *mdh* et *zwf* a été validée par PCR. Le *pCF3* udhA* a été réintroduit dans la souche $\Delta mdh \Delta zwf$ selon le protocole de transformation par électroporation décrit dans le Chapitre II, partie 4.3.2. Les loci génétiquement modifiés ont ensuite été validés par PCR, Figure 54.

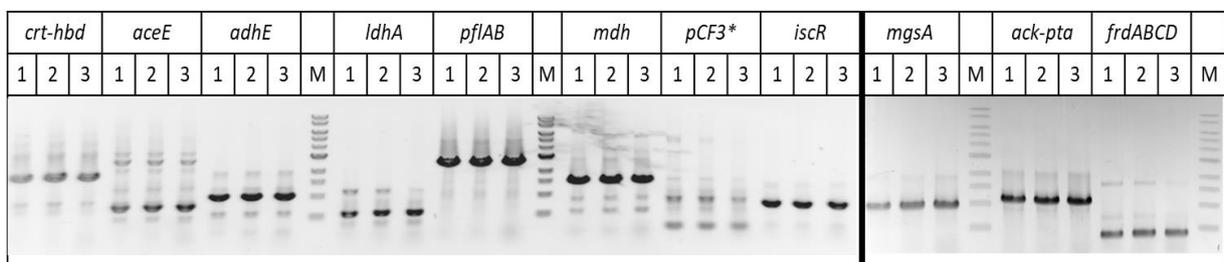


Figure 54 : Validation par PCR des loci dans 3 clones de la souche ST143. Piste M : marqueurs de taille (de haut en bas : 10,0 – 8,0 – 6,0 – 5,0 – 4,0 – 3,0 – 2,0 – 1,5 – 1,0 – 0,5 KB) ; Piste *crt-hbd*: taille attendue 1903pb (amorces : OL29/30) ; Piste *aceE*: taille attendue 572pb (amorces : aceEs/aceErv) ; Piste *adhE*: taille attendue 984pb (amorces : adhEs/adhErv) ; Piste *ldhA*: taille attendue 576pb (amorces : hslJC/ ldhAC2) ; Piste *pflAB*: taille attendue 2273pb (amorces : pflAB1/pflAB2) ; Piste *mdh*: taille attendue 1646pb (amorces : mdh-F/-R) ; Piste *pCF3**: taille attendue 4,4kb (amorces : OL28/106) ; Piste *iscR*: taille attendue 708pb (amorces : iscR1s/iscR1rv) ; Piste *mgsA*: taille attendue 961pb (amorces : mgsAs/mgsArv) ; Piste *ack-pta*: taille attendue 1103pb (amorces : B2295f/ YfcCr) ; Piste *frdABCD*: taille attendue 1123pb (amorces : frdABCD1s/frdABCD1rv).

Comme précédemment, le plasmide *pCF3* udhA* utilisé pour la transformation ne contient pas le mutant UdhA Arg455Leu. La souche d'*E. coli* MG1655 $\Delta mdh \Delta zwf \Delta ldhA, \Delta pflAB, \Delta ack-pta, \Delta iscR, \Delta frdabcd, \Delta aceE, \Delta mgsA, \Delta adhE \Delta melB::TT02 ptrc01/RBS01*2crt-hbd ptrc30RBS01*2atoB (g.3,625,558-3,720,629del) pCF3* udhA$ construite a été nommée ST143.

La première culture en anaérobiose dans du milieu chimiquement défini à base de glucose supplémenté avec de l'extrait de levure et des nitrate est présentée en Figure 55. La culture de cette souche ST143 a nécessité une longue période d'adaptation en milieu chimiquement défini à base de glucose supplémenté avec 4 g/L d'extrait de levure et 5 mM de nitrate(600h) avant de restaurer une croissance et une production en butanol significatives, accompagnées de la re-consommation du

pyruvate accumulé lors de la première phase de croissance. Le titre final en butanol est de 0,9g/L, avec une densité optique maximum de 1,2 unité (DO_{550nm}) et une production de 0,9g/L d'éthanol.

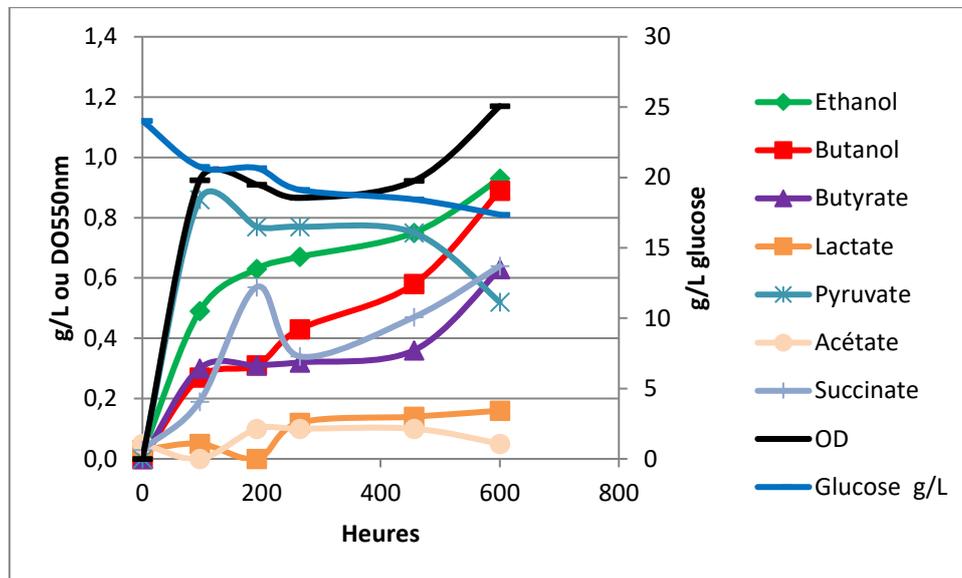


Figure 55 : Cinétique de croissance et de production des métabolites lors de la culture initiale de la souche Butanol $\Delta zwf \Delta mdh$ (ST143) en anaérobiose dans le milieu chimiquement défini à base de glucose supplémenté avec de l'extrait de levure et des nitrate

Pour améliorer les performances de cette souche ST143, une évolution adaptative a été réalisée dans le milieu chimiquement défini supplémenté avec 4 g/L d'extrait de levure et 5mM de nitrate. La stratégie d'évolution adaptative de la souche ST143 est représentée en Figure 56.

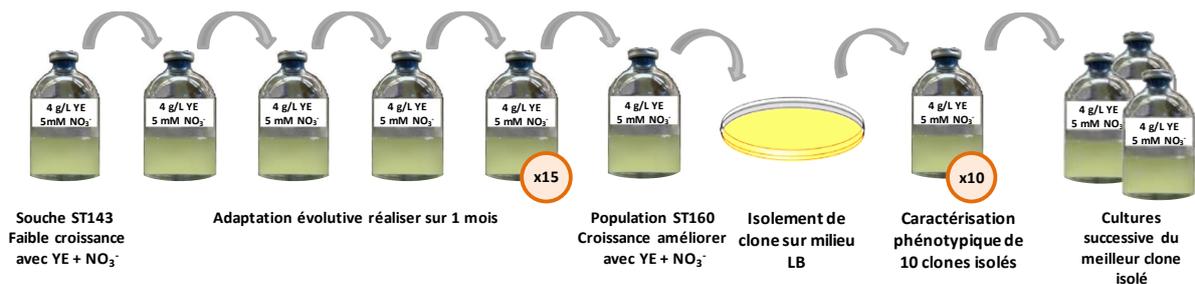


Figure 56 : Schéma de l'évolution adaptative de la souche ST143 pour améliorer la croissance et la production de butanol en anaérobiose dans le milieu chimiquement défini supplémenté avec 4 g/L d'extrait de levure et 5mM de nitrate.

L'évolution adaptative a été réalisée en effectuant des repiquages successifs des cultures, à une biomasse initiale de 0,1 unité de densité optique (DO_{550nm}), après 48 à 72h de culture en anaérobiose dans du milieu frais chimiquement défini supplémenté avec 4 g/L d'extrait de levure et 5mM de nitrate. Cette évolution adaptative a permis d'obtenir une population possédant une meilleure croissance et

un titre en butanol plus élevé que la souche initiale. Cette population a été nommée ST160. Après la conduite de cette évolution adaptative pendant 1 mois, des clones ont été ré-isolés en aérobiose sur boîte LB à partir de la population. Le phénotype des clones isolés a été caractérisé en anaérobiose dans le milieu chimiquement défini supplémenté avec 4 g/L d'extrait de levure et 5mM de nitrate, et leurs performances ont été comparées à celles de la population. A partir de 10 clones ré-isolés, cultivés en anaérobiose dans le milieu chimiquement défini supplémenté avec 4 g/L d'extrait de levure et 5mM de nitrate dans un volume de 5ml, une importante variabilité a été observée dans les caractéristiques phénotypiques des clones. Cependant, ce format de culture compromet l'interprétation des données en raison des potentielles différences d'état physiologique des cellules utilisées pour inoculer les cultures liquides directement à partir des isollements sur milieu solide. A titre indicatif, les résultats de ces cultures préliminaires sont présentés dans le Tableau 40. Par la suite, les clones les plus prometteurs ont été repiqués à partir de ces cultures de 5 mL afin de permettre l'analyse. Ces résultats sont présentés dans le Tableau 41.

Souche	Ethanol (g/L)	Butanol (g/L)	Butyrate (g/L)	DO _{550nm}	Butanol /Ethanol	Rdt Butanol /Glucose (g/g)
Population évoluée ST160	1,6	2	0,7	2,1	1,3	0,33
Clone 1	2	2,1	0,6	2,5	1,1	0,24
Clone 4	3	3,3	1,8	3	1,1	0,39
Clone 5	2,3	3	0,7	2,8	1,3	0,24
Clone 6	1,2	1,9	0,5	2,7	1,6	0,19
Clone 7	1,8	3,1	0,7	2,5	1,7	0,26
Clone 8	1,9	3,1	0,8	3,7	1,7	0,28
Clone 9	2,6	3,3	0,8	2,8	1,3	0,29
Clone 10	1,9	3	0,8	3,1	1,6	0,27
Clone 11	2,4	3	0,7	2,9	1,3	0,24

Tableau 40 : Analyse des cultures discontinues réalisées à partir des clones isolés de la population Butanol $\Delta mdh \Delta zwf$ (ST160) après 90h de croissance en anaérobiose dans le milieu chimiquement défini à base de glucose supplémenté avec 4g/L d'extrait de levure et 5mM de nitrate. Les résultats sont comparés à la population utilisée pour effectuer l'isolement. Les lignes surlignées en rouge correspondent aux clones les plus performants.

Souche	Glucose consommé (g/L)	Ethanol (g/L)	Butanol (g/L)	Butyrate (g/L)	Lactate (g/L)	Acétate (g/L)	Succinate (g/L)	DO _{550nm}	Butanol /Ethanol	Rdt. Butanol /Glucose (g/g)	Carbone balance %
ST001	14,5	2,2	3,3	0,6	0,6	0,1	0,2	1,8	1,5	0,23	99%
Clone 7	16,0	2,4	3,9	1,1	0,3	0,2	0,4	3,1	1,6	0,24	99%
Clone 10	20,2	2,9	4,5	1,1	0,3	0,2	0,3	3,5	1,6	0,22	93%

Tableau 41 : Analyse des cultures discontinues réalisées à partir des clones isolés de la population Butanol $\Delta mdh \Delta zwf$ (ST160) après 400h de croissance en anaérobiose dans le milieu chimiquement défini à base de glucose supplémenté avec 4g/L d'extrait de levure et 5mM de nitrate. La ligne surlignée en rouge correspond au clone le plus performant.

Le clone 10 possède les meilleures performances, et il est capable de produire du butanol à un titre final de 4,5 g/L, 3,5 unités de densité optique (DO_{550nm}) et un ratio Butanol/Ethanol de 1,6. Cependant, le rendement de production du butanol dans le clone 10 est de 0,22, soit 54% du rendement théorique maximum. Cette baisse du rendement de production s'explique par l'utilisation d'une part plus importante du carbone pour la croissance. On observe également une production plus importante de butyrate (1,1g/L) par rapport à la souche ST001. Afin d'augmenter le rendement de production du clone 10, un nouveau cycle d'évolution adaptative a été conduit à partir de celui-ci, avec 6 repiquages successifs. Les résultats de ces cultures sont présentés et analysés dans le Tableau 42.

Souche	Glucose consommé (g/L)	Ethanol (g/L)	Butanol (g/L)	Butyrate (g/L)	Lactate (g/L)	Acétate (g/L)	Succinate (g/L)	DO _{550nm}	Butanol /Ethanol	Rdt. Butanol /Glucose (g/g)	Carbone balance %
ST001	14,5	2,2	3,3	0,6	0,6	0,1	0,2	1,8	1,5	0,23	99%
10.1	12,1	1,5	3,3	0,9	0,2	0,1	0,3	2,9	2,2	0,27	118%
10.2	14,0	1,8	3,8	1,0	0,2	0,2	0,4	3	2,1	0,27	108%
10.4	17,1	1,8	4,7	1,5	0,2	0,2	0,4	3,3	2,6	0,27	116%
10.6	24,2	3,0	6,1	1,2	0,3	0,2	0,4	3,7	2	0,33	97%
10.7	28,0	3,1	6	1,1	0,3	0,3	0,5	3,6	1,9	0,27	105%

Tableau 42 : Analyse des cultures discontinues réalisées à partir de la souche Butanol $\Delta mdh \Delta zwf$ (ST143) lors de la croissance en anaérobiose dans le milieu chimiquement défini à base de glucose supplémenté avec 4g/L d'extrait de levure et 5mM de nitrate. Les résultats sont comparés à la souche Butanol initiale (ST001)

Au cours de l'évolution adaptative du clone 10, on observe une augmentation du titre en butanol, plus particulièrement entre la culture 10.4 et 10.6, avec le titre en butanol passant de 4.7g/L à 6.1g/L. On observe également une augmentation du titre en éthanol entre ces 2 cultures passant de 1.8g/L à 3.0g/L. Cependant, la densité optique reste similaire entre les 2 cultures, avec respectivement 3,3 et 3,7 unités (DO_{550nm}). A l'issue de cette évolution adaptative, la souche ST160-10.6 a produit un

maximum 6,1 g/L de butanol avec une densité optique de 3,7 unités (DO_{550nm}), et une production en éthanol de 3,0g/L, donnant un ratio Butanol/Ethanol de 2, et un rendement de production du butanol de 0,33 gramme de butanol produit par gramme de glucose consommé.

La construction et l'évolution adaptative réalisées sur la souche Butanol $\Delta zwf \Delta mdh$ a conduit à isoler un clone capable de produire du butanol à une concentration de 1,8 fois supérieure à la souche Butanol initiale ST001 (3.3g/L), d'améliorer le ratio Butanol/Ethanol de 1,3 fois, et d'obtenir un rendement de production en butanol à 80% du rendement théorique maximum. Cependant, malgré plusieurs tentatives, il n'a pas été possible d'adapter la souche ST160-10 pour croître en milieu chimiquement défini à base de glucose en absence de supplémentation avec de l'extrait de levure et des nitrate.

4.3.1. Séquençage complet de l'ADN génomique extrait du clone ré-isolé ST160-10.4 :

Afin d'identifier les mutations génétiques susceptibles d'être responsables de l'augmentation du titre final, le chromosome et le plasmide contenus dans le clone ré-isolé ST160-10.4 ont été complètement séquencés. Le séquençage a été effectué en utilisant la technologie Ion torrent (décrite dans le Chapitre II, partie 7) et analysé par la Plateforme GET-Biopuces (Génopole -Toulouse). Les résultats ont été comparés au génome initial de la souche ST001. Cette analyse a révélé 3 mutations potentielles dans la souche ST160, avec 2 mutations sur le chromosome dans les gènes *opgH* et *yqhC*, et une sur le plasmide *pCF3*udhA* dans le gène *udhA*. Cependant, le reséquençage des mutations potentielles par la méthode de Sanger n'a permis de confirmer que les mutations dans *yqhC* et *udhA*.

La mutation observée dans *yqhC* est une insertion de 6 nucléotides dans le gène *yqhC*, introduisant une lysine et une phénylalanine entre les positions 102 et 103 dans la protéine. C'est la seconde fois que l'on observe une mutation dans le gène *yqhC* après une évolution adaptative de la souche Butanol. Cependant, la précédente mutation dans *YqhC* était localisée en position 69 dans la séquence protéique. Il est donc possible que l'insertion des acides aminés lysine et phénylalanine entre les positions 102 et 103 dans *YqhC* ait un effet différent sur l'expression des gènes *yqhD* et *dkgA*. Afin de démontrer l'intérêt de cette mutation dans la production de n-butanol, il faudrait réintroduire cette mutation dans la souche ST001 puis caractériser son phénotype. De plus, il est possible d'effectuer une RT-qPCR sur le gène *YqhD* afin de vérifier son taux de transcription entre une souche ayant un gène *yqhC* natif et le mutant présent dans la souche ST160.

Un transposon a été identifié dans le gène *udhA* surexprimé dans le vecteur *pCF3* udhA*. Ce transposon d'environ 600pb est localisé dans la région 3' du gène de position 1300 à 1401 *udhA*

[(1300_1401)ins(600)]. L'activité transhydrogénase de la souche ST160-10 a été mesurée sur extrait brut, et comparée à la souche ST001 afin de déterminer l'impact de cette mutation.

4.3.1.1. Etude de l'impact du transposon dans UdhA, surexprimé dans le vecteur pCF3*udhA identifié dans la souche ST160-10, sur l'activité catalytique de la transhydrogénase

Afin de démontrer l'impact de l'insertion d'un transposon dans le gène *udhA* surexprimé dans le vecteur pCF3* *udhA*, l'activité transhydrogénase de la souche ST160 a été mesurée sur extrait acellulaire et comparé à l'activité transhydrogénase native présente dans la souche ST001 (Tableau 43).

Souche	Description	Activité spécifique (U/mg)
ST095	Pas de surexpression d' <i>udhA</i>	0,77 ± 0,12
ST001	UdhA Arg455Leu	6,37 ± 0,34
ST160-10	<i>udhA</i> [(1300_1401)ins(600)]	0,19 ± 0,07

Tableau 43 : Détermination de l'activité transhydrogénase sur extrait acellulaire, tests réalisés à 35°C en aérobiose dans le tampon Tris-HCl +10µM FAD à pH 7.5. Les valeurs moyennes et les écart-types ont été déterminés sur au moins trois mesures indépendantes.

L'activité spécifique de la transhydrogénase mesurée après culture, en anaérobiose dans le milieu chimiquement défini à base de glucose supplémenté avec 4 g/L d'extrait de levure et 5mM de nitrate, de la souche ST160 est équivalente à celle de la souche qui ne surexprime pas le gène *udhA*, ce qui suggère que la protéine UdhA n'est pas fonctionnelle en présence de ce transposon. Il semble donc que l'inactivation de la transhydrogénase UdhA force la réoxydation du NADPH généré par la FNOR de *C. acetobutylicum*, lors de la réoxydation de la ferrédoxine, par l'activité NADPH dépendante d'YqhD et DkgA potentiellement impliqué dans la production de n-butanol.

5. Modification de la voie métabolique de conversion du pyruvate en n-butanol dans la souche ST001 :

Comme présenté dans la partie 1 du chapitre IV, la souche ST001 utilise une FNOR issue de *C. acetobutylicum* afin de réoxyder la ferrédoxine réduite lors de la production de n-butanol. Cette FNOR est strictement NADP⁺ dépendante. Afin de maintenir l'équilibre redox lors de la production de n-butanol par la souche ST001, il est donc nécessaire d'exprimer la transhydrogénase soluble d'*E. coli* (UdhA) pour convertir le NADPH, généré lors de la réoxydation de la ferrédoxine réduite par la FNOR, en NADH, nécessaire à la production de butanol.

Toutefois, le reséquençage de l'ADN génomique des clones ré-isolés à partir des populations évoluées a révélé différentes mutations dans *udhA* surexprimé à partir du vecteur, à plusieurs reprises, suggérant que la surexpression d'UdhA pourrait être instable au sein de la cellule, et que la conversion du NADPH en NADH, étape essentielle pour la synthèse de butanol, pourrait affecter la production de n-butanol.

Comme présenté dans le Chapitre 3, une souche d'*E. coli* a été développée au cours de cette étude pour permettre un criblage fonctionnel *in vivo* des FNOR. A travers cette approche, les complexes Rnf de *C. ljungdahlii* et *D. alaskensis* ont été testés, mais leur capacité à réoxyder la ferrédoxine réduite *in vivo* chez *E. coli* n'a pas été démontrée. En revanche, l'expression de la FNOR de *C. tepidum*, décrite comme une ferrédoxine oxydoréductase NAD(P)⁺ dépendante, dans cette souche de criblage, a conduit au rétablissement de sa croissance, montrant sa capacité à réoxyder *in vivo* la ferrédoxine réduite de *C. acetobutylicum*. Comme présenté dans le chapitre III, la stratégie d'évolution *in vivo* mise en place a conduit à la sélection d'un mutant de cette enzyme, chez lequel une délétion de 3 nucléotides est observée, provoquant la suppression de l'asparagine en position 264 (FNOR (Δ N264)). En comparaison avec l'activité enzymatique de l'enzyme sauvage, l'activité enzymatique spécifique de cette enzyme mutante, NADH dépendante, a été déterminée comme étant 2,2 fois supérieure à celle de l'enzyme native. Ce mutant pourrait donc remplacer la ferrédoxine NADP⁺ oxydoréductase de *C. acetobutylicum* dans la souche ST001, convertissant le glucose en butanol comme produit de fermentation majoritaire, et devrait permettre d'éviter la surexpression de la transhydrogénase *udhA*. Le métabolisme de cette souche est représenté en Figure 57.

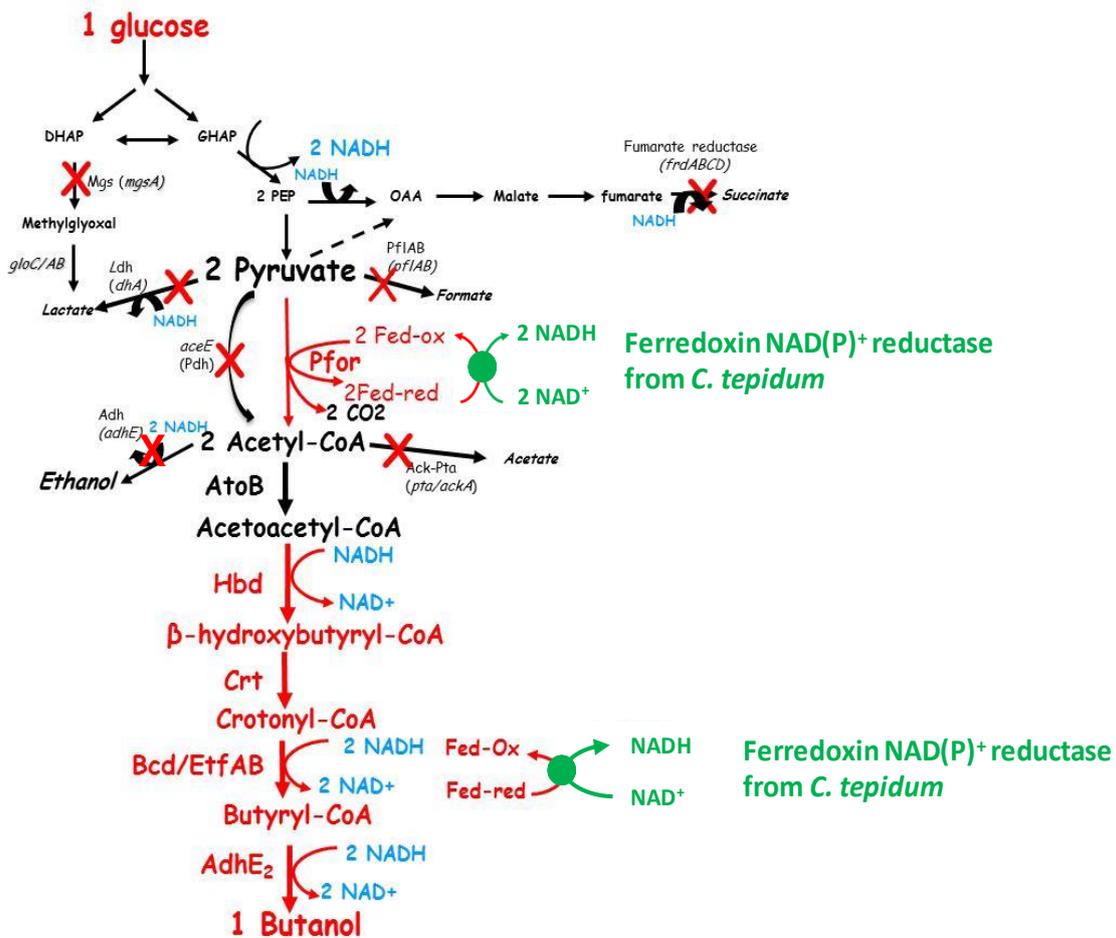


Figure 57 : Représentation schématique du métabolisme de la souche modifiée d'*E. coli* capable de convertir le glucose en n-butanol en utilisant la voie CoA-dépendante de *C. acetobutylicum* et la ferrédoxine NAD(P)⁺ oxydoréductase de *C. tepidum*. Les flèches en noir correspondent au métabolisme natif d'*E. coli*, les flèches en rouge correspondent à la voie CoA-dépendante de *C. acetobutylicum* et les flèches en vert correspondent aux étapes utilisant la FNOR de *C. tepidum* pour réoxyder la ferrédoxine réduite. D'après Soucaille et al Brevet N° EP15306225(2015)(Soucaille et al., 2015).

Afin d'exprimer la FNOR* de *C. tepidum* dans la souche Butanol, le plasmide *pCF3* udhA*, contenant les gènes nécessaires à la production du n-butanol, a dû être modifié afin d'éliminer les gènes codant pour la FNOR de *C. acetobutylicum* et pour la transhydrogénase UdhA d'*E. coli*. Les détails de la construction de ce vecteur sont présentés dans le Chapitre 2. Ce nouveau plasmide, nommé PL025, a été validé par un reséquençage complet des gènes qui le composent.

L'expression de la FNOR ($\Delta N264$) évoluée de *C. tepidum* est effectuée à partir d'un second vecteur, dont l'expression est thermo-inductible, et dont la construction est également détaillée dans le Chapitre 2. Afin de comparer les souches Butanol exprimant la FNOR ($\Delta N264$) évoluée de *C. tepidum* et celle exprimant le système FNOR de *C. acetobutylicum* et transhydrogénase UdhA d'*E. coli*, le système FNOR/transhydrogénase a été exprimé dans le même vecteur. Ces nouveaux plasmides

respectivement nommés PL053 et PL024, ont été validés par un reséquençage complet des gènes qui les composent.

La souche d'*E. coli* MG1655 $\Delta ldhA$, $\Delta pflAB$, $\Delta ack-pta$, $\Delta iscR$, $\Delta frdabcd$, $\Delta aceE$, $\Delta mgsA$, $\Delta adhE$ $\Delta melB::TT02$ *ptrc01/RBS01*2crt-hbd ptrc30RBS01*2atoB* *PL025(pCF3* Δ FNOR Δ udhA)* *PL024(pACYC_FNOR_{CA}+UdhA)* exprimant le système FNOR de *C. acetobutylicum* et transhydrogénase UdhA sous le contrôle du promoteur thermo-inductible a été construite et nommée ST063. La présence du PL025, ainsi que les loci chromosomiques *adhE* et *atoB*, dans la souche ST063, ont été validés par PCR. Les résultats sont présentés en Figure 58.

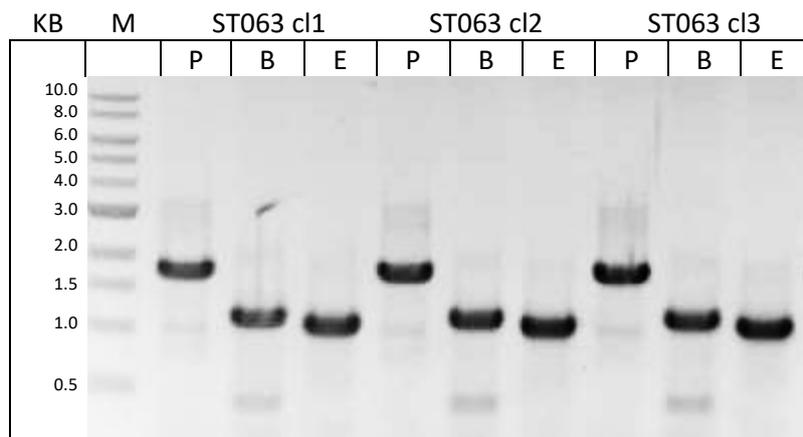


Figure 58 : Validation par PCR de la présence du PL025 dans la souche ST063 et des loci *atoB* et *adhE*. Piste M : marqueur de taille 1kb ; Piste P : PL025, taille attendue 1,7kb ; Piste B : *atoB*, taille attendue 1094 pb (amorces : *atoBs/atoBrv*) ; Piste A : *adhE*, taille attendue 984pb (amorces : *adhEs/adhErv*).

La souche d'*E. coli* MG1655 $\Delta ldhA$, $\Delta pflAB$, $\Delta ack-pta$, $\Delta iscR$, $\Delta frdabcd$, $\Delta aceE$, $\Delta mgsA$, $\Delta adhE$ $\Delta melB::TT02$ *ptrc01/RBS01*2crt-hbd ptrc30RBS01*2atoB* *PL025(pCF3* Δ FNOR Δ udhA)* *PL053(pACYC_FNOR (Δ N264))* exprimant la FNOR (Δ N264) évoluée de *C. tepidum* sous le contrôle du promoteur thermo-inductible a été construite et nommée ST191. La présence du PL053 dans la souche ST191 a été validée par PCR. Les résultats sont présentés en Figure 59.

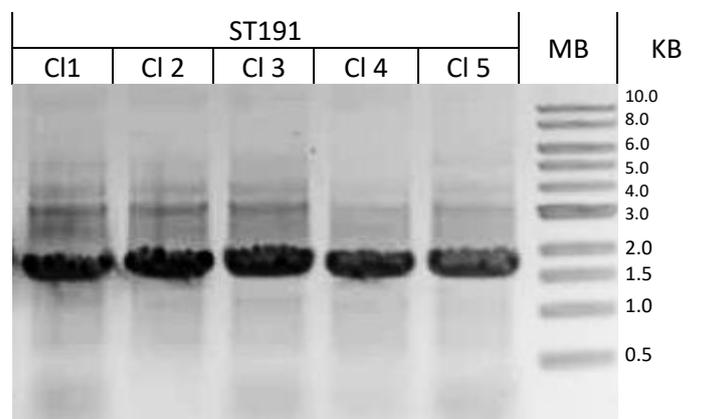


Figure 59 : Validation par PCR de la présence du PL053 dans la souche ST191 pour les clones 1 à 5. Piste M : marqueur de taille 1kb ; Taille attendue pour le PL053 : 1643pb (amorces : OL3/128).

Les phénotypes des souches ST063 et ST191 ont été caractérisés en anaérobiose dans le milieu chimiquement défini supplémenté avec 4 g/L d'extrait de levure et 5mM de nitrate. Les résultats des cultures sont présentés et analysés dans le Tableau 44.

Souche	Glucose consommé (g/L)	Ethanol (g/L)	Butanol (g/L)	Butyrate (g/L)	Lactate (g/L)	Acétate (g/L)	Succinate (g/L)	DO _{550nm}	Butanol /Ethanol	Rdt. Butanol /Glucose (g/g)	Carbone balance %
ST001	14,5	2,2	3,3	0,6	0,6	0,1	0,2	1,8	1,5	0,23	99%
ST063	7,8	0,6	2,1	0,4	0,3	0,1	0,1	1,4	3,5	0,27	102%
ST191	11,4	1,7	3,0	0,5	0,4	0,1	0,1	2,7	1,7	0,26	104%

Tableau 44 : Analyse des cultures discontinues des souches Butanol ST063 et ST191 en anaérobiose dans le milieu chimiquement défini à base de glucose supplémenté avec 4 g/L d'extrait de levure et 5mM de nitrate. Les résultats sont comparés à la souche ST001 cultivée dans les mêmes conditions.

La souche ST063 a atteint une densité optique maximale de 1.4 unités (DO mesurée à 550nm) et a produit du butanol comme produit de fermentation majoritaire (2.1g/L), accompagné d'une production significative d'éthanol (0.6g/L) et de butyrate (0.4g/L). Aucune accumulation de pyruvate n'a été observée lors de la culture de la souche ST063 en anaérobiose. Cependant, on observe une différence des performances entre la souche ST001 et la souche ST063. Cette différence s'explique dans un premier temps par l'absence de la mutation UdhA Arg455Leu dans la souche ST063. De plus, les vecteurs utilisés pour exprimer le système FNOR/transhydrogénase diffèrent entre les souches ST001 et ST063 en termes de promoteur utilisé, et d'origine de répllication du plasmide, ce qui influence l'expression des gènes et peut impacter les performances.

La souche ST191, qui exprime la ferrédoxine NAD(P)⁺ oxydoréductase (Δ N264) de *C. tepidum* évoluée, a atteint une densité optique maximale de 2.7 unités (DO_{550nm}), ce qui représente 1,9 fois la densité optique de la souche de référence ST063. En conséquence, la production en butanol de la souche ST191 est également supérieure, atteignant 3,0 g/L, ce qui représente 1,4 fois le titre en butanol de la souche ST063. De même, la concentration en éthanol est supérieure (1.7g/L), conduisant à un ratio Butanol/Ethanol défavorable de 1,7, par rapport 3,5 pour la souche ST063. Le rendement de production du butanol est de 0,26 gramme de butanol produit par gramme de glucose consommé, ce qui est similaire à celui de la souche ST063 (0,27 g/g).

L'expression de la ferrédoxine NAD(P)⁺ réductase (Δ N264) de *C. tepidum* évoluée permet le remplacement fonctionnel du couple FNOR/transhydrogénase, conduisant à la production de butanol. La comparaison de la souche ST191 avec la souche butanol initiale montre que la quantité de butanol produite est similaire entre les 2 souches, mais le rendement de production du butanol est 1,1 fois

supérieur dans la souche ST191. De plus, la densité optique est 1,5 fois supérieure dans la souche ST191 par rapport à ST001.

Ces premiers résultats sont prometteurs pour le développement d'une souche productrice de butanol sans la co-expression de la F_{nor} de *C. acetobutylicum* et la transhydrogénase. La réalisation d'une évolution *in-vivo* de la souche ST191, en continu, comme appliquée pour la souche ST001, pourrait éventuellement permettre d'améliorer les performances et d'optimiser la production de n-butanol de la souche ST191. De plus, les travaux effectués précédemment pour améliorer la production de n-butanol pourraient être utilisés pour améliorer les performances de cette souche, en effectuant la délétion des gènes *zwf* et *mdh*, ainsi que l'introduction de la mutation dans LptG qui est observée dans la souche EARY55.

6. Production de n-butanol à partir de cellobiose

Dans le cadre du projet Cellutanol, qui a pour objectif de réaliser la production de n-butanol chez *E. coli* à partir de cellulose, une souche intermédiaire a été construite par l'équipe partenaire du projet. Cette souche est capable d'utiliser le cellobiose comme source de carbone, qui est l'un des composés présents après l'hydrolyse de la cellulose, grâce à l'introduction de la β -glucosidase (*bgIA*) de *Ruminococcus albus* au locus *ybfD* dans le chromosome de la souche ST001. Cette souche a ensuite été adaptée en aérobiose pour utiliser le cellobiose, et a développé une mutation dans *lacI*, facilitant l'import du cellobiose dans la cellule au travers du symporteur LacY. Cette souche est nommée Cel1.1, ou ST003. Le phénotype de cette souche Cel1.1 a été analysé en anaérobiose dans le milieu chimiquement défini en présence de cellobiose comme source de carbone et supplémenté avec 4 g/L d'extrait de levure et 5 mM de nitrate. Les résultats obtenus ont été comparés au phénotype de la souche Cel1.1 lors de sa culture en anaérobiose dans le milieu chimiquement défini en présence de glucose comme source de carbone et supplémenté avec 4 g/L d'extrait de levure et 5 mM de nitrate. Les cinétiques de croissance et des produits de fermentation sont représentées en Figure 60.

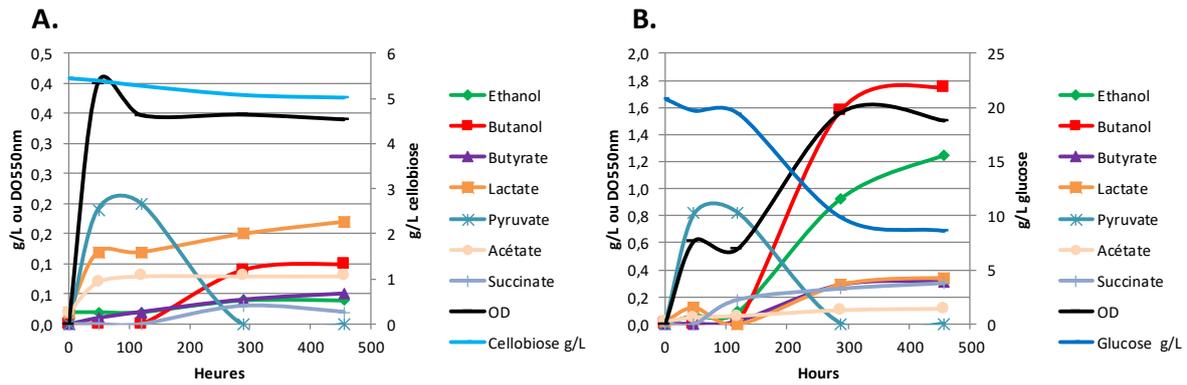


Figure 60 : Comparaison des cinétiques de croissance et des produits de fermentation de la souche Cel1.1 entre l'utilisation du cellobiose et du glucose comme source de carbone lors de la culture discontinue en anaérobiose dans le milieu chimiquement défini à base de glucose supplémenté avec 4g/L d'extrait de levure et 5mM de nitrate

Lors de la culture sur cellobiose, on observe une culture en 2 phases, avec, dans un premier temps, une accumulation de pyruvate et une absence de production en butanol, et dans un deuxième temps, une réassimilation du pyruvate, et une production de 100 mg/L de butanol avec un rendement de 0,23 gramme de butanol produit par gramme de cellobiose consommé. Lors de la croissance sur glucose, on observe une phase de latence avec une accumulation de pyruvate et un titre en butanol final inférieur à celui observé pour la souche ST001. De plus, à partir de la culture sur cellobiose, une évolution adaptative a été initiée en repiquant successivement la souche Cel1.1 par une méthode similaire à celle présentée précédemment. Cependant, il n'a pas été possible d'augmenter le titre en butanol produit.

Pour conclure, la production de n-butanol chez *E. coli* en utilisant le cellobiose comme source de carbone est réalisable, mais d'importants travaux d'ingénierie métabolique restent à effectuer afin de l'optimiser.

7. Bilan des souches construites au cours de cette étude produisant du butanol

Afin de permettre une analyse globale des travaux réalisés sur la souche butanol, le Tableau 45 regroupe l'ensemble des caractérisations phénotypiques des souches présentées au cours de ce chapitre IV.

Souche	Glucose consommé (g/L)	Ethanol (g/L)	Butanol (g/L)	Butyrate (g/L)	Lactate (g/L)	Acétate (g/L)	Succinate (g/L)	DO _{550nm}	Butanol /Ethanol	Rdt. Butanol /Glucose (g/g)	Carbone balance %
Milieu chimiquement défini à base de glucose supplémenté avec 4g/L d'extrait de levure et 5mM de nitrate											
ST001	14,5	2,2	3,3	0,6	0,6	0,1	0,2	1,8	1,5	0,23	99%
EARY 55	21,6	3,2	6,1	0,5	0,3	0,1	0,4	3,7	1,9	0,28	112%
ST101	15,4	3,0	3,7	0,7	0,1	0,1	0,8	3,4	1,2	0,24	121%
ST160-10	24,2	3,0	6,1	1,2	0,3	0,2	0,4	3,7	2	0,33	97%
Milieu chimiquement à base de glucose défini sans supplémentation											
Pop. C5 bis	8,9	1	2,5	0,1	0,1	0,1	0,1	1,1	2,5	0,28	103%
Pop. ST115	7,1	0,8	2,1	0,1	0	0,1	0,1	0,6	2,5	0,29	99%

Tableau 45 : Comparaison des performances des différentes souches développées au cours de cette étude produisant du n-butanol. Les lignes surlignées en rouge correspondent aux clones les plus performants.

D'après le Tableau 45, la présence de mutations dans le gène *yqhC*, *lptG* et dans le gène *udhA* surexprimé sur le plasmide pCF3* *udhA* dans la souche EARY55 permet d'améliorer la production de n-butanol de 1,8 fois par rapport à la souche ST001. De plus le rendement de production du butanol est également supérieur dans cette souche. On observe des performances similaires dans la souche ST160-10, qui combine les délétions des gènes *zwf* et *mdh*. Ces délétions semblent permettre d'améliorer le rendement de production du butanol, car la souche ST160 présente un rendement de production du n-butanol 1,2 fois supérieur à celui de la souche EARY 55, alors que leurs titres finaux en butanol sont équivalents. Afin d'améliorer la production de n-butanol, l'introduction de la mutation présente dans le gène *lptG* pourrait être réintroduite dans la souche ST160.

Les évolutions adaptatives réalisées pour permettre la croissance et la production de n-butanol dans le milieu chimiquement défini sans supplémentation indiquent que la délétion de *zwf* facilite l'adaptation de la souche. Cependant, l'introduction des mutations dans les gènes *yqhC* et *lptG*, présentes dans la souche EARY 55, pourrait permettre d'améliorer les performances de la souche ST115.

Pour conclure, la meilleure production de n-butanol a été atteinte grâce à la combinaison d'une ingénierie rationnelle du métabolisme et d'une stratégie d'évolution adaptative de la souche afin d'optimiser la production en n-butanol. Cependant, les travaux présentés au cours de cette étude montrent également qu'un nombre important de pistes reste à explorer, en particulier en combinant les meilleures caractéristiques de plusieurs souches. De plus, la production d'ATP semble limiter la croissance de la souche et la production en n-butanol, car l'absence de nitrate dans le milieu de culture a un impact important sur le titre en butanol. La construction d'une voie de production du n-butanol permettant de générer de l'ATP pourrait être un moyen de favoriser la production de n-butanol dans cette souche.

Conclusion générale

Les travaux réalisés dans le cadre de ce doctorat visent à optimiser la production de n-butanol dans la souche ST001, au travers de trois stratégies menées en parallèle. La première stratégie avait pour objectif d'associer la production de n-butanol à la formation d'ATP au travers de l'expression du complexe Rnf chez *E. coli*. La stratégie mise en place pour sélectionner un complexe Rnf fonctionnel chez *E. coli* a montré que l'activité des complexes Rnf de *C. ljungdahlii* et *D. alaskensis* dans les conditions d'expression testées n'était pas suffisante pour rétablir la croissance d'*E. coli* en milieu chimiquement défini sur glucose. Cette stratégie ayant été appliquée sur plusieurs FNOR, elle a toutefois permis de sélectionner une Ferrédoxine NAD(P)⁺ oxydoréductase évoluée issue de *C. tepidum*, fonctionnelle chez *E. coli*, capable de réoxyder *in vivo* la ferrédoxine réduite et ainsi maintenir la croissance. Cette enzyme évoluée a ensuite été exprimée pour remplacer le système FNOR de *C. acetobutylicum* associé à la transhydrogénase soluble UdhA dans la souche ST001 productrice de n-butanol. La capacité de cette enzyme à réoxyder *in vivo* la ferrédoxine réduite a été démontrée à travers la production de n-butanol. La seconde stratégie était de poursuivre l'ingénierie rationnelle du métabolisme de la souche ST001, produisant du n-butanol comme produit de fermentation majoritaire, afin de réorienter les flux de carbone et d'électrons vers la production de n-butanol, et d'empêcher la formation des coproduits. La troisième stratégie a consisté à forcer l'évolution *in vivo* de la souche ST001 productrice de n-butanol, à travers l'utilisation d'une méthodologie d'évolution adaptative de la souche en culture continue pour i) augmenter la tolérance au butanol et les performances de la souche en terme de croissance et de concentration en n-butanol produite et ii) forcer la croissance de la souche dans un milieu de culture chimiquement défini à base de glucose simplifié sans supplémentation par une source d'azote complexe et en absence de nitrate.

Construction d'une souche génétiquement modifiée d'*E. coli* pour le criblage fonctionnel et l'évolution dirigée *in vivo* de Ferrédoxine NAD(P)⁺ oxydoréductase

La construction d'une souche génétiquement modifiée d'*E. coli* utilisable comme plateforme pour le criblage fonctionnel de ferrédoxine NAD(P)⁺ oxydoréductase a été réalisée. La stratégie est basée sur le couplage de la croissance de la souche d'*E. coli* génétiquement modifiée avec la production d'éthanol lors de la culture en anaérobiose dans un milieu chimiquement défini à base de glucose. Cette croissance est strictement dépendante de la fonctionnalité d'une FNOR. Le fonctionnement de cette plateforme repose sur la présence d'un nœud ferrédoxine dépendent, composé de la pyruvate:ferrédoxine oxidoreductase (Pfor) et de la ferrédoxine (2[4Fe-4S]) issues de *C. acetobutylicum*. En absence d'une FNOR fonctionnelle, l'incapacité d'*E. coli* à réoxyder la ferrédoxine

réduite générée par la Pfor bloque la croissance en anaérobiose dans le milieu chimiquement défini à base de glucose. La fonctionnalité de ce système a tout d'abord été validée à travers l'expression de la FNOR NADPH dépendante de *C. acetobutylicum* associée avec l'expression de la transhydrogénase soluble UdhA d'*E. coli*. La robustesse de l'approche a été validée à travers l'expression de la FNOR de *C. tepidum* et des complexes Rnf de *C. ljungdahlii* et *D. alaskensis*. La FNOR de *C. tepidum* possède la particularité d'utiliser le NAD⁺ ou le NADP⁺ comme accepteur d'électrons lors de la réoxydation de la ferrédoxine. Cette particularité dispense cette FNOR de la co-expression de la transhydrogénase soluble UdhA d'*E. coli* pour générer le NADH nécessaire au maintien de l'équilibre redox. Cependant, expérimentalement, la FNOR de *C. tepidum* présente une affinité cinq fois plus importante pour le NADPH que pour le NADH. La plus faible affinité pour le NADH a été compensée par l'évolution *in-vivo* résultante de la pression de sélection exercée par la plateforme de criblage lors de la croissance en anaérobiose dans un milieu chimiquement défini à base de glucose. La plateforme de criblage a permis de faire évoluer la FNOR de *C. tepidum* afin d'augmenter l'activité spécifique de l'enzyme en présence de NADH, et ainsi optimiser le flux d'électrons. La FNOR évoluée de *C. tepidum* a ensuite été utilisée dans la souche Butanol, et la production de n-butanol de cette souche a été comparée à une souche équivalente exprimant le système FNOR de *C. acetobutylicum* et la transhydrogénase d'*E. coli*. Les résultats ont mis en évidence que l'expression d'une FNOR ayant une activité FNOR NAD⁺ dépendante conduisait à la croissance et la production de n-butanol en absence de la surexpression de la transhydrogénase. Concernant l'expression des complexes Rnf de *C. ljungdahlii* et *D. alaskensis*, leurs expressions dans la souche d'*E. coli* génétiquement modifiée pour la production d'éthanol pourrait permettre d'associer la réoxydation de la ferrédoxine réduite à la production d'ATP, et, en cas de fonctionnalité, d'utiliser ces complexes dans la souche ST001 pour la production de n-butanol. Cependant, la stratégie d'expression utilisée au cours de cette étude n'a pas permis de rétablir la croissance d'*E. coli* en milieu chimiquement défini sur glucose. Ces résultats suggèrent que les complexes Rnf exprimés ne sont pas fonctionnels avec cette stratégie d'expression. Cependant, récemment, un autre groupe est parvenu avec succès à exprimer les complexes Rnf de *C. ljungdahlii* et *C. difficile* chez *E. coli*, en réarrangeant l'ordre des gènes dans l'opéron Rnf (*rnfCBDAEG*) afin de diminuer la toxicité du complexe et également en modulant l'expression du complexe au travers de son expression avec le promoteur de la fumarate réductase (*frd*) natif d'*E. coli* (Schiffels and Selmer, 2019). Cette étude a également montré que, *in-vivo*, dans ces conditions, chez *E. coli*, le complexe Rnf réalise la réduction de la ferrédoxine en utilisant le NADH comme donneur d'électrons. Cette étude démontre la fonctionnalité du complexe Rnf chez *E. coli* mais les résultats obtenus indiquent également que l'activité *in vivo* du complexe est faible, car le butyrate est produit en faible quantité, et le produit majoritaire de fermentation est le lactate, indiquant une déséquilibre redox. Cependant, il pourrait

être intéressant d'exprimer les complexes Rnf dont la fonctionnalité a été démontrée dans les mêmes conditions dans la souche d'*E. coli* génétiquement modifiée, pour permettre le criblage *in vivo* de ferrédoxine NAD(P)⁺ oxydoréductase. Si le complexe Rnf réalise uniquement la réduction de la ferrédoxine en utilisant le NADH comme donneur d'électrons, aucune croissance ne sera possible, mais si une faible activité de réoxydation de la ferrédoxine réduite est présente, il pourrait être possible d'observer des mutations du complexe Rnf par évolution *in vivo*, permettant d'améliorer sa fonctionnalité et favoriser la croissance de la souche.

La souche d'*E. coli* génétiquement modifiée développée pour permettre le criblage *in vivo* de ferrédoxine NAD(P)⁺ oxydoréductase pourrait être utilisée de façon plus étendue pour le criblage *in vivo* de bibliothèques de gènes codant des FNORs chez *E. coli*, et comme outil de caractérisation de l'activité ferrédoxine NAD(P)⁺ oxydoréductase sur des gènes dont l'activité FNOR n'a pas encore été démontrée. Cette souche pourrait être utilisée pour tester d'autres couples Pfor/Fd, et ainsi mieux caractériser les interactions Pfor/ferrédoxine/ferrédoxine NAD(P)⁺ oxydoréductase.

Amélioration de la production en n-butanol en réorientant le flux de carbone et d'électrons vers la production de n-butanol dans la souche ST001

L'ingénierie du métabolisme de la souche ST001 produisant du butanol, réalisée au cours de ces travaux, a permis d'augmenter la production de n-butanol. L'inactivation de la première étape de la voie des pentoses phosphate par la délétion du gène *zwf* codant pour la glucose-6-phosphate déshydrogénase, afin de rediriger le flux de carbone uniquement vers la glycolyse, a permis d'augmenter de 1,1 fois la production de n-butanol (3,7 g/L à un rendement de 0,24 g/g). Cependant, cette augmentation du titre en butanol s'accompagne d'une augmentation des coproduits, avec 0,8 g/L de succinate produit, soit 4 fois plus que la souche initiale ST001. La délétion du gène *zwf*, associée à la délétion du gène *mdh* codant pour la malate déshydrogénase, a conduit à la sélection de clones capables de produire 1,8 fois plus de butanol (6,1 g/L à un rendement de 0,33 g/g) lors de la culture discontinuée de la souche dans un milieu supplémenté en extrait de levure et en nitrate par rapport à la souche Butanol initiale ST001. De plus, la délétion du gène *mdh* a permis de diviser par 2 la production de succinate (0,4 g/L) par rapport à la souche dont la seule délétion est le gène *zwf*, et également de diviser par 2 la production de lactate (0,2 g/L) par rapport à la souche initiale ST001. On observe que la diminution des coproduits permet d'améliorer le rendement de production du n-butanol de 1,4 fois par rapport à la souche Butanol initiale ST001.

Augmentation de la production et de la tolérance au butanol chez *E. coli* par évolution adaptative

Après 4500 heures d'évolution *in-vivo*, de la souche ST001 produisant du butanol, en culture continue dans un milieu de culture chimiquement défini supplémenté avec de l'extrait de levure et des nitrate, une population évoluée a été sélectionnée : ses performances en termes de concentration en butanol produit, de rendement en butanol produit, et de rapport entre le butanol et l'éthanol produit sont améliorées. Cette population est capable de produire du butanol jusqu'à 11 g/L de n-butanol avec un rendement de 0,28 g/g. Des clones ont été réisolés à partir de cette population évoluée et après validation de leurs performances en cultures discontinues ; leurs ADN génomiques ont été reséquencés afin d'identifier les cibles génétiques susceptibles d'être responsables de l'amélioration des performances de ces clones. En comparaison avec la souche ST001, deux mutations à l'échelle du génome ont été identifiées dans les gènes *yqhC* et *lptG*, entraînant respectivement un changement ponctuel d'acide aminé dans YqhC et l'introduction d'un codon stop dans *lptg*. La démonstration que ces deux mutations puissent être impliquées dans l'augmentation de la concentration en butanol produite lors de la culture continue doit être validée par réinsertion de ces deux mutations dans la souche ST001 non évoluée. L'évolution adaptative de la souche ST001 a permis d'améliorer les performances de la souche, en termes de titre final et de rendement de conversion du glucose en butanol, et de proposer de nouvelles pistes pour poursuivre l'ingénierie du métabolisme d'*E. coli* au travers des mutations observées dans les gènes *yqhC* et *lptG* présents dans la population après évolution.

Adaptation *in-vivo* de la souche ST001 pour la production de n-butanol dans un milieu chimiquement défini à base de glucose sans supplémentation en source complexe d'azote et sans nitrate

L'adaptation de la souche ST001, pour permettre sa croissance dans un milieu chimiquement défini à base de glucose sans supplémentation en extrait de levure ou en nitrate, a été menée en 2 étapes distinctes. La première a consisté à retirer graduellement l'extrait de levure et les nitrate du milieu de culture, par des sous-cultures successives de la souche, en culture discontinue. Cette première étape a permis d'isoler une souche, nommée ST023, capable de croître et de produire du butanol lors de sa culture discontinue, en anaérobiose, dans le milieu chimiquement défini à base de glucose sans supplémentation. Le titre maximal en butanol obtenu avec cette souche ST023 est de 2,2 g/L à un rendement de 0,37 g/g. Cependant, la biomasse formée (0,4 unités de densité optique) par cette souche demeure faible et limite la production de n-butanol. De plus, l'absence de supplémentation en nitrate, nécessaire pour la respiration anaérobie, semble limiter la production de n-butanol, ce qui indique que c'est le niveau d'ATP présent dans la cellule qui limite la production de n-butanol. Pour résoudre ce problème, une évolution adaptative, en culture continue, dans le milieu minimum sans supplémentation, a été conduite sur la souche ST023-5 isolée, afin de sélectionner une

population, nommée ST025, capable de former plus de biomasse, et ainsi produire plus de butanol. Lors de la culture continue de cette population, une concentration jusqu'à 4,5 g/L de butanol a été observée. D'après la littérature, c'est la plus forte concentration en n-butanol produite chez *E. coli* dans un milieu minimum en comparaison avec la souche BP1, qui produit 0,6 g/L de n-butanol en milieu M9 (Pontrelli *et al.*, 2018b).

Cependant, la stabilité de cette souche ST025 a été un obstacle à la poursuite de ces expériences, en montrant une tendance à évoluer vers la production de biomasse au détriment de la production de n-butanol.

Pour conclure, l'approche d'évolution *in vivo* de la souche ST001 a permis d'identifier plusieurs cibles génétiques susceptibles d'augmenter la concentration en n-butanol. La prolongation de ces recherches pourrait permettre de combiner l'expression des différentes modifications génomiques (*yqhC*, *lptG*, *nadK*) aux délétions des gènes *zwf* et *mdh* dans la souche ST001, afin d'obtenir une souche capable de produire du n-butanol à des concentrations rivalisant avec celles publiées dans la littérature.

Toutefois, quelles que soient les améliorations génétiques apportées, la croissance et la production de n-butanol semblent toujours limitées par la production d'ATP dès lors que le nitrate est supprimé du milieu de culture. Afin de s'affranchir de cette limitation, le couplage entre la production de n-butanol et la génération d'ATP semble une bonne stratégie afin d'améliorer le titre et le rendement de production en n-butanol. La prolongation des recherches sur l'expression du complexe Rnf, en exprimant le complexe développé par Schiffels et Selmer, pourrait permettre de lever la limitation de la production en n-butanol dans la souche ST001.

Références bibliographique

- Abdelaal, A.S., Ageez, A.M., Abd El-Hadi, A.E.H.A., Abdallah, N.A., 2015. Genetic improvement of n-butanol tolerance in *Escherichia coli* by heterologous overexpression of *groESL* operon from *Clostridium acetobutylicum*. *3 Biotech* 5, 401–410. <https://doi.org/10.1007/s13205-014-0235-8>
- Akhtar, M.K., Jones, P.R., 2014. Cofactor Engineering for Enhancing the Flux of Metabolic Pathways. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2, 30. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2014.00030>
- Akhtar, M.K., Jones, P.R., 2008. Deletion of *iscR* stimulates recombinant clostridial Fe-Fe hydrogenase activity and H₂-accumulation in *Escherichia coli* BL21(DE3). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78, 853–862. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1377-6>
- Alexeeva, S., Hellingwerf, K.J., Teixeira de Mattos, M.J., 2003. Requirement of *ArcA* for redox regulation in *Escherichia coli* under microaerobic but not anaerobic or aerobic conditions. *J. Bacteriol.* 185, 204–209. <https://doi.org/10.1128/JB.185.1.204-209.2003>
- Aliprandi, P., Navarro, E., Raynaud, C., Bestel-Corre, G., Soucaille, P., 2017. New microorganism and method for the production of 1,2-propanediol based on NADPH dependent acetol reductase and improved NADPH supply. *PCT/EP2015/060487*.
- Aliverti, A., Pandini, V., Pennati, A., de Rosa, M., Zanetti, G., 2008. Structural and functional diversity of ferredoxin-NADP⁺ reductases. *Arch. Biochem. Biophys.* <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.02.014>
- Alterthum, F., Ingram, L.O., 1989. Efficient ethanol production from glucose, lactose, and xylose by recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1943–1948.
- Angov, E., Hillier, C.J., Kincaid, R.L., Lyon, J.A., 2008. Heterologous protein expression is enhanced by harmonizing the codon usage frequencies of the target gene with those of the expression host. *PLoS One* 3, e2189. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002189>
- Asghari, A., Bothast, R.J., Doran, J.B., Ingram, L.O., 1996. Ethanol production from hemicellulose hydrolysates of agricultural residues using genetically engineered *Escherichia coli* strain KO11. *J. Ind. Microbiol.* 16, 42–47. <https://doi.org/10.1007/bf01569920>
- Ataman, M., Hernandez Gardiol, D.F., Fengos, G., Hatzimanikatis, V., 2017. redGEM: Systematic

- reduction and analysis of genome-scale metabolic reconstructions for development of consistent core metabolic models. *PLoS Comput. Biol.* 13, e1005444. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005444>
- Atkinson, J.T., Campbell, I., Bennett, G.N., Silberg, J.J., 2016. Cellular Assays for Ferredoxins: A Strategy for Understanding Electron Flow through Protein Carriers That Link Metabolic Pathways. *Biochemistry* 55, 7047–7064. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00831>
- Atsumi, S., Cann, A.F., Connor, M.R., Shen, C.R., Smith, K.M., Brynildsen, M.P., Chou, K.J.Y., Hanai, T., Liao, J.C., 2008a. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol production. *Metab. Eng.* 10, 305–311. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2007.08.003>
- Atsumi, S., Hanai, T., Liao, J.C., 2008b. Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels. *Nature* 451, 86–89. <https://doi.org/10.1038/nature06450>
- Auriol, C., Bestel-Corre, G., Claude, J.-B., Soucaille, P., Meynial-Salles, I., 2011. Stress-induced evolution of *Escherichia coli* points to original concepts in respiratory cofactor selectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 1278–83. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010431108>
- Ausubel Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A. and Struhl K., F.M., 2001. *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Pub. Associates. <https://doi.org/10.1002/0471142727>
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K.A., Tomita, M., Wanner, B.L., Mori, H., 2006. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* 2, 2006.0008. <https://doi.org/10.1038/msb4100050>
- Bachi, B., Kornberg, H.L., 2009. Genes Involved in the Uptake and Catabolism of Gluconate by *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 90, 321–335. <https://doi.org/10.1099/00221287-90-2-321>
- Backiel, J., Juárez, O., Zagorevski, D. V, Wang, Z., Nilges, M.J., Barquera, B., 2008. Covalent binding of flavins to RnfG and RnfD in the Rnf complex from *Vibrio cholerae*. *Biochemistry* 47, 11273–84. <https://doi.org/10.1021/bi800920j>
- Baer, S.H., Blaschek, H.P., Smith, T.L., 1987. Effect of Butanol Challenge and Temperature on Lipid Composition and Membrane Fluidity of Butanol-Tolerant *Clostridium acetobutylicum*. *Appl.*

- Environ. Microbiol. 53, 2854–61.
- Barbosa, M.F., Beck, M.J., Fein, J.E., Potts, D., Ingram, L.O., 1992. Efficient fermentation of Pinus sp. acid hydrolysates by an ethanologenic strain of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 1382–4.
- Bausch, C., Peekhaus, N., Utz, C., Blais, T., Murray, E., Lowary, T., Conway, T., 1998. Sequence analysis of the GntII (Subsidiary) system for gluconate metabolism reveals a novel pathway for L-idonic acid catabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 180, 3704–3710.
- Bell, D.S., Ingram, L.O., Ben-Bassat, A., Doran, J.B., Fowler, D.E., Hall, R.G., Wood, B.E., 1992. Conversion of hydrolysates of corn cobs and hulls into ethanol by recombinant *Escherichia coli* B containing integrated genes for ethanol production. *Biotechnol. Lett.* 14, 857–862. <https://doi.org/10.1007/BF01029153>
- Bengelsdorf, F.R., Beck, M.H., Erz, C., Hoffmeister, S., Karl, M.M., Riegler, P., Wirth, S., Poehlein, A., Weuster-Botz, D., Dürre, P., 2018. Bacterial Anaerobic Synthesis Gas (Syngas) and CO₂+ H₂ Fermentation. *Adv. Appl. Microbiol.* <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2018.01.002>
- Bengelsdorf, F.R., Poehlein, A., Linder, S., Erz, C., Hummel, T., Hoffmeister, S., Daniel, R., Dürre, P., 2016. Industrial acetogenic biocatalysts: A comparative metabolic and genomic analysis. *Front. Microbiol.* 7, 1036. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01036>
- Berezina, O. V., Zakharova, N. V., Brandt, A., Yarotsky, S. V., Schwarz, W.H., Zverlov, V. V., 2010. Reconstructing the clostridial n-butanol metabolic pathway in *Lactobacillus brevis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 635–646. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2480-z>
- Beri, D., Olson, D.G., Holwerda, E.K., Lynd, L.R., 2016. Nicotinamide cofactor ratios in engineered strains of *Clostridium thermocellum* and *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*. *FEMS Microbiol. Lett.* <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw091>
- Berry, L., Poudel, S., Tokmina-Lukaszewska, M., Colman, D.R., Nguyen, D.M.N., Schut, G.J., Adams, M.W.W., Peters, J.W., Boyd, E.S., Bothner, B., 2018. H/D exchange mass spectrometry and statistical coupling analysis reveal a role for allostery in a ferredoxin-dependent bifurcating transhydrogenase catalytic cycle. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1862, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.10.002>

- Bertani, B.R., Taylor, R.J., Nagy, E., Kahne, D., Ruiz, N., 2018. A cluster of residues in the lipopolysaccharide exporter that selects substrate variants for transport to the outer membrane. *Mol. Microbiol.* 109, 541–554. <https://doi.org/10.1111/mmi.14059>
- Bertani, G., 1951. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 62, 293–300.
- Bertsch, J., Müller, V., 2015a. Bioenergetic constraints for conversion of syngas to biofuels in acetogenic bacteria. *Biotechnol. Biofuels.* <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0393-x>
- Bertsch, J., Müller, V., 2015b. CO Metabolism in the Acetogen *Acetobacterium woodii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 5949. <https://doi.org/10.1128/AEM.01772-15>
- Bertsova, Y. V., Fadeeva, M.S., Kostyrko, V.A., Serebryakova, M. V., Baykov, A.A., Bogachev, A. V., 2013. Alternative pyrimidine biosynthesis protein ApbE is a flavin transferase catalyzing covalent attachment of FMN to a threonine residue in bacterial flavoproteins. *J. Biol. Chem.* 288, 14276–14286. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.455402>
- Biegel, E., Muller, V., 2010. Bacterial Na⁺-translocating ferredoxin:NAD⁺ oxidoreductase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 18138–18142. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010318107>
- Biegel, E., Schmidt, S., González, J.M., Müller, V., 2011. Biochemistry, evolution and physiological function of the Rnf complex, a novel ion-motive electron transport complex in prokaryotes. *Cell. Mol. Life Sci.* <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0555-8>
- Biegel, E., Schmidt, S., Müller, V., 2009. Genetic, immunological and biochemical evidence for a Rnf complex in the acetogen *Acetobacterium woodii*. *Environ. Microbiol.* 11, 1438–43. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01871.x>
- Bittel, C., Tabares, L.C., Armesto, M., Carrillo, N., Cortez, N., 2003. The oxidant-responsive diaphorase of *Rhodobacter capsulatus* is a ferredoxin (flavodoxin)-NADP(H) reductase. *FEBS Lett.* 553, 408–412. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)01075-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)01075-5)
- Blangy, D., Buc, H., Monod, J., 1968. Kinetics of the allosteric interactions of phosphofructokinase from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 31, 13–35. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(68\)90051-X](https://doi.org/10.1016/0022-2836(68)90051-X)

- Blattner, F.R., Longerich, S., Rosenberg, S. M., Harris, R.S., Gonzalez, C., Lin, D., Nehring, R.B., Saint-Ruf, C., Gibson, J.L., Frisch, R.L., Lichtarge, O., Hastings, P.J., Rosenberg, Susan M., 1997. The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* (80-). 277, 1453–1462. <https://doi.org/10.1126/science.277.5331.1453>
- Boiangiu, C.D., Jayamani, E., Brügel, D., Herrmann, G., Kim, J., Forzi, L., Hedderich, R., Vgenopoulou, I., Pierik, A.J., Steuber, J., Buckel, W., 2006. Sodium ion pumps and hydrogen production in glutamate fermenting anaerobic bacteria. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1159/000091558>
- Bokinsky, G., Peralta-Yahya, P.P., George, A., Holmes, B.M., Steen, E.J., Dietrich, J., Soon Lee, T., Tullman-Ercek, D., Voigt, C.A., Simmons, B.A., Keasling, J.D., 2011. Synthesis of three advanced biofuels from ionic liquid-pretreated switchgrass using engineered *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 19949–19954. <https://doi.org/10.1073/pnas.1106958108>
- Boonstra, B., French, C.E., Wainwright, I., Bruce, N.C., 1999. The *udhA* gene of *Escherichia coli* encodes a soluble pyridine nucleotide transhydrogenase. *J. Bacteriol.* 181, 1030–1034.
- Boonstra, B., Rathbone, D.A., French, C.E., Walker, E.H., Bruce, N.C., 2000. Cofactor regeneration by a soluble pyridine nucleotide transhydrogenase for biological production of hydromorphone. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5161–5166. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.12.5161-5166.2000>
- Boonstra, Björklund, L., French, C.E., Wainwright, I., Bruce, N.C., 2000. Cloning of the *sth* gene from *Azotobacter vinelandii* and construction of chimeric soluble pyridine nucleotide transhydrogenases. *FEMS Microbiol. Lett.* 191, 87–93. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(00\)00375-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(00)00375-X)
- Bossi, R.T., Aliverti, A., Raimondi, D., Fischer, F., Zanetti, G., Ferrari, D., Tahallah, N., Maier, C.S., Heck, A.J.R., Rizzi, M., Mattevi, A., 2002. A covalent modification of NADP + revealed by the atomic resolution structure of FprA, a *Mycobacterium tuberculosis* oxidoreductase. *Biochemistry* 41, 8807–8818. <https://doi.org/10.1021/bi025858a>
- Boynton, Z.L., Bennet, G.N., Rudolph, F.B., 1996. Cloning, sequencing, and expression of clustered genes encoding beta-hydroxybutyryl-coenzyme A (CoA) dehydrogenase, crotonase, and butyryl-CoA dehydrogenase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J. Bacteriol.* 178, 3015–24. <https://doi.org/10.1128/jb.178.11.3015-3024.1996>

- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Bruschi, M., 2002. Structure, function and evolution of bacterial ferredoxins. *FEMS Microbiol. Lett.* 54, 155–175. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(88\)90175-9](https://doi.org/10.1016/0378-1097(88)90175-9)
- Buckel, W., Thauer, R.K., 2018a. Flavin-based electron bifurcation, ferredoxin, flavodoxin, and anaerobic respiration with protons (Ech) or NAD⁺ (Rnf) as electron acceptors: A historical review. *Front. Microbiol.* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00401>
- Buckel, W., Thauer, R.K., 2018b. Flavin-Based Electron Bifurcation, A New Mechanism of Biological Energy Coupling. *Chem. Rev.* <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00707>
- Buckel, W., Thauer, R.K., 2013. Energy conservation via electron bifurcating ferredoxin reduction and proton/Na⁺ translocating ferredoxin oxidation. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1827, 94–113. <https://doi.org/10.1016/J.BBABIO.2012.07.002>
- Burgard, A., Burk, M.J., Osterhout, R., Van Dien, S., Yim, H., 2016. Development of a commercial scale process for production of 1,4-butanediol from sugar. *Curr. Opin. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.04.016>
- Cannon, W.R., 2014. Concepts, Challenges, and Successes in Modeling Thermodynamics of Metabolism. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2, 53. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2014.00053>
- Canonaco, F., Hess, T.A., Heri, S., Wang, T., Szyperski, T., Sauer, U., 2001. Metabolic flux response to phosphoglucose isomerase knock-out in *Escherichia coli* and impact of overexpression of the soluble transhydrogenase UdhA. *FEMS Microbiol. Lett.* 204, 247–252. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10892.x>
- Cao, Z., Song, P., Xu, Q., Su, R., Zhu, G., 2011. Overexpression and biochemical characterization of soluble pyridine nucleotide transhydrogenase from *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 320, 9–14. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02287.x>
- Carrillo, N., Ceccarelli, E.A., 2003. Open questions in ferredoxin-NADP⁺ reductase catalytic mechanism. *Eur. J. Biochem.* 270, 1900–1915. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03566.x>

- Ceccarelli, E.A., Arakaki, A.K., Cortez, N., Carrillo, N., 2004. Functional plasticity and catalytic efficiency in plant and bacterial ferredoxin-NADP(H) reductases. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1698, 155–165. <https://doi.org/10.1016/J.BBAPAP.2003.12.005>
- Chang, A.C.Y., Cohen, S.N., 1978. Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol.* 134, 1141–1156.
- Charusanti, P., Conrad, T.M., Knight, E.M., Venkataraman, K., Fong, N.L., Xie, B., Gao, Y., Palsson, B.Ø., 2010. Genetic basis of growth adaptation of *Escherichia coli* after deletion of *pgi*, a major metabolic gene. *PLoS Genet.* 6, e1001186. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001186>
- Chemler, J.A., Fowler, Z.L., McHugh, K.P., Koffas, M.A.G., 2010. Improving NADPH availability for natural product biosynthesis in *Escherichia coli* by metabolic engineering. *Metab. Eng.* 12, 96–104. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2009.07.003>
- Chen, Y., Ren, H., Liu, D., Zhao, T., Shi, X., Cheng, H., Zhao, N., Li, Z., Li, B., Niu, H., Zhuang, W., Xie, J., Chen, X., Wu, J., Ying, H., 2014. Enhancement of n-butanol production by in situ butanol removal using permeating-heating-gas stripping in acetone-butanol-ethanol fermentation. *Bioresour. Technol.* 164, 276–284. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.04.107>
- Cherepanov, P.P., Wackernagel, W., 1995. Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* 158, 9–14. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00193-A](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00193-A)
- Choi, G.W., Kang, H.W., Kim, Y.R., Chung, B.W., 2008. Ethanol production by *Zymomonas mobilis* CHZ2501 from industrial starch feedstocks. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 13, 765–771. <https://doi.org/10.1007/s12257-008-0184-3>
- Chowdhury, N.P., Klomann, K., Seubert, A., Buckel, W., 2016. Reduction of Flavodoxin by Electron Bifurcation and Sodium Ion-dependent Re-oxidation by NAD⁺ Catalysed by Ferredoxin:NAD⁺ Reductase (Rnf). *J. Biol. Chem.* jbc.M116.726299. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.726299>
- Clark, D.P., 1989. The fermentation pathways of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 63, 223–234. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(89\)90132-8](https://doi.org/10.1016/0378-1097(89)90132-8)
- Clarke, D.M., Bragg, P.D., 1985. Purification and properties of reconstitutively active nicotinamide

- nucleotide transhydrogenase of *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 149, 517–523.
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1985.tb08955.x>
- Cohen, P.T., Kaplan, N.O., 1970. Purification and properties of the pyridine nucleotide transhydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 245, 2825–2836.
- Crasnier-Mednansky, M., Park, M.C., Studley, W.K., Saier, M.H., 1997. Cra-mediated regulation of *Escherichia coli* adenylate cyclase. *Microbiology* 143, 785–792.
<https://doi.org/10.1099/00221287-143-3-785>
- Crépin, L., Barthe, M., Leray, F., Guillouet, S.E., 2018. Alka(e)ne synthesis in *Cupriavidus necator* boosted by the expression of endogenous and heterologous ferredoxin–ferredoxin reductase systems. *Biotechnol. Bioeng.* 115, 2576–2584. <https://doi.org/10.1002/bit.26805>
- Crépin, L., Lombard, E., Guillouet, S.E., 2016. Metabolic engineering of *Cupriavidus necator* for heterotrophic and autotrophic alka(e)ne production. *Metab. Eng.* 37, 92–101.
<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2016.05.002>
- Crown, S.B., Indurthi, D.C., Ahn, W.S., Choi, J., Papoutsakis, E.T., Antoniewicz, M.R., 2011. Resolving the TCA cycle and pentose-phosphate pathway of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824: Isotopomer analysis, in vitro activities and expression analysis. *Biotechnol. J.* 6, 300–305.
<https://doi.org/10.1002/biot.201000282>
- Cui, J., Olson, D.G., Lynd, L.R., 2019. Characterization of the *Clostridium thermocellum* AdhE, NfnAB, ferredoxin and Pfor proteins for their ability to support high titer ethanol production in *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*. *Metab. Eng.* 51, 32–42.
<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.09.006>
- Daley, D.O., Rapp, M., Granseth, E., Melén, K., Drew, D., Von Heijne, G., 2005. Biochemistry: Global topology analysis of the *Escherichia coli* inner membrane proteome. *Science* (80-.). 308, 1321–1323. <https://doi.org/10.1126/science.1109730>
- Datsenko, K.A., Wanner, B.L., 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 6640–6645.
<https://doi.org/10.1073/pnas.120163297>

- de Melo, A.G., Levesque, S., Moineau, S., 2018. Phages as friends and enemies in food processing. *Curr. Opin. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.09.004>
- Dellomonaco, C., Rivera, C., Campbell, P., Gonzalez, R., 2010. Engineered respiro-fermentative metabolism for the production of biofuels and biochemicals from fatty acid-rich feedstocks. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 5067–5078. <https://doi.org/10.1128/AEM.00046-10>
- Demmer, J.K., Huang, H., Wang, S., Demmer, U., Thauer, R.K., Ermler, U., 2015. Insights into Flavin-based Electron Bifurcation via the NADH-dependent Reduced Ferredoxin:NADP Oxidoreductase Structure. *J. Biol. Chem.* 290, 21985–95. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.656520>
- Demuez, M., Cournac, L., Guerrini, O., Soucaille, P., Girbal, L., 2007. Complete activity profile of *Clostridium acetobutylicum* [FeFe]-hydrogenase and kinetic parameters for endogenous redox partners. *FEMS Microbiol. Lett.* 275, 113–121. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00868.x>
- den Dunnen, J.T., Dagleish, R., Maglott, D.R., Hart, R.K., Greenblatt, M.S., McGowan-Jordan, J., Roux, A.F., Smith, T., Antonarakis, S.E., Taschner, P.E.M., 2016. HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. *Hum. Mutat.* 37, 564–569. <https://doi.org/10.1002/humu.22981>
- Dien, B.S., Cotta, M.A., Jeffries, T.W., 2003. Bacteria engineered for fuel ethanol production: Current status. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1444-y>
- Dien, B.S., Hespell, R.B., Wyckoff, H.A., Bothast, R.J., 1998. Fermentation of hexose and pentose sugars using a novel ethanologenic *Escherichia coli* strain. *Enzyme Microb. Technol.* 23, 366–371. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(98\)00064-7](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(98)00064-7)
- Dien, B.S., Iten, L.B., Bothast, R.J., 1999. Conversion of corn fiber to ethanol by recombinant *E. coli* strain FBR3. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 22, 575–581. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900628>
- Dien, B.S., Nichols, N.N., O'Bryan, P.J., Bothast, R.J., 2000. Development of new ethanologenic *Escherichia coli* strains for fermentation of lignocellulosic biomass, in: *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*. Humana Press, pp. 181–196. <https://doi.org/10.1385/ABAB:84-86:1-9:181>

- Dong, H., Zhao, C., Zhang, T., Zhu, H., Lin, Z., Tao, W., Zhang, Y., Li, Y., 2017. A systematically chromosomally engineered *Escherichia coli* efficiently produces butanol. *Metab. Eng.* 44, 284–292. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2017.10.014>
- Dong, Zhang, Z., Tang, X., Paterson, N.G., Dong, C., 2017. Structural and functional insights into the lipopolysaccharide ABC transporter LptB2FG. *Nat. Commun.* 8, 222. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00273-5>
- Doran, J.B., Cripe, J., Sutton, M., Foster, B., 2000. Fermentations of pectin-rich biomass with recombinant bacteria to produce fuel ethanol, in: *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 141–152. <https://doi.org/10.1385/ABAB:84-86:1-9:141>
- Duncombe, G.R., Frerman, F.E., 1976. Molecular and catalytic properties of the acetoacetyl-coenzyme A thiolase of *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* 176, 159–170. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(76\)90152-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(76)90152-1)
- Dürre, P., 2007. Biobutanol: An attractive biofuel. *Biotechnol. J.* <https://doi.org/10.1002/biot.200700168>
- Dusséaux, S., Croux, C., Soucaille, P., Meynial-Salles, I., 2013. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 for the high-yield production of a biofuel composed of an isopropanol/butanol/ethanol mixture. *Metab. Eng.* 18, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2013.03.003>
- Edwards, J.S., Palsson, B.O., 2000. The *Escherichia coli* MG1655 in silico metabolic genotype: Its definition, characteristics, and capabilities. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 5528–5533. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.10.5528>
- Escalante, A., Cervantes, A.S., Gosset, G., Bolívar, F., 2012. Current knowledge of the *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate-carbohydrate phosphotransferase system: Peculiarities of regulation and impact on growth and product formation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4101-5>
- Evans, M.C., Buchanan, B.B., Arnon, D.I., 1966. A new ferredoxin-dependent carbon reduction cycle in a photosynthetic bacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 55, 928–934.

<https://doi.org/10.1073/pnas.55.4.928>

Feist, A.M., Henry, C.S., Reed, J.L., Krummenacker, M., Joyce, A.R., Karp, P.D., Broadbelt, L.J., Hatzimanikatis, V., Palsson, B., 2007. A genome-scale metabolic reconstruction for *Escherichia coli* K-12 MG1655 that accounts for 1260 ORFs and thermodynamic information. *Mol. Syst. Biol.* 3, 121. <https://doi.org/10.1038/msb4100155>

Fenton, A.W., Paricharttanakul, N.M., Reinhart, G.D., 2003. Identification of substrate contact residues important for the allosteric regulation of phosphofructokinase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 42, 6453–6459. <https://doi.org/10.1021/bi034273t>

Fenton, A.W., Reinhart, G.D., 2002. Isolation of a single activating allosteric interaction in phosphofructokinase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 41, 13410–13416. <https://doi.org/10.1021/bi026450g>

Fisher, M.A., Boyarskiy, S., Yamada, M.R., Kong, N., Bauer, S., Tullman-Ercek, D., 2014. Enhancing tolerance to short-chain alcohols by engineering the *Escherichia coli* AcrB efflux pump to secrete the non-native substrate n-butanol. *ACS Synth. Biol.* 3, 30–40. <https://doi.org/10.1021/sb400065q>

Flores, N., Flores, S., Escalante, A., De Anda, R., Leal, L., Malpica, R., Georgellis, D., Gosset, G., Bolívar, F., 2005. Adaptation for fast growth on glucose by differential expression of central carbon metabolism and gal regulon genes in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system. *Metab. Eng.* 7, 70–87. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2004.10.002>

Fontecave, M., 2006. Iron-sulfur clusters: Ever-expanding roles. *Nat. Chem. Biol.* 2, 171–174. <https://doi.org/10.1038/nchembio0406-171>

Förster, A.H., Gescher, J., 2014. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of mixed-acid fermentation end products. *Front. Bioeng. Biotechnol.* <https://doi.org/10.3389/fbioe.2014.00016>

Fowler, Z.L., Gikandi, W.W., Koffas, M.A.G., 2009. Increased malonyl coenzyme A biosynthesis by tuning the *Escherichia coli* metabolic network and its application to flavanone production. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 5831–5839. <https://doi.org/10.1128/AEM.00270-09>

- French, C.E., Boonstra, B., Bufton, K.A., Bruce, N.C., 1997. Cloning, sequence, and properties of the soluble pyridine nucleotide transhydrogenase of *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.* 179, 2761–5.
- Fritz, M., Klyszejko, A.L., Morgner, N., Vonck, J., Brutschy, B., Muller, D.J., Meier, T., Müller, V., 2008. An intermediate step in the evolution of ATPases - a hybrid F₀-V₀ rotor in a bacterial Na⁺ F₁F₀ ATP synthase. *FEBS J.* 275, 1999–2007. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06354.x>
- Fuhrer, T., Sauer, U., 2009. Different biochemical mechanisms ensure network-wide balancing of reducing equivalents in microbial metabolism. *J. Bacteriol.* 191, 2112–2121. <https://doi.org/10.1128/JB.01523-08>
- Fuhrman, L.K., Wanken, A., Nickerson, K.W., Conway, T., 1998. Rapid accumulation of intracellular 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate in an Entner-Doudoroff aldolase mutant results in bacteriostasis. *FEMS Microbiol. Lett.* 159, 261–266. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(97\)00580-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(97)00580-6)
- Galbe, M., Zacchi, G., 2002. A review of the production of ethanol from softwood. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1058-9>
- Garcia, P.S., Gribaldo, S., Py, B., Barras, F., 2019. The SUF system: an ABC ATPase-dependent protein complex with a role in Fe–S cluster biogenesis. *Res. Microbiol.* <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2019.08.001>
- Gauquelin, C., Baffert, C., Richaud, P., Kamionka, E., Etienne, E., Guieysse, D., Girbal, L., Fourmond, V., André, I., Guigliarelli, B., Léger, C., Soucaille, P., Meynial-Salles, I., 2018. Roles of the F-domain in [FeFe] hydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1859, 69–77. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2017.08.010>
- Gheshlaghi, R., Scharer, J.M., Moo-Young, M., Chou, C.P., 2009. Metabolic pathways of clostridia for producing butanol. *Biotechnol. Adv.* <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.06.002>
- Giel, J.L., Rodionov, D., Liu, M., Blattner, F.R., Kiley, P.J., 2006. IscR-dependent gene expression links iron-sulphur cluster assembly to the control of O₂-regulated genes in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 60, 1058–1075. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05160.x>

- Girbal, L., Croux, C., Vasconcelos, I., Soucaille, P., 1995. Regulation of metabolic shifts in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *FEMS Microbiol. Rev.* 17, 287–297. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1995.tb00212.x>
- Girbal, L., Von Abendroth, G., Winkler, M., Benton, P.M.C., Meynial-Salles, I., Croux, C., Peters, J.W., Happe, T., Soucaille, P., 2005. Homologous and heterologous overexpression in *Clostridium acetobutylicum* and characterization of purified clostridial and algal Fe-only hydrogenases with high specific activities. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 2777–2781. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.5.2777-2781.2005>
- González-Pajuelo, M., Meynial-Salles, I., Mendes, F., Andrade, J.C., Vasconcelos, I., Soucaille, P., 2005. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* for the industrial production of 1,3-propanediol from glycerol. *Metab. Eng.* 7, 329–336. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2005.06.001>
- González-Peñas, H., Lu-Chau, T.A., Moreira, M.T., Lema, J.M., 2015. Assessment of morphological changes of *Clostridium acetobutylicum* by flow cytometry during acetone/butanol/ethanol extractive fermentation. *Biotechnol. Lett.* 37, 577–584. <https://doi.org/10.1007/s10529-014-1702-3>
- Gonzalez, R., Tao, H., Shanmugam, K.T., York, S.W., Ingram, L.O., 2002. Global gene Expression differences associated with changes in glycolytic flux and growth rate in *Escherichia coli* during the fermentation of glucose and xylose. *Biotechnol. Prog.* 18, 6–20. <https://doi.org/10.1021/bp010121i>
- Gray, C.T., Wimpenny, J.W., Mossman, M.R., 1966. Regulation of metabolism in facultative bacteria. II. Effects of aerobiosis, anaerobiosis and nutrition on the formation of Krebs cycle enzymes in *Escherichia coli*. *BBA - Gen. Subj.* [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(66\)90149-8](https://doi.org/10.1016/0304-4165(66)90149-8)
- Green, A.J., Munro, A.W., Cheesman, M.R., Reid, G.A., Von Wachenfeldt, C., Chapman, S.K., 2003. Expression, purification and characterisation of a *Bacillus subtilis* ferredoxin: A potential electron transfer donor to cytochrome P450. *Biol. J. Inorg. Biochem.* 93, 92–99. [https://doi.org/10.1016/S0162-0134\(02\)00456-7](https://doi.org/10.1016/S0162-0134(02)00456-7)
- Grohmann, K., Baldwin, E.A., Buslig, B.S., Ingram, L.O., 1994. Fermentation of galacturonic acid and other sugars in orange peel hydrolysates by the ethanologenic strain of *Escherichia coli*.

Biotechnol. Lett. 16, 281–286. <https://doi.org/10.1007/BF00134626>

Guerrini, O., Burlat, B., Léger, C., Guigliarelli, B., Soucaille, P., Girbal, L., 2008. Characterization of two 2[4Fe4S] ferredoxins from *Clostridium acetobutylicum*. *Curr. Microbiol.* 56, 261–267. <https://doi.org/10.1007/s00284-007-9072-x>

Gunsalus, R.P., 1992. Control of electron flow in *Escherichia coli*: Coordinated transcription of respiratory pathway genes. *J. Bacteriol.* <https://doi.org/10.1128/jb.174.22.7069-7074.1992>

Gusyatiner, M.M., Rostova, Y.G., Kiryukhin, M.Y., Romkina, A.Y., 2017. Method for producing an L-amino acid using a bacterium of the family Enterobacteriaceae having a disrupted putrescine degradation pathway. USPTO.

Hackmann, T.J., Firkins, J.L., 2015. Electron transport phosphorylation in rumen butyrovibrios: unprecedented ATP yield for glucose fermentation to butyrate. *Front. Microbiol.* 6, 622. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00622>

Hädicke, O., Klamt, S., 2017. EColiCore2: A reference network model of the central metabolism of *Escherichia coli* and relationships to its genome-scale parent model. *Sci. Rep.* 7, 39647. <https://doi.org/10.1038/srep39647>

Hanke, G., Mulo, P., 2012. Plant type ferredoxins and ferredoxin-dependent metabolism. <https://doi.org/10.1111/pce.12046>

Hasona, A., York, S.W., Yomano, L.P., Ingram, L.O., Shanmugam, K.T., 2002. Decreasing the level of ethyl acetate in ethanolic fermentation broths of *Escherichia coli* KO11 by expression of *Pseudomonas putida* estZ esterase. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2651–2659. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.6.2651-2659.2002>

Haverkorn van Rijsewijk, B.R.B., Kochanowski, K., Heinemann, M., Sauer, U., 2016. Distinct transcriptional regulation of the two *Escherichia coli* transhydrogenases PntAB and UdhA. *Microbiol. (United Kingdom)* 162, 1672–1679. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000346>

He, X., Xue, T., Ma, Y., Zhang, J., Wang, Z., Hong, J., Hui, L., Qiao, J., Song, H., Zhang, M., 2019. Identification of functional butanol-tolerant genes from *Escherichia coli* mutants derived from error-prone PCR-based whole-genome shuffling. *Biotechnol. Biofuels* 12, 73.

<https://doi.org/10.1186/s13068-019-1405-z>

Hess, V., Gallegos, R., Jones, J.A., Barquera, B., Malamy, M.H., Müller, V., 2016. Occurrence of ferredoxin:NAD + oxidoreductase activity and its ion specificity in several Gram-positive and Gram-negative bacteria. *PeerJ* 4, e1515. <https://doi.org/10.7717/peerj.1515>

Hess, V., Schuchmann, K., Müller, V., 2013. The ferredoxin:NAD⁺ oxidoreductase (Rnf) from the acetogen *Acetobacterium woodii* requires Na⁺ and is reversibly coupled to the membrane potential. *J. Biol. Chem.* 288, 31496–502. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.510255>

Hinks, J., Wang, Y., Matysik, A., Kraut, R., Kjelleberg, S., Mu, Y., Bazan, G.C., Wuertz, S., Seviour, T., 2015. Increased Microbial Butanol Tolerance by Exogenous Membrane Insertion Molecules. *ChemSusChem* 8, 3718–3726. <https://doi.org/10.1002/cssc.201500194>

Hinks, J., Wuertz, S., 2017. Method of improving solvent tolerance in microbes. US 2017/0226541 A1.

Hofnung, M., 1993. A short course in bacterial genetics and a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. *Biochimie*. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(93\)90118-C](https://doi.org/10.1016/0300-9084(93)90118-C)

Holms, W.H., 1986. The Central Metabolic Pathways of *Escherichia coli*: Relationship between Flux and Control at a Branch Point, Efficiency of Conversion to Biomass, and Excretion of Acetate, in: *Current Topics in Cellular Regulation*. Academic Press, pp. 69–105. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-152828-7.50004-4>

Hreha, T.N., Mezic, K.G., Herce, H.D., Duffy, E.B., Bourges, A., Pryshchep, S., Juarez, O., Barquera, B., 2015. Complete topology of the RNF complex from *Vibrio cholerae*. *Biochemistry* 54, 2443–2455. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00020>

Huang, H., Wang, S., Moll, J., Thauer, R.K., 2012. Electron bifurcation involved in the energy metabolism of the acetogenic bacterium *Moorella thermoacetica* growing on glucose or H₂ plus CO₂. *J. Bacteriol.* 194, 3689–3699. <https://doi.org/10.1128/JB.00385-12>

Huerta-Beristain, G., Utrilla, J., Hernández-Chávez, G., Bolívar, F., Gosset, G., Martínez, A., 2008. Specific ethanol production rate in ethanologenic *Escherichia coli* strain KO11 is limited by pyruvate decarboxylase. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 15, 55–64. <https://doi.org/10.1159/000111993>

- Imkamp, F., Biegel, E., Jayamani, E., Buckel, W., Müller, V., 2007. Dissection of the caffeate respiratory chain in the acetogen *Acetobacterium woodii*: identification of an Rnf-type NADH dehydrogenase as a potential coupling site. *J. Bacteriol.* 189, 8145–53. <https://doi.org/10.1128/JB.01017-07>
- Imkamp, F., Müller, V., 2002. Chemiosmotic energy conservation with Na(+) as the coupling ion during hydrogen-dependent caffeate reduction by *Acetobacterium woodii*. *J. Bacteriol.* 184, 1947–51. <https://doi.org/10.1128/JB.184.7.1947-1951.2002>
- Ingram, L.O., Conway, T., 1988. Expression of Different Levels of Ethanogenic Enzymes from *Zymomonas mobilis* in Recombinant Strains of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 397–404.
- Inui, M., Suda, M., Kimura, S., Yasuda, K., Suzuki, H., Toda, H., Yamamoto, S., Okino, S., Suzuki, N., Yukawa, H., 2008. Expression of *Clostridium acetobutylicum* butanol synthetic genes in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77, 1305–1316. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1257-5>
- Iuchi, S., Lin, E.C.C., 2014. Signal Transduction in the Arc System for Control of Operons Encoding Aerobic Respiratory Enzymes, in: *Two-Component Signal Transduction*. American Society of Microbiology, pp. 223–231. <https://doi.org/10.1128/9781555818319.ch13>
- Iuchi, S., Weiner, L., 1996. Cellular and molecular physiology of *Escherichia coli* in the adaptation to aerobic environments. *J. Biochem.* <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021519>
- Jan, J., Martinez, I., Wang, Y., Bennett, G.N., San, K.Y., 2013. Metabolic engineering and transhydrogenase effects on NADPH availability in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* 29, 1124–1130. <https://doi.org/10.1002/btpr.1765>
- Jarboe, L.R., 2011. YqhD: A broad-substrate range aldehyde reductase with various applications in production of biorenewable fuels and chemicals. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89, 249–257. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2912-9>
- Jarboe, L.R., Grabar, T.B., Yomano, L.P., Shanmugan, K.T., Ingram, L.O., 2007. Development of ethanogenic bacteria. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 108, 237–261. https://doi.org/10.1007/10_2007_068

- Jiang, Y., Chen, B., Duan, C., Sun, B., Yang, J., Yang, S., 2015. Multigene Editing in the *Escherichia coli* Genome via the CRISPR-Cas9 System. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 2506–2514. <https://doi.org/10.1128/aem.04023-14>
- Joe Shaw, A., Jenney, F.E., Adams, M.W.W., Lynd, L.R., 2008. End-product pathways in the xylose fermenting bacterium, *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*. *Enzyme Microb. Technol.* 42, 453–458. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2008.01.005>
- Johansson, C., Bergkvist, A., Fjellström, O., Rydström, J., Karlsson, B.G., 1999. NMR characterization of the NADP(H)-binding domain of *Escherichia coli* transhydrogenase: Sequential assignment and global fold. *FEBS Lett.* 458, 180–184. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)01156-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01156-4)
- Johansson, T., Oswald, C., Pedersen, A., Törnroth, S., Ökvist, M., Karlsson, B.G., Rydström, J., Kregel, U., 2005. X-ray structure of domain I of the proton-pumping membrane protein transhydrogenase from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 352, 299–312. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.07.022>
- Jones, D.T., Woods, D.R., 1986. Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiol. Rev.* 50, 484–524.
- Jouanneau, Y., Jeong, H.S., Hugo, N., Meyer, C., Willison, J.C., 1998. Overexpression in *Escherichia coli* of the *rnf* genes from *Rhodobacter capsulatus*--characterization of two membrane-bound iron-sulfur proteins. *Eur. J. Biochem.* 251, 54–64. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2510054.x>
- Jungermann, K., Rupprecht, E., Ohrloff, C., Thauer, R.K., Decker, K., 1971. Regulation of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide-ferredoxin reductase system in *Clostridium kluveri*. *J. Biol. Chem.* 246, 960–963.
- Jungermann, K., Thauer, R.K., Leimenstoll, G., Decker, K., 1973. Function of reduced pyridine nucleotide-ferredoxin oxidoreductases in saccharolytic *Clostridia*. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 305, 268–280. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(73\)90175-8](https://doi.org/10.1016/0005-2728(73)90175-8)
- Kallel-Mhiri, H., Miclo, A., 1993. Mechanism of ethyl acetate synthesis by *Kluyveromyces fragilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 111, 207–212. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1993.tb06387.x>
- Kamins, H., 1984. Ferredoxin:NADP⁺ Oxidoreductase 259, 8832–8839.

- Kang, Y., Weber, K.D., Qiu, Y., Kiley, P.J., Blattner, F.R., 2005. Genome-wide expression analysis indicates that FNR of *Escherichia coli* K-12 regulates a large number of genes of unknown function. *J. Bacteriol.* 187, 1135–1160. <https://doi.org/10.1128/JB.187.3.1135-1160.2005>
- Karplus, P.A., Bruns, C.M., 1994. Structure-function relations for ferredoxin reductase. *J. Bioenerg. Biomembr.* 26, 89–99. <https://doi.org/10.1007/BF00763221>
- Karplus, P.A., Faber, H.R., 2004. Structural Aspects of Plant Ferredoxin : NADP⁺ Oxidoreductases. *Photosynth. Res.* 81, 303–315. <https://doi.org/10.1023/B:PRES.0000036884.57303.2e>
- Kataoka, N., Tajima, T., Kato, J., Rachadech, W., Vangnai, A.S., 2011. Development of butanol-tolerant *Bacillus subtilis* strain GRSW2-B1 as a potential bioproduction host. *AMB Express* 1, 1–11. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-1-10>
- Kawai, S., Mori, S., Mukai, T., Hashimoto, W., Murata, K., 2001. Molecular characterization of *Escherichia coli* NAD kinase. *Eur. J. Biochem.* 268, 4359–4365. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.02358.x>
- Kean, K.M., Carpenter, R.A., Pandini, V., Zanetti, G., Hall, A.R., Faber, R., Aliverti, A., Karplus, P.A., 2017. High-resolution studies of hydride transfer in the ferredoxin:NADP⁺ reductase superfamily. *FEBS J.* 284, 3302–3319. <https://doi.org/10.1111/febs.14190>
- Khodayari, A., Maranas, C.D., 2016. A genome-scale *Escherichia coli* kinetic metabolic model k-ecoli457 satisfying flux data for multiple mutant strains. *Nat. Commun.* 7, 13806. <https://doi.org/10.1038/ncomms13806>
- Kiley, P.J., Beinert, H., 2003. The role of Fe-S proteins in sensing and regulation in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00039-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00039-0)
- Kim, Y., Ingram, L.O., Shanmugam, K.T., 2007. Construction of an *Escherichia coli* K-12 mutant for homoethanogenic fermentation of glucose or xylose without foreign genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 1766–71. <https://doi.org/10.1128/AEM.02456-06>
- Koebmann, B.J., Westerhoff, H. V, Snoep, J.L., Nilsson, D., Jensen, P.R., 2002. The glycolytic flux in *Escherichia coli* is controlled by the demand for ATP. *J. Bacteriol.* 184, 3909–3916. <https://doi.org/10.1128/JB.184.14.3909-3916.2002>

- Kojima, H., Ogawa, Y., Kawamura, K., Konosuke Sano, 2000. METHOD OF PRODUCING L-LYSINE BY FERMENTATION.
- Kolodrubetz, D., Schleif, R., 1981. Regulation of the l-arabinose transport operons in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 151, 215–227. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(81\)90512-X](https://doi.org/10.1016/0022-2836(81)90512-X)
- Komori, H., Seo, D., Sakurai, T., Higuchi, Y., 2010. Crystal structure analysis of *Bacillus subtilis* ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase and the structural basis for its substrate selectivity. *Protein Sci.* 19, 2279–2290. <https://doi.org/10.1002/pro.508>
- Köpke, M., Held, C., Hujer, S., Liesegang, H., Wiezer, A., Wollherr, A., Ehrenreich, A., Liebl, W., Gottschalk, G., Dürre, P., Köpke, M., Held, C., Hujer, S., Liesegang, H., Wiezer, A., Wollherr, A., Ehrenreich, A., Liebl, W., Gottschalk, G., Durre, P., 2010. *Clostridium ljungdahlii* represents a microbial production platform based on syngas. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 15305–15305. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011320107>
- Kozuleva, M., Goss, T., Twachtmann, M., Rudi, K., Trapka, J., Selinski, J., Ivanov, B., Garapati, P., Steinhoff, H.-J., Hase, T., Scheibe, R., Klare, J.P., Hanke, G.T., 2016. Ferredoxin:NADP(H) Oxidoreductase Abundance and Location Influences Redox Poise and Stress Tolerance. *Plant Physiol.* 172, 1480–1493. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01084>
- Krapp, A.R., Rodriguez, R.E., Poli, H.O., Paladini, D.H., Palatnik, J.F., Carrillo, N., 2002. The flavoenzyme ferredoxin (flavodoxin)-NADP(H) reductase modulates NADP(H) homeostasis during the soxRS response of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 184, 1474–1480. <https://doi.org/10.1128/JB.184.5.1474-1480.2002>
- Kremling, A., Geiselmann, J., Ropers, D., de Jong, H., 2015. Understanding carbon catabolite repression in *Escherichia coli* using quantitative models. *Trends Microbiol.* 23, 99–109. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.11.002>
- Krivoruchko, A., Serrano-Amatriain, C., Chen, Y., Siewers, V., Nielsen, J., 2013. Improving biobutanol production in engineered *Saccharomyces cerevisiae* by manipulation of acetyl-CoA metabolism. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 40, 1051–1056. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1296-0>
- Kuchenreuther, J.M., Grady-Smith, C.S., Bingham, A.S., George, S.J., Cramer, S.P., Swartz, J.R., 2010. High-Yield Expression of Heterologous [FeFe] Hydrogenases in *Escherichia coli*. *PLoS One* 5,

e15491. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015491>

- Kurusu, G., Kusunoki, M., Katoh, E., Yamazaki, T., Teshima, K., Onda, Y., Kimata-Arigo, Y., Hase, T., 2001. Structure of the electron transfer complex between ferredoxin and ferredoxin-NADP⁺ reductase. *Nat. Struct. Biol.* 8, 117–121. <https://doi.org/10.1038/84097>
- Kuyper, M., Toirkens, M.J., Diderich, J.A., Winkler, A.A., Van Dijken, J.P., Pronk, J.T., 2005. Evolutionary engineering of mixed-sugar utilization by a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain. *FEMS Yeast Res.* 5, 925–934. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2005.04.004>
- Lan, E.I., Liao, J.C., 2012. ATP drives direct photosynthetic production of 1-butanol in cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 6018–6023. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200074109>
- Lan, E.I., Ro, S.Y., Liao, J.C., 2013. Oxygen-tolerant coenzyme A-acylating aldehyde dehydrogenase facilitates efficient photosynthetic n-butanol biosynthesis in cyanobacteria. *Energy Environ. Sci.* 6, 2672–2681. <https://doi.org/10.1039/c3ee41405a>
- Lawford, H.G., Rousseau, J.D., 2003. The Effect of Glucose on High-Level Xylose Fermentations by Recombinant *Zymomonas* in Batch and Fed-Batch Fermentations. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 77, 235–250. <https://doi.org/10.1385/abab:77:1-3:235>
- Lee, C., Kim, I., Lee, J., Lee, K.-L., Min, B., Park, C., 2010. Transcriptional activation of the aldehyde reductase YqhD by YqhC and its implication in glyoxal metabolism of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 192, 4205–14. <https://doi.org/10.1128/JB.01127-09>
- Lee, J., Yun, H., Feist, A.M., Palsson, B., Lee, S.Y., 2008. Genome-scale reconstruction and in silico analysis of the *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 metabolic network. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80, 849–862. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1654-4>
- Lee, J.H., Yeo, W.S., Roe, J.H., 2003. Regulation of the *sufABCDSE* operon by Fur. *J. Microbiol.* 41, 109–114.
- Lee, J.Y., Yang, K.S., Jang, S.A., Sung, B.H., Kim, S.C., 2011. Engineering butanol-tolerance in *Escherichia coli* with artificial transcription factor libraries. *Biotechnol. Bioeng.* 108, 742–749. <https://doi.org/10.1002/bit.22989>

- Lee, K.C., Yeo, W.S., Roe, J.H., 2008. Oxidant-responsive induction of the *suf* operon, encoding a Fe-S assembly system, through Fur and IscR in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 190, 8244–8247. <https://doi.org/10.1128/JB.01161-08>
- Lee, S.Y., Jang, Y.S., Lee, J.Y., Lee, Joungmin, Park, J.H., Im, J.A., Eom, M.H., Lee, Julia, Lee, S.H., Song, H., Cho, J.H., Seung, D.Y., 2012. Enhanced butanol production obtained by reinforcing the direct butanol-forming route in *Clostridium acetobutylicum*. *MBio* 3, e00314-12. <https://doi.org/10.1128/mBio.00314-12>
- Leite, A.R., Guimarães, W.V., De Araújo, E.F., Silva, D.O., 2000. Fermentation of sweet whey by recombinant *Escherichia coli* KO11. *Brazilian J. Microbiol.* 31, 212–215. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822000000300011>
- Li, F., Hinderberger, J., Seedorf, H., Zhang, J., Buckel, W., Thauer, R.K., 2008. Coupled ferredoxin and crotonyl coenzyme A (CoA) reduction with NADH catalyzed by the butyryl-CoA dehydrogenase/Etf complex from *Clostridium kluyveri*. *J. Bacteriol.* 190, 843–850. <https://doi.org/10.1128/JB.01417-07>
- Li, X., Li, Z., Zheng, J., Shi, Z., Li, L., 2012. Yeast extract promotes phase shift of bio-butanol fermentation by *Clostridium acetobutylicum* ATCC824 using cassava as substrate. *Bioresour. Technol.* 125, 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.056>
- Lian, J., Si, T., Nair, N.U., Zhao, H., 2014. Design and construction of acetyl-CoA overproducing *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Metab. Eng.* 24, 139–149. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2014.05.010>
- Liang, J., Huang, H., Wang, S., 2019. Distribution, Evolution, Catalytic Mechanism, and Physiological Functions of the Flavin-Based Electron-Bifurcating NADH-Dependent Reduced Ferredoxin: NADP⁺ Oxidoreductase. *Front. Microbiol.* 10, 373. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00373>
- Lin, E.C.C., Iuchi, S., 2003. Regulation of Gene Expression in Fermentative and Respiratory Systems in *Escherichia coli* and Related Bacteria. *Annu. Rev. Genet.* 25, 361–387. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.25.120191.002045>
- Liu, J., Guo, T., Wang, D., Shen, X., Liu, D., Niu, H., Liang, L., Ying, H., 2016. Enhanced butanol production by increasing NADH and ATP levels in *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 by insertional

- inactivation of Cbei_4110. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 4985–96. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7299-9>
- Liu, S., Qureshi, N., 2009. How microbes tolerate ethanol and butanol. *N. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2009.06.984>
- Liu, S., Qureshi, N., Hughes, S.R., 2017. Progress and perspectives on improving butanol tolerance. *World J. Microbiol. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2220-y>
- Lo, J., Olson, D.G., Murphy, S.J.L., Tian, L., Hon, S., Lanahan, A., Guss, A.M., Lynd, L.R., 2017. Engineering electron metabolism to increase ethanol production in *Clostridium thermocellum*. *Metab. Eng.* 39, 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2016.10.018>
- Lo, J., Zheng, T., Olson, D.G., Ruppertsberger, N., Tripathi, S.A., Tian, L., Guss, A.M., Lynd, L.R., 2015. Deletion of nfnAB in *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* and Its Effect on Metabolism. *J. Bacteriol.* 197, 2920–9. <https://doi.org/10.1128/JB.00347-15>
- López Rivero, A.S., Rossi, M.A., Ceccarelli, E.A., Catalano-Dupuy, D.L., 2019. A bacterial [2[4Fe–4S] ferredoxin as redox partner of the plastidic-type ferredoxin-NADP + reductase from *Leptospira interrogans*. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1863, 651–660. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2019.01.004>
- Lovitt, R.W., Shen, G.J., Zeikus, J.G., 1988. Ethanol production by thermophilic bacteria: biochemical basis for ethanol and hydrogen tolerance in *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *J. Bacteriol.* 170, 2809–15. <https://doi.org/10.1128/jb.170.6.2809-2815.1988>
- Lu, F., Smith, P.R., Mehta, K., Swartz, J.R., 2015. Development of a synthetic pathway to convert glucose to hydrogen using cell free extracts. *Int. J. Hydrogen Energy* 40, 9113–9124. <https://doi.org/10.1016/J.IJHYDENE.2015.05.121>
- Lubner, C.E., Jennings, D.P., Mulder, D.W., Schut, G.J., Zadvornyy, O.A., Hoben, J.P., Tokmina-Lukaszewska, M., Berry, L., Nguyen, D.M., Lipscomb, G.L., Bothner, B., Jones, A.K., Miller, A.F., King, P.W., Adams, M.W.W., Peters, J.W., 2017. Mechanistic insights into energy conservation by flavin-based electron bifurcation. *Nat. Chem. Biol.* 13, 655–659. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2348>

- Luo, Q., Yang, X., Yu, S., Shi, H., Wang, K., Xiao, L., Zhu, G., Sun, C., Li, T., Li, D., Zhang, X., Zhou, M., Huang, Y., 2017. Structural basis for lipopolysaccharide extraction by ABC transporter LptB 2 FG. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 24, 469–474. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3399>
- Luria, S., Delbrück, M., 1943. Mutations of Bacteria from Virus Sensitivity to Virus Resistance. *Genetics* 28, 491–511. <https://doi.org/10.1038/nature10260>
- Ma, D., Alberti, M., Lynch, C., Nikaido, H., Hearst, J.E., 1996. The local repressor AcrR plays a modulating role in the regulation of *acrAB* genes of *Escherichia coli* by global stress signals. *Mol. Microbiol.* 19, 101–112. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.357881.x>
- Ma, K., Adams, M.W., 2001. Ferredoxin:NADP oxidoreductase from *Pyrococcus furiosus*. *Methods Enzymol.* 334, 40–45. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(01\)34456-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(01)34456-7)
- Macpherson, A.J.S., Jones-Mortimer, M.C., Henderson, P.J.F., 1981. Identification of the AraE transport protein of *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 196, 269–283. <https://doi.org/10.1042/bj1960269>
- Mainil, J., 2013. *Escherichia coli* virulence factors. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 152, 2–12. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.09.032>
- Mandai, T., Fujiwara, S., Imaoka, S., 2009. A novel electron transport system for thermostable CYP175A1 from *Thermus thermophilus* HB27. *FEBS J.* 276, 2416–2429. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.06974.x>
- Marani, P., Wagner, S., Baars, L., Genevaux, P., Gier, J. De, Nilsson, I., Casadio, R., Heijne, G. Von, 2006. New *Escherichia coli* outer membrane proteins identified through prediction and experimental verification. *Protein Sci.* 15, 884–889. <https://doi.org/10.1110/ps.051889506>
- Martinez, A., Grabar, T.B., Shanmugam, K.T., Yomano, L.P., York, S.W., Ingram, L.O., 2007. Low salt medium for lactate and ethanol production by recombinant *Escherichia coli* B. *Biotechnol. Lett.* 29, 397–404. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9252-y>
- Martinez, A., York, S.W., Yomano, L.P., Pineda, V.L., Davis, F.C., Shelton, J.C., Ingram, L.O., 1999. Biosynthetic Burden and Plasmid Burden Limit Expression of Chromosomally Integrated Heterologous Genes (*pdc*, *adhB*) in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* 15, 891–897. <https://doi.org/10.1021/bp990103p>

- Masters, M., Colloms, M.D., Oliver, I.R., He, L., MacNaughton, E.J., Charters, Y., 1993. The *pcnB* gene of *Escherichia coli*, which is required for *ColE1* copy number maintenance, is dispensable. *J. Bacteriol.* 175, 4405–4413. <https://doi.org/10.1128/jb.175.14.4405-4413.1993>
- Mayer, F., Müller, V., 2014. Adaptations of anaerobic archaea to life under extreme energy limitation. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 449–472. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12043>
- McCloskey, D., Palsson, B., Feist, A.M., 2013. Basic and applied uses of genome-scale metabolic network reconstructions of *Escherichia coli*. *Mol. Syst. Biol.* <https://doi.org/10.1038/msb.2013.18>
- Medina, M., Luquita, A., Tejero, J., Hermoso, J., Mayoral, T., Sanz-Aparicio, J., Grever, K., Gomez-Moreno, C., 2001. Probing the determinants of coenzyme specificity in ferredoxin-NADP⁺ reductase by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 276, 11902–12. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009287200>
- Membrillo-Hernandez, J., Echave, P., Cabisco, E., Tamarit, J., Ros, J., Lin, E.C., 2000. Evolution of the *adhE* gene product of *Escherichia coli* from a functional reductase to a dehydrogenase. Genetic and biochemical studies of the mutant proteins. *J. Biol. Chem.* 275, 33869–75. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005464200>
- Mettert, E.L., Kiley, P.J., 2014. Coordinate regulation of the Suf and Isc Fe-S cluster biogenesis pathways by IscR is essential for viability of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 196, 4315–4323. <https://doi.org/10.1128/JB.01975-14>
- Meuller, J., Zhang, J., Hou, C., Bragg, P.D., Rydström, J., 1997. Properties of a cysteine-free proton-pumping nicotinamide nucleotide transhydrogenase. *Biochem. J.* 324 (Pt 2, 681–7. <https://doi.org/10.1042/bj3240681>
- Meyer, H.-P., R., D., 2012. Microbial Expression Systems and Manufacturing from a Market and Economic Perspective. *Innov. Biotechnol.* 1–28. <https://doi.org/10.5772/29417>
- Meyer, J., 2008. Iron-sulfur protein folds, iron-sulfur chemistry, and evolution. *J. Biol. Inorg. Chem.* <https://doi.org/10.1007/s00775-007-0318-7>
- Meyer, J., 2001. Ferredoxins of the third kind. *FEBS Lett.* 509, 1–5. [284](https://doi.org/10.1016/S0014-</p></div><div data-bbox=)

- Meynial-Salles, I., Cervin, M.A., Soucaille, P., 2005a. New tool for metabolic pathway engineering in *Escherichia coli*: one-step method to modulate expression of chromosomal genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 2140–4. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.4.2140-2144.2005>
- Meynial-Salles, I., Gonzalez, B., Soucaille, P., 2005b. Evolved micro-organisms for the production of 1,2-propanediol. PCT/FR2005/000070.
- Meynial-Salles, I., Soucaille, P., 2012. Creation of new metabolic pathways or improvement of existing metabolic enzymes by in vivo evolution in *Escherichia coli*. *Methods Mol. Biol.* 834, 75–86. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-483-4_6
- Mock, J., Zheng, Y., Mueller, A.P., Ly, S., Tran, L., Segovia, S., Nagaraju, S., Köpke, M., Dürre, P., Thauer, R.K., 2015. Energy Conservation Associated with Ethanol Formation from H₂ and CO₂ in *Clostridium autoethanogenum* Involving Electron Bifurcation. *J. Bacteriol.* 197, 2965–80. <https://doi.org/10.1128/JB.00399-15>
- Moniruzzaman, M., Ingram, L.O., 1998. Ethanol production from dilute acid hydrolysate of rice hulls using genetically engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* 20, 943–947. <https://doi.org/10.1023/A:1005490501736>
- Mori, S., Kawai, S., Shi, F., Mikami, B., Murata, K., 2005. Molecular conversion of NAD kinase to NADH kinase through single amino acid residue substitution. *J. Biol. Chem.* 280, 24104–24112. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502518200>
- Mortenson, L.E., Valentine, R.C., Carnahan, J.E., 1962. An electron transport factor from *Clostridium pasteurianum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 7, 448–452. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(62\)90333-9](https://doi.org/10.1016/0006-291X(62)90333-9)
- Müller, J.J., Lapko, A., Bourenkov, G., Ruckpaul, K., Heinemann, U., 2001. Adrenodoxin reductase-adrenodoxin complex structure suggests electron transfer path in steroid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 276, 2786–9. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008501200>
- Müller, V., 2015. Microbial life at the thermodynamic limit: how much energy is required to sustain life? *Environ. Microbiol. Rep.* 7, 31–32. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12232>

- Müller, V., 2003. Energy conservation in acetogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6345–53. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.11.6345-6353.2003>
- Müller, V., Chowdhury, N.P., Basen, M., 2018. Electron Bifurcation: A Long-Hidden Energy-Coupling Mechanism. *Annu. Rev. Microbiol.* 72, 331–353. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090816-093440>
- Müller, V., Hess, V., 2017. The Minimum Biological Energy Quantum. *Front. Microbiol.* 8, 2019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02019>
- Müller, V., Imkamp, F., Biegel, E., Schmidt, S., Dilling, S., 2008. Discovery of a Ferredoxin:NAD⁺-Oxidoreductase (Rnf) in *Acetobacterium woodii*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1125, 137–146. <https://doi.org/10.1196/annals.1419.011>
- Mulo, P., Medina, M., 2017. Interaction and electron transfer between ferredoxin–NADP⁺ oxidoreductase and its partners: structural, functional, and physiological implications. *Photosynth. Res.* <https://doi.org/10.1007/s11120-017-0372-0>
- Munjal, N., Jawed, K., Wajid, S., Yazdani, S.S., 2015. A constitutive expression system for cellulase secretion in *Escherichia coli* and its use in bioethanol production. *PLoS One* 10, e0119917. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119917>
- Muraki, N., Seo, D., Shiba, T., Sakurai, T., Kurisu, G., 2010. Asymmetric dimeric structure of ferredoxin-NAD(P)⁺ oxidoreductase from the green sulfur bacterium *Chlorobaculum tepidum*: Implications for binding ferredoxin and NADP⁺. *J. Mol. Biol.* 401, 403–414. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.06.024>
- Murray, E.L., Conway, T., 2005. Multiple regulators control expression of the Entner-Doudoroff aldolase (Eda) of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 187, 991–1000. <https://doi.org/10.1128/JB.187.3.991-1000.2005>
- Mutter, A.C., Tyryshkin, A.M., Campbell, I.J., Poudel, S., Bennett, G.N., Silberg, J.J., Nanda, V., Falkowski, P.G., 2019. De novo design of symmetric ferredoxins that shuttle electrons in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116, 14557–14562. <https://doi.org/10.1073/pnas.1905643116>
- Nakamura, C.E., Whited, G.M., 2003. Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-

propanediol. Curr. Opin. Biotechnol. 14, 454–459.
<https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2003.08.005>

Nakayama, Y., Yasui, M., Sugahara, K., Hayashi, M., Unemoto, T., 2000. Covalently bound flavin in the NqrB and NqrC subunits of Na⁺-translocating NADH-quinone reductase from *Vibrio alginolyticus*. FEBS Lett. 474, 165–168. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01595-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01595-7)

Narita, S. ichiro, Tokuda, H., 2009. Biochemical characterization of an ABC transporter LptBFGC complex required for the outer membrane sorting of lipopolysaccharides. FEBS Lett. 583, 2160–2164. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.05.051>

Nascimento, A.S., Catalano-Dupuy, D.L., Bernardes, A., Neto, M., Santos, M., Ceccarelli, E.A., Polikarpov, I., 2007. Crystal structures of *Leptospira interrogans* FAD-containing ferredoxin-NADP⁺ reductase and its complex with NADP⁺. BMC Struct. Biol. 7, 69. <https://doi.org/10.1186/1472-6807-7-69>

Neale, A.D., Scopes, R.K., Kelly, J.M., 1988. Alcohol production from glucose and xylose using *Escherichia coli* containing *Zymomonas mobilis* genes. Appl. Microbiol. Biotechnol. 29, 162–167. <https://doi.org/10.1007/BF01982896>

Neidhardt, F.C., Kushner, S., 2017. *Escherichia coli*, in: Reference Module in Life Sciences. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.06393-7>

Nesbit, A.D., Fleischhacker, A.S., Teter, S.J., Kiley, P.J., 2012. ArcA and AppY antagonize IscR repression of hydrogenase-1 expression under anaerobic conditions, revealing a novel mode of O₂ regulation of gene expression in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 194, 6892–6899. <https://doi.org/10.1128/JB.01757-12>

Nguyen, D.M.N., Schut, G.J., Zadvornyy, O.A., Tokmina-Lukaszewska, M., Poudel, S., Lipscomb, G.L., Adams, L.A., Dinsmore, J.T., Nixon, W.J., Boyd, E.S., Bothner, B., Peters, J.W., Adams, M.W.W., 2017. Two functionally distinct NADP⁺-dependent ferredoxin oxidoreductases maintain the primary redox balance of *Pyrococcus furiosus*. J. Biol. Chem. 292, 14603–14616. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.794172>

Nguyen, N.P.T., Raynaud, C., Meynial-Salles, I., Soucaille, P., 2018. Reviving the Weizmann process for commercial n-butanol production. Nat. Commun. 9, 3682. <https://doi.org/10.1038/s41467-018->

- Nielsen, D.R., Leonard, E., Yoon, S.H., Tseng, H.C., Yuan, C., Prather, K.L.J., 2009. Engineering alternative butanol production platforms in heterologous bacteria. *Metab. Eng.* 11, 262–273. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2009.05.003>
- Nogués, I., Pérez-Dorado, I., Frago, S., Bittel, C., Mayhew, S.G., Gómez-Moreno, C., Hermoso, J.A., Medina, M., Cortez, N., Carrillo, N., 2005. The ferredoxin-NADP(H) reductase from *Rhodobacter capsulatus*: Molecular structure and catalytic mechanism. *Biochemistry* 44, 11730–11740. <https://doi.org/10.1021/bi0508183>
- Norman, R.O.J., Millat, T., Winzer, K., Minton, N.P., Hodgman, C., 2018. Progress towards platform chemical production using *Clostridium autoethanogenum*. *Biochem. Soc. Trans.* 46, 523–535. <https://doi.org/10.1042/bst20170259>
- Norrander, J., Kempe, T., Messing, J., 1983. Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. *Gene* 26, 101–106. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(83\)90040-9](https://doi.org/10.1016/0378-1119(83)90040-9)
- Ogawa, T., Mori, H., Tomita, M., Yoshino, M., 2007. Inhibitory effect of phosphoenolpyruvate on glycolytic enzymes in *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.* 158, 159–163. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2006.11.003>
- Ohta, K., Beall, D.S., Mejia, J.P., Shanmugam, K.T., Ingram, L.O., 1991a. Genetic improvement of *Escherichia coli* for ethanol production: chromosomal integration of *Zymomonas mobilis* genes encoding pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase II. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 893–900.
- Ohta, K., Beall, D.S., Mejia, J.P., Shanmugam, K.T., Ingram, L.O., 1991b. Metabolic engineering of *Klebsiella oxytoca* M5A1 for ethanol production from xylose and glucose. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2810–5.
- Ohtake, T., Pontrelli, S., Laviña, W.A., Liao, J.C., Putri, S.P., Fukusaki, E., 2017. Metabolomics-driven approach to solving a CoA imbalance for improved 1-butanol production in *Escherichia coli*. *Metab. Eng.* 41, 135–143. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2017.04.003>

- Orencio-Trejo, M., Utrilla, J., Fernández-Sandoval, M.T., Huerta-Beristain, G., Gosset, G., Martinez, A., 2010. Engineering the Escherichia coli fermentative metabolism. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* https://doi.org/10.1007/10_2009_61
- Orth, J.D., Conrad, T.M., Na, J., Lerman, J.A., Nam, H., Feist, A.M., Palsson, B., 2011. A comprehensive genome-scale reconstruction of Escherichia coli metabolism-2011. *Mol. Syst. Biol.* 7, 535. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.65>
- Ow, D.S.W., Lee, R.M.Y., Nissom, P.M., Philp, R., Oh, S.K.W., Yap, M.G.S., 2007. Inactivating FruR global regulator in plasmid-bearing Escherichia coli alters metabolic gene expression and improves growth rate. *J. Biotechnol.* 131, 261–269. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.07.508>
- Page, C.C., Moser, C.C., Chen, X., Dutton, P.L., 1999. Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation-reduction. *Nature* 402, 47–52. <https://doi.org/10.1038/46972>
- Park, J.H., Jang, Y.S., Lee, J.W., Lee, S.Y., 2011. Escherichia coli W as a new platform strain for the enhanced production of L-Valine by systems metabolic engineering. *Biotechnol. Bioeng.* 108, 1140–1147. <https://doi.org/10.1002/bit.23044>
- Peng, L., Arauzo-Bravo, M.J., Shimizu, K., 2004. Metabolic flux analysis for a ppc mutant Escherichia coli based on ¹³C-labelling experiments together with enzyme activity assays and intracellular metabolite measurements. *FEMS Microbiol. Lett.* 235, 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.04.003>
- Perrenoud, A., Sauer, U., 2005. Impact of global transcriptional regulation by ArcA, ArcB, Cra, Crp, Cya, Fnr, and Mlc on glucose catabolism in Escherichia coli. *J. Bacteriol.* 187, 3171–3179. <https://doi.org/10.1128/JB.187.9.3171-3179.2005>
- Petitdemange, H., Cherrier, C., Raval, G., Gay, R., 1976. Regulation of the NADH and NADPH-ferredoxin oxidoreductases in Clostridia of the butyric group. *BBA - Gen. Subj.* 421, 334–347. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(76\)90300-7](https://doi.org/10.1016/0304-4165(76)90300-7)
- Phue, J.N., Sang, J.L., Trinh, L., Shiloach, J., 2008. Modified Escherichia coli B (BL21), a superior producer of plasmid DNA compared with Escherichia coli K (DH5α). *Biotechnol. Bioeng.* 101, 831–836. <https://doi.org/10.1002/bit.21973>

- Poehlein, A., Schmidt, S., Kaster, A.-K., Goenrich, M., Vollmers, J., Thürmer, A., Bertsch, J., Schuchmann, K., Voigt, B., Hecker, M., Daniel, R., Thauer, R.K., Gottschalk, G., Müller, V., 2012. An ancient pathway combining carbon dioxide fixation with the generation and utilization of a sodium ion gradient for ATP synthesis. *PLoS One* 7, e33439. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033439>
- Pomposiello, P.J., Demple, B., 2000. Identification of SoxS-regulated genes in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J. Bacteriol.* 182, 23–9. <https://doi.org/10.1128/jb.182.1.23-29.2000>
- Ponce, E., Flores, N., Martinez, A., Valle, F., Bolivar, F., 1995. Cloning of the two pyruvate kinase isoenzyme structural genes from *Escherichia coli*: The relative roles of these enzymes in pyruvate biosynthesis. *J. Bacteriol.* 177, 5719–5722. <https://doi.org/10.1128/jb.177.19.5719-5722.1995>
- Pontrelli, S., Chiu, T.Y., Lan, E.I., Chen, F.Y.H., Chang, P., Liao, J.C., 2018a. *Escherichia coli* as a host for metabolic engineering. *Metab. Eng.* 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.04.008>
- Pontrelli, S., Fricke, R.C.B., Sakurai, S.S.M., Putri, S.P., Fitz-Gibbon, S., Chung, M., Wu, H.Y., Chen, Y.J., Pellegrini, M., Fukusaki, E., Liao, J.C., 2018b. Directed strain evolution restructures metabolism for 1-butanol production in minimal media. *Metab. Eng.* 49, 153–163. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.08.004>
- Prieto, A.A., Di, E., 1996. Molecular Characterization of the 4-Hydroxyphenylacetate Catabolic Pathway of. *Microbiology* 178, 111–120. <https://doi.org/10.1128/jb.178.1.111-120.1996>
- Qi, F., Thakker, C., Zhu, F., Pena, M., Yiu, K., Bennett, G.N., 2018. Improvement of butanol production in *Clostridium acetobutylicum* through enhancement of NAD (P) H availability. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 1–10. <https://doi.org/10.1007/s10295-018-2068-7>
- Qureshi, N., Blaschek, H.P., 2000. Recovery of butanol from fermentation broth by gas stripping. *Renew. Energy* 22, 557–564. [https://doi.org/10.1016/S0960-1481\(00\)00108-7](https://doi.org/10.1016/S0960-1481(00)00108-7)
- Qureshi, N., Meagher, M.M., Huang, J., Hutkins, R.W., 2001. Acetone butanol ethanol (ABE) recovery by pervaporation using silicalite-silicone composite membrane from fed-batch reactor of *Clostridium acetobutylicum*. *J. Memb. Sci.* 187, 93–102. [https://doi.org/10.1016/S0376-7388\(00\)00667-0](https://doi.org/10.1016/S0376-7388(00)00667-0)
- Ragsdale, S.W., Pierce, E., 2008. Acetogenesis and the Wood-Ljungdahl pathway of CO(2) fixation.

- Biochim. Biophys. Acta 1784, 1873–98. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.08.012>
- Rao, K., Chaudhari, V., Varanasi, S., Kim, D.S., 2007. Enhanced ethanol fermentation of brewery wastewater using the genetically modified strain *E. coli* KO11. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74, 50–60. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0643-8>
- Rapp, M., Granseth, E., Seppälä, S., von Heijne, G., 2006. Identification and evolution of dual-topology membrane proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 112–116. <https://doi.org/10.1038/nsmb1057>
- Ratushny, a V, Smirnova, O.G., Usuda, Y., Matsui, K., 2006. Regulation of the Pentose Phosphate Pathway in *Escherichia Coli* : Gene Network Reconstruction and Mathematical Modeling 40–44.
- Ravcheev, D.A., Thiele, I., 2016. Genomic analysis of the human gut microbiome suggests novel enzymes involved in quinone biosynthesis. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00128>
- Reed, J.L., Vo, T.D., Schilling, C.H., Palsson, B.O., 2003. An expanded genome-scale model of *Escherichia coli* K-12 (iJR904 GSM/GPR). *Genome Biol.* 4, R54. <https://doi.org/10.1186/gb-2003-4-9-r54>
- Reppe, W., Friederich, H., Lautenschlager, H., Laib, H., 1955. Production of acrylic acid or its derivatives using a cationic complex nickel catalyst.
- Reyes, L.H., Abdelaal, A.S., Kao, K.C., 2013. Genetic determinants for n-butanol tolerance in evolved *Escherichia coli* mutants: Cross adaptation and antagonistic pleiotropy between n-butanol and other stressors. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 5313–5320. <https://doi.org/10.1128/AEM.01703-13>
- Reyes, L.H., Almario, M.P., Winkler, J., Orozco, M.M., Kao, K.C., 2012. Visualizing evolution in real time to determine the molecular mechanisms of n-butanol tolerance in *Escherichia coli*. *Metab. Eng.* 14, 579–590. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2012.05.002>
- Roy, A., Kucukural, A., Zhang, Y., 2010. I-TASSER: A unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat. Protoc.* 5, 725–738. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.5>
- Rühl, J., Schmid, A., Blank, L.M., 2009. Selected *Pseudomonas putida* strains able to grow in the presence of high butanol concentrations. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 4653–4656.

<https://doi.org/10.1128/AEM.00225-09>

- Ruiz, N., Gronenberg, L.S., Kahne, D., Silhavy, T.J., 2008. Identification of two inner-membrane proteins required for the transport of lipopolysaccharide to the outer membrane of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 5537–42. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801196105>
- Rydzak, T., Garcia, D., Stevenson, D.M., Sladek, M., Klingeman, D.M., Holwerda, E.K., Amador-Noguez, D., Brown, S.D., Guss, A.M., 2017. Deletion of Type I glutamine synthetase deregulates nitrogen metabolism and increases ethanol production in *Clostridium thermocellum*. *Metab. Eng.* 41, 182–191. <https://doi.org/10.1016/j.YMBEN.2017.04.002>
- Rydzak, T., McQueen, P.D., Krokhn, O. V, Spicer, V., Ezzati, P., Dwivedi, R.C., Shamshurin, D., Levin, D.B., Wilkins, J.A., Sparling, R., 2012. Proteomic analysis of *Clostridium thermocellum* core metabolism: Relative protein expression profiles and growth phase-dependent changes in protein expression. *BMC Microbiol.* 12, 214. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-214>
- Sääf, A., Johansson, M., Wallin, E., von Heijne, G., 1999. Divergent evolution of membrane protein topology: the *Escherichia coli* RnfA and RnfE homologues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 8540–4.
- Sabra, W., Groeger, C., Zeng, A.P., 2016. Microbial cell factories for diol production, in: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 165–197. https://doi.org/10.1007/10_2015_330
- Saier, M.H., 2000. Vectorial metabolism and the evolution of transport systems. *J. Bacteriol.* 182, 5029–35. <https://doi.org/10.1128/jb.182.18.5029-5035.2000>
- Saier, M.H., Ramseier, T.M., 1996. The Catabolite Repressor/Activator (Cra) Protein of Enteric Bacteria. *J. Bacteriol.* 178, 3411–3417.
- Saini, M., Chiang, C.J., Li, S.Y., Chao, Y.P., 2016a. Production of biobutanol from cellulose hydrolysate by the *Escherichia coli* co-culture system. *FEMS Microbiol. Lett.* 363, fnw008. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw008>
- Saini, M., Li, S.Y., Wang, Z.W., Chiang, C.J., Chao, Y.P., 2016b. Systematic engineering of the central metabolism in *Escherichia coli* for effective production of n-butanol. *Biotechnol. Biofuels* 9, 69.

<https://doi.org/10.1186/s13068-016-0467-4>

Saini, M., Lin, L.J., Chiang, C.J., Chao, Y.P., 2017a. Synthetic Consortium of *Escherichia coli* for n-Butanol Production by Fermentation of the Glucose-Xylose Mixture. *J. Agric. Food Chem.* 65, 10040–10047. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04275>

Saini, M., Wang, Z.W., Chiang, C.J., Chao, Y.P., 2017b. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of n-butanol from crude glycerol. *Biotechnol. Biofuels* 10, 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0857-2>

Saint-Amans, S., Girbal, L., Andrade, J., Ahrens, K., Soucaille, P., 2001. Regulation of carbon and electron flow in *Clostridium butyricum* VPI 3266 grown on glucose-glycerol mixtures. *J. Bacteriol.* 183, 1748–1754. <https://doi.org/10.1128/JB.183.5.1748-1754.2001>

Salmon, K., Hung, S.P., Mekjian, K., Baldi, P., Hatfield, G.W., Gunsalus, R.P., 2003. Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12: The effects of oxygen availability and FNR. *J. Biol. Chem.* 278, 29837–29855. <https://doi.org/10.1074/jbc.M213060200>

Salmon, K.A., Hung, S.P., Steffen, N.R., Krupp, R., Baldi, P., Hatfield, G.W., Gunsalus, R.P., 2005. Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12: Effects of oxygen availability and ArcA. *J. Biol. Chem.* 280, 15084–15096. <https://doi.org/10.1074/jbc.M414030200>

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (2nd ed.). Cold Spring Harb. Lab. Press 1–3, 931–957. <https://doi.org/10.1096/fj.201600781R>

Santos, J.A., Pereira, P.J.B., Macedo-Ribeiro, S., 2015. What a difference a cluster makes: The multifaceted roles of IscR in gene regulation and DNA recognition. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2015.01.010>

Sarkar, D., Shimizu, K., 2008. Effect of *cra* gene knockout together with other genes knockouts on the improvement of substrate consumption rate in *Escherichia coli* under microaerobic condition. *Biochem. Eng. J.* 42, 224–228. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.06.019>

Sauer, U., Canonaco, F., Heri, S., Perrenoud, A., Fischer, E., 2004. The soluble and membrane-bound transhydrogenases UdhA and PntAB have divergent functions in NADPH metabolism of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 279, 6613–9. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311657200>

- Sawers, G., Böck, A., 1989. Novel transcriptional control of the pyruvate formate-lyase gene: upstream regulatory sequences and multiple promoters regulate anaerobic expression. *J. Bacteriol.* 171, 2485–2498. <https://doi.org/10.1128/jb.171.5.2485-2498.1989>
- Sawers, G., Böck, A., 1988. Anaerobic regulation of pyruvate formate-lyase from *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 170, 5330–5336. <https://doi.org/10.1128/jb.170.11.5330-5336.1988>
- Schiffels, J., Selmer, T., 2019. Combinatorial assembly of ferredoxin-linked modules in *Escherichia coli* yields a testing platform for Rnf-complexes. *Biotechnol. Bioeng.* bit.27079. <https://doi.org/10.1002/bit.27079>
- Schmidt, S., Biegel, E., Müller, V., 2009. The ins and outs of Na⁺ bioenergetics in *Acetobacterium woodii*. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1787, 691–696. <https://doi.org/10.1016/J.BBABIO.2008.12.015>
- Schuchmann, K., Müller, V., 2014. Autotrophy at the thermodynamic limit of life: A model for energy conservation in acetogenic bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* <https://doi.org/10.1038/nrmicro3365>
- Schulz, G.E., Schirmer, R.H., Sachsenheimer, W., Pai, E.F., 1978. The structure of the flavoenzyme glutathione reductase. *Nature* 273, 120–124. <https://doi.org/10.1038/273120a0>
- Schwartz, C.J., Giel, J.L., Patschkowski, T., Luther, C., Ruzicka, F.J., Beinert, H., Kiley, P.J., 2001. IscR, an Fe-S cluster-containing transcription factor, represses expression of *Escherichia coli* genes encoding Fe-S cluster assembly proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 14895–14900. <https://doi.org/10.1073/pnas.251550898>
- Sedlak, M., Ho, N.W.Y., 2004. Characterization of the effectiveness of hexose transporters for transporting xylose during glucose and xylose co-fermentation by a recombinant *Saccharomyces* yeast. *Yeast* 21, 671–684. <https://doi.org/10.1002/yea.1060>
- Senda, M., Kishigami, S., Kimura, S., Fukuda, M., Ishida, T., Senda, T., 2007. Molecular Mechanism of the Redox-dependent Interaction between NADH-dependent Ferredoxin Reductase and Rieske-type [2Fe-2S] Ferredoxin. *J. Mol. Biol.* 373, 382–400. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.08.002>
- Senda, T., Yamada, T., Sakurai, N., Kubota, M., Nishizaki, T., Masai, E., Fukuda, M., Mitsui, Y., 2000. Crystal structure of NADH-dependent ferredoxin reductase component in biphenyl dioxygenase.

- J. Mol. Biol. 304, 397–410. <https://doi.org/10.1006/JMBI.2000.4200>
- Seo, D., Asano, T., 2018. C-terminal residues of ferredoxin-NAD(P)⁺ reductase from *Chlorobaculum tepidum* are responsible for reaction dynamics in the hydride transfer and redox equilibria with NADP⁺/NADPH. *Photosynth. Res.* 136, 275–290. <https://doi.org/10.1007/s11120-017-0462-z>
- Seo, D., Kamino, K., Inoue, K., Sakurai, H., 2004. Purification and characterization of ferredoxin-NADP⁺ reductase encoded by *Bacillus subtilis* yumC. *Arch. Microbiol.* 182, 80–89. <https://doi.org/10.1007/s00203-004-0701-5>
- Seo, D., Kitashima, M., Sakurai, T., Inoue, K., 2016. Kinetics of NADP⁺/NADPH reduction–oxidation catalyzed by the ferredoxin-NAD(P)⁺ reductase from the green sulfur bacterium *Chlorobaculum tepidum*. *Photosynth. Res.* 130, 479–489. <https://doi.org/10.1007/s11120-016-0285-3>
- Seo, D., Muraki, N., Shiba, T., Sakurai, T., Kurisu, G., 2013. Crystal structure of ferredoxin-NAD(P)⁺ Reductase from the green sulfur bacterium *chlorobaculum tepidum*, in: *Advanced Topics in Science and Technology in China*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 189–192. https://doi.org/10.1007/978-3-642-32034-7_39
- Seo, D., Okabe, S., Yanase, M., Kataoka, K., Sakurai, T., 2009. Studies of interaction of homo-dimeric ferredoxin-NAD(P)⁺ oxidoreductases of *Bacillus subtilis* and *Rhodospseudomonas palustris*, that are closely related to thioredoxin reductases in amino acid sequence, with ferredoxins and pyridine nucleotide coenzymes. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1794, 594–601. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.12.014>
- Seo, D., Sakurai, H., 2002. Purification and characterization of ferredoxin-NAD(P)⁺ reductase from the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1597, 123–132. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(02\)00269-8](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(02)00269-8)
- Setlhaku, M., Heitmann, S., Górak, A., Wichmann, R., 2013. Investigation of gas stripping and pervaporation for improved feasibility of two-stage butanol production process. *Bioresour. Technol.* 136, 102–108. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.02.046>
- Sevrioukova, I.F., Li, H., Poulos, T.L., 2004. Crystal Structure of Putidaredoxin Reductase from *Pseudomonas putida*, the Final Structural Component of the Cytochrome P450cam Monooxygenase. *J. Mol. Biol.* 336, 889–902. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2003.12.067>

- Shalel-Levanon, S., San, K.Y., Bennett, G.N., 2005a. Effect of ArcA and FNR on the expression of genes related to the oxygen regulation and the glycolysis pathway in *Escherichia coli* under microaerobic growth conditions. *Biotechnol. Bioeng.* 92, 147–159. <https://doi.org/10.1002/bit.20583>
- Shalel-Levanon, S., San, K.Y., Bennett, G.N., 2005b. Effect of oxygen, and ArcA and FNR regulators on the expression of genes related to the electron transfer chain and the TCA cycle in *Escherichia coli*. *Metab. Eng.* 7, 364–374. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2005.07.001>
- Shen, C.R., Lan, E.I., Dekishima, Y., Baez, A., Cho, K.M., Liao, J.C., 2011. Driving Forces Enable High-Titer Anaerobic 1-Butanol Synthesis in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 2905–2915. <https://doi.org/10.1128/aem.03034-10>
- Shen, C.R., Liao, J.C., 2008. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol and 1-propanol production via the keto-acid pathways. *Metab. Eng.* 10, 312–320. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2008.08.001>
- Shi, S., Si, T., Liu, Z., Zhang, H., Ang, E.L., Zhao, H., 2016. Metabolic engineering of a synergistic pathway for n-butanol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci. Rep.* 6, 25675. <https://doi.org/10.1038/srep25675>
- Si, H.M., Zhang, F., Wu, A.N., Han, R.Z., Xu, G.C., Ni, Y., 2016. DNA microarray of global transcription factor mutant reveals membrane-related proteins involved in n-butanol tolerance in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Biofuels* 9, 114. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0527-9>
- Simpson, B.W., Owens, T.W., Orabella, M.J., Davis, R.M., May, J.M., Trauger, S.A., Kahne, D., Ruiz, N., 2016. Identification of residues in the lipopolysaccharide ABC transporter that coordinate ATPase activity with extractor function. *MBio* 7. <https://doi.org/10.1128/mBio.01729-16>
- Sivers, M. Von, Zacchi, G., Olsson, L., Hahn-Hügerdal, B., 1994. Cost Analysis of Ethanol Production from Willow Using Recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* 10, 555–560. <https://doi.org/10.1021/bp00029a017>
- Skråmo, S., Hersleth, H.-P., Hammerstad, M., Andersson, K.K., Røhr, Å.K., 2014. Cloning, expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a ferredoxin/ flavodoxin-NADP(H) oxidoreductase (Bc0385) from *Bacillus cereus*. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol.*

Commun. 70, 777–780. <https://doi.org/10.1107/s2053230x14008334>

Soucaille, P., Meynial-Salles, I., Foulquier, C., Rivière, A., 2015. New polypeptide having ferredoxin NADP+ reductase activity polynucleotide encoding the sale and uses thereof. Eur. Pat. Appl. EP15306225.

Soupene, E., Van Heeswijk, W.C., Plumbridge, J., Stewart, V., Bertenthal, D., Lee, H., Prasad, G., Paliy, O., Charernnoppakul, P., Kustu, S., 2003. Physiological studies of Escherichia coli strain MG1655: Growth defects and apparent cross-regulation of gene expression. J. Bacteriol. 185, 5611–5626. <https://doi.org/10.1128/JB.185.18.5611-5626.2003>

Sprenger, G.A., 1995. Genetics of pentose-phosphate pathway enzymes of Escherichia coli K-12. Arch. Microbiol. <https://doi.org/10.1007/BF02529978>

Steen, E.J., Chan, R., Prasad, N., Myers, S., Petzold, C.J., Redding, A., Ouellet, M., Keasling, J.D., 2008. Metabolic engineering of Saccharomyces cerevisiae for the production of n-butanol. Microb Cell Fact 7, 36. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-7-36>

Stewart, V., 1988. Nitrate respiration in relation to facultative metabolism in enterobacteria. Microbiol. Rev. 52, 190–232.

Studier, F.W., Moffatt, B.A., 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. J. Mol. Biol. 189, 113–130. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(86\)90385-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(86)90385-2)

Stutz, H.E., Reid, S.J., 2004. GltX from Clostridium saccharobutylicum NCP262: Glutamate synthase or oxidoreductase? Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr. 1676, 71–82. <https://doi.org/10.1016/j.bbaexp.2003.11.001>

Suharti, S., Wang, M., De Vries, S., Ferry, J.G., 2014. Characterization of the RnfB and RnfG subunits of the Rnf complex from the archaeon Methanosarcina acetivorans. PLoS One 9, 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097966>

Suzuki, T., Ueno, H., Mitome, N., Suzuki, J., Yoshida, M., 2002. F0 of ATP synthase is a rotary proton channel. Obligatory coupling of proton translocation with rotation of c-subunit ring. J. Biol. Chem. 277, 13281–13285. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111210200>

- Swidah, R., Wang, H., Reid, P.J., Ahmed, H.Z., Pisanelli, A.M., Persaud, K.C., Grant, C.M., Ashe, M.P., 2015. Butanol production in *S. cerevisiae* via a synthetic ABE pathway is enhanced by specific metabolic engineering and butanol resistance. *Biotechnol. Biofuels* 8, 97. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0281-4>
- Tchieu, J.H., Norris, V., Edwards, J.S., Saier, M.H., 2001. The complete phosphotransferase system in *Escherichia coli*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3, 329–46.
- Thauer, R.K., Rupprecht, E., Ohrloff, C., Jungermann, K., Decker, K., 1971. Regulation of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide-ferredoxin reductase system in *Clostridium kluyveri*. *J. Biol. Chem.* 246, 960–963.
- Thompson, R.A., Dahal, S., Garcia, S., Nookaew, I., Trinh, C.T., 2016. Exploring complex cellular phenotypes and model-guided strain design with a novel genome-scale metabolic model of *Clostridium thermocellum* DSM 1313 implementing an adjustable cellulosome. *Biotechnol. Biofuels* 9, 194. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0607-x>
- Tian, L., Lo, J., Shao, X., Zheng, T., Olson, D.G., Lynd, L.R., 2016. Ferredoxin:NAD⁺ Oxidoreductase of *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* and Its Role in Ethanol Formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 7134–7141. <https://doi.org/10.1128/aem.02130-16>
- Tian, L., Perot, S.J., Hon, S., Zhou, J., Liang, X., Bouvier, J.T., Guss, A.M., Olson, D.G., Lynd, L.R., 2017. Enhanced ethanol formation by *Clostridium thermocellum* via pyruvate decarboxylase. *Microb. Cell Fact.* 16, 171. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0783-9>
- Tomas, C.A., Welker, N.E., Papoutsakis, E.T., 2003. Overexpression of groESL in *Clostridium acetobutylicum* results in increased solvent production and tolerance, prolonged metabolism, and changes in the cell's transcriptional program. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4951–4965. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.4951-4965.2003>
- Trauchessec, M., Jaquinod, M., Bonvalot, A., Brun, V., Bruley, C., Ropers, D., De Jong, H., Garin, J., Bestel-Corre, G., Ferro, M., 2014. Mass spectrometry-based workflow for accurate quantification of *Escherichia coli* enzymes: How proteomics can play a key role in metabolic engineering. *Mol. Cell. Proteomics* 13, 954–968. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.032672>
- Tremblay, P.-L., Zhang, T., Dar, S.A., Leang, C., Lovley, D.R., 2012. The Rnf complex of *Clostridium*

- ljungdahlii is a proton-translocating ferredoxin:NAD⁺ oxidoreductase essential for autotrophic growth. *MBio* 4, e00406-12. <https://doi.org/10.1128/mBio.00406-12>
- Trindade, W.R. da S., Santos, R.G. dos, 2017. Review on the characteristics of butanol, its production and use as fuel in internal combustion engines. *Renew. Sustain. Energy Rev.* <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.11.213>
- Trinh, C.T., Unrean, P., Srienc, F., 2008. Minimal *Escherichia coli* cell for the most efficient production of ethanol from hexoses and pentoses. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 3634–43. <https://doi.org/10.1128/AEM.02708-07>
- Turner, P.C., Miller, E.N., Jarboe, L.R., Baggett, C.L., Shanmugam, K.T., Ingram, L.O., 2011. YqhC regulates transcription of the adjacent *Escherichia coli* genes yqhD and dkgA that are involved in furfural tolerance. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38, 431–439. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0787-5>
- Uden, G., Bongaerts, J., 1997. Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: Energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(97\)00034-0](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(97)00034-0)
- Uyttebroek, M., Van Hecke, W., Vanbroekhoven, K., 2015. Sustainability metrics of 1-butanol. *Catal. Today* 239, 7–10. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2013.10.094>
- Valentine, R.C., 1964. Bacterial Ferredoxin. *Bacteriol. Rev.* 28, 497–517.
- Vasconcelos, I., Girbal, L., Soucaille, P., 1994. Regulation of carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* grown in chemostat culture at neutral pH on mixtures of glucose and glycerol. *J. Bacteriol.* 176, 1443–1450. <https://doi.org/10.1128/jb.176.5.1443-1450.1994>
- Voordouw, G., Van Der Vies, S.M., Eweg, J.K., Veegfr, C., Van Breemen, J.F.L., Van Bruggen, E.F.J., 1980. Pyridine Nucleotide Transhydrogenase from *Azotobacter vinelandii* Improved Purification, Physical Properties and Subunit Arrangement in Purified Polymers. *Eur. J. Biochem.* 111, 347–355. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1980.tb04948.x>
- Wahlund, T.M., Tabita, F.R., 1997. The reductive tricarboxylic acid cycle of carbon dioxide assimilation: Initial studies and purification of ATP-citrate lyase from the green sulfur bacterium *Chlorobium*

- tepidum. *J. Bacteriol.* 179, 4859–4867. <https://doi.org/10.1128/jb.179.15.4859-4867.1997>
- Wan, J.T., Jarrett, J.T., 2002. Electron acceptor specificity of ferredoxin (flavodoxin):NADP+oxidoreductase from *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* 406, 116–126. [https://doi.org/10.1016/S0003-9861\(02\)00421-6](https://doi.org/10.1016/S0003-9861(02)00421-6)
- Wang, S., Huang, H., Moll, J., Thauer, R.K., 2010. NADP+ reduction with reduced ferredoxin and NADP+ reduction with NADH are coupled via an electron-bifurcating enzyme complex in *Clostridium kluyveri*. *J. Bacteriol.* 192, 5115–23. <https://doi.org/10.1128/JB.00612-10>
- Weissermel, K., Arpe, H.-J., 2003. *Industrial organic chemistry*. Wiley-VCH.
- Wen, R.C., Shen, C.R., 2016. Self-regulated 1-butanol production in *Escherichia coli* based on the endogenous fermentative control. *Biotechnol. Biofuels* 9, 267. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0680-1>
- Westphal, L., Wiechmann, A., Baker, J., Minton, N.P., Müller, V., 2018. The Rnf Complex Is an Energy-Coupled Transhydrogenase Essential To Reversibly Link Cellular NADH and Ferredoxin Pools in the Acetogen *Acetobacterium woodii*. *J. Bacteriol.* 200, e00357-18. <https://doi.org/10.1128/jb.00357-18>
- Wiegand, K., Winkler, M., Rumpel, S., Kannchen, D., Rexroth, S., Hase, T., Farès, C., Happe, T., Lubitz, W., Rögner, M., 2018. Rational redesign of the ferredoxin-NADP+-oxidoreductase/ferredoxin-interaction for photosynthesis-dependent H₂-production. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1859, 253–262. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2018.01.006>
- Wiehn, M., Staggs, K., Wang, Y., Nielsen, D.R., 2014. In situ butanol recovery from *Clostridium acetobutylicum* fermentations by expanded bed adsorption. *Biotechnol. Prog.* 30, 68–78. <https://doi.org/10.1002/btpr.1841>
- Wiesenborn, D.P., Rudolph, F.B., Papoutsakis, E.T., 1988. Thiolase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and Its Role in the Synthesis of Acids and Solvents. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2717–22.
- Wilbanks, B., Layton, D.S., Garcia, S., Trinh, C.T., 2018. A Prototype for Modular Cell Engineering. *ACS Synth. Biol.* 7, 187–199. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00269>

- Xu, M., Zhao, J., Yu, L., Tang, I.C., Xue, C., Yang, S.T., 2015. Engineering *Clostridium acetobutylicum* with a histidine kinase knockout for enhanced n-butanol tolerance and production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 1011–1022. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6249-7>
- Xue, C., Liu, F., Xu, M., Tang, I.C., Zhao, J., Bai, F., Yang, S.T., 2016a. Butanol production in acetone-butanol-ethanol fermentation with in situ product recovery by adsorption. *Bioresour. Technol.* 219, 158–168. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.111>
- Xue, C., Liu, F., Xu, M., Zhao, J., Chen, L., Ren, J., Bai, F., Yang, S.T., 2016b. A novel in situ gas stripping-pervaporation process integrated with acetone-butanol-ethanol fermentation for hyper n-butanol production. *Biotechnol. Bioeng.* 113, 120–129. <https://doi.org/10.1002/bit.25666>
- Xue, C., Yang, D., Du, G., Chen, L., Ren, J., Bai, F., 2015. Evaluation of hydrophobic micro-zeolite-mixed matrix membrane and integrated with acetone-butanol-ethanol fermentation for enhanced butanol production. *Biotechnol. Biofuels* 8, 105. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0288-x>
- Xue, C., Zhao, J., Chen, L., Yang, S.T., Bai, F., 2017. Recent advances and state-of-the-art strategies in strain and process engineering for biobutanol production by *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnol. Adv.* <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.01.007>
- Xue, C., Zhao, J., Liu, F., Lu, C., Yang, S.T., Bai, F.W., 2013. Two-stage in situ gas stripping for enhanced butanol fermentation and energy-saving product recovery. *Bioresour. Technol.* 135, 396–402. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.062>
- Xue, C., Zhao, J., Lu, C., Yang, S.T., Bai, F., Tang, I.C., 2012. High-titer n-butanol production by *Clostridium acetobutylicum* JB200 in fed-batch fermentation with intermittent gas stripping. *Biotechnol. Bioeng.* 109, 2746–2756. <https://doi.org/10.1002/bit.24563>
- Yamamoto, N., Nakahigashi, K., Nakamichi, T., Yoshino, M., Takai, Y., Touda, Y., Furubayashi, A., Kinjyo, S., Dose, H., Hasegawa, M., Datsenko, K.A., Nakayashiki, T., Tomita, M., Wanner, B.L., Mori, H., 2009. Update on the Keio collection of *Escherichia coli* single-gene deletion mutants. *Mol. Syst. Biol.* 5, 335. <https://doi.org/10.1038/msb.2009.92>
- Yan, Y., Liao, J.C., 2009. Engineering metabolic systems for production of advanced fuels. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36, 471–479. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0532-0>

- Yan, Z., Nam, Y.-W., Fushinobu, S., Wakagi, T., 2014. *Sulfolobus tokodaii* ST2133 is characterized as a thioredoxin reductase-like ferredoxin:NADP⁺ oxidoreductase. *Extremophiles* 18, 99–110. <https://doi.org/10.1007/s00792-013-0601-1>
- Yang, C., Hua, Q., Baba, T., Mori, H., Shimizu, K., 2003. Analysis of *Escherichia coli* anaerobic metabolism and its regulation mechanisms from the metabolic responses to altered dilution rates and phosphoenolpyruvate carboxykinase knockout. *Biotechnol. Bioeng.* 84, 129–144. <https://doi.org/10.1002/bit.10692>
- Yannone, S.M., Burgess, B.K., 1998. The seven-iron Fdi from *Azotobacter vinelandii* regulates the expression of NADPH: Ferredoxin reductase via an oxidative stress response. *J. Biol. Inorg. Chem.* 3, 253–258. <https://doi.org/10.1007/s007750050229>
- Yim, H., Haselbeck, R., Niu, W., Pujol-Baxley, C., Burgard, A., Boldt, J., Khandurina, J., Trawick, J.D., Osterhout, R.E., Stephen, R., Estadilla, J., Teisan, S., Schreyer, H.B., Andrae, S., Yang, T.H., Lee, S.Y., Burk, M.J., Van Dien, S., 2011. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for direct production of 1,4-butanediol. *Nat. Chem. Biol.* 7, 445–452. <https://doi.org/10.1038/nchembio.580>
- Yomano, L.P., York, S.W., Ingram, L.O., 1998. Isolation and characterization of ethanol-tolerant mutants of *Escherichia coli* KO11 for fuel ethanol production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 20, 132–138. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900496>
- Yomano, L.P., York, S.W., Zhou, S., Shanmugam, K.T., Ingram, L.O., 2008. Re-engineering *Escherichia coli* for ethanol production. *Biotechnol. Lett.* 30, 2097–2103. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9821-3>
- Yoo, M., Bestel-Corre, G., Croux, C., Riviere, A., Meynial-Salles, I., Soucaille, P., 2015. A quantitative system-scale characterization of the metabolism of *Clostridium acetobutylicum*. *MBio* 6, e01808-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.01808-15>
- Yoo, M., Croux, C., Meynial-Salles, I., Soucaille, P., 2017. Metabolic flexibility of a butyrate pathway mutant of *Clostridium acetobutylicum*. *Metab. Eng.* 40, 138–147. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2017.01.011>
- Yoo, M., Croux, C., Meynial-Salles, I., Soucaille, P., 2016. Elucidation of the roles of adhE1 and adhE2 in the primary metabolism of *Clostridium acetobutylicum* by combining in-frame gene deletion and

- a quantitative system-scale approach. *Biotechnol. Biofuels* 9, 92. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0507-0>
- Yoo, M., Nguyen, N.P.T., Soucaille, P., 2019. Trends in Systems Biology for the Analysis and Engineering of *Clostridium acetobutylicum* Metabolism. *Trends Microbiol.* <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.09.003>
- Zaldivar, J., Martinez, A., Ingram, L.O., 1999. Effect of selected aldehydes on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 65, 24–33. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19991005\)65:1<24::AID-BIT4>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19991005)65:1<24::AID-BIT4>3.0.CO;2-2)
- Zerez, C.R., Moul, D.E., Gomez, E.G., Lopez, V.M., Andreoli, A.J., 1987. Negative modulation of *Escherichia coli* NAD kinase by NADPH and NADH. *J. Bacteriol.* 169, 184–188. <https://doi.org/10.1128/jb.169.1.184-188.1987>
- Zhang, H., Cheng, Q.X., Liu, A.M., Zhao, G.P., Wang, J., 2017. A novel and efficient method for bacteria genome editing employing both CRISPR/Cas9 and an antibiotic resistance cassette. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00812>
- Zhang, L., King, E., Luo, R., Li, H., 2018. Development of a High-Throughput, in Vivo Selection Platform for NADPH-Dependent Reactions Based on Redox Balance Principles. *ACS Synth. Biol.* 7, 1715–1721. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.8b00179>
- Zhang, R., Andersson, C.E., Savchenko, A., Skarina, T., Evdokimova, E., Beasley, S., Arrowsmith, C.H., Edwards, A.M., Joachimiak, A., Mowbray, S.L., 2003. Structure of *Escherichia coli* Ribose-5-Phosphate Isomerase: A Ubiquitous Enzyme of the Pentose Phosphate Pathway and the Calvin Cycle. *Structure* 11, 31–42. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(02\)00933-4](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(02)00933-4)
- Zhao, C., Lin, Z., Dong, H., Zhang, Y., Li, Y., 2017. Reexamination of the Physiological Role of PykA in *Escherichia coli* Revealed that It Negatively Regulates the Intracellular ATP Levels under Anaerobic Conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 83. <https://doi.org/10.1128/aem.00316-17>
- Zhao, C., Zhang, Y., Li, Y., 2019. Production of fuels and chemicals from renewable resources using engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol. Adv.* <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.06.001>
- Zhao, J., Baba, T., Mori, H., Shimizu, K., 2004. Effect of *zwf* gene knockout on the metabolism of

Escherichia coli grown on glucose or acetate. *Metab. Eng.* 6, 164–174.
<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2004.02.004>

Zhou, J., Olson, D.G., Lanahan, A.A., Tian, L., Murphy, S.J.L., Lo, J., Lynd, L.R., 2015. Physiological roles of pyruvate ferredoxin oxidoreductase and pyruvate formate-lyase in *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* JW/SL-YS485. *Biotechnol. Biofuels* 8, 138. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0304-1>

Zhou, Z., Wang, C., Chen, Y., Zhang, K., Xu, H., Cai, H., Chen, Z., 2015. Increasing available NADH supply during succinic acid production by *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol. Prog.* 31, 12–19. <https://doi.org/10.1002/btpr.1998>

Ziegler, G.A., Vornrhein, C., Hanukoglu, I., Schulz, G.E., 1999. The Structure of Adrenodoxin Reductase of Mitochondrial P 450 Systems: Electron Transfer for Steroid Biosynthesis. *J. Mol. Biol.* 289, 981–990. <https://doi.org/10.1006/JMBI.1999.2807>

Liste des Figures

Figure 1 : Procédés pétrochimiques pour la production de 1-butanol	14
Figure 2 : Procédé de Weizmann pour la production d'acétone, butanol et éthanol par voie fermentaire	16
Figure 3 : Métabolisme centrale d' <i>E. coli</i>	25
Figure 4 : Mécanisme de transport du glucose via le système phosphotransférase (PTS) chez <i>E. coli</i>	27
Figure 5 : Représentation schématique des voies de biosynthèse associées aux principales voies métaboliques.....	28
Figure 6 : La voie d'Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), également appelée glycolyse chez <i>E. coli</i>	29
Figure 7 : Le cycle de Krebs chez <i>E. coli</i>	31
Figure 8 : La voie des pentoses phosphates chez <i>E. coli</i>	32
Figure 9 : La voie d'Entner-Doudoroff chez <i>E. coli</i> couplée au catabolisme des sucres acides	35
Figure 10 : Métabolisme central du carbone chez <i>E. coli</i> sauvage en anaérobiose.....	38
Figure 11 : Régulation de la biosynthèse des centres Fe-S chez <i>E. coli</i>	39
Figure 12: Schéma de la transhydrogénase PntAB.....	41
Figure 13 : Alignement des séquences protéiques entre les transhydrogénases soluble STH de <i>Azobacter vinelandii</i> (AZOVI), <i>Pseudomonas fluorescens</i> (PSEFL) et <i>E. coli</i> (ECOLI)	44
Figure 14 : Photomicrographie électronique des protéines Sth de (a) <i>A. vinelandii</i> , (b) <i>P. fluorescens</i> , (c) <i>E. coli</i> , (d) chimère avec C-terminal de <i>P. fluorescens</i> et (e) chimère avec C-terminal d' <i>E. coli</i>	45
Figure 15 : Photomicrographie électronique et spectre de diffraction optique de la transhydrogénase Sth d' <i>A. vinelandii</i>	46
Figure 16 : Les sucres peuvent être convertis en une large variété de produits métaboliques grâce à la souplesse du métabolisme d' <i>E. coli</i>	49
Figure 17 : Conversion des hexoses et des pentoses en éthanol par <i>E. coli</i> exprimant la voie métabolique pour la production d'éthanol de <i>Zymomonas mobilis</i>	56
Figure 18 : Généalogie des souches d' <i>E. coli</i> exprimant l'opéron PET de <i>Z. mobilis</i>	58
Figure 19 : Métabolisme central de <i>C. acetobutylicum</i>	62
Figure 20 : Ingénierie métabolique de <i>Clostridium acetobutylicum</i> pour la production de n-butanol	64

Figure 21 : Ingénierie métabolique d' <i>E. coli</i> pour la production de n-butanol générant une force motrice couplant la croissance de la souche en anaérobiose à la production en n-butanol	70
Figure 22 : Suivi des cultures de la souche JCL299.....	71
Figure 23 : Construction d'une souche d' <i>E. coli</i> pour la production de n-butanol sans plasmide.....	73
Figure 24 : Ingénierie métabolique réalisée dans la souche d' <i>E. coli</i> But-8 pour la production de n-butanol.	77
Figure 25 : Voies métabolique pour la production de n-butanol chez <i>E. coli</i> en utilisant la voie CoA-dépendante de <i>C. acetobutylicum</i>	79
Figure 26 : Illustration schématique de la production de butanol-propanol via les voies de biosynthèse de la thréonine et de la norvaline chez <i>E. coli</i>	81
Figure 1: Structural representation of the [4Fe-4S] and [2Fe-2S] ferredoxin families.....	89
Figure 2: Example of a ferredoxin node in anaerobic metabolism with three alternative mechanisms to reoxidize reduced ferredoxin and maintain the redox balance	92
Figure 3: Three-dimensional structure of plastidic-type, bacterial-type, AdR-like, ONFR-like and TrxR-like FNORs.....	96
Figure 4: Schematic representation of the electron-bifurcation mechanism in the NfnAB complex.	106
Figure 5: Representation of the ethanol-acetate fermentation of <i>C. kluyveri</i> at low ethanol and acetate concentrations.....	108
Figure 6: Metabolism of <i>M. thermoacetica</i> , producing of 3 moles of acetic acids from 1 mole of glucose using the transhydrogenase activity of the NfnAB complex.	109
Figure 7: Representation of the Rnf complex coupled to ATP synthase.....	111
Figure 8: Representation of the oxidation of reduced ferredoxin (Fd _{red}) to NAD ⁺ by the Rnf complex of <i>A. woodii</i>	113
Figure 9: Production of acetate from H ₂ +CO ₂ in <i>A. woodii</i>	117
Figure 27 : Déroulement des opérations lors du séquençage Ion torrent (ThermoFisher)	158
Figure 1: Ferredoxin dependent pathway for ethanol production under strict anaerobic conditions in the growth based selection platform ST034 with an unbalanced redox state in anaerobic conditions	166

Figure 2: Rational engineering of <i>E. coli</i> 's central metabolism for the construction of a growth-based selection platform for FNOR.....	176
Figure 3: Redox balance of the ethanologenic strain with a functional FNOR	177
Figure 4: Expression of FNOR modules in the chassis strain ST034 cultivated in anaerobic conditions in medium supplemented with yeast extracts and nitrate.....	177
Figure 5: Western blot analysis of the native Rnf complex from <i>C. ljungdahlii</i> overexpressed in <i>E. coli</i>	179
Figure 6: Schematic procedure for the adaptation of strains for growth in glucose mineral medium without supplementation of yeast extracts and nitrate.	180
Figure 7: Evolution of metabolic pathway enhanced growth and ethanol production.....	181
Figure 8: SDS-PAGE gel of the purified native UdhA.....	185
Figure 9: NADPH inhibition on the native and mutant UdhA	187
Figure 10: 3D models of UdhA	188
Figure 28 : Représentation du métabolisme anaérobie de la souche <i>E. coli</i> ST001, réorienté vers la production de n-butanol, utilisant la voie complète CoA-dépendante de <i>C. acetobutylicum</i>	198
Figure 29 : Bilan redox de la production de n-butanol dans la souche ST001	199
Figure 30 : Cinétique de la croissance de la souche ST001	200
Figure 31 : Analyse de la répartition du carbone lors de la culture de la souche ST001	201
Figure 32 : Région génomique délétée (3,625,558-3,720,629) au cours de la construction de la souche	203
Figure 33 : Validation par PCR de la perte de la région chromosomique (3,625,558-3,720,629) dans la souche ST001.....	204
Figure 34 : Comparaison de l'inhibition de l'activité transhydrogénase entre l'enzyme native et le mutant R455L en fonction de la concentration en NADPH.....	206
Figure 35: Modèle 3D de la transhydrogénase UdhA	207
Figure 36 : Cinétique de production des produits de fermentation formés lors de la première culture en continu de la souche Butanol ST001	209
Figure 37 : Cinétiques de la consommation du glucose et de croissance lors de la première culture en continu de la souche Butanol ST001	210

Figure 38 : Cinétique des produits de fermentation formés lors de la seconde culture en continu de la souche Butanol.....	211
Figure 39 : Cinétiques de la consommation du glucose et de croissance lors de la seconde culture en continu de la souche Butanol.....	212
Figure 40 : Organisation des gènes <i>yqhC</i> , <i>yqhD</i> et <i>dkgA</i> chez <i>E. coli</i>	216
Figure 41 : Représentation schématique du transporteur LptABCDEFG impliqué dans le transport des lipopolysaccharides de la membrane interne vers la membrane externe.....	218
Figure 42 : Interaction des sous-unités LptFG avec LptB	219
Figure 43 : Structure du transporteur LptB ₂ FG	220
Figure 44 : Schéma de la procédure d'évolution adaptative de la souche Butanol pour obtenir une culture en anaérobiose en absence de supplémentation en extrait de levure et nitrate	223
Figure 45 : Suivi de l'évolution <i>in-vivo</i> de la culture continue de la souche ST023-5 en anaérobiose dans le milieu chimiquement défini sans supplémentation en extrait de levure et sans nitrate avec un pH régulé à 6,0.....	229
Figure 46: : Suivi de la seconde évolution <i>in-vivo</i> de la culture continue à partir de la population ST025 en anaérobiose dans le milieu chimiquement défini à base de glucose sans supplémentation	231
Figure 47 : Validation par PCR des loci <i>pykA</i> , <i>ldhA</i> et <i>adhE</i> dans la souche ST100	233
Figure 48 : Cinétiques de croissance et des produits de fermentation de la souche ST100 lors de la culture discontinue en anaérobiose dans le milieu chimiquement défini à base de glucose supplémenté avec 4g/L d'extrait de levure et 5mM de nitrate.	234
Figure 49 : Validation par PCR des loci <i>zwf</i> , <i>ldhA</i> et <i>adhE</i> dans la souche ST101.....	236
Figure 50 : Cinétique de croissance et de production des métabolites lors de la culture de la souche ST101.	236
Figure 51 : Schéma de l'évolution adaptative de la souche ST101 pour permettre la croissance et la production de butanol en anaérobiose dans le milieu chimiquement défini sans supplémentation en extrait de levure et en nitrate	238
Figure 52 : Cinétiques de croissance et de production des métabolites lors de l'adaptation de la souche ST101 pour la culture en anaérobiose dans le milieu chimiquement défini à base de glucose sans supplémentation en extrait de levure et sans nitrate.....	239

Figure 53 : Cinétiques de croissance et de production des métabolites lors de la culture discontinue de la souche ST115 en anaérobiose dans le milieu chimiquement défini à base de glucose sans supplémentation en extrait de levure et sans nitrate.....	241
Figure 54 : Validation par PCR des loci dans 3 clones de la souche ST143.	242
Figure 55 : Cinétique de croissance et de production des métabolites lors de la culture initiale de la souche Butanol $\Delta zwf \Delta mdh$ (ST143) en anaérobiose dans le milieu chimiquement défini à base de glucose supplémenté avec de l'extrait de levure et des nitrate	243
Figure 56 : Schéma de l'évolution adaptative de la souche ST143 pour améliorer la croissance et la production de butanol en anaérobiose dans le milieu chimiquement défini supplémenté avec 4 g/L d'extrait de levure et 5mM de nitrate.....	243
Figure 57 : Représentation schématique du métabolisme de la souche modifiée d' <i>E. coli</i> capable de convertir le glucose en n-butanol en utilisant la voie CoA-dépendante de <i>C. acetobutylicum</i> et la ferrédoxine NAD(P) ⁺ oxydoréductase de <i>C. tepidum</i>	249
Figure 58 : Validation par PCR de la présence du PL025 dans la souche ST063 et des loci <i>atoB</i> et <i>adhE</i>	250
Figure 59 : Validation par PCR de la présence du PL053 dans la souche ST191 pour les clones 1 à 5	250

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Comparaison entre l'essence et les biocarburants	17
Tableau 2 : Prix de l'éthanol et du n-butanol sur le marché international	17
Tableau 3 : Analyse transcriptomique sur micropuces à ADN pour identifier les gènes régulés par le régulateur global Fnr lors du passage d'une croissance aérobie à une croissance anaérobie	37
Tableau 4 : Opérons régulés par IscR chez <i>E. coli</i>	40
Tableau 5 : Paramètres cinétiques de la transhydrogénase sauvage avec un His-Tag en C-terminal ..	43
Tableau 6 : Force et faiblesse des GEMs en fonction de leurs applications	52
Tableau 7 : Biomasse utilisée par la souche <i>E. coli</i> KO11 pour la production d'éthanol	57
Tableau 8 : Comparaison entre différents organismes pour la production d'éthanol en utilisant le xylose comme source de carbone.....	60
Tableau 9 : Bilan des études sur le couplage de la fermentation de <i>C. acetobutylicum</i> avec un procédé de récupération du n-butanol.....	66
Tableau 10 : Production hétérologue de n-butanol en fonction de l'hôte	67
Tableau 11 : Bilan des souches d' <i>E. coli</i> produisant du n-butanol.....	83
Tableau 12 : Gènes identifiés comme impliqués dans la tolérance au butanol lors de la croissance d' <i>E. coli</i> en présence de butanol exogène.....	86
Table 1: Classification of [2Fe-2S] and [4Fe-4S] ferredoxins according to (Atkinson <i>et al.</i> , 2016).	90
Table 2: Structural/phylogenetic classification of ferredoxin-NAD(P) ⁺ oxidoreductases adapted and updated from (Aliverti <i>et al.</i> , 2008) associated to their main characteristics.	95
Tableau 13 : Noms et descriptions des souches <i>E. coli</i> modifiées	127
Tableau 14 : Nom et description des plasmides utilisés pour transformer les souches <i>E. coli</i>	129
Tableau 15 : Séquences des RBS optimisés utilisés dans cette étude	130
Tableau 16 : Noms et séquences des amorces de PCR utilisées dans cette étude.....	135
Tableau 17 : Composition du milieu LB agar.....	136
Tableau 18 : Composition du milieu MMcoli agar	136
Tableau 19 : Composition des milieux LB, SOC et TB.....	137
Tableau 20 : Composition du milieu MAC à pH 7.3.....	137

Tableau 21 : Composition du milieu minimum synthétique de culture dit « MM» à pH 6.8.	137
Tableau 22 : Concentrations finales des antibiotiques utilisés	138
Tableau 23 : Préparation des tubes pour la transduction généralisée avec le phage P1	147
Tableau 24 : Calibration de la colonne pour détermination de la masse molaire par chromatographie d'exclusion stérique	150
Tableau 25 : Composition du tampon de dénaturation Laemmli (5X).....	151
Tableau 26 : Composition du tampon de migration	151
Tableau 27 : Solutions étalon utilisées pour la calibration de l'HPLC	154
Tableau 28 : Liste des anticorps dirigés contre les sous-unités du complexe Rnf de <i>C. ljungdahlii</i> et séquences des antigènes utilisés pour la production des anticorps.....	155
Tableau 29 : Composition du tampon de transfert.....	156
Tableau 30 : Composition du tampon PBS à pH 7.4.....	157
Tableau 31 : Composition des tampons de saturation et de rinçage	157
Table 1: Strains and Plasmids	169
Table 2: Dosage and analysis of the fermentation products at the end of the fermentation from Figure 2.....	178
Table 3: Comparison of the strain performances at the end of the fermentation when all cells were grown on glucose mineral medium.....	182
Table 4: Analysis of the fermentation products at the end of the fermentation from reconstructed strains compared to the evolved strains.....	184
Table 5: Specific transhydrogenase activity tests determined from crude extracts,.....	185
Table 6: Characterization of the native and the mutant purified transhydrogenase UdhA	186
Table 7: Specific FNOR activity determined from crude extracts	189
Table S1 : List of primers	193
Table S2: Summary of the Western blot performed on the Rnf complex of <i>C. ljungdahlii</i>	193
Table S3: Specific AdhE activity determined from crude extracts	194
Tableau 32 : Performances de la souche ST001	199

Tableau 33: Détermination de l'activité enzymatique spécifique <i>in vitro</i> des enzymes UdhA sauvage et UdhA Arg455Leu mutante.....	205
Tableau 34 : Comparaison des performances entre la souche ST001, la population évoluée, et 7 clones ré-isolés à partir de la population évoluée	214
Tableau 35 : Analyse des cultures discontinues réalisées au cours de l'évolution adaptative pour permettre la croissance de la souche Butanol en anaérobiose sans apport en extrait de levure dans le milieu de culture	224
Tableau 36 : Analyse de la culture discontinue C5 bis réalisée au cours de l'évolution adaptative pour permettre la croissance de la souche Butanol en anaérobiose sans apport en extrait de levure et sans nitrate dans le milieu de culture	225
Tableau 37 : Analyse des cultures discontinues en anaérobiose lors de la culture dans le milieu chimiquement défini à base de glucose sans supplémentation en extrait de levure et sans apport en nitrate des clones isolés par rapport à la population évoluée C5 bis. La ligne surlignée en rouge correspond au clone le plus performant.....	226
Tableau 38 : Analyse des cultures discontinues réalisées à partir de la souche ST101 lors de la croissance en anaérobiose dans le milieu chimiquement défini à base de glucose supplémenté avec 4g/L d'extrait de levure et 5mM de nitrate.....	237
Tableau 39 : Analyse des cultures discontinues de la souche Butanol Δzwf en anaérobiose sans apport en extrait de levure et sans nitrate dans le milieu de culture	240
Tableau 40 : Analyse des cultures discontinues réalisées à partir des clones isolés de la population Butanol $\Delta mdh \Delta zwf$ (ST160) après 90h de croissance en anaérobiose dans le milieu chimiquement défini à base de glucose supplémenté avec 4g/L d'extrait de levure et 5mM de nitrate.....	244
Tableau 41 : Analyse des cultures discontinues réalisées à partir des clones isolés de la population Butanol $\Delta mdh \Delta zwf$ (ST160) après 400h de croissance en anaérobiose dans le milieu chimiquement défini à base de glucose supplémenté avec 4g/L d'extrait de levure et 5mM de nitrate. La ligne surlignée en rouge correspond au clone le plus performant.....	245
Tableau 42 : Analyse des cultures discontinues réalisées à partir de la souche Butanol $\Delta mdh \Delta zwf$ (ST143) lors de la croissance en anaérobiose dans le milieu chimiquement défini à base de glucose supplémenté avec 4g/L d'extrait de levure et 5mM de nitrate.	245
Tableau 43 : Détermination de l'activité transhydrogénase sur extrait acellulaire.....	247

Tableau 44 : Analyse des cultures discontinues des souches Butanol ST063 et ST191 en anaérobiose dans le milieu chimiquement défini à base de glucose supplémenté avec 4 g/L d'extrait de levure et 5mM de nitrate 251

Tableau 45 : Comparaison des performances des différentes souches développées au cours de cette étude produisant du n-butanol. Les lignes surlignées en rouge correspondent aux clones les plus performants..... 254

Abréviations

Å : angström
°C : Degré Celsius
μ : Taux de croissance
μl : Microlitre

A

AA : Acide aminé
ABE : Acétone-Butanol-Ethanol
Acét. : Acétate
Ack : Acétate kinase
ACP : Acyl Carrier Protein
Adc : Acétoacétate décarboxylase
Adh : Alcool déshydrogénase
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADP : Adenosine-5' diphosphate
AMPc : Adenosine-5' monophosphate cyclique
Amp : Ampicilline
ARN : Acide ribonucléique
ATP : Adenosine-5' triphosphate

B

pb, kb : paire de base, kilo-base
Bcd : Butyryl-CoA déshydrogénase
BET : Bromure d'ethidium
BSA : Bovin Albumin Serum
Buk : Butyrate kinase
ButOH : Butanol
Buty. : Butyrate

C

C. acetobutylicum : *Clostridium acetobutylicum*
Cm : Chloramphénicol
CO : Monoxyde de carbone
CO₂ : Dioxyde de carbone
CoA-SH : Coenzyme A réduit
Conso. : consommé
Crt : Crotonase

D

Da, kDa : Dalton, kilo-Dalton
DHAP : Dihydroxyacétone phosphate
dNTPs : Desoxyribonucleotides-5'-triphosphate
DO : Densité optique
DTT : Dithioerythriol

E

E. coli : Escherichia coli
ECH : Electron conserving hydrogenase
ED : Entner- Doudorof
EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique
EMP : Embden-Meyerhof-Parnas
Etf : Electron transferring flavoprotein
EtOH : Ethanol

F

FMN : Flavo-mono-nucléotide
FAD : Flavine adénine di-nucléotide
FADH₂ : Flavine adénine di-nucléotide réduit
FDH : Formate déshydrogénase
FNOR : Ferredoxin NAD(P)⁺ oxydoréductase
FRT : FLP recognition target
FPR : Ferrédoxine NADP⁺ réductase

G

G6PDH : Glucose-6-phosphate déshydrogénase
Gapdh : Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase
Glc : Glucose
GDP : Guanosine-5' diphosphate
GTP : Guanosine-5' triphosphate

H

H⁺: proton
H₂: Dihydrogène
Hbd : β-hydroxybutyryl-CoA déshydrogénase
HCl : Acide chlorhydrique
Hepes : N-[2-hydroxyéthyl]piperazine-N'-[acide 2-éthane sulfonique]
HPLC : High Performance Liquid Chromatography

I

IPTG : isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

K

K_m : Constante de Michaëlis
K_{cat} : Constante catalytique
Kana : Kanamycine

L

Lact. : Lactate
LB : Lysogeny broth
Ldh : Lactate déshydrogénase
Log : Logarithme décimal

M

M, mM : molaire (mol.L⁻¹), milli-molaire
Mdh : Malate déshydrogénase
mg : milligramme
mol, mmol, μmol, nmol : Mole, millimole, micromole, nanomole
MM : milieu minimum
mV : millivolt
MV : méthyl viologène

N

Na⁺ : sodium
NAD⁺ : Nicotinamide adenine dinucleotide oxydé
NADH : Nicotinamide adenine dinucleotide réduit
NADP⁺ : Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxydé
NADPH : Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate réduit
Ni : Nitrate
nm : Nanomètre
NTA : Acide nitrilotriacétique

O

O₂: oxygène
ORF : Open reading frame

P

P : Phosphate
PAGE : Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS : Phosphate buffered saline
PDB : protein databank
PCR : Polymerase chain reaction
PEP : Phosphoenolpyruvate
Pfk : Phosphofructokinase
Pfor : Pyruvate ferrédoxine oxydo-réductase
Pgk : Phosphoglycerate kinase
Pgi : Phosphoglucoisomérase
PPP : Pentoses-phosphate pathway
Pta : Phosphotransacetylase
Ptb : Phosphotransbutyrylase
PTS : Phosphotranférase system
pthI : Promoteur de la thiolase de *C. acetobutylicum*

Pyk : Pyruvate kinase

R

RBS : Ribosome binding site

Rdt But/Glu : Rendement Butanol/Glucose

ROS : Reactive oxygen species

rpm : Rotations par minute

S

S. cerevisiae : *Saccharomyces cerevisiae*

SDS : dodécylsulfate de sodium

SOC : Super optimal broth with catabolite repression

Spec : Spectinomycine

Succi. : Succinate

T

TAE : Tris, Acétate, EDTA

TCA : Acide trichloroacétique

Thl : Thiolase

Tris : trishydroxyméthylaminométhane

TPI : Triose phosphate isomérase

U

UV : Ultra Violet

V

V_{max} : Vitesse maximale

V, kV : Volt, kilo-volt

v/v : Volume à volume

W

WT : Wild type

Y

YE : yeast extract, extrait de levure

“Now this is not the end.
It is not even the beginning of the end.
But it is, perhaps, the end of the beginning”

Winston Churchill