



**HAL**  
open science

**La promiscuité de protéines : facteur clef pour la  
(ré-)assimilation et la valorisation de la molécule  
plateforme non naturelle 2,4-dihydroxybutyrate chez  
Escherichia coli**

Thibault Malfoy

► **To cite this version:**

Thibault Malfoy. La promiscuité de protéines : facteur clef pour la (ré-)assimilation et la valorisation de la molécule plateforme non naturelle 2,4-dihydroxybutyrate chez Escherichia coli. Microbiologie et Parasitologie. INSA de Toulouse, 2023. Français. NNT : 2023ISAT0067 . tel-04651925

**HAL Id: tel-04651925**

**<https://theses.hal.science/tel-04651925>**

Submitted on 17 Jul 2024

**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.

# Doctorat de l'Université de Toulouse

préparé à l'INSA Toulouse

---

La promiscuité de protéines : facteur clef pour la  
(ré-)assimilation et la valorisation de la molécule  
plateforme non naturelle 2,4-dihydroxybutyrate  
chez *Escherichia coli*

---

Thèse présentée et soutenue, le 4 décembre 2023 par

**THIBAUT MALFOY**

**École 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**

Jean Marie FRANCOIS

**Composition du jury**

Mme Marie-Thérèse GIUDICI-ORTICONI, Rapporteur, CNRS

M. Alain PERRET, Rapporteur, CEA

M. Jean Marie FRANCOIS, Directeur de thèse, INSA

Mme Stéphanie HEUX, Présidente, INRAE

**Membres invités**

M. Clément Auriol, Cinabio - Adisseo

Mme Ceren Alkim, INSA







## Résumé

Les molécules plateformes sont des petites molécules faisant l'interface, dans la production de produits de commodité, entre une source de carbone (fossile ou renouvelable) et ces produits. La production de ces molécules en biotechnologie a tendance à devenir une part importante des molécules plateformes en raison de la volonté de développer la bioéconomie circulaire, en utilisant des sources de carbone renouvelable, et en produisant des molécules moins compromettantes pour l'environnement, particulièrement dans le domaine des plastiques. Le 2,4-dihydroxybutyrate (DHB) est un exemple de ce type de molécule plateforme originale, car d'une part, cette molécule n'est pas produite naturellement par les micro-organismes, et d'autre part, elle peut permettre la confection de molécules dans les secteurs de la chimie fine et de commodité (1,3-propanediol et acide hydroxypropionique, et précurseurs pour de nouveaux biopolymères), de la pharmacie (2-butyrolactone, butanetriol) et de la nutrition animale (dérivé de la méthionine). Cependant, sa production doit être industriellement attractive, ce qui a été l'objet de nombreux travaux qui ont été réalisés antérieurement à ma thèse et qui sont encore en cours actuellement.

Étant donné que le DHB est une molécule non naturelle pour son hôte de production *Escherichia coli*, ce qui signifie qu'à part quelques promiscuités de substrat ayant été envisagées pour la production du DHB ou l'amélioration de souches productrices, il n'existe pas de description de l'interaction du DHB avec la physiologie d'*E. coli*. Mon travail de thèse a donc contribué à l'annotation des voies métaboliques permettant l'assimilation du DHB. Par l'ajout d'un racémique de DHB dans le milieu, il a été constaté que le DHB peut être oxydé par trois lactates oxydases d'*E. coli*, et produire le 2-oxo-4-hydroxybutyrate (OHB), qui s'avère être le précurseur de DHB dans certaines voies conçues pour sa biosynthèse. L'OHB peut ensuite être clivé en formaldéhyde et en pyruvate par plusieurs aldolases pyruvate spécifiques, respectivement dissimilé en formate et pyruvate, lequel se voit redirigé vers le métabolisme carboné central des cellules. Ce projet a également permis de mettre en évidence de potentiels importeurs de DHB.

En parallèle, la construction d'un biosenseur d'OHB a été effectuée, et son utilisation dans diverses applications démontrées. Enfin, la possibilité d'utiliser le DHB comme monomère pour la biosynthèse d'un polymère innovant a également été étudiée dans ce travail. Préliminairement à cet aspect, la contrainte pour l'enzyme catalysant la polymérisation d'utiliser l'énantiomère (D) du substrat a nécessité l'identification d'une enzyme catalysant la réduction de l'OHB vers le D-DHB. Bien que d'autres voies d'assimilation du DHB restent encore à être déterminées, et que la synthèse de polymère nécessite encore du travail, tous ces résultats soutiennent le fait que la promiscuité de substrat des protéines (enzymes, facteur de transcription, transporteur) d'*E. coli* est importante. Elle permet la facilitation de la mise en place de nouvelles voies synthétique de production de molécules. Mais dans le même temps, la production de molécules, et a fortiori non naturelles, requiert une attention particulière pour éviter des interactions indésirables, possiblement délétères ou toxiques pour les cellules, pouvant pénaliser significativement sa « production » par l'usine cellulaire ainsi construite.



## Abstract

Platform molecules are small molecules that act as an intermediate in the production of commodity products, between a carbon source (fossil or renewable) and these products. The production of these molecules in biotechnology is becoming increasingly significant as there is a wish to develop circular bioeconomy, utilising renewable carbon sources and generating environmentally friendlier molecules, especially within the field of plastics. 2,4-dihydroxybutyrate (DHB) is an example of this type of original platform molecule, because on one hand, it is not naturally produced by microorganisms, and on the other, it can be used to produce molecules for the fine chemicals and commodity sectors (1,3-propanediol and hydroxypropionic acid, and precursors for new biopolymers), pharmaceuticals (2-butyrolactone, butanetriol) and animal nutrition (methionine derivative). However, its production needs to be industrially attractive, which has been the subject of several projects carried out prior to my thesis and still ongoing today.

DHB is not a naturally occurring molecule in its production host organism, *Escherichia coli*. This means that, aside from a few instances where a few substrate promiscuities were used for DHB production or enhancing strains that produce DHB, there is no detailed information available about how DHB interacts with the physiology of *E. coli*. My thesis work therefore contributed to the annotation of the metabolic pathways enabling DHB assimilation. By adding a racemic of DHB to the medium, it was found that DHB can be oxidised by three *E. coli* lactate oxidases, and produce 2-oxo-4-hydroxybutyrate (OHB), which turns out to be the precursor of DHB in some of the pathways designed for its biosynthesis. OHB can then be cleaved into formaldehyde and pyruvate by a number of specific pyruvate aldolases, dissimilated into formate and pyruvate respectively, which is then redirected to the cells' central carbon metabolism. This work also enabled identification of potential DHB importers.

In parallel, the construction of a DHB biosensor was carried out, and its use in various applications was demonstrated. Finally, the possibility of using DHB as a monomer for the biosynthesis of innovative polymers was also investigated in this work. Before addressing this aspect, the requirement for the enzyme catalysing polymerisation to use the (D)-enantiomer of the substrate made it necessary to identify an enzyme capable to specifically reduce OHB to D-DHB. While other DHB uptake pathways have yet to be identified, and polymer synthesis still requires additional research, all these findings support the significance of substrate promiscuity in *E. coli* proteins (enzymes, transcription factor, transporter). Enzyme promiscuity simplifies the creation of new synthetic pathways for molecule production. However, the production of molecules, especially unnatural ones, demands special attention to prevent unwanted interactions that could be harmful or toxic to the cells. These interactions could severely hinder the production within the resulting constructed cellular factory.





## Remerciements

Je voudrais remercier dans un premier temps les collègues qui avant même de commencer ma thèse, m'ont aidé à mûrir et devenir autonome dans un laboratoire. Je remercie donc l'équipe EcometBio, et particulièrement Hélène, pour ton enseignement dans le domaine de l'enzymologie et surtout sur la méthodologie à appliquer, en plus des résultats générés pour la caractérisation des racémases d'*E. coli*; merci à Julie pour tes conseils de biologie moléculaire, ainsi que pour la caractérisation du biosenseur; merci Pauline de m'avoir simplifié la vie tant que tu étais là avec l'analytique; et enfin merci à Ceren, qui m'a énormément apporté pendant ces 16 mois à TWB au niveau expérimental, ainsi que pour l'identification de transporteurs du DHB.

Merci aux membres de l'équipe PHYGE, qui ont rendu cette thèse bien plus agréable qu'elle ne l'aurait été. Particulièrement, merci Ellen pour les fou rires et l'entraide dans ces moments difficiles de la thèse cumulés à la crise COVID; merci Maëlle pour toutes ces conversations où même si on n'en ressortait pas plus avancés, on était quand même rassurés sur ce que l'on voudrait faire ensuite; merci Didier pour les discussions matinales, les conseils et avis éclairés.

Merci aux collègues du Toulouse Biotechnology Institute, pour leur aide sur différents points expérimentaux ou pour la camaraderie qu'ils m'ont permis d'avoir pendant ces trois années: Pauline, Kévin, Manon, Cyril, Céline, Guy, Cédric, Brice, Denis, Hanna, Stéphanie, Pietro, Svetlana, Edern...

Merci à l'équipe iGEM 2021 pour m'avoir permis de participer à l'encadrement de mes piou-pious, et en particulier à Brice et Ambre pour votre confiance, laquelle m'a permis de rencontrer Margaux qui a ensuite pu faire un super stage sous ma supervision. Merci donc pour ta motivation ton intelligence et tes suggestions.

Pour leur accueil très chaleureux, qui m'a permis de me sentir immédiatement à l'aise et de travailler du mieux possible dans les meilleures conditions, merci à Seiichi, Sangho et Ayaka. **ありがとう !**

Merci enfin à ma famille, qui ont suivi de loin mes travaux et qui, malgré leur incompréhension face à mon sujet et mes explications vagues, avez su continuer de m'encourager tout au long de ma thèse. Merci aussi à mes proches que je n'aurai rencontrés qu'en cours de route, mais qui avez joué un rôle tout aussi important à un moment où j'en ai eu le plus besoin : Valérie, Bruno, Clara et Marie, merci pour votre accueil, et d'être restés vrais, naturels et toujours bienveillants. Enfin, Lola, pour être entrée dans ma vie à un moment où j'allais m'abandonner au travail, merci de m'avoir permis de respirer et de m'apprendre à souffler de temps en temps pour pouvoir tenir la cadence et voir le bout de cette thèse.

Je ne peux pas clôturer ces remerciements sans remercier à la personne qui m'a permis de m'y mettre, merci Jean Marie, de m'avoir fait confiance pour mener à bien ce projet, de m'avoir aussi permis d'explorer certaines voies qui me semblaient intéressantes, tout en me rappelant les priorités de temps à autres.





## Liste des abréviations

- ACP : protéine porteuse d'acyle
- ADN : acide désoxyribonucléique
- AlaC\*\* : glutamate aminotransférase (*E. coli*) A142P:Y275D
- AMP : adénosine monophosphate
- ARN : acide ribonucléique
- ATP : adénosine triphosphate
- BET : bromure d'éthidium
- BODIPY : bore-dipyrrrométhène
- BSC : *cf*SSC (dénomination SONY SH800)
- CK : *Clostridium kluyveri*
- CO<sub>2</sub> : dioxyde de carbone
- DAP : diaminopimélate
- DCPIP : 2,6-dichlorophénol-indophénol
- DEG : diéthylène glycol
- DHAP : dihydroxyacétone phosphate
- DHB : 2,4-dihydroxybutyrate
- DMSO : diméthylsulfoxyde
- DTNB : acide 5-mercapto-2-nitrobenzoïque
- DTT : dithiothréitol
- EDTA : acide éthylènediaminetétraacétique
- FACS : tri cellulaire activé par fluorescence
- FAR : fragment d'ADN amplifié contenant le gène *phaC* d'*Aeromonas caviae*
- FID : détecteur à flamme d'ionisation
- FRE : fragment d'ADN amplifié contenant le gène *phaC* de *Ralstonia eutropha*
- FRT : site de reconnaissance de la flippase de *S. cerevisiae*
- FSC : *forward scatter* – lumière diffusée aux petits angles
- GABA :  $\gamma$ -aminobutyrate
- GBL :  $\gamma$ -butyrolactone
- GC : chromatographie gazeuse
- GFP : *green fluorescent protein* (protéine fluorescente verte)

GHB :  $\gamma$ -hydroxybutyrate  
HADH : hydroxyacide déshydrogénase  
HBL : hydroxybutyrolactone  
HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique  
HMTB : 2-hydroxy-4-méthylthiobutyrate  
HPLC : chromatographie liquide à haute performance  
IPTG : isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside  
 $k_{cat}$  : constante catalytique  
 $k_{cat}/K_m$  : efficacité catalytique  
 $K_m$  : constante de Michaelis  
LB : lysogeny broth  
LCPO : Laboratoire de Chimie des Polymères Organiques  
LO : lactate oxydase  
mcl : monomère à moyenne chaîne de carbone  
MDH 5Q : malate déshydrogénase (E. coli) I12V:R81A:M85Q:G179D:D86S  
ME : *Megasphaera elsdenii*  
MOPS : acide 3-morpholino-1-propanesulfonique  
MS : spectrométrie de masse  
NADH : nicotinamide adénine dinucléotide réduit  
NPN : *nickel pincer nucleotide cofactor*  
NR : rouge du Nil  
OCDE : Organisation de coopération et de développement économiques  
OHB : 2-céto-4-hydroxybutyrate  
OO : *Oenococcus oeni*  
ORF : cadre de lecture ouvert  
PBS : tampon phosphate salin OU polybutène succinate  
PCR : réaction de polymérisation en chaîne  
PCT : propionyl-CoA transférase  
PDO : 1,3-propanediol  
PEG : polyéthylène glycol  
PEHD : polyéthylène de haute densité

PELD : polyéthylène de basse densité  
PELLD : polyéthylène de basse densité linéaire  
PEMD : polyéthylène de moyenne densité  
PEP : phosphoénol pyruvate  
PET : polytéréphtalate d'éthylène  
PHA : polyhydroxyalcanoate  
PHB : polyhydroxybutyrate  
PLA : acide polylactique  
PLP : pyridoxal-5-phosphate  
PP : polypropylène  
PS : polystyrène  
PSE : polystyrène extensible  
PUR : polyuréthane  
PVC : polychlorure de vinyle  
pYag : promoteur de l'opéron *yag*  
RBS : *ribosome binding site* – site de fixation du ribosome  
RE : *Ralstonia eutropha*  
RMN : résonance magnétique nucléaire  
RPM : rotation par minute  
scl : monomère à courte chaîne de carbone  
SDS : sodium dodécylsulfate  
SDS-PAGE : électrophorèse de gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécylsulfate  
SEC : chromatographie par exclusion de taille  
SELEX : évolution systématique de ligands par enrichissement exponentiel  
SOB : *super optimal broth*  
SOC : *super optimal broth with catabolic repression*  
SSC : *side scatter* – lumière diffusée à 90 degrés  
TAE : tris-acétate EDTA  
TBI : Toulouse Biotechnology Institute  
TSE : tris-sucrose EDTA  
TSP : triméthylsilylpropanoate



TSS : solution de transformation et de stockage

TT : *Thermus thermophilus*

TWB : Toulouse White Biotechnology

UV-VIS : ultra-violet visible

$V_{\max}$  : vitesse maximale

vscl : monomère à très courte chaîne de carbone

WC : *Weissella confusa*

WT : sauvage

YFP : *yellow fluorescent protein* – protéine fluorescente jaune





# Table des matières

<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>25</b>
<i>I. Molécule plateforme : définition et contexte .....</i>	<i>25</i>
1. La bioéconomie : un vecteur de la transition vers l'économie circulaire. ....	26
2. Méthodes de production des molécules plateformes .....	28
2.1 Méthodes de production chimique .....	28
2.2 Voies de production biologique .....	28
<i>II. Le 2,4-dihydroxybutyrate : une molécule plateforme synthétique et inédite ..</i>	<i>31</i>
1. Les différentes voies de production du DHB .....	33
1.1 La voie malyl-Pi.....	33
1.2 La voie malyl-CoA .....	33
1.3 La voie homosérine .....	34
1.4 La voie éthylène glycol.....	35
2. Proposition de valorisation innovante du DHB : le polymère de DHB.....	38
2.1 Le DHB peut-il être monomère pour la synthèse de nouveaux polymères ?.....	38
2.2 La promiscuité de substrat est la problématique limitant l'utilisation du DHB comme monomère.....	38
<i>III. Les polymères biosourcés, acteurs de la bioéconomie circulaire et moteurs d'innovation.....</i>	<i>39</i>
1. Le biopolymère idéal : biosourcé et biodégradable.....	40
1.1 Polymères naturels, synthétiques, biosourcés : définitions.....	41
1.2 Les polyhydroxyalcanoates (PHA) : les biopolymères parfaits ?.....	41
1.3 Méthodes de biosynthèse des PHA .....	42
a. Voie « acetoacetyl-CoA ».....	42
b. Voie $\beta$ -oxydation .....	43
c. Via la biosynthèse des acides gras .....	43
d. Voie simplifiée : PCT/PHA synthase.....	43
1.4 La PHA synthase, l'enzyme clef de la polymérisation <i>in vivo</i> de PHA.....	45
1.5 Variété de biosynthèses des PHA grâce aux diverses PHA synthases existantes	46
a. Copolymères de 3-hydroxyalcanoates .....	46
b. (co)Polymères d'alcane 2- ou 4-hydroxylés ( $\alpha$ ou $\gamma$ hydroxylés) .....	47
c. PHA à monomères di-hydroxylés .....	48
<i>IV. Objectifs de la thèse .....</i>	<i>48</i>
<b>RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>50</b>
<b>CHAPITRE 1 : VOIES METABOLIQUES D'ASSIMILATION DU DHB .....</b>	<b>50</b>
<i>I. Clivage de l'OHB en pyruvate et formaldéhyde.....</i>	<i>50</i>
1. Caractérisation <i>in vivo</i> .....	51
2. Caractérisation <i>in vitro</i> .....	54
<i>II. Oxydation du DHB en OHB.....</i>	<i>56</i>
1. Une voie d'assimilation du DHB chez <i>E. coli</i> fait intervenir lactate oxydases et aldolases pyruvate spécifique.....	57
2. Production et caractérisation des lactates déshydrogénases sur lactate et DHB.....	59
2.1 Activité enzymatique sur lactate .....	60
2.2 Activité enzymatique sur DHB .....	60
<i>III. Autres voies d'assimilation de l'OHB .....</i>	<i>62</i>
1. Production de pyruvate <i>via</i> PanB .....	62
2. Retour à l'homosérine <i>via</i> une transaminase.....	63
<i>IV. Import du DHB extracellulaire dans le cytoplasme d'<i>E. coli</i> .....</i>	<i>64</i>
<i>V. Perspectives.....</i>	<i>72</i>

CHAPITRE 2 : DEVELOPPEMENT D'UN BIOSENSEUR D'OHB .....	77
I. <i>Mise au point</i> .....	78
1. Spécificité de substrat du biosenseur .....	79
1.1 Sensibilité, et méthodes de mesure.....	79
a. Sensibilité du biosenseur.....	79
b. Le spectrofluoromètre permet de faciliter les expérimentations .....	79
c. Étude de la gamme dynamique du biosenseur.....	80
d. Étude de la spécificité du biosenseur.....	82
d.1. Réponse du biosenseur au DHB.....	82
d.2. L'OHB est un meilleur activateur du biosenseur que le DHB.....	83
2. Affinité de substrat du biosenseur .....	86
3. Conclusion : le biosenseur est spécifique du D-xylonate et de l'OHB.....	87
II. <i>Applications</i> .....	88
1. Identification de transporteurs de DHB.....	88
2. Criblage de transaminases modifiées pour la production d'OHB.....	92
III. <i>Perspectives</i> .....	93
CHAPITRE 3 : LE D-DHB COMME SOURCE UTILE POUR LA BIOSYNTHESE DE POLYMERE DE DHB.....	95
I. <i>D'où vient la forme D- du DHB lors de sa production fermentaire ?</i> .....	95
1. Activités racémase d' <i>E. coli</i> .....	95
2. La Mdh modifiée n'a pas perdu sa stéréospécificité.....	97
II. <i>Comment produire le D-DHB ?</i> .....	98
1. Par la racémisation du L-DHB.....	98
2. Par l'oxydation D-spécifique de l'OHB.....	100
2.1 Par l'intermédiaire d'une D-malate déshydrogénase d' <i>E. coli</i> .....	100
2.2 D-2-hydroxyacide déshydrogénases : enzymes alternatives pour la synthèse de D-DHB	103
III. <i>Perspectives</i> .....	105
CHAPITRE 4 : POLYMERISATION <i>IN VIVO</i> DU DHB.....	108
I. <i>Identification des enzymes nécessaires</i> .....	108
1. Recherche d'acyl-CoA transférase pour l'activation du DHB.....	109
1.1 Identification à partir de la littérature.....	109
1.2 Purification et tests <i>in vitro</i> des PCT produites.....	109
a. Mesure par la détermination de l'acétyl-CoA résiduel .....	110
b. Mesure par couplage enzymatique .....	112
1.3 Conclusion : l'activation du DHB en DHB-CoA peut être catalysée par une PCT naturelle.....	114
2. Choix de PHA synthases.....	115
3. Constructions des combinaisons PCT et PhaC .....	116
II. <i>Mise au point de méthodes d'analyses de la production de biopolymères</i> ....	117
1. Analyse par microscopie à fluorescence.....	118
2. Analyse de la fluorescence en cytométrie de flux.....	119
3. Conclusion : la microscopie et la cytométrie sont complémentaires dans l'analyse phénotypique de PHA marqués au rouge du Nil .....	121
III. <i>Tentative d'homopolymérisation du DHB</i> .....	122
1. Effet de la concentration de DHB ajoutée au milieu .....	122
2. Comparaison des constructions pour la polymérisation du DHB .....	125
3. Tentative de caractérisation du polymère produit avec le DHB.....	126
4. Conclusion .....	127
IV. <i>Enrichissement de P(3HB) avec du DHB</i> .....	128
1. Terminaison de polymérisation avec un DHB non activé .....	128
2. Copolymérisation de DHB activé .....	132

3. Conclusion .....	134
V. <i>Perspectives</i> .....	135
<b>CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>138</b>
<i>I. Apports de la thèse</i> .....	138
<i>II. Perspectives et continuité de la thèse</i> .....	141
<i>III. Ouverture</i> .....	144
<b>MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>146</b>
<i>I. Matériel</i> .....	146
1. Souches .....	146
2. Plasmides.....	147
3. Amorces.....	150
4. Produits.....	152
5. Milieux .....	152
5.1 Milieux riches : LB, SOB et SOC .....	153
5.2 Milieu minimum (M9).....	153
6. Synthèse de l'OHB .....	153
<i>II. Protocoles</i> .....	153
1. Transformation de cellules .....	153
1.1 Cellules commerciales.....	153
1.2 Transformation TSS.....	153
1.3 Electroporation.....	154
2. Biologie moléculaire.....	154
2.1 Manipulation d'ADN .....	154
2.2 Délétion de gène par transduction de phage P1.....	155
a. Préparation des lysats .....	155
b. Transduction.....	155
c. Élimination de la cassette de résistance à la kanamycine .....	155
2.3 Délétion de gène par CrispR-Cas9 .....	156
a. Obtention de l'ADN donneur .....	156
b. Remplacement des gènes cibles par CrispR-Cas9.....	156
2.4 Délétion de gène par recombinaison homologue (Lambda Red) .....	157
2.5 Construction des biosenseurs .....	157
a. pBS2 .....	157
b. pBS3.....	158
c. pBS5.....	158
2.6 Constructions des plasmides exprimant les PCT/PhaC .....	158
3. Cultures microbiologiques .....	159
3.1 Pour le suivi de la consommation de DHB .....	159
3.2 Pour l'identification d'importeurs de DHB.....	159
3.3 Pour les tests des biosenseurs .....	160
a. Analysées en cytométrie .....	160
b. Analysées au spectrofluoromètre .....	160
3.4 Pour la polymérisation <i>in vivo</i> .....	160
3.5 Pour la surproduction de protéines.....	160
4. Biochimie des protéines .....	161
4.1 Purification des protéines.....	161
4.2 Gel SDS-PAGE.....	161
4.3 Tests enzymatiques.....	162
a. Aldolases.....	162
b. Lactates oxydases.....	162
c. Racémases .....	163

d.	Malate/2-hydroxyacide déshydrogénases .....	163
e.	CoA-transférases .....	164
f.	Couplage de transaminase et déshydrogénase .....	164
5.	Analyse de la fluorescence .....	164
5.1	Produite par le biosenseur .....	165
5.2	Produite par le rouge du Nil .....	165
<i>III.</i>	<i>Biochimie analytique</i> .....	<i>166</i>
1.	Quantification des acides organiques en HPLC .....	166
2.	Quantification des polymères intracellulaires en GC .....	166
	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>167</b>







# Introduction

L'industrie pétrochimique est devenue essentielle aux activités de l'Homme et à son développement, par la production notamment de plastiques et de fertilisants. Elle représentait à elle seule en 2018 pas moins de 14% et 8% de la consommation mondiale de pétrole et de gaz respectivement. Plus spécifiquement, ce sont les molécules pivots faisant l'interface entre les ressources fossiles de cette industrie et les produits qu'elle génère qui s'avèrent fondamentales : les molécules plateformes (Fernandez Pales & Levi, 2018).

## I. Molécule plateforme : définition et contexte

Les molécules plateformes peuvent être définies comme des petites molécules dites « blocs de construction », c'est-à-dire qu'elles servent de base, destinées à être modifiées pour produire des molécules d'intérêt utilisables dans divers domaines. Ces molécules peuvent être issues d'une transformation de carbone fossile, ou bien dérivées de biomasse (Farmer & Mascal, 2015). Pour être considérée comme plateforme, une molécule doit, selon Bomtempo et al, (2017), répondre à plusieurs critères, parmi lesquels :

- i. Être un intermédiaire dans la chaîne de valeur ;
- ii. Avoir une structure chimique flexible, et présenter des groupements fonctionnels qui permettent de générer des dérivés ;
- iii. Avoir des interfaces avec différents degrés d'ouverture, qui permettent leur transformation en une large gamme de dérivés à des prix compétitifs. Ces transformations peuvent être chimiques ou physiques ;
- iv. Être innovante, et présenter des caractéristiques et des intérêts divers à différents endroits de la chaîne de valeur, et être destinée à différents produits finaux ;
- v. Créer de la valeur grâce à des économies d'échelle.

Ces critères sont valables qu'il s'agisse de molécules plateformes synthétisées à partir de matière fossile ou biologique. C'est en 2004, lorsque le Ministère de l'Énergie Américain (DOE) a sorti un rapport sur les « Produits chimiques à haute valeur ajoutée issus de la biomasse », que l'intérêt des scientifiques pour la production biotechnologique, c'est-à-dire par l'intermédiaire de micro-organismes, de petites molécules utilisables comme « blocs de construction » a connu un gain d'intérêt. Les auteurs de ce rapport ont identifié douze de ces molécules, qui ont pour particularité de pouvoir être ensuite transformées en de nombreuses molécules intermédiaires ensuite exploitées de différentes manières : industries, transports, textiles, agroalimentaire, environnement, communication, logement, loisirs, santé (Werpy & Peterson, 2005).

La production biotechnologique de ces molécules plateformes, en opposition à leur synthèse chimique, permet la valorisation ou la revalorisation de nombreuses matières premières renouvelables, notamment la lignine, les polysaccharides (amidon, (hemi)cellulose, chitine) et monosaccharides dont ils sont majoritairement issus (Moreno

*et al*, 2020; Takkellapati *et al*, 2018; Xu *et al*, 2022) ou encore les protéines, certains des acides aminés les constituant faisant partie de ces douze molécules de base.

Ces procédés sont de cette manière inscrits dans la bioéconomie, préférant se baser sur des matières premières organiques végétales ou animales, des biodéchets ou plus simplement des cultures dédiées (Xicluna, 2019). Ceci permet avant tout une transition des procédés faisant appel à des matières premières d'origine fossiles, et *de facto* non renouvelables ou polluantes, vers des méthodes plus respectueuses de l'environnement pour préparer l'intégration de la bioéconomie dans nos vies quotidiennes pour enclencher une sobriété écologique nécessaire (Karan *et al*, 2019).

## **1. La bioéconomie : un vecteur de la transition vers l'économie circulaire.**

Les ressources fossiles peuvent être utilisées soit pour produire de l'énergie soit pour servir de matière première. En l'occurrence, l'industrie chimique était responsable en 2017 de l'émission de 1.5 gigatonne de dioxyde de carbone (GtCO<sub>2</sub>), en combinant les 85 % d'émissions dues à l'énergie nécessitée par les procédés, et les 15 % d'émissions dues aux procédés, représentant le carbone présent dans les matières premières au début du procédé, mais non retrouvé dans le produit fini. La production de molécules plateformes compte pour 60 % de ces émissions (Fernandez Pales & Levi, 2018). Bien que dénoncé par la communauté scientifique depuis de nombreuses années, c'est en particulier avec la médiatisation de l'Accord de Paris, qui vise à limiter l'augmentation de la température à la surface du globe à « bien moins de 2°C », que la conscience collective s'est éveillée et que des actions concrètes ont commencé à être mises en place, comme en France, avec la politique de l'air (actions lors de pics de pollution atmosphérique par exemple), ou la politique de l'énergie (transition énergétique, diminution de la consommation). Pour atteindre cet objectif, il faudrait que les émissions de gaz à effet de serre commencent à décliner d'ici 2025, et que ce déclin atteigne 43 % pour 2030 (United Nations, 2015). L'objectif de diminuer la production des molécules plateformes à partir de ressources fossiles revêt donc un intérêt vital pour permettre la réduction d'émissions de gaz à effet de serre, étant donné la proportion importante que représente leur production dans le paysage industriel actuel. En limiter l'usage, et par conséquent la production, serait une première réponse évidente pour se conformer à l'Accord de Paris. Ceci pourrait être facilité par la production de molécules plateformes à partir de ressources renouvelables comme la matière organique (Sheldon, 2014). C'est dans cet effort que se développe la bioéconomie, concept reposant sur l'utilisation de biomasse pour la production de nourriture, matériaux et énergie (Xicluna, 2019).

La pollution amenée par le raffinage et l'utilisation de ressources fossiles ne se limitent pas qu'à l'émission de gaz à effet de serre. Par exemple, la quantité de plastiques produite chaque année ne cesse d'augmenter, de 365.5 Mt en 2018 à 390.7 Mt en 2021, dont un peu plus de 8 % (32.5) sont issus du recyclage, et dont seulement 1.5 % (5.9 Mt) sont biosourcés (Plastics Europe, 2022). L'Organisation de Coopération et de Développement Économiques (OCDE) estimait qu'en 2019, 353 Mt de déchets plastiques

étaient produites. 9 % de ces déchets étaient recyclés, 19 % incinérés, alors que 49 % étaient stockés dans des décharges et 22 % se retrouvaient dans la nature (OCDE, 2022).

Au-delà de la pollution causée par les (micro-)plastiques d'origine fossile abandonnés dans l'environnement, qui est aujourd'hui une évidence, leur stockage en décharge, en cause le coût du recyclage et leur non-biodégradabilité, est également problématique. De la même manière que lorsqu'abandonnés dans la nature, les plastiques entreposés en décharge sont à l'origine de microparticules de plastique, charriées par les pluies, le vent, les animaux, etc. Ce sont d'importants pollueurs des nappes phréatiques, rivières, terrains, et des océans. La dégradation ainsi non contrôlée de ces microplastiques (MP) est à l'origine du relargage de bisphénol A, phtalates, composés organiques volatils dangereux, qui sont de puissants perturbateurs endocriniens, engendrant chez l'Homme, diabète, obésité, réduction de la fertilité, maladies thyroïdiennes, troubles du déficit de l'attention et d'hyperactivité entre autres. Ils peuvent transporter avec eux d'autres contaminants, comme des métaux lourds ou des composés pharmaceutiques toxiques (Wojnowska-Baryła *et al*, 2022; Demeneix, 2020).

Ces constats montrent que la transition vers la production de plastiques biodégradables et biosourcés devient indispensable pour endiguer les conséquences néfastes des plastiques issus de ressources fossiles sur l'environnement et notre santé. Bien que certains plastiques produits à partir de ressources fossiles soient quand même biodégradables, leur production contribue à l'émission de gaz à effet de serre. L'industrie bioplastique produit également des plastiques issus de carbone renouvelable, mais qui ne sont pas biodégradables, ce qui devrait donc également être évité.

La production de bioplastiques biodégradables permet de renforcer, en plus de la bioéconomie, l'économie circulaire, formant ainsi la bioéconomie circulaire. Elle vise à réduire la dépendance aux matières premières non renouvelables au profit de la biomasse, en considérant également les résidus et les déchets de production, tout en motivant une utilisation intelligente de la biomasse par la réutilisation des produits et leur recyclage répété (Stegmann *et al*, 2020).

Les deux plus gros secteurs utilisant des matières premières fossiles étant actuellement les engrais azotés et les plastiques (Levi & Cullen, 2018), une façon d'intégrer ces produits dans la bioéconomie circulaire serait leur réutilisation par un retour à la biomasse, ou encore plus spécifiquement le recyclage (pour les plastiques), toutefois difficilement mis en œuvre à l'heure actuelle. C'est pourquoi la production de nouvelles molécules plateformes, parfaitement implémentées dans la bioéconomie, et *a priori* dans l'économie circulaire, car biodégradables, est recherchée et permet une transition encore douce et passive du point de vue des utilisateurs (Karan *et al*, 2019; Chojnacka *et al*, 2020).

## 2. Méthodes de production des molécules plateformes

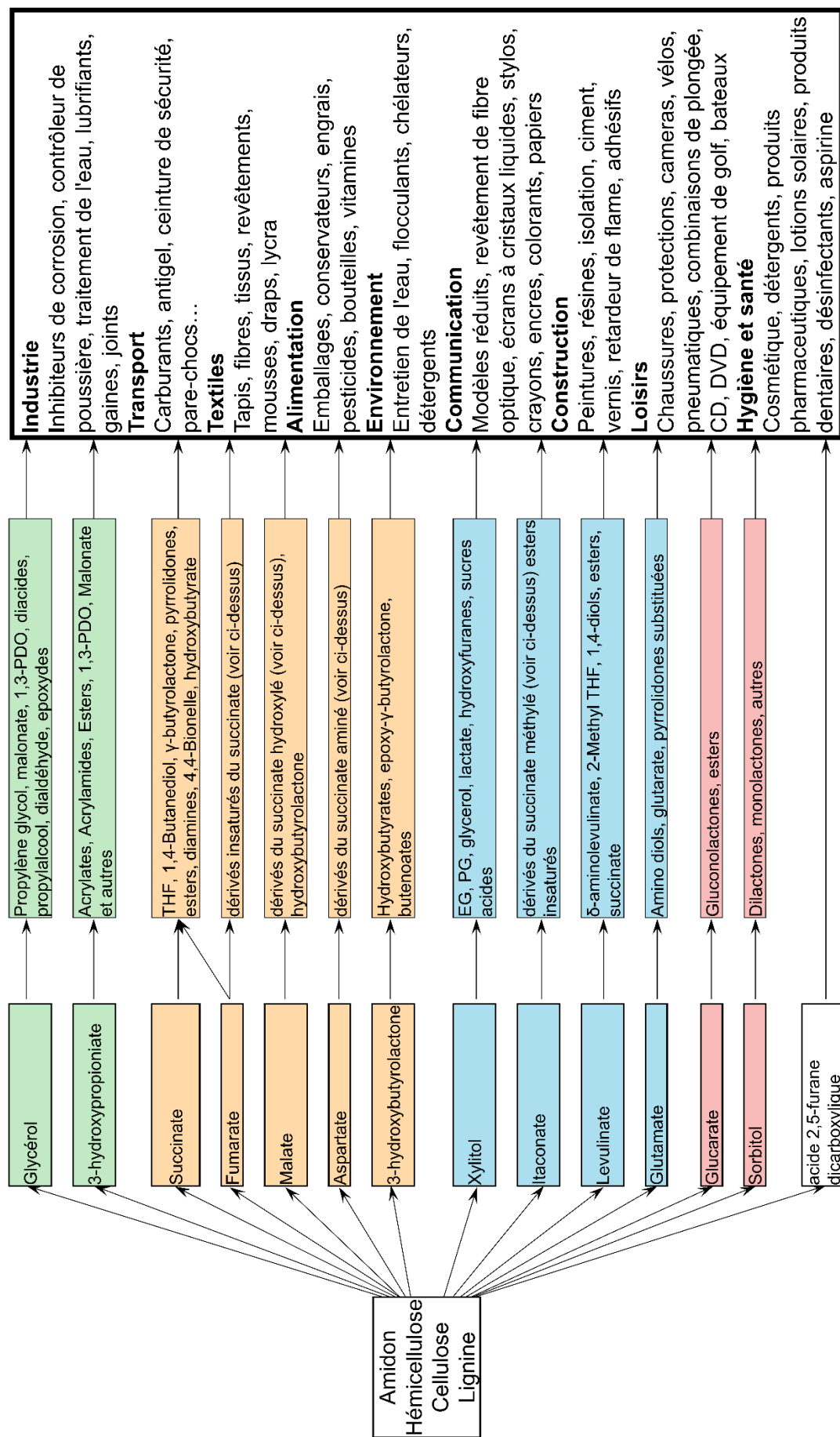
### 2.1 Méthodes de production chimique

Alors que l'on compte douze molécules plateformes lorsqu'elles sont biosourcées, l'industrie pétrochimique n'en produit que sept, à partir de pétrole, de gaz naturel ou de charbon : éthylène, propylène, benzène, toluène, xylène, ammoniac et méthanol (Fernandez Pales & Levi, 2018). Brièvement, ces matières premières fossiles sont transformées en gaz de synthèse (également appelé syngas) pour ensuite produire du méthanol (Galeon W. Schoenthal & Lynn H. Slauch, 1986) ou de l'ammoniac (Clark, 2002). Le pétrole devra être distillé pour produire le naphta, une mixture complexe d'hydrocarbures, pour amener ensuite aux cinq autres molécules plateformes de base (Al-Yassir *et al*, 2017; Ludwig, 1951; Timken & Angevine, 1997).

### 2.2 Voies de production biologique

La production de molécules plateformes par voies biotechnologiques, également appelée bioraffinerie, permet la biosynthèse de nombreuses molécules plateformes, à partir de nombreuses ressources d'origines renouvelables, pouvant ensuite utilisées pour synthétiser de nombreux produits par des procédés chimiques bien établis (Farmer & Mascal, 2015). Les douze molécules plateformes identifiées par Werpy & Peterson (2005) dans le rapport du Ministère de l'Énergie Américain sont les 1,4-diacides (acide succinique, l'acide fumarique, l'acide malique), l'acide 2,5-furane dicarboxylique, l'acide 3-hydroxypropionique, l'acide glucarique, l'acide itaconique, l'acide levulinique, l'aspartate, le glutamate, la 3-hydroxybutyrolactone, le glycérol, le sorbitol et le xylitol. Huit d'entre eux sont des petits acides organiques (en omettant les acides aminés aspartate et glutamate). Bien qu'initialement associés à l'agroalimentaire en particulier, ils ont néanmoins le potentiel de contribuer à la transition vers une bioéconomie circulaire dans de nombreux domaines, notamment en les utilisant comme molécule de base pour la synthèse de produits de commodité ou de nouveaux polymères (Sauer *et al*, 2008) (Figure 1).

Néanmoins, depuis la sortie de ce rapport, les marchés ont connu une évolution, à la fois sur les besoins et sur les capacités de production des molécules plateformes (Chen & Nielsen, 2016; Jang *et al*, 2012; Bruni & Terrell, 2022). Pour arriver à la bioproduction de molécules à valeur ajoutée de manière compétitive et économiquement viable en comparaison des méthodes reposant sur les matières fossiles, l'optimisation de la conversion de la biomasse (préférentiellement peu coûteuse, largement disponible et surtout n'entrant pas en compétition avec l'alimentation humaine) par l'intermédiaire de micro-organismes, est cruciale. L'utilisation de ce genre de biomasses (lignocellulose, cellulose, etc.) est un réel point dur en biotechnologie puisque ces matières premières ne sont pas directement assimilables par les micro-organismes, et nécessitent donc des voies synthétiques dédiées permettant leur déconstruction en leurs composants (Kawaguchi *et al*, 2016). L'amélioration de la production des molécules plateformes peut se faire selon



**Figure 1** : Résumé des différentes molécules plateformes décrites par Werpy et Peterson, ainsi que leurs dérivés principaux et les domaines d'applications dans lesquels ils sont employés. 1,3-PDO : 1,3-propanediol ; THF : tétrahydrofurane ; EG : éthylène glycol ; PG : propylène glycol. Adapté de Werpy et Peterson, 2005. Vert : molécule à 3 carbones ; jaune : 4 carbones ; bleu : 5 carbones ; rose : 6 carbones

différents angles : une production plus efficace (ingénierie métabolique de souches, pour ou par leur adaptation à ces nouvelles matières premières, l'ingénierie d'exporteurs pour l'optimisation de la sécrétion des molécules produites par exemple), la compatibilité avec les infrastructures industrielles existantes ou l'optimisation des procédés d'extraction et de purification (Hatti-Kaul *et al*, 2007; Lee *et al*, 2011).

Partant des potentialités métaboliques de micro-organismes, les outils d'ingénierie métabolique permettent d'optimiser leurs capacités de production de molécules (titre, rendement carbone par exemple). D'autre part, l'utilisation d'autres techniques, comme la biologie synthétique ou l'évolution adaptative, permet d'accéder à des organismes modifiés exprimant de nouvelles fonctions et capacités technologiques (Lee *et al*, 2011). Cependant, dans les deux cas de figure, la complexité des réseaux métaboliques et de leur régulation au niveau génétique, transcriptomique et traductionnel, rend l'atteinte aux performances souhaitées souvent très difficile. En plus de l'intégration de ces outils dans la construction d'organismes producteurs, la prise en compte de l'impact de ces modifications et de la production de molécules d'intérêt sur le métabolisme intrinsèque de l'hôte est fondamentale.

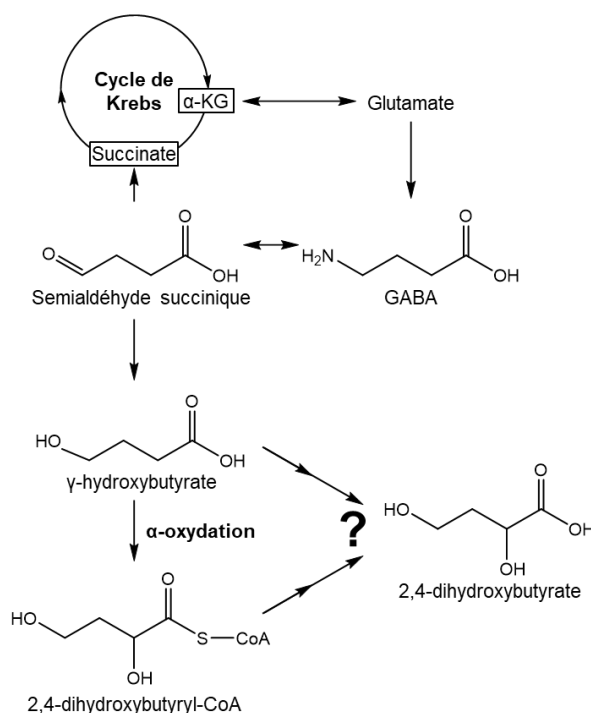
En effet, la simple production de molécules non naturelles pour un organisme peut avoir des effets toxiques pour lui (McKenna & Nielsen, 2011; Mukhopadhyay, 2015). Mais l'implémentation de voies métaboliques synthétiques peut occasionner la synthèse de co-produits dont l'accumulation peut aussi s'avérer toxique (Kizer *et al*, 2008). Dans d'autres circonstances, cela peut aussi être la surproduction d'une protéine en particulier qui s'avère toxique (Wagner *et al*, 2007). Au-delà de la limite de la production qu'elle représente, la toxicité amenée directement ou non par ces molécules donne également des indices sur les interactions possibles entre la molécule et l'hôte, notamment avec ses protéines, et pouvant avoir des répercussions sur les aspects transcriptomiques, traductionnels ou métaboliques de la cellule. La toxicité reste le seul effet secondaire abordé par les auteurs présentant leurs travaux de production en biotechnologie (Chubukov *et al*, 2016). Les autres interactions, invisibles, comme la réassimilation d'une molécule, occasionnant une perte de flux de carbone, l'activation ou la répression de certains gènes, sont très rarement abordées. Cette question sera abordée plus tard dans ce manuscrit et constitue l'intérêt principal de ma thèse.

Sur la grande diversité de molécules produites par bioraffinerie, certaines comme des acides aminés ou organiques (succinate) peuvent donc être conçues par des voies métaboliques naturellement présentes au sein de micro-organismes (Rafieenia, 2014). Ces voies peuvent être modifiées, afin d'optimiser le flux de synthèse, notamment en enlevant les rétro-inhibitions du produit final sur la voie, en identifiant les enzymes limitantes et en réduisant les pertes d'intermédiaires dans des voies annexes (Bailey, 1991; Guarnieri *et al*, 2017). D'autres molécules, sont non naturelles pour le micro-organisme, mais peuvent être produites naturellement par d'autres organismes, comme l'artémisine, un précurseur de médicaments produit par la plante *Artemisia*, utilisée pour lutter contre la malaria notamment (Bhattarai *et al*, 2007). La production d'artémisine chez d'autres plantes ou *E. coli* par exemple a été rendue possible par l'expression hétérologue de gènes

codant des enzymes nécessaires à sa biosynthèse (Arsenault *et al*, 2008). La dernière catégorie est celle des molécules non naturelles, qui ne sont produites par aucun organisme connu, ou dont la voie de biosynthèse n'est actuellement pas décrite. La production de ces molécules nécessite la création de voies métaboliques dédiées, comme dans le cas du 2,4-dihydroxybutyrate (Walther *et al*, 2017).

Néanmoins, la production de ces molécules dans un contexte de viabilité industrielle a fait appel à l'élaboration de voies métaboliques synthétiques, non existantes dans l'organisme hôte, occasionnant entre autres des perturbations métaboliques, malheureusement peu étudiées ou même prises en considération. L'étude de ces perturbations permettrait pourtant une meilleure compréhension du métabolisme de l'organisme hôte, et ainsi de potentiellement améliorer la production de ces molécules. Certaines d'entre elles ont également la capacité de répondre aux critères les catégorisant comme molécule plateforme, et leur production pourrait alors devenir économiquement intéressante. C'est le cas de l'acide 2,4-dihydroxybutyrique (2,4-dihydroxybutyrate ; DHB), une molécule synthétique pour *Escherichia coli* et à haut potentiel de molécule plateforme.

## II. Le 2,4-dihydroxybutyrate : une molécule plateforme synthétique et inédite



**Figure 2** : Voies proposées pour la synthèse du DHB dans la dégradation du GABA (acide γ-amino-butyrique). α-KG α-cétoglutarate.

D'abord trouvé dans les urines en très faibles quantités chez l'humain sain (Thompson *et al*, 1975; Bouatra *et al*, 2013), les taux urinaires de 2,4-dihydroxybutyrate (DHB) augmentent significativement chez les patients atteints de troubles métaboliques,



notamment par un déficit de la semialdéhyde succinique déshydrogénase (Brown *et al*, 1987). La présence de DHB dans les urines a été corrélée à la dégradation de l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) (Jakobs *et al*, 1993) (Figure 2). Ensuite identifié dans le liquide cérébro-spinal et dans le sérum sanguin (Hoffmann *et al*, 1993), le DHB a été proposé comme marqueur de la progression de la maladie d'Alzheimer (Orešič *et al*, 2011). Brièvement, une voie proposée pour la dégradation du GABA en DHB consiste en la conversion du GABA en semialdéhyde succinique, puis en  $\gamma$ -hydroxybutyrate (GHB), par les voies naturelles du métabolisme du GABA. Le GHB ainsi obtenu pourrait subir une  $\alpha$ -oxydation pour arriver au 2,4-dihydroxybutyryl-CoA (DHB-CoA) (Figure 2) (Sadhukhan *et al*, 2014). Le DHB-CoA pourrait alors être le sujet d'une autre  $\alpha$ -oxydation, mais d'autres enzymes pourraient intervenir dans sa conversion en DHB. Le GHB pourrait également être à l'origine de la présence de DHB, puisque seule une fonction -OH sur le carbone  $\alpha$  les sépare. En résumé, cette molécule a été identifiée en très faible quantité, sans qu'à ce jour sa voie de biosynthèse ne soit décrite.

Le DHB remplit par ailleurs les conditions pour être considéré comme une molécule plateforme d'intérêt. Entre autres, la présence de deux fonctions hydroxyles rend cette molécule fonctionnelle et permet de la transformer en de nombreux produits dérivés, ce qui en fait un intermédiaire de la chaîne de valeur. Il s'agit également d'une molécule plateforme innovante, puisque bien que décrite depuis longtemps dans la littérature en santé humaine, la première voie de biosynthèse du DHB n'a été proposée que récemment (Walther *et al*, 2015, 2017). D'abord utilisé comme intermédiaire entre des matières premières renouvelables et la synthèse chimique du 2-hydroxy-4-méthylthiobutyrate (HMTB) (Walther *et al*, 2017, 2018), l'utilisation du DHB comme molécule plateforme a déjà été mise en application puisqu'il est utilisé entre autres comme intermédiaire dans la production du 1,3-propanediol (Frazão *et al*, 2019) ou encore du 1,2,4-butanetriol (Li *et al*, 2015). Les domaines d'application de ces molécules sont larges, de l'industrie agroalimentaire aux solvants, en passant par les bioplastiques ou les combustibles (Zhang & Guo, 2008; Li *et al*, 2015; Nakamura & Whited, 2003). De plus, en condition de pH acide, le DHB se transforme spontanément en 2-hydroxy- $\gamma$ -butyrolactone (2-HBL), qui peut être converti en 1,4-butanediol ou en  $\gamma$ -butyrolactone (GBL) (Hong *et al*, 2014). La GBL est une molécule de commodité très utilisée dans diverses industries, notamment dans la production de bioplastiques *via* ses dérivés, le 4-hydroxybutyrate ou la caprolactone (Moore *et al*, 2005; Azimi *et al*, 2014). Récemment, des copolymères innovants de 2-HBL et de caprolactone ont aussi pu être synthétisés chimiquement (Pascouau *et al*, 2023).

La synthèse biotechnologique de DHB revêt donc un intérêt certain. Toutefois, c'est une molécule introuvable dans le métabolome des organismes utilisés comme châssis de production en biotechnologie, et aucune voie métabolique permettant sa synthèse n'est annotée. Elle requiert donc de l'ingénierie pour créer des voies métaboliques synthétiques qui permettront sa production *in vivo*. Il existe quatre voies différentes de production du DHB chez *Escherichia coli*.

## 1. Les différentes voies de production du DHB

### 1.1 La voie malyl-Pi

La première voie de synthèse du DHB décrite prend pour exemple la voie naturelle de biosynthèse de la L-homosérine à partir du L-aspartate (Chassagnole *et al*, 2001). Elle s'appuie sur l'utilisation de trois enzymes pour transformer le L-malate en L-malyl-4-phosphate (1), puis en L-malate-4-semialdéhyde (2) avant de produire du L-DHB (3) (Figure 3). La réaction de phosphorylation (1) est catalysée par une aspartate kinase modifiée d'*E. coli*, LysC V115A:E119S:E250K:E434V, qui présente une activité accrue sur le L-malate en comparaison de l'enzyme sauvage, et un  $K_m$  deux fois plus élevé que pour son substrat naturel l'aspartate. De plus, ce variant a perdu son activité sur l'aspartate, ce qui est un atout non négligeable pour la synthèse de DHB. L'activité de malate semialdéhyde déshydrogénase (2) a été récupérée sur une enzyme de *Bacillus subtilis*, Asd, également modifiée. Elle porte la mutation E218Q, ce qui lui permet de perdre son activité sur son substrat naturel, le L-aspartyl-4-phosphate, en augmentant considérablement son activité sur le malyl-4-phosphate ( $k_{cat}/K_m$  650 fois supérieur à l'enzyme sauvage). Enfin, la réaction (3) est catalysée par une succinique semialdéhyde déshydrogénase de *Metallosphaera sedula* modifiée (H39R:N43H), lui procurant une activité quatre fois plus importante sur le L-malate-4-semialdéhyde que l'enzyme sauvage (Walther *et al*, 2017).

L'assemblage en opéron des gènes exprimant les enzymes de cette voie synthétique sur un plasmide a permis aux auteurs de produire  $60 \text{ mg.L}^{-1}$  de DHB après 24h, mettant en évidence sa fonctionnalité. La biosynthèse de DHB a pu être optimisée : (a) en surexprimant une phosphoénol-pyruvate carboxylase anaplérotique (Ppc). En effet, le détournement du flux de malate limitant la régénération de l'oxaloacétate dans le cycle de Krebs, un déséquilibre s'installe entre oxaloacétate et acétyl-CoA, qui se retrouve alors en excès. Ceci peut être limité en produisant une Ppc modifiée (K620S), qui permet le maintien de l'équilibre entre les deux composés. La mutation de Ppc permet quant à elle d'éviter une inhibition de son activité par le malate ou l'aspartate (Izui *et al*, 1981) ; (b) en optimisant les sites de fixation du ribosome (RBS) des gènes codant les enzymes impliquées dans la biosynthèse de DHB. Ceci a permis d'améliorer la production de DHB jusqu'à  $1.8 \text{ g.L}^{-1}$  après 24h de culture.

L'ingénierie métabolique opérée dans le cadre de ce travail repose sur l'incorporation et l'expression d'enzymes, en l'occurrence modifiées, pour produire une molécule non naturelle pour *E. coli*. Cependant, le remaniement du métabolisme associé aux métabolites interagissant avec cette nouvelle voie est crucial, comme le montre le déséquilibre oxaloacétate/malate apparaissant lors de la production de DHB.

### 1.2 La voie malyl-CoA

Une autre voie utilise le malate comme porte d'entrée pour la biosynthèse du DHB, mais passe par la production de malyl-CoA. Cette voie implique trois enzymes catalysant trois réactions distinctes : (1) l'activation du (L)-malate en (L)-malyl-CoA ; (2) la réduction du (L)-malyl-CoA en (L)-malate-4-semialdéhyde ; (3) sa réduction en DHB (Figure 3) (Walther *et al*, 2013; Li *et al*, 2015). Les deux équipes ayant travaillé sur cette voie ont utilisé deux ensembles d'enzymes différentes. L'une a opté pour un ensemble de malyl-

CoA lyase (*mtkAB*, *Methylbacterium extorquens* (1)), une malonyl-CoA réductase modifiée (*mcr* codant Mcr T206P, *Sulfurisphaera tokodaii* (2)), et une succinique semialdéhyde réductase (*ssr*, *Metallosphaera sedula* (3)). Cet ensemble de gènes cloné en opéron sur un plasmide a été introduit dans une souche d'*E. coli* délétée pour les gènes *pta*, codant pour une phosphate acétyltransférase, *iclR*, pour un répresseur de la transcription d'une isocitrate lyase, et *aceB*, codant une malate synthase. Ces délétions permettent respectivement d'empêcher la formation d'acétate, de surexprimer l'isocitrate lyase, augmentant la production de succinate, et augmentent la disponibilité du malate (Walther *et al*, 2013).

Cette voie a aussi été conçue par une autre équipe qui a utilisé un autre jeu d'enzymes. Il consistait d'une malonyl-CoA lyase différente de celle utilisée précédemment (*mktAB*, *Methylibium petroleiphilum* (1)), une succinique semialdéhyde réductase et une 4-hydroxybutyrate déshydrogénase (*sucD* (2), *AhbD* (3) de *Porphyromonas gingivalis*) (Li *et al*, 2015). Dans les deux conditions, les constructions ont permis l'obtention de 6 mg/L de DHB. Malgré les faibles quantités de DHB obtenues, ces voies sont démontrées comme fonctionnelles et constituent une manière supplémentaire de produire du DHB à partir de sucres. Toutefois, les faibles concentrations produites sont probablement signe de perturbations complexes gravitant autour des voies métaboliques du malate, impliquant des remaniements métaboliques nécessaires pour une production viable par ces voies. Enfin, l'utilisation du glyoxylate et l'acétyl-CoA pour la biosynthèse de DHB limite certainement sa production. En effet, la voie de synthèse du glyoxylate est réprimée par le glucose, alors que l'acétyl-CoA, nécessaire à plusieurs voies de biosynthèse, est très peu disponible (Nanchen *et al*, 2008; Krivoruchko *et al*, 2015).

### 1.3 La voie homosérine

La voie de biosynthèse du DHB se basant sur l'homosérine vise à dévier le flux d'homosérine naturellement produit par les cellules d'*E. coli* pour produire une première molécule non naturelle pour la cellule, le 2-céto-4-hydroxybutyrate (OHB), par une réaction de transamination (1), et cet OHB est ensuite réduit en DHB (2). Lors d'une première étude (Walther *et al*, 2018), la réaction (1) de cette voie artificielle reposait sur l'expression d'une aspartate transaminase (AspC) d'*E. coli*, tandis que la réaction (2) était catalysée par une lactate déshydrogénase de *Lactococcus lactis* modifiée (LdhA Q85C) (Figure 3). Cette mutation permet une activité quatre fois supérieure sur l'OHB et une baisse de la spécificité pour les substrats naturels de l'enzyme, en comparaison de l'enzyme sauvage. Une ingénierie d'*E. coli* pour optimiser la disponibilité d'homosérine et par conséquent la production de DHB a également été faite : (a) la surexpression de l'aspartate kinase/homosérine déshydrogénase ThrA S345F permet de stimuler la voie naturelle de biosynthèse de l'homosérine ; (b) la délétion des gènes *thrB* et *metA* codant respectivement une homosérine kinase et une homosérine-O-succinyl transférase qui permet d'empêcher la perte d'homosérine vers des flux accessoires ; (c) la délétion du gène *adhE*, codant une alcool déshydrogénase, et qui permet d'augmenter la production de DHB dans des conditions limitantes en oxygène. Cette voie synthétique a permis d'amener à la production de 410 mg/L de DHB après 24h de culture (et 5.3 g/L après 48h de fermentation « fed-batch »), démontrant la potentialité de cette voie. En rajoutant la surexpression de

la Ppc K620S comme proposé précédemment, la production de DHB a pu être portée à hauteur de 468 mg/L après 24h de culture.

Les auteurs notaient toutefois que d'une part la réaction (1) pouvait être également catalysée par d'autres transaminases naturelles d'*E. coli* (IlvE, une aminotransférase d'acides aminés branchés et TyrB, une tyrosine transaminase), et d'autre part que la réaction (2) pouvait aussi être réalisée par des enzymes naturelles d'*E. coli* (la lactate déshydrogénase LdhA et la malate déshydrogénase Mdh), avec cependant des activités bien plus faibles que celles des enzymes retenues pour la biosynthèse de DHB. C'est pourquoi plus tard, les auteurs ont publié leurs travaux menés sur l'ingénierie de la Mdh d'*E. coli*, en démontrant que l'utilisation de la Mdh I12V:R81A:M85E:G179D:D86S ou de la Mdh I12V:R81A:M85Q:G179D:D86S (Mdh5Q) permettait de produire après 24h 0.95 g/L mM et 0.91 g/L de DHB respectivement (Frazão *et al*, 2018a).

L'utilisation de cette voie pour la production de DHB présente plusieurs intérêts : (a) le titre obtenu en fermentation est encourageant, puisque dépassant les 5 g/L malgré l'utilisation d'enzymes de faible activité, en particulier la transaminase, qui après les travaux effectués sur la Mdh, pourrait s'avérer être l'enzyme limitante de cette voie ; (b) cette approche ne requiert que deux enzymes, contre trois pour les voies « malate semialdéhyde » ou « malyl-Pi » ; (c) les auteurs ont souligné la multiplicité des enzymes naturelles d'*E. coli* candidates pour cette voie. Le fait qu'une souche au contexte génétique modifié optimisant la production de DHB, mais ne surexprimant pas les gènes de la voie, pouvait tout de même produire une petite quantité de DHB (59 mg/L), appuie le fait que des enzymes naturelles d'*E. coli* sont *a priori* promiscuitaires pour l'homosérine d'une part (transamination) et l'OHB d'autre part (déshydrogénation).

#### 1.4 La voie éthylène glycol

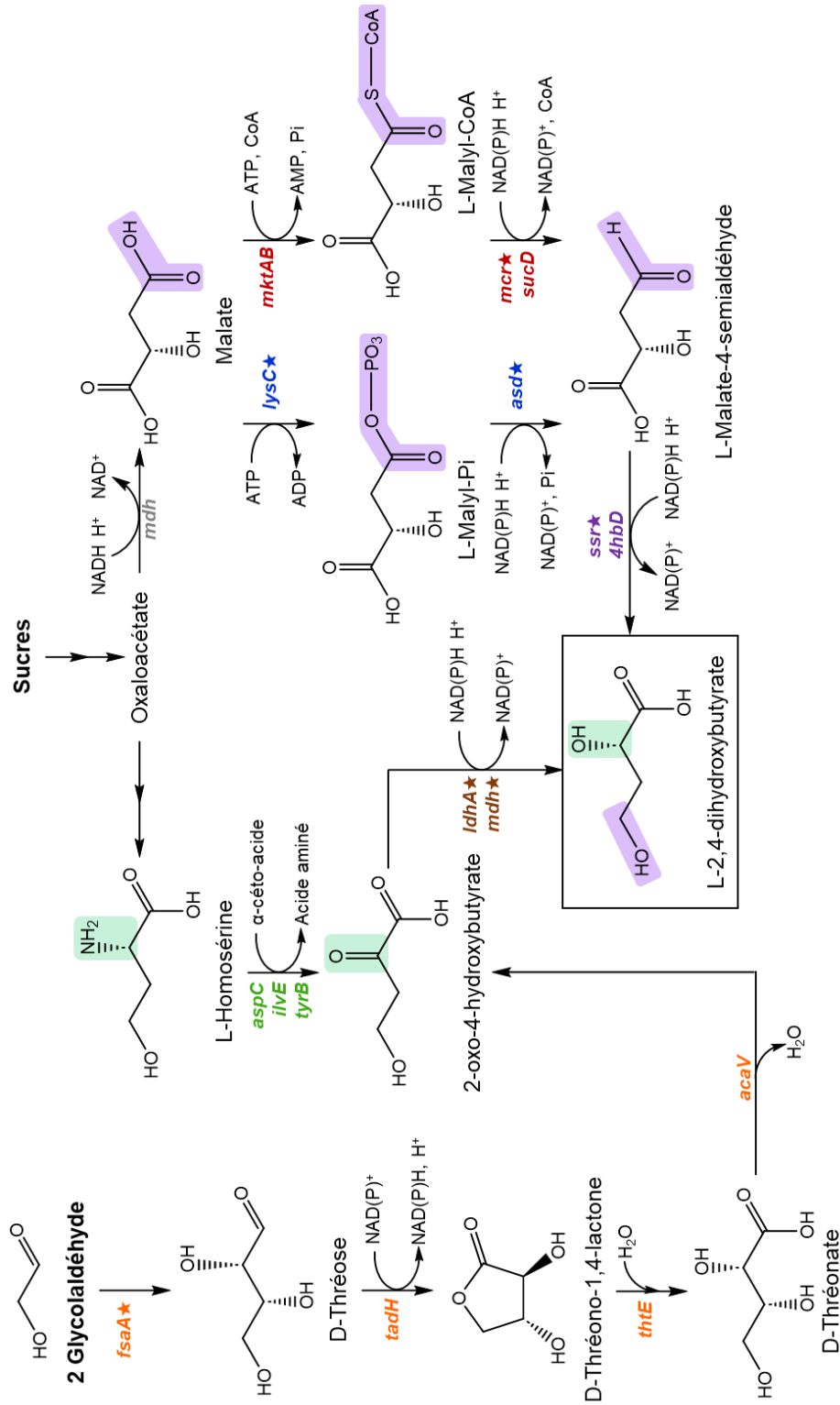
Plus récemment, une troisième voie de biosynthèse du DHB a été publiée, proposant d'utiliser de l'éthylène glycol ou du glycolaldéhyde comme source de carbone (Frazão *et al*, 2023). La voie de biosynthèse consiste à condenser deux molécules de glycolaldéhyde en D-thréose par l'intermédiaire d'une D-fructose-6-phosphate aldolase modifiée d'*E. coli* (FsaA L107Y:A129G), ensuite transformé en D-thréone-1,4-lactone *via* une D-threo-aldose 1-déshydrogénase de *Paraburkholderia caryophylli* (TadH). Une gluconolactonase de *Thermogutta terrifontis* (Thte1497) permet de linéariser la lactone en D-thréonate, ensuite déshydraté grâce à une D-arabinonate déshydratase de *Acidovorax avenae* (Acav1654), pour produire de l'OHB. La dernière réaction de réduction de l'OHB en DHB est réalisée par la Mdh5Q d'*E. coli* modifiée (I12V:R81A:M85Q:G179D:D86S) vue précédemment.

Afin d'éviter le détournement du flux de glycolaldéhyde dans des voies auxiliaires, les gènes *yqhD* et *aldA*, codant pour une glycolaldéhyde réductase et une aldéhyde déshydrogénase respectivement, ont été délétés de la souche de production. Ces modifications, avec l'expression de la voie synthétique, ont permis l'accumulation de 12 mg/L de DHB après 48h de culture. Une autre modification apportée a été de surexprimer le gène *kdgT* (*Ralstonia eutropha*\_b0317) codant un transporteur de D-thréonate. Bien que la surexpression de ce dernier gène ne soit pas explicitée sur une souche utilisant directement le glycolaldéhyde, cela a permis de porter l'accumulation de DHB à 19.2 mg/L

de DHB. Face à ces résultats encourageants, les auteurs ont apporté deux autres modifications à leur souche de production : la délétion de *lldD*, qui code pour une L-lactate déshydrogénase, mais catalyse une réaction d'oxydation du lactate vers le pyruvate, avait été également décrite pour oxyder le DHB en OHB (Frazão *et al*, 2018a), allant ainsi à contresens de la voie désirée ; et la délétion d'*aspC*, une aspartate transaminase, puisque la réaction de transamination de l'homosérine vers l'OHB, qui est réversible et catalysée entre autres par AspC, avait déjà été décrite (Walther *et al*, 2018), et aurait été la source de possibles pertes d'OHB pour la production de DHB. Ces deux délétions supplémentaires ont permis une accumulation de DHB de 198 mg/L. En bioréacteur, cette même souche a permis la production de 1 g/L de DHB après seulement 24h de fermentation.

Cette nouvelle voie de production de DHB devient ainsi une alternative intéressante à la fermentation basée sur les sucres, permettant la production d'une molécule plateforme innovante selon différents procédés. Grâce à ce travail, il apparaît également de manière bien plus évidente que des protéines, en l'occurrence des enzymes, ont une promiscuité de substrat avec le DHB et son dérivé oxydé, l'OHB. Ceci peut avoir des conséquences sur la production de DHB bien sûr, mais l'impact de la présence de ces molécules sur la physiologie de l'hôte est encore mal connu, car la promiscuité pourrait ne pas se limiter aux enzymes, mais à d'autres protéines, comme des facteurs de transcription, des transporteurs, etc.

Cette prise en compte devient donc nécessaire, en particulier dans le cas du DHB, mais aussi de l'OHB (puisque'il s'agit d'un de ses précurseurs non naturels), et des molécules non naturelles de manière générale, car leur présence occasionne très certainement des effets aux conséquences inconnues sur l'hôte, pouvant avoir un impact sur le transcriptome et le métabolome. Plus précisément, elles pourraient impacter des fonctions et des mécanismes cellulaires essentiels, comme des voies de biosynthèse ou de transduction du signal, se traduisant dans le pire des cas en une toxicité pour la cellule.



**Figure 3 : Les quatre voies de biosynthèse du L-DHB.** (1) Les gènes verts et marrons participent à la voie homosérine ; (2) Les gènes orange et marron participent à la voie glycolaldéhyde ; (3) Les gènes bleus et violets participent à la voie malyl phosphate, et (4) les gènes rouges et violets participent à la voie malyl-CoA. Le glycolaldéhyde et les sucres sont ajoutés au milieu de culture. *4hbD* 4-hydroxybutyrate déshydrogénase de *P. gingivalis* ; *acaV* D-arabinonate déshydratase de *A. avenae* ; *asd* Aspartate-semialdéhyde déshydrogénase de *B. subtilis* ; *aspC* aspartate transaminase d' *E. coli* ; *fsaA* D-fructose-6-phosphate déshydrogénase modifiée (L107Y:A129G) d' *E. coli* ; *ilvE* amino-transférase d'acides aminés branchés d' *E. coli* ; *ldhA* L-lactate déshydrogénase modifiée (Q85C) de *L. lactis* ; *lysC* aspartate kinase modifiée (V115A:E119S:E250K:E434V) d' *E. coli* ; *mcr* malonyl-CoA réductase modifiée (T206P) de *S. tokodaiti* ; *mdh* malate déshydrogénase modifiée (I12V:R81A:M85Q:G179D:D86S) d' *E. coli* ; *mktAB* malyl-CoA lyase de *M. petroleiphilum* ; *ssr* succinimide semialdéhyde réductase de *M. sedula* ; *sucD* succinimide semialdéhyde réductase de *P. gingivalis* ; *tadH* D-threo-aldose 1-déshydrogénase de *P. caryophylli* ; *thtE* gluconolactonase de *T. terrifontis* ; *tyrB* tyrosine transaminase d' *E. coli*.

## 2. Proposition de valorisation innovante du DHB : le polymère de DHB

### 2.1 Le DHB peut-il être monomère pour la synthèse de nouveaux polymères ?

Les polyhydroxyalcanoates (PHA) sont des polyesters biodégradables historiquement produits par les micro-organismes comme moyens de stockage du carbone en conditions de croissance défavorables. Parmi eux ont été identifiés les polyhydroxybutyrates (PHB), et en particulier le poly-3-hydroxybutyrate P(3HB) (Lemoigne, 1926). Les polymères de 2- et 4-hydroxybutyrates ont depuis été produits en biotechnologie, présentant différentes caractéristiques optiques, physiques et thermiques (Matsumoto *et al*, 2013; Hein *et al*, 2006). Au sein de ce groupe de PHA, les PHB ont également la possibilité de contenir des groupements fonctionnels, comme des benzyles, hydroxyles, amines ou carboxyles, ce qui modifie leurs propriétés. Par exemple, l'ajout de fonctions hydroxyles sur la chaîne carbonée du polymère peut le rendre plus hydrophile, pour des applications en santé humaine entre autres (Hazer & Steinbüchel, 2007). L'ajout de fonctions hydroxyles peut se faire par voie chimique à partir de PHB insaturé déjà synthétisé, mais la pureté optique obtenue est difficilement contrôlable (Lee *et al*, 2001; Renard *et al*, 2005; Eroğlu *et al*, 2005).

Nous avons vu que le DHB répondait aux critères nécessaires pour être une molécule plateforme, et dans ce cadre une des nouvelles applications que l'on pourrait lui attribuer serait alors d'être un monomère pour la synthèse d'un nouveau genre de polyesters. L'utilisation de ce précurseur pour la biosynthèse d'homopolymère ou de copolymère de DHB n'a pas encore été décrite dans la littérature. Toutefois, avant de pouvoir expérimenter la (co-)polymérisation du DHB, il est important de connaître le devenir du DHB lorsqu'il est mis au contact des cellules. La métabolisation du DHB chez *E. coli* n'a jamais été étudiée auparavant dans la littérature.

### 2.2 La promiscuité de substrat est la problématique limitant l'utilisation du DHB comme monomère

Comme vu à plusieurs reprises au cours de la partie II.1, le DHB a pour particularité d'être une molécule non naturelle pour *E. coli*, ce qui occasionne très certainement des interactions encore inconnues et pouvant perturber la physiologie de la cellule, ayant pour conséquence une réduction du rendement de sa production. Ainsi, la suppression d'enzymes comme AspC ou LldD a permis une meilleure production de DHB dans certains cas, alors que dans d'autres, le choix entre plusieurs enzymes naturelles candidates à la catalyse de réactions incluant l'OHB ou le DHB comme substrat ou comme produit a dû être déterminé, démontrant une promiscuité de substrat existante pour ces composés pourtant synthétiques.

En effet, la promiscuité, concept bien plus répandu et admis aujourd'hui, repose sur le fait que toutes les enzymes annotées sont capables de catalyser une réaction différente de celle pour laquelle elles ont été décrites (promiscuité enzymatique), ou d'utiliser un autre substrat (promiscuité de substrat) (Valle & Bolívar, 2021; Kazlauskas, 2005; Li *et al*, 2020). Précédemment, une étude a montré que de telles réactions chez *E.*

*coli* permettaient l'établissement d'un véritable réseau métabolique alternatif, octroyant un meilleur fitness et une plasticité métabolique à l'organisme (D'Ari & Casadesús, 1998).

La promiscuité de substrat devient alors un réel point fort pour la biologie synthétique et l'ingénierie métabolique, car pour créer de nouvelles voies il suffirait donc d'utiliser des enzymes naturelles, déjà existantes et catalysant déjà la réaction souhaitée sur un substrat structurellement proche de celui visé. Une fois qu'une activité, même faible, est démontrée sur le substrat non naturel désiré, il est alors possible de modifier l'enzyme, pour augmenter la vitesse ou la spécificité de la réaction, ou améliorer la stabilité de l'enzyme. Ces modifications peuvent être conduites par ingénierie enzymatique *in vitro*, par la génération de mutants aléatoires (mutagenèse aléatoire), ou ciblés (mutagenèse site spécifique saturante), ou *in vivo*, par évolution expérimentale par exemple. Cette exploitation de la promiscuité de substrat est devenue courante en ingénierie métabolique (Li *et al*, 2020). Ces travaux, qui permettent une meilleure annotation des activités enzymatiques, et qui rendent fonctionnelle une voie de synthèse pour produire une molécule cible, discutent toutefois rarement de la promiscuité de substrat que peut subir cette molécule et de l'impact qu'elle a sur la physiologie de l'organisme producteur, ou alors restent superficiels. Par exemple, le DHB a la possibilité d'être oxydé par la L-lactate déshydrogénase LldD chez *E. coli* (Frazão *et al*, 2018a), mais aucune donnée n'existe sur d'autres enzymes capables de métaboliser le DHB, d'autres lactates déshydrogénases, ou sur les protéines interagissant avec l'OHB qui résulte de cette oxydation.

À partir de ces connaissances, la première partie de mon travail de thèse a consisté à mettre en évidence, par des approches génétiques et enzymatiques, les protéines capables d'interagir avec le DHB ou l'OHB, qu'il s'agisse d'enzymes ou de transporteurs, et de comprendre comment le DHB pouvait être métabolisé et assimilé par *E. coli*.

### III. Les polymères biosourcés, acteurs de la bioéconomie circulaire et moteurs d'innovation

Les polymères sont une classe de matériaux constitués de macromolécules, qui sont elles-mêmes constituées par la répétition de motifs, comme des molécules de faible masse moléculaire (Gold, 2019). Les polymères peuvent être différenciés en deux catégories : les polymères naturels et synthétiques. Bien que les polymères naturels aient été les premiers à être utilisés par l'Homme (bois, cuir, laine), c'est la synthèse chimique du premier plastique qui marquera le début de l'industrie plastique moderne avec la bakélite (anhydride de polyoxybenzylméthylène glycol) (Baekeland, 1909). En 2021, sur 390.7 Mt de plastiques produits dans le monde, 91.7 % étaient d'origine fossile, avec par ordre d'importance : le polypropylène (PP), les polyéthylènes linéaires et ramifiés à basse densité (PELLD et PELD), le polychlorure de vinyle (PVC), les PE de moyenne et haute densités (PEMD et PEHD), le polyéthylène téréphtalate (PET), le polyuréthane (PUR), le polystyrène (PS) et PS extensible (PSE) (Plastics Europe, 2022). Les PP, PE et PVC représentent 59.1 % de la production mondiale de plastique. Le PP est produit par la polymérisation d'une des sept molécules plateformes issues de ressources fossiles, le propylène, alors que les PE et PVC sont préparés à partir d'éthylène. À cause des raisons



évoquées plus tôt, notamment leur non-biodégradabilité, ces voies de productions ne sont plus acceptables d'un point de vue écologique, et ne permettent pas la mise en place d'une bioéconomie circulaire plus saine pour l'environnement, la santé de la planète et de ses occupants. C'est pourquoi des alternatives, faisant appel à des moyens de production biotechnologiques de ces plastiques, ont vu le jour au fil du temps.

La bioproduction de plastiques intéresse de plus en plus d'industriels souhaitant améliorer leur image et réduire leur empreinte carbone, notamment la société brésilienne Braskem pour les PE et PP (Siracusa & Blanco, 2020; Braskem, 2021; Laird, 2023), ou le groupe anglais INEOS pour le PVC (Biovyn, 2022). Les PE et le PVC peuvent être produits à partir de glucose, lequel est transformé en éthanol par fermentation, qui est ensuite déshydraté en éthylène. Le PE obtenu par polymérisation de cet éthylène présente les mêmes caractéristiques mécaniques, physiques et thermiques que celui produit à partir de ressources fossiles (Morschbacker, 2009), et les coproduits du procédé de synthèse du bioéthylène sont facilement et directement réutilisés dans les plantations de cannes à sucre dont le glucose initial est issu (Wheals, 1999). Le PP également pourrait être directement obtenu à partir de glucose, par l'intermédiaire de la molécule plateforme 1,2-propanediol, déshydraté une première fois en 2-propanol puis une seconde fois en propylène. Ce biopropylène peut ensuite être polymérisé en bio-PP (Haveren *et al*, 2008). L'avantage de ces procédés réside dans l'utilisation de sources de carbone renouvelable, et dans le fait que la polymérisation utilise les molécules bioproduites ou d'origine fossile indifféremment. De ce fait, les caractéristiques thermiques, physiques et mécaniques des plastiques sont maintenues.

Bien que ces plastiques bénéficient de la dénomination de « bioplastiques », du fait que leur carbone est d'origine biologique, leurs caractéristiques étant inchangées, leur biodégradabilité ne s'en retrouve pour autant pas améliorée. De plus, bien que recyclables, les PE, PP et PVC ne sont pas des plastiques biodégradables, ou très difficilement, et par des organismes et conditions très particuliers (Ojeda, 2013; Mohanan *et al*, 2020). Leur impact sur l'environnement reste donc bien supérieur à des plastiques biodégradables. On préfère en effet aujourd'hui l'emploi de biopolymères dont la biodégradation est avérée. Elle permet une dépolymérisation de deux natures : (1) contrôlée, dans une perspective de recyclage plus facilement mise en œuvre, puisqu'après la dépolymérisation (enzymatique ou chimique), les monomères obtenus peuvent être directement réemployés (Coates & Getzler, 2020; Lamberti *et al*, 2020), ou dans une optique de compostage aérobie ou anaérobie ; (2) naturelle. Le compostage de bioplastiques amène à la production finale et directe de CO<sub>2</sub> (par compostage aérobie), ou indirectement, par l'incinération de CH<sub>4</sub> (méthane obtenu par compostage anaérobie) (Stagner, 2016), qui sera ensuite capturé grâce à la photosynthèse pour régénérer la biomasse. La dépolymérisation naturelle est catalysée par des organismes, dans le but d'utiliser les monomères qui en résultent comme source de carbone (Sheel & Pant, 2018). Ces nouveaux procédés de recyclage par la biodégradation permettent une mise en œuvre démonstrative de la bioéconomie circulaire.

## **1. Le biopolymère idéal : biosourcé et biodégradable**

Les différentes appellations de biopolymères/bioplastiques peuvent rendre complexe leur différenciation. Naturels, synthétiques, biosourcés, biodégradables, la

confusion peut facilement s'installer. Afin de faciliter leur distinction et d'explicitier quel type de polymère pourrait et devrait être produit à partir de DHB, un travail de définition se doit d'être fait.

### 1.1 Polymères naturels, synthétiques, biosourcés : définitions

Le préfixe « bio » de « bioplastiques » est à l'origine de confusions et peut représenter plusieurs choses, parmi lesquelles (ou en combinaison) : (1) les monomères sont dérivés de sources de carbone renouvelables et chimiquement polymérisés ; (2) le polymère est extrait de biomasse ; (3) le polymère est biodégradable ; (4) le polymère est obtenu par un procédé biologique. Cela autorise donc, comme nous l'avons vu, à donner au bio-PP la dénomination de bioplastique bien que celui-ci ne soit pas biodégradable, alors que le polybutène succinate est d'origine fossile, mais biodégradable. Enfin, les PHA sont les deux à la fois, biosourcés et biodégradables, pour autant que la source de carbone des micro-organismes soit biosourcée (Rosenboom *et al*, 2022). Les polymères naturels comme les PHA, la cellulose ou l'ADN sont donc par essence des polymères biosourcés et biodégradables. Plusieurs types de polymères biosourcés existent, par exemple les polyesters, dont les monomères sont liés les uns aux autres par des liaisons ester (dont les PHA font partie), les polycarbonates (PC) ou les polyamides. Les polycarbonates sont des polymères incorporant des carbonates dans leur chaîne carbonée, et l'utilisation de monomères bioproducts permet le remplacement de composés toxiques comme le bisphénol A par d'autres, moins toxiques. Bien que non dégradables, les PC ont l'avantage d'être particulièrement résistants aux stress mécaniques, et sont optiquement transparents. Les polyamides, ou nylons, ont la particularité de lier leurs unités monomériques par des liaisons amides. Les nylons, en particulier le PA66, montrent de très bonnes résistances mécaniques à la chaleur et aux produits chimiques. Toutefois, la bioproduction de monomères semblables à ceux utilisés pour le PA66 pourrait permettre une exploitation d'autres nylons, qui s'avèreraient alors biosourcés. C'est par exemple le cas pour le PA56, dont les propriétés pourraient lui permettre de remplacer le PA66 dans certaines applications, notamment grâce à sa biodégradabilité et ses propriétés ignifuges (Hayes *et al*, 2023; Luo *et al*, 2023).

Les PHA ont l'avantage, grâce au procédé de biosynthèse, de pouvoir désormais incorporer différents monomères, ce qui leur confère des propriétés particulières. Ces procédés permettent également de produire des PHA « à façon », possédant les caractéristiques thermiques, physiques et mécaniques désirées. Dans le cadre de cette thèse, je ne m'intéresserai qu'aux polyesters, dont j'essaierai de synthétiser de nouvelles formes à base de DHB.

### 1.2 Les polyhydroxyalcanoates (PHA) : les biopolymères parfaits ?

Les PHA sont une famille de polyesters aliphatiques biodégradables, dont la polymérisation est effectuée par divers micro-organismes comme *Pseudomonas* ou *Ralstonia*, ou par des algues ou même des plantes telles qu'*Arabidopsis* (Mendhulkar & Shetye, 2017). Les PHA peuvent occuper une part importante de l'espace intracellulaire des micro-organismes, qu'elles synthétisent comme moyen de stockage du carbone en conditions de croissance défavorables (Lemoigne, 1926). Il existe plus de 160 types de 3-

hydroxyacides carboxyliques (3-HA) répertoriés pouvant composer les PHA, que l'on peut classer en deux catégories : les monomères à chaîne courte (scl, entre trois et cinq carbones) ou à chaîne moyenne (mcl, entre six et quatorze carbones) (Madison & Huisman, 1999). Le plus étudié d'entre eux est le poly(3-hydroxybutyrate) (P(3HB)), un PHA-scl, qui possède des caractéristiques thermiques et physiques comparables à celles du PP. Lors de sa synthèse par les cellules, les PHA se retrouvent sous forme de granules « fluides et amorphes », alors qu'après son extraction avec des solvants organiques, il en résulte un matériau cristallin, dur, mais cassant (Doi, 1995). En contraste, les PHA-mcl sont amorphes et présentent des propriétés d'élastomères : mous, température de fusion basse, forte résistance à l'étirement (Reddy *et al*, 2022).

Des efforts ont alors été menés pour chercher à diversifier la gamme de PHA disponibles, grâce à : (1) l'augmentation de la masse moléculaire du PHA produit, procurant une meilleure élasticité du polymère et une meilleure cristallinité (Kusaka *et al*, 1999) ; (2) l'incorporation dans la chaîne carbonée de nouveaux monomères, pour la synthèse de copolymères, ou plus radicalement par l'utilisation de monomères différents des 3-HA. La diversification des monomères a amené à l'utilisation de nouveaux HA, tels que le lactate, le glycolate, le 2-hydroxybutyrate ou encore le 4-hydroxybutyrate. Ces modifications nécessitent cependant une connaissance de la biosynthèse *in vivo* des PHA.

### 1.3 Méthodes de biosynthèse des PHA

Trois voies naturelles principales de biosynthèse des PHA sont décrites dans la littérature, deux utilisant le glucose comme substrat, une pour la synthèse de PHA-scl et une autre, empruntant la voie de biosynthèse des acides gras pour la synthèse de PHA-mcl. La troisième voie répertoriée emprunte la voie de  $\beta$ -oxydation, pour la synthèse de PHA-mcl à partir d'acides gras ajoutés au milieu de culture.

#### a. Voie « acetoacetyl-CoA »

La voie classique de biosynthèse des PHA-scl repose sur la condensation de deux acétyl-CoA en acétoacétyl-CoA grâce à une  $\beta$ -ketothiolase, transformé *via* une acétoacétyl-CoA réductase en 3-hydroxybutyryl-CoA, qui peut alors être utilisé comme monomère par une PHA synthase (également appelée PHA polymérase) pour produire du PHB Figure 4.a). Cette voie de synthèse, attribuée à *Ralstonia eutropha* (*Cupriavus necator*, *Alcaligenes eutrophus*), est désormais bien connue, et a surtout permis de mettre en évidence la fonction clef de la PHA synthase, enzyme terminale catalysant la polymérisation des monomères (3-HA) pour la biosynthèse des PHA (Reinecke & Steinbüchel, 2009). Les enzymes de cette voie sont majoritairement codées dans l'opéron *phaCAB* de *Ralstonia*. Les gènes *phaA* et *bktB* produisent les principales  $\beta$ -ketothiolases, spécifiques de l'acétyl-CoA (PhaA) ou non (BktB) (Slater *et al*, 1988). La réaction de réduction de l'acétoacétyl-CoA est également catalysée par de nombreuses enzymes chez *Ralstonia* ((R)-3-hydroxybutyryl-CoA déshydrogénase), mais les plus importantes sont codées par *phaB1*, *phaB2* et *phaB3* (Budde *et al*, 2010). Enfin, la réaction de polymérisation du substrat activé est catalysée par PhaC1, dont le gène est constitutivement exprimé. La spécificité de substrat de l'enzyme a été décrite comme étant large, autorisant la réaction de polymérisation à s'effectuer sur plusieurs substrats, mais

tous des 3-HA, sous forme d'homo ou de copolymères (Haywood *et al*, 1989). J'aurai l'occasion de revenir sur les particularités de ces PHA synthases (PhaC) et de leur impact sur les propriétés des PHA polymérisés plus tard dans cette introduction. Une souche d'*E. coli* a été modifiée pour exprimer la voie de biosynthèse du P(3HB) de *Ralstonia eutropha* (opéron *phaCAB*), et a permis d'accumuler 33 % du poids sec des cellules en P(3HB) (Agus *et al*, 2006).

#### b. Voie $\beta$ -oxydation

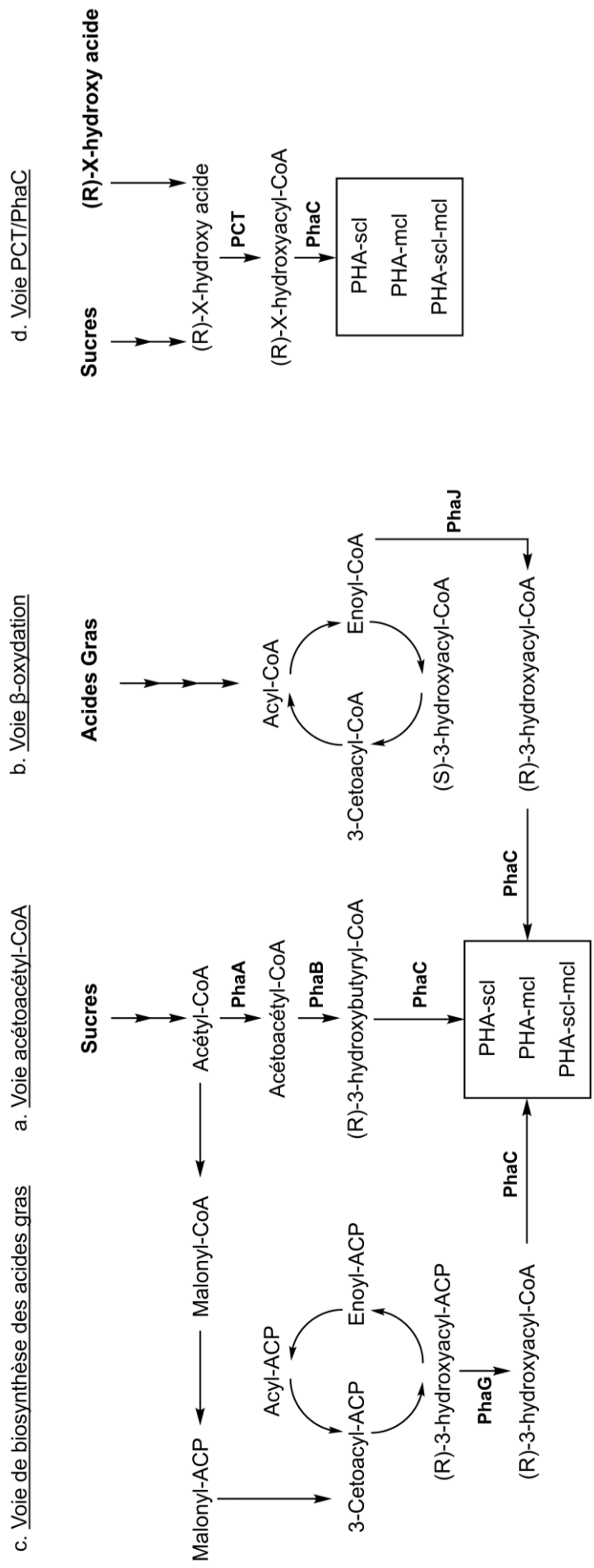
Cette voie de biosynthèse, identifiée en particulier chez *Pseudomonas aeruginosa*, utilise des produits intermédiaires du cycle  $\beta$ -oxydatif pour synthétiser des PHA-mcl, en utilisant des acides gras supplémentés dans le milieu de culture, comme source de carbone. Brièvement, les acides gras sont convertis en enoyl-CoA grâce au cycle  $\beta$ -oxydatif, qui est ensuite transformé en R-3-hydroxyacyl-CoA par l'intermédiaire d'une 2-enoyle-CoA hydratase (R)-spécifique (PhaJ) (Tsuge *et al*, 2003), et devient le substrat d'une PHA synthase pour la polymérisation (Figure 4.b). Ainsi, l'expression de *phaJ1* et *phaC2* de *Pseudomonas aeruginosa* a permis par exemple la biosynthèse chez *E. coli* de PHA-mcl, à hauteur de 6.62 % du poids sec des cellules, sous forme de copolymère P(3-hydroxyoctanoate-co-3-hydroxydecanoate) (Zhuang *et al*, 2014). Toutefois, le R-3-hydroxyacyl-CoA peut également être synthétisé par la voie de biosynthèse des acides gras, permettant l'utilisation d'autres sources de carbone pour la polymérisation de PHA (Chen *et al*, 2015).

#### c. Via la biosynthèse des acides gras

Dans cette voie, l'acétyl-CoA qui résulte de l'assimilation du substrat (sucre, acide aminé...) est transformé en R-3-hydroxyacyl-ACP par l'intermédiaire de la voie de biosynthèse des acides gras (carboxylation de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA, ensuite transformé en malonyl-ACP ; condensation avec un acyl-CoA en 3-ketoacyl-ACP ; réduction en R-3-hydroxyacyl-ACP) (Figure 4.c) (Janßen & Steinbüchel, 2014). L'enzyme permettant l'utilisation comme monomère du R-3-hydroxyacyl-ACP est PhaG, une 3-hydroxyacyl-acyl carrier protein-CoA transférase, dont le produit de réaction est donc le R-3-hydroxyacyl-CoA (Rehm *et al*, 1998). Ce dernier pourra être incorporé à la réaction de polymérisation catalysée par PhaC, pour la génération de PHA-mcl. Cette voie a été montrée comme fonctionnelle chez *Pseudomonas fragi*, en coexprimant *phaG* et *phaC1* de *Pseudomonas aeruginosa*. Elle a permis la production, exclusivement à partir de gluconate, de 14 % du poids sec des cellules de PHA constitué de 3-hydroxydecanoate, 3-hydroxyhexanoate, 3-hydroxyoctanoate, 3-hydroxydodecanoate, 3-hydroxydodecenoate et 3-hydroxytétradecanoate (Fiedler *et al*, 2000).

#### d. Voie simplifiée : PCT/PHA synthase

La biosynthèse de PHA a été au fil du temps rendue possible avec des monomères non canoniques, permettant leur homo- et copolymérisation. Ceci est possible grâce à l'expression dans les cellules d'une propionyl-CoA transférase (ou acétyl-CoA transférase, ci-après dénommée PCT), catalysant la génération d'hydroxyacyl-CoA à partir dudit



**Figure 4 :** a., b., c., voies naturelles de production de PHA. d., voie synthétique de production de PHA. Les sources de carbone et substrat à la biosynthèse de PHA, supplémentés dans le milieu, sont en gras. Acyl-ACP, etc. : protéine porteuse d'acyle (Acyl Carrier Protein) ; PhaA β-kéthiolas ; PhaB (R)-3-hydroxybutyryl-CoA déshydrogénase ; PhaC PHA synthase (polymérase) ; PhaG 3-hydroxyacyl-acyl carrier protein-CoA transférase ; PhaJ 2-enoyl-CoA hydratase ; PhaI 2-enoyl-CoA hydratase (R)-spécifique ; PCT propionyl-CoA transférase.

hydroxyacide et d'acétyl-CoA (ou propionyl-CoA) (Selmer *et al*, 2002). Le dérivé CoA ainsi produit peut être utilisé pour la polymérisation par une PHA synthase (Figure 4.d). Cette voie a été testée avec succès *in vitro*, avec la PCT purifiée de *Clostridium propionicum* et PhaC de *Chromatium vinosum*, en présence de 3HB et d'acétyl-CoA. Ce système a permis l'agrégation de granules de P(3HB) *in vitro* (Jossek & Steinbüchel, 1998). Cette voie de biosynthèse a ensuite été exprimée chez *E. coli*. Différents gènes de PCT (*prpE* de *Salmonella enterica*, et *orfZ* de *Clostridium kluyveri*) ont été clonés en tandem avec l'opéron *phaCAB* de *Ralstonia eutropha* sur des plasmides, testés ensuite dans une souche sur un milieu LB supplémenté avec 1 % de 3-hydroxypropionate. Dans ces conditions, les cellules avaient pu accumuler 11 % du poids sec pour les cellules exprimant *prpE* et 7 % pour celles exprimant pour *orfZ* de P(3HP-co-3HB), contenant respectivement 89 et 91 % de 3HP. En comparaison, la souche exprimant uniquement l'opéron *phaCAB* n'avait accumulé que 7 % du poids sec des cellules de PHA, qui contenait moins de 0.05 % de 3HP (Valentin *et al*, 2000).

Ces résultats ont ensuite été approfondis, avec l'utilisation d'autres PCT pour l'activation d'autres monomères, et surtout avec l'ingénierie de PHA synthase de différents organismes, qui s'avère être l'enzyme déterminante pour la polymérisation de PHA *in vivo*.

#### 1.4 La PHA synthase, l'enzyme clef de la polymérisation *in vivo* de PHA

La PHA synthase (PhaC) est l'enzyme essentielle à la biosynthèse de PHA puisqu'elle catalyse la polymérisation du monomère activé (hydroxyacyl-CoA) en PHA. Elle conditionne également la composition du PHA, selon son affinité pour les monomères disponibles, ce qui aura un impact direct sur la qualité et les propriétés du PHA. En fonction de leur spécificité de substrat et la composition de leurs sous-unités, les PhaC sont catégorisées en quatre classes : les classes I, II, III, et IV. Brièvement, les classes I, III et IV auront tendance à synthétiser des PHA-scl, et la classe II des PHA-mcl ; les PhaC de classe I et II ne sont constituées que d'une seule unité alors que celles des classes III et IV sont constituées de deux sous-unités, PhaC et PhaE pour la classe III et PhaC et PhaR pour la classe IV. Enfin la poche catalytique des PhaC de classe II contient plusieurs domaines conservés avec celles de la classe I (Rehm, 2003). Ainsi, les polymérasés des différents organismes naturellement producteurs de PHA ont pu être classifiées (Zher Neoh *et al*, 2022). Par exemple, les PhaC bien étudiées de *Ralstonia eutropha* ou celle d'*Aeromonas caviae* sont des polymérasés de classe I, alors que celle de *Pseudomonas* sp. 61-3 est catégorisée dans la classe II.

L'utilisation des PHA comme alternative viable aux polymères d'origine pétrochimique étant principalement limitée par les caractéristiques physico-chimiques du P(3HB), des efforts d'ingénierie enzymatique ont été menés sur les PhaC, dans l'optique d'améliorer l'accumulation de PHA, leur poids moléculaire et modifier leur promiscuité de substrat pour diversifier la composition de leurs monomères (Rehm, 2003), notamment avec des 2HA (lactate, glycolate, 2-HB), ce qui était possible avec la PHA synthase de *Ralstonia eutropha*, mais très peu fonctionnel (Han *et al*, 2011). Une technique majeure de génération de mutants est l'évolution *in vitro*, grâce par exemple à la PCR sujette aux erreurs (Taguchi *et al*, 2001), la mutagenèse de type suppressive (Taguchi *et al*, 2002), ou la mutagenèse saturante site-spécifique (Tsuge *et al*, 2004). Ainsi, la PhaC de classe II de

*Pseudomonas* sp. 61-3 (PhaC<sub>Ps</sub>) a été mutée en deux positions, par mutagenèse saturante, pour obtenir le variant PhaC<sub>Ps</sub> S325T Q481K (PhaC<sub>STQK</sub>). Ce mutant a permis une augmentation de l'accumulation de P(3HB) de 400 % en comparaison de l'enzyme sauvage. Étant une PhaC de classe II, donc adaptée à l'utilisation de monomères mcl, ces résultats indiquent que les mutations S325T et Q481K portées par la PhaC<sub>Ps</sub> rendent l'enzyme intermédiaire entre les classes I et II en matière de spécificité de substrat, puisque le 3HB est un monomère de type scl (Taguchi & Doi, 2004). Ceci a été confirmé par l'utilisation de ce même variant dans la biosynthèse de P(3-hydroxybutyrate-*co*-lactate) (Taguchi *et al*, 2008a), ou de P(glycolate-*co*-3-hydroxyalkanoates) et P(lactate-*co*-3-hydroxyalkanoates) (Matsumoto *et al*, 2011), entre autres.

La construction d'enzymes chimères est un autre outil permettant l'ingénierie de nouvelles enzymes. Une enzyme chimère est une fusion de deux ou plusieurs enzymes, exposant certaines caractéristiques de chacune des enzymes parentales. Cette méthode a été utilisée pour générer une PhaC chimère de *Ralstonia eutropha* (PhaC<sub>RE</sub>) et *Aeromonas caviae* (PhaC<sub>AC</sub>), deux PhaC décrites respectivement comme particulièrement efficace pour la polymérisation (Slater *et al*, 1988), et ayant une spécificité de substrat large, notamment pour les plus gros monomères scl (4 à 6 carbones) (Fukui & Doi, 1997). La chimère (PhaC<sub>AR</sub>) constituée de 26 % de la séquence N-terminale de PhaC<sub>AC</sub> et de 74 % de la séquence C-terminale de PhaC<sub>RE</sub> a permis une accumulation de P(3HB) comparable aux enzymes parentales, mais a surtout permis une accumulation de copolymère-mcl plus importante et plus diversifiée que les enzymes parentales : 50 % du poids sec des cellules (40 % au mieux pour PhaC<sub>AC</sub>), constitué de 3-hydroxybutyrate, 3-hydroxyhexanoate et de traces de 3-hydroxyoctanoate (Matsumoto *et al*, 2009). Une autre étude a pu obtenir des copolymères de 2- et 3-hydroxybutyrates (après activation directe des monomères fournis dans le surnageant par une PCT de *Megasphaera elsdenii* (PCT<sub>ME</sub>)), démontrant l'élargissement des substrats possibles pour la polymérisation *in vivo* par cette chimère (Sato *et al*, 2022).

Le DHB, un monomère scl, hydroxylé en carbone 2 et 4, est donc un substrat au premier abord non utilisable pour la biosynthèse de PHA, notamment du fait que les PHA synthases sont spécifiques des 3-hydroxyalkanoates. Toutefois, l'ingénierie réalisée sur ces enzymes a permis d'élargir le panel de monomères employables pour l'homo- et la copolymérisation de monomères aux chaînes carbonées plus ou moins longues en comparaison du 3HB, mais surtout hydroxylés en d'autres positions qu'à la position canonique, sur le carbone β.

## 1.5 Variété de biosynthèses des PHA grâce aux diverses PHA synthases existantes

### a. Copolymères de 3-hydroxyalkanoates

Le plus étudié de ces PHA-scl est le P(3-hydroxybutyrate-*co*-3hydroxyvalerate) (P(3HB-*co*-3HV)). L'incorporation de 3HV rend le polymère moins cristallin, plus flexible, mais moins cassant, et améliore sa biodégradabilité, ce qui lui donne un attrait particulier pour des utilisations dans le domaine médical. Les propriétés du P(3HB-*co*-3HV) dépendent du ratio entre les deux monomères, une augmentation de la proportion en 3HV

dans le polymère diminuant par exemple la température de fusion du polymère (Bossu *et al*, 2020).

Un autre exemple de copolymère de 3HB largement étudié est celui du P(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyhexanoate) (P(3HB-*co*-3HHx)), constitué de 3HB et de l'alcanoate *mcl* 3-hydroxyhexanoate. De la même manière que pour l'incorporation de 3HV, l'incorporation de 3HHx abaisse la température de fusion du polymère, sa cristallinité, mais augmente la résistance à l'étirement du polymère. Enfin, ce copolymère est décrit comme biodégradable, plus rapidement que le P(3HB), en raison de son caractère moins cristallin (Doi *et al*, 1995; Morse *et al*, 2011). Grâce à cela, en plus de sa malléabilité, il représente un attrait pour les industries, et notamment la production d'emballage à usage unique.

D'autres copolymères, plus complexes, ont également été synthétisés, avec par exemple le P(3HB-*co*-3HV-*co*-3HHx) (Bhubalan *et al*, 2010), ou le P(3-Hydroxybutyrate-*co*-4-Hydroxybutyrate-*co*-3-Hydroxyvalerate) (Kucera *et al*, 2019). Un quaterpolymère a même pu être biosynthétisé, le P(3-hydroxyvalérate-*co*-3-hydroxyoctanoate-*co*-3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyhexanoate) (Schmack *et al*, 1998). Toutes ces déclinaisons montrent la multiplicité existante des PHA, et notamment la possibilité de les enrichir avec des acides organiques plus longs, ou hydroxylés en d'autres carbones que classiquement décrit (carbone 3 ( $\beta$ )).

#### b. (co)Polymères d'alcane 2- ou 4-hydroxylés ( $\alpha$ ou $\gamma$ hydroxylés)

Bien que les 3-hydroxyalcanoates aient été les premiers monomères permettant la synthèse de PHA, la possibilité d'utiliser d'autres hydroxyacides n'est pas exclue. Le 4-hydroxybutyrate (4HB) peut par exemple être utilisé dans la synthèse d'homopolymère P(4HB), grâce à l'ajout dans le milieu de 4HB et à la co-expression de la PCT de *Clostridium kluyveri*, et de *phaCRE* (Hein *et al*, 2006) ou de copolymère P(3HB-*co*-4HB), dans de nombreux cas par l'intermédiaire des mêmes enzymes (Huong *et al*, 2021). Ces deux polymères présentent toutefois des caractéristiques différentes, mais ils sont biocompatibles et biodégradables, donc tout à fait utilisables dans le domaine biomédical (Mitra *et al*, 2021).

De la même manière, des copolymères d'acide lactique (LA) avec du 3HB (Taguchi *et al*, 2008a) ou du 2-hydroxybutyrate (2HB) (Matsumoto *et al*, 2013) ont été biosynthétisés. Les voies permettant leur production faisaient appel à la PCT<sub>ME</sub> et PhaC<sub>STQK</sub>. Le P(LA-*co*-3HB) ainsi synthétisé contenait 6 % de LA, diminuant la température de fusion en comparaison du P(3HB), mais ouvrant la porte à la biosynthèse d' homo- et copolymères de LA, jusqu'alors synthétisé chimiquement uniquement. D'autre part, le P(2HB-*co*-LA), constitué à 86 % de 2HB, présente des caractéristiques à mi-chemin entre celles du PLA (dur, cassant à l'étirement), et celles du P(2HB) (biosynthétisé par la même voie que le P(2HB-*co*-LA), qui est remarquablement pliable et étirable.

Les monomères constituant les polymères présentés jusqu'à maintenant sont tous des acides organiques monohydroxylés. Comme vu précédemment, l'intégration de chaînes secondaires fonctionnelles permettrait à ces polymères d'améliorer certaines de leurs propriétés, en particulier leur hydrophilie, dans l'optique de biosynthétiser des polymères bien plus intéressants pour le domaine biomédical que ceux vus jusqu'ici.



### c. PHA à monomères dihydroxylés

Je n'ai identifié que deux publications rapportant des polyesters biosynthétisés et incorporant des acides dicarboxyliques, chez *Ralstonia* ou *E. coli*. Chez *E. coli*, la production du copolymère à partir de glycolate ajouté dans le milieu a pu être établie grâce à l'expression de : la PCT<sub>ME</sub>, qui active le substrat, le glycolate en glycoyl-CoA ; la  $\beta$ -ketothiolase (*bktB*) de *Ralstonia eutropha*, catalysant la condensation du glycoyl-CoA et d'un acétyl-CoA pour produire du 2- ou 4-hydroxy-3-keto-butryl-CoA ; la PhaB1 (*Ralstonia eutropha*), dans le but de réduire ces deux derniers composés en 2,3-DHB-CoA et 3,4-DHB-CoA respectivement ; la PhaC<sub>RE</sub>, catalysant la polymérisation des deux dihydroxyacides activés. Chez *Ralstonia eutropha*, seule l'expression de la PCT<sub>ME</sub> était nécessaire pour produire du copolymère. Toutefois, seul le copolymère P(3HB-co-3HV-co-2,3-DHB) a pu être obtenu, entre 1 et 13 % du poids sec des cellules, et présente de très faibles concentrations de co-substrat (1% 3HV, 1-3% 2,3-DHB), selon l'organisme hôte et la source de carbone utilisée. Les auteurs suspectent un flux favorisé pour le 3HB en comparaison des autres monomères (Insomphun *et al*, 2016, 2017). Une particularité notable de ce PHA concerne l'intégration du monomère 2,3-DHB : le monomère suivant dans la chaîne peut être incorporé par l'intermédiaire de l'hydroxyle présent en carbone  $\alpha$  ou en carbone  $\beta$ . Les auteurs ont identifié que la polymérisation avec ce monomère avait tendance à se faire par l' $\alpha$ -hydroxyle, générant de ce fait un PHA-vscl (très courte chaîne), de deux carbones par monomère. Bien que la PhaC<sub>RE</sub> accepte ce genre de monomères (Han *et al*, 2011), elle n'est pas classiquement employée pour la biosynthèse de PHA à partir de 2-HA. L'utilisation d'enzymes capables d'utiliser à la fois des 2- et 3-HA, comme la PhaC<sub>STQK</sub>, pourrait certainement pallier cette problématique et permettre l'enrichissement du polymère en 2,3-DHB.

En résumé, ces résultats indiquent la possibilité d'étendre la gamme de HA utilisables comme monomères pour la biosynthèse de PHA, grâce à la multiplicité des PCT disponibles et à la construction de PHA synthases modifiées. Des monomères partageant des caractéristiques avec le DHB (2HB, 4HB, 2,3-DHB, LA) ayant déjà pu être utilisés pour la biosynthèse de nouveaux PHA, le DHB devient de ce fait un candidat intéressant pour la biosynthèse de nouveaux polymères aux caractéristiques inédites.

## IV. Objectifs de la thèse

Les objectifs de cette thèse sont multiples. Il s'agira dans un premier temps d'étudier de quelle manière *E. coli* peut assimiler le DHB : par quel moyen les cellules peuvent importer le DHB dans le cytoplasme, et quelles voies métaboliques alternatives peuvent intervenir dans son assimilation. Cette identification a été effectuée de manière génétique dans un premier temps, avant d'être confirmée *in vitro*. Le développement d'un outil permettant de signaler la présence de DHB ou d'un des produits de sa dégradation sera abordé. J'aborderai aussi les possibilités qu'un tel outil pourrait permettre, soit dans le cadre de l'identification de voies d'assimilation du DHB, soit pour servir d'autres buts biotechnologiques.

J'ai également été amené à travailler sur la production biotechnologique de D-DHB. En effet, la spécificité des PHA synthases pour les monomères de type D- a questionné la

possibilité d'intégrer une voie de production de P(DHB) à une souche productrice de L-DHB. Mais la présence de D-DHB en faible quantité (5 %) dans les productions fermentaires de DHB a soulevé la question de la possibilité de production de cet énantiomère par des enzymes présentes chez *E. coli*, et sera approfondie par l'utilisation d'enzymes exogènes.

Enfin, la possibilité pour *E. coli* de polymériser le DHB par l'intermédiaire d'une PCT et d'une PHA synthase a été investiguée. Cet objectif m'a amené à étudier dans le même temps la manière de caractériser le P(DHB) et de confirmer sa production *in vivo*, avant de pouvoir tester la faisabilité de biosynthèse d'un tel polymère.

# Résultats et discussion

## Chapitre 1 : Voies métaboliques d'assimilation du DHB

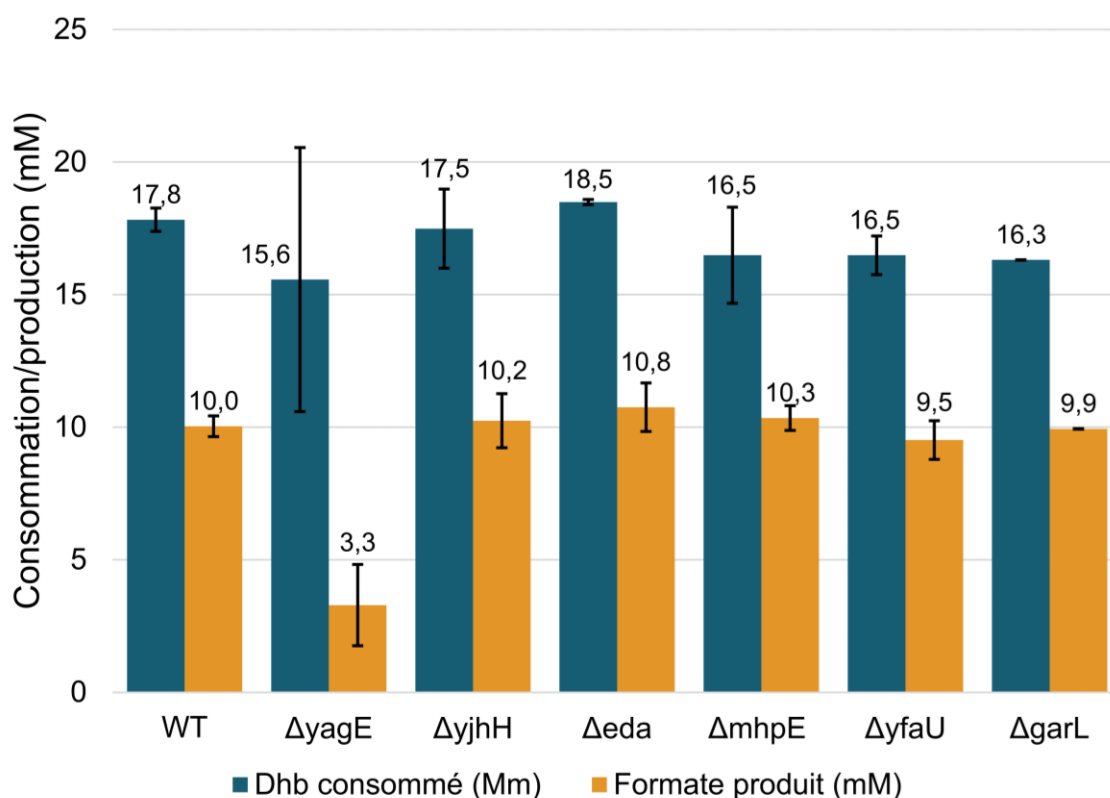
Comme nous l'avons vu, la promiscuité de substrat que possèdent certaines enzymes, en l'occurrence celles d'*E. coli*, permet d'une part une ingénierie facilitée pour la production de molécules non naturelles comme le DHB, mais permet également à ces molécules d'être métabolisées par des mécanismes qui sont alors non annotés dans la littérature. Une attention particulière doit donc être observée concernant ces molécules non naturelles. Ceci fait l'objet de ce premier chapitre. J'ai mis en évidence la première étape essentielle à l'assimilation du DHB, son oxydation en OHB par des lactate déshydrogénases, ainsi que la réaction suivante de clivage par des aldolases, menant à la production finale de formate. Enfin, j'ai pu identifier un transporteur de DHB permettant son import dans le cytoplasme des cellules.

### I. Clivage de l'OHB en pyruvate et formaldéhyde

Une culture d'*E. coli* substr. K12 MG1655 (ci-après Sauvage (WT)), mise en culture dans un milieu M9 Xylose 2 g/L et supplémenté avec 50 mM d'un racémique de DHB (mélange de 50 % de D-DHB et 50 % de L-DHB, obtenu chimiquement à partir de 2-hydroxy-4-méthylthiobutryate (Henryon & Monbrun, 2012), et fourni par Adisseo), m'a servi de point de départ à l'étude du catabolisme du DHB par cette bactérie. J'ai privilégié l'utilisation de xylose comme source de carbone plutôt que le glucose afin d'éviter une éventuelle répression catabolique qui aurait retardé l'assimilation du DHB. Après analyse des acides organiques (HPLC, voir Matériel et méthodes) présents dans le surnageant au début et à la fin de la culture, j'ai d'abord constaté que la concentration initiale en DHB avait diminué de 17.8 mM, soit une réduction de 35.6 %, après 96 h de culture, et qu'une quantité significative de formate (10 mM, soit 56 % de la quantité de DHB assimilée) avait été produite (Figure 5). Dans une culture sans DHB, aucune présence de formate ne pouvait être remarquée. Je me suis donc interrogé sur la voie employée par la cellule pour transformer le DHB en formate. En me basant sur d'anciens travaux, j'ai émis l'hypothèse que le formate pourrait provenir non pas du DHB, mais de l'OHB (Hift & Mahler, 1952; Bouzon *et al*, 2017; He *et al*, 2020). Car à l'instar du DHB, l'OHB est également une molécule non naturelle pour *E. coli*, et son devenir dans les cellules est également inconnu, et les interactions avec des enzymes aux promiscuités de substrats larges sont des possibilités à prendre en compte. En effet, *in vivo* et dans la voie homosérine, le DHB provient de la réduction de l'OHB par une Mdh modifiée (Frazão *et al*, 2018a), réaction qui n'est pas réversible *in vivo*. En revanche, l'hypothèse avait été émise que le DHB, tout comme le lactate, pourrait être oxydé en OHB par des enzymes de type lactate déshydrogénase (Frazão *et al*, 2019) (voir section II de ce chapitre). D'autre part, l'OHB est employé comme intermédiaire dans l'assimilation de C1 comme le méthanol : le méthanol est d'abord oxydé en formaldéhyde, qui peut ensuite être condensé avec une molécule de pyruvate en OHB (Hift & Mahler, 1952), avant de poursuivre son assimilation par le biais d'une aminotransférase qui le transformera en homosérine (sens inverse de la

voie de production *via* l'homosérine, Figure 3). Le génome d'*E. coli* compte à ce jour sept gènes connus dont les enzymes ont été testées pour leur capacité à catalyser cette réaction (*yfaU*, *yjhH*, *yagE*, *eda*, *garL*, *mhpE*, *dgoA*). Quatre d'entre elles ont montré la possibilité de catalyser la condensation du pyruvate et du formaldéhyde en OHB *in vivo* (He *et al*, 2020). La possibilité de catalyser cette réaction dans le sens inverse, donc de l'OHB vers le pyruvate et le formaldéhyde est alors à investiguer. Le pyruvate pourrait être redirigé dans le métabolisme carboné central de la cellule, alors que le formaldéhyde, qui est un composé toxique pour les cellules, sera pris en charge par le système de détoxification glutathion-dépendant des cellules, codé par *frmRAB* (Gutheil *et al*, 1992; Gonzalez *et al*, 2006). Il en résultera ainsi du formate qui sera retrouvé dans le surnageant de culture.

Par ailleurs, des résultats de transcriptomiques indiquent que lors de la production de DHB par fermentation, en comparaison d'une souche non productrice, les gènes *yagE* et *yjhH* sont surexprimés. Cette surexpression va de 1.82 à 13.33 fois l'expression en condition non productrice de DHB pour *yagE*, et de 1.25 à 3.33 fois pour *yjhH* (Malfoy *et al*). Les produits de la réaction du clivage de l'OHB étant de plus immédiatement utilisés dans le métabolisme carboné central ou pris en charge par un système de détoxification, elle paraît également physiologiquement plus favorable. Ces informations combinées permettent de penser que la réaction de clivage serait bien possiblement catalysée par une de ces aldolases au moins.

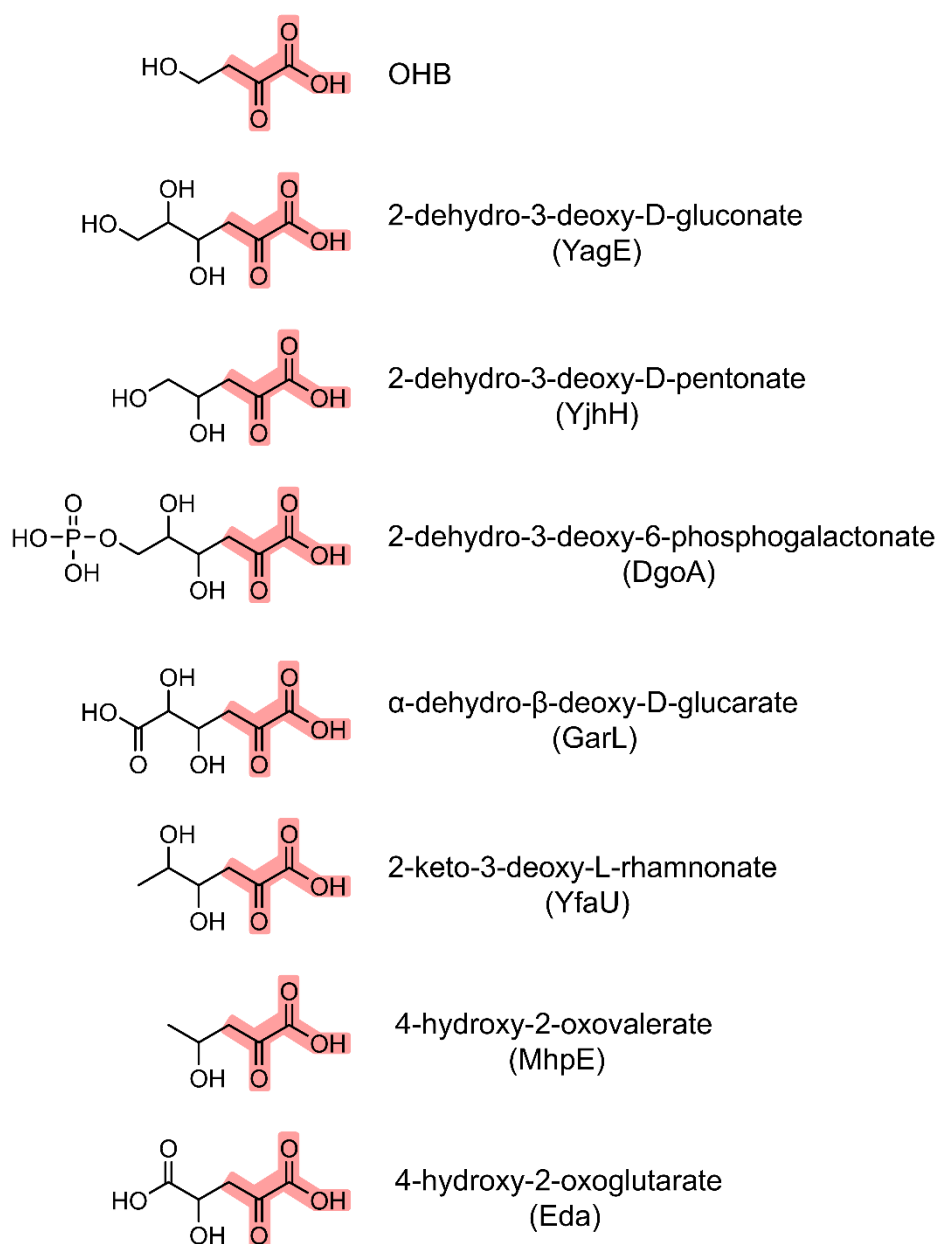


**Figure 5 :** Consommation de DHB et production de formate ( en mM) en fonction des souches d'*E. coli* mutantes pour différentes aldolases, après 96h d'incubation dans un milieu M9 xylose 0.2 % et DHB 50 mM. WT : souche sauvage

## 1. Caractérisation *in vivo*

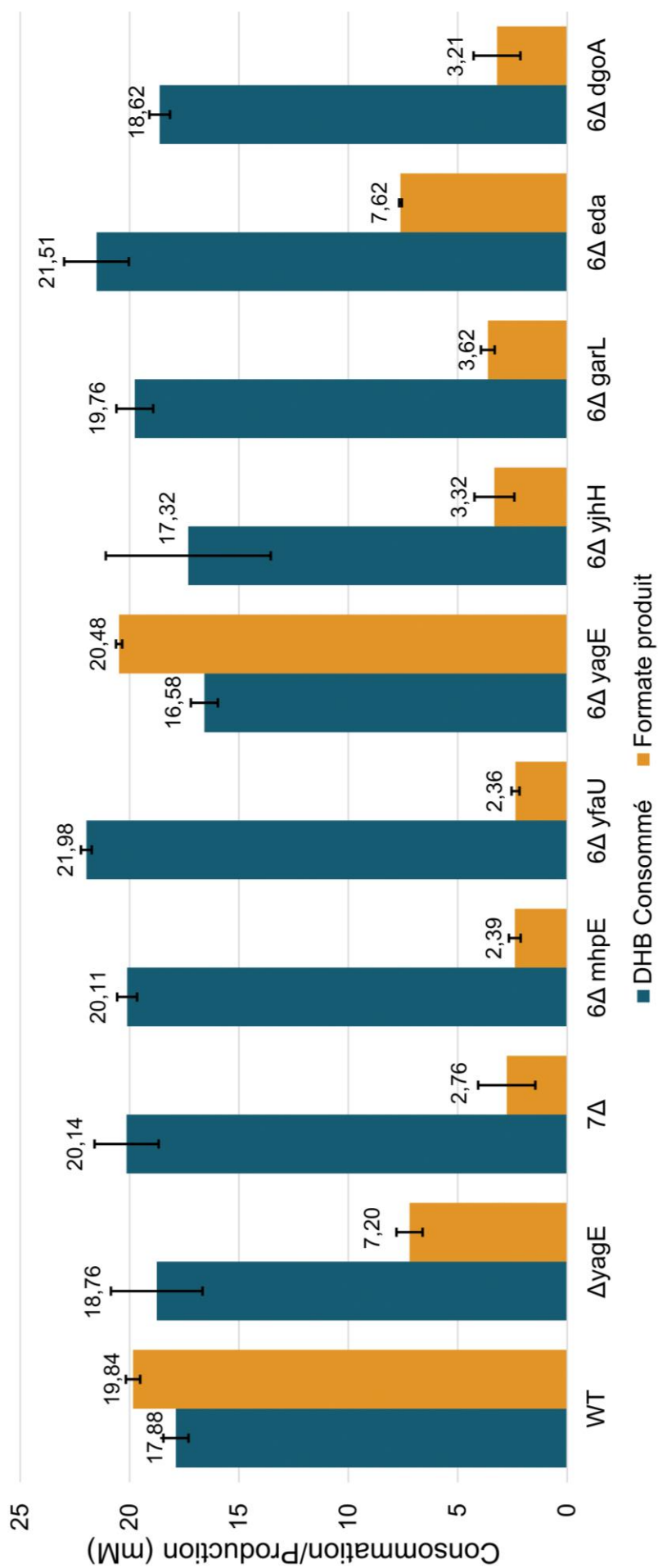
J'ai décidé dans un premier temps de tester ces sept aldolases pyruvate-spécifiques de manière génétique en observant le phénotype des souches délétées de six des gènes

codants pour ces enzymes : *yfaU*, *yjhH*, *yagE*, *eda*, *garL*, *mhpE*. La délétion de *dgoA* n'a pas été immédiatement testée, en raison d'une différence de substrat naturel (le 2-dehydro-3-deoxy-6-phosphogalactonate, composé de six carbones et d'un phosphate) très prononcée avec l'OHB (quatre carbones) (Figure 6). Les délétions de ces gènes ont été obtenues par transduction de lysat de phage P1 (voir Matériel et méthodes).



**Figure 6** : Les différents substrats utilisés dans les réactions catalysées par les aldolases pyruvate-spécifiques identifiées. Le pyruvate résultant de la réaction de clivage est indiqué en surbrillance.

Cinq des 6 souches mutantes pour une des aldolases proposées ont montré les mêmes concentrations de DHB consommé, entre 16.3 et 18.5 mM, et de formate produit, entre 9.9 et 10.8 mM, que la souche sauvage après 96 h de culture dans les mêmes conditions. Seule la délétion de *yagE* a permis d'observer des différences de consommation de DHB et de production de formate avec la souche sauvage (Figure 5). La délétion de *yagE* n'a pas impacté l'assimilation de DHB, qui est restée similaire à celle de la souche sauvage (15.6 mm et 17.8 mM respectivement), mais a conduit à une diminution de la production de formate de 10 à 3.3 mM, soit une diminution de 67 %.



**Figure 7** : Consommation de DHB et production de formate (en mM) en fonction des souches d'*E. coli* mutantes pour différentes aldolases, après 96 h d'incubation dans un milieu M9 xylose 2 g/L et DHB 50 mM. WT : souche sauvage ; 7Δ : souches délétees des 7 aldolases indiquées ; 6Δ : souche délétee des six autres aldolases que celles identifiées.

Cette observation indique qu'il est effectivement possible qu'une aldolase, en l'occurrence YagE, puisse catalyser la réaction du clivage de l'OHB en pyruvate et formaldéhyde, amenant par la suite à la présence de formate. La concentration résiduelle de formate pourrait être due à l'activité d'une des autres aldolases, dont la délétion seule ne permettrait pas d'en voir les effets, probablement compensés par l'activité de YagE. J'ai donc continué cette investigation avec la délétion des sept aldolases identifiées dans la même souche d'*E. coli* (7Δ). Ces délétions ont permis de produire moins de formate que la souche Δ*yagE* (2.8 mM contre 7.2 mM), soit une diminution de 86 % avec la souche sauvage, dont la production de formate était étonnamment haute (Figure 7). Cette forte production (19.84 mM produit contre 10 mM pour la souche sauvage, entre les expériences résumées en Figures 5 et 7) pourrait très probablement être due à la présence accidentelle dans la préculture effectuée en milieu M9, de DHB, ce qui pourrait avoir eu comme conséquence d'exprimer de manière prématurée les gènes impliqués dans l'assimilation du DHB. Au moins une des autres aldolases doit alors jouer un rôle dans la conversion de l'OHB en pyruvate et formaldéhyde. J'ai donc poursuivi en ne laissant qu'une seule des sept aldolases présentes dans le génome d'*E. coli*, ce qui permet d'identifier les gènes dont la présence ne serait pas bénéfique pour la production de formate. La Figure 7 illustre ces résultats : la présence individuelle de *mhpE*, *yfaU*, *yjhH*, *garL* ou *dgoA* n'a pas semblé avoir d'impact sur la production de formate à partir d'OHB. *A contrario*, la présence de *yagE* permet de rétablir le phénotype de la souche sauvage, indiquant que cette enzyme occupe une place prépondérante dans la production de formate. Il semble qu'*eda* joue aussi un rôle, cependant moins important (production de 7.6 mM de formate contre 19.8 pour la souche sauvage).

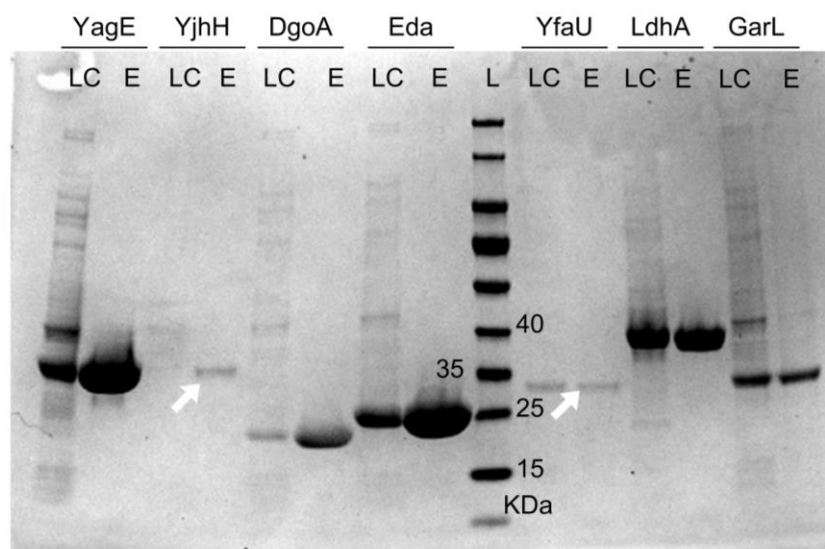
Malgré la suppression des gènes exprimant les principales enzymes suspectées d'intervenir dans le clivage de l'OHB, les cellules étaient toujours en capacité de consommer du DHB d'une part, et à produire du formate d'autre part. La présence de formate, même après la délétion de toutes les aldolases pyruvate-spécifiques identifiées, pourrait être expliqué par une enzyme encore non identifiée pouvant utiliser l'OHB comme substrat. Quant au fait que les cellules sont toujours capables de consommer le DHB alors qu'elles ne produisent presque plus de formate, cela indique très clairement que d'autres voies ayant l'OHB comme substrat de base existent.

## 2. Caractérisation *in vitro*

Les aldolases pyruvate-spécifiques ont également été testées *in vitro*, avec l'OHB comme substrat. Les gènes codant pour les enzymes testées ont été clonés dans un plasmide pET28, et les plasmides correspondants transformés dans des cellules d'*E. coli* BL21 (DE3). Les cellules ont été mises en culture dans un milieu LB + Kanamycine (50 µg/mL) jusqu'à l'obtention d'une DO<sub>600</sub> de 0.5-0.6. L'expression des aldolases a alors été induite avec 1 mM d'isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), avant de replacer les cultures à 37°C pendant 4 h. Les enzymes ont été extraites des culots cellulaires (sonication), puis purifiées par affinité grâce à l'étiquette histidine présente à l'extrémité N-terminale des enzymes, sur une colonne de résine de cobalt (His SpinTrap, Cytiva). La taille des enzymes purifiées a été vérifiée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE), et a également permis d'estimer la

pureté de l'enzyme (ImageLab, BioRad) (Figure 8). Les tests ont été réalisés en présence d'OHB, de NADH (0.2 mM) et de 20 µg/mL de lactate déshydrogénase (LdhA, *E. coli*) dans un tampon HEPES 50 mM, KCl 50 mM et MgCl<sub>2</sub> 5 mM, pH 7.5. LdhA est une D-lactate déshydrogénase naturelle chez *E. coli*, qui catalyse la conversion du pyruvate en D-lactate, mais n'est pas active sur l'OHB. La diminution de l'absorbance du NADH à 340 nm lors de la réduction du pyruvate issu du clivage de l'OHB en lactate par LdhA a pu être suivie en temps réel. Au vu des résultats obtenus *in vivo*, je n'ai pas considéré utile de caractériser l'activité de MhpE sur DHB, car elle nécessitait une co-purification avec MhpF pour être soluble (Lee *et al*, 2006).

Les résultats des caractérisations des six aldolases sont synthétisés dans le tableau 1. Ils montrent que YagE et YjhH présentent les meilleures affinités ( $K_m = 0.36$  mM et 0.45 mM respectivement) et une activité sur OHB, bien que la plus active soit YfaU ( $k_{cat} = 0.45$  s<sup>-1</sup>). En revanche, Eda s'est avérée complètement inactive sur l'OHB tandis que l'activité de GarL était tout juste mesurable. L'écart-type entre mesures indépendantes étant assez important pour GarL, on peut conclure que cette enzyme est aussi inactive sur l'OHB.



**Figure 8** : Gel SDS-PAGE obtenu pour les aldolases et LdhA purifiées. LC : lysat clair, E : enzyme. Les flèches blanches indiquent les bandes d'inérêt.

**Tableau 1** : Constantes enzymatiques calculées sur les différentes enzymes suspectées d'exercer une activité aldolase sur l'OHB.

	Km (mM)	Vmax (µmol.mn-1.mg-1)	Kcat (s-1)	Kcat/Km (s-1.M-1)
YagE	0.36 ± 0.0014	0.73 ± 0.15	0.1 ± 0.02	291 ± 57
YjhH	0.45 ± 0.1	0.37 ± 0.07	0.05 ± 0.01	116.9 ± 2.5
YfaU	2.5 ± 0.9	2.7 ± 0.8	0.45 ± 0.13	181.7 ± 9.3
DgoA	3.2 ± 0.7	0.04 ± 0.01	0.005 ± 0.001	1.69 ± 0.02
GarL	3.5 ± 2.3	0.03 ± 0.04	0.003 ± 0.003	1.35 ± 1.73
Eda	>20	nd	nd	nd

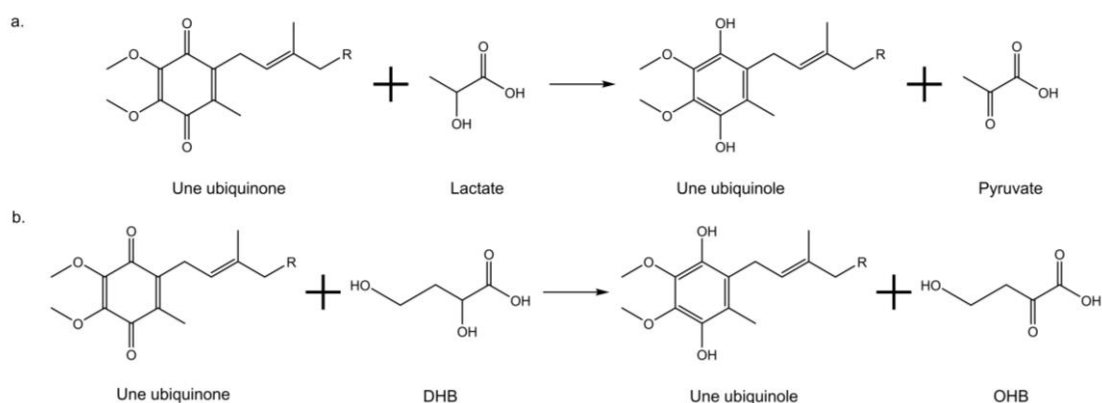


Les données cinétiques des aldolases doivent être mises en relation avec les données de production de formate *in vivo*. Ces dernières indiquent un rôle prépondérant de YagE alors que les données cinétiques indiquent que c'est YfaU qui est la plus active, ce qui est en accord avec des travaux employant cette enzyme pour la biosynthèse d'OHB *in vivo* (Hernandez *et al*, 2017; He *et al*, 2020) ou *in vitro* (Moreno *et al*, 2023) à partir de pyruvate et de formaldéhyde. Cependant, deux données suggèrent que YfaU n'est sans doute que très peu impliquée dans le clivage de l'OHB. D'une part, elle montre une affinité pour l'OHB 7 fois inférieure par rapport à YagE, et d'autre part, l'expression de *yagE* est fortement augmentée en présence de DHB, alors que *yfaU* ne l'est pas (bien que cette dernière donnée vienne de l'analyse transcriptomique d'une souche productrice de DHB, et pas des analyses d'incubation d'*E. coli* en présence de DHB présentées ici). Les niveaux d'expression des gènes exprimant ces enzymes pourraient être vérifiés dans les conditions d'assimilation du DHB, par qRT-PCR ou par analyse globale du transcriptome.

Enfin, si l'OHB clivé mène à la production de formate, il doit nécessairement provenir du DHB fourni aux cellules. La conversion de l'OHB vers le DHB a déjà été démontrée dans des voies de biosynthèse, mais la réaction d'oxydation du DHB pour produire de l'OHB n'a pas encore été prouvée, et son origine doit être mise en lumière.

## II. Oxydation du DHB en OHB

L'OHB est un métabolite intermédiaire dans le catabolisme du DHB en formate. Je me suis alors demandé si sa présence pouvait être expliquée par l'oxydation du DHB. Comme le DHB est structurellement proche du lactate (Figure 9), mon attention s'est donc en premier lieu portée sur la possibilité que le DHB soit pris en charge par les lactate déshydrogénases d'*E. coli*, qui oxydent le D- et L-lactate en pyruvate. Il existe trois enzymes chez *E. coli* caractérisées comme étant des lactate déshydrogénases, bien qu'elles ne fonctionnent pas de la même façon. En premier lieu, il y a la lactate déshydrogénase cytosolique (ou LdhA), qui n'est pas capable *in vivo* de fonctionner dans le sens oxydatif (lactate vers pyruvate), car le  $\Delta G^{\text{m}}$  (en considérant m comme la valeur de l'énergie libre de Gibbs avec des concentrations de substrats et produits de 1 mM) est de  $-23.7 \text{ kJ.mol}^{-1}$  dans le sens de la réduction (eQuilibrator, (Beber *et al*, 2022)). Je me suis donc intéressé aux deux autres lactates déshydrogénases chez *E. coli*, qui ont été rapportées pour oxyder le L- ou D-lactate en pyruvate (Figure 9).



**Figure 9** : a. Réaction naturellement catalysée par les LO membranaires d'*E. coli*. b. Proposition de réaction potentiellement catalysée par ces mêmes enzymes avec le DHB comme substrat.

Ces deux enzymes, codées par les gènes *dld* (Futai, 1973), agissant sur le D-lactate, et *lldD* (Futai & Kimura, 1977) sur le L-lactate, sont localisées dans la partie cytoplasmique de la membrane plasmique. Il a été montré que Dld présente un domaine d'adhésion à la membrane, qui lui permet une adhésion électrostatique à celle-ci (Dym *et al*, 2000), mais rien n'est connu à ce jour pour LldD. Ces deux enzymes catalysent donc l'oxydation du lactate en pyruvate, en présence d'un cofacteur, en l'occurrence une ubiquinone, qui récupère les électrons et la transmet à la chaîne respiratoire, particulièrement au niveau du complexe III (cytochrome bc<sub>1</sub>) (Cox *et al*, 1970; Futai, 1973). De cette observation, il conviendrait donc plutôt d'utiliser l'appellation « lactate oxydase » (LO), pour les réactions catalysant l'oxydation du lactate.

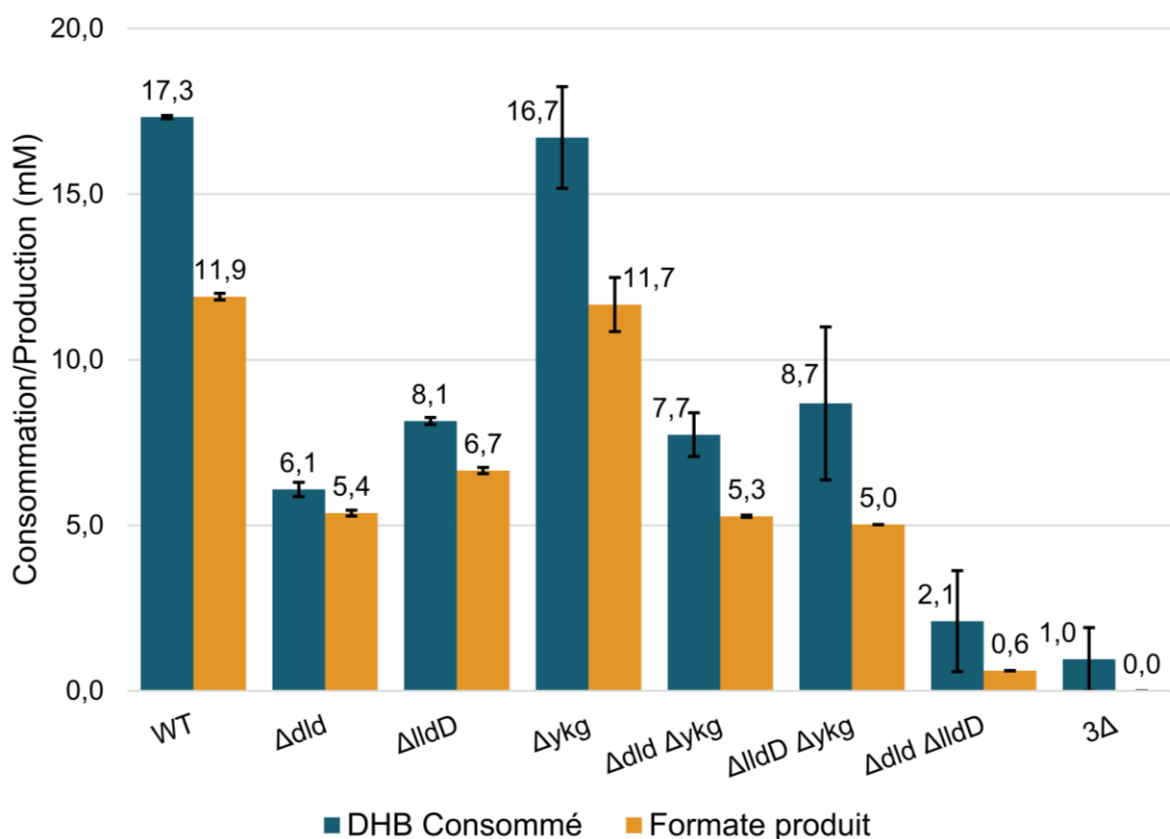
Enfin, je me suis aussi intéressé à l'opéron *ykgEFG* (*ykg*), un opéron initialement identifié chez *Shewanella oneidensis* MR-1 (Pinchuk *et al*, 2009) et rapporté pour permettre l'oxydation du L- et D- lactate (Sweeney *et al*, 2015). L'expression de cet opéron a aussi été montrée active uniquement dans les cas où les autres voies permettant l'assimilation du lactate étaient inactives (Sweeney *et al*, 2015). L'intérêt pour cet opéron réside dans le fait que lors de la production de DHB par fermentation (données non publiées), les gènes de l'opéron *ykg* sont fortement surexprimés (13.5 fois pour *ykgE*, 14.9 fois pour *ykgF*, 8.1 fois pour *ykgG*).

## 1. Une voie d'assimilation du DHB chez *E. coli* fait intervenir lactate oxydases et aldolases pyruvate spécifiques

Les souches d'*E. coli* MG1655 portant les délétions d'une ou plusieurs des LO citées ont été mises en culture en milieu M9 Xylose 2 g/L, supplémenté avec 50 mM d'un racémique de DHB. Après quatre jours d'incubation, des échantillons du surnageant des cultures ont été prélevés et analysés en HPLC pour mesurer la consommation de DHB et la production de formate, qui a été montrée dépendante de la consommation de DHB (Figure 10). Les délétions seules ou en combinaison des gènes codants les LO ont été effectuées par transduction par lysat de phage P1. Comme cette technique nécessite un certain éloignement (environ 100 kb) entre deux gènes cibles lors de suppressions cumulatives, l'opéron entier *ykgEFG* a été supprimé en une seule fois (voir Matériel et méthodes), bien qu'à ce jour, seul *ykgF* a été caractérisé *in vivo* comme codant une lactate déshydrogénase, catalysant à la fois l'oxydation du L- et D-lactate (Pinchuk *et al*, 2009; Sweeney *et al*, 2015). Sweeney et ses collègues ont aussi démontré que la délétion de *dld*, *lldD*, *ykgF*, et *gldD* (une glycolate déshydrogénase) empêchait l'utilisation de L- ou D-lactate par *E. coli*. J'ai opté pour la délétion de l'opéron entier, ce qui permet de s'affranchir de toute activité d'utilisation du lactate possiblement codée par cet opéron.

Les résultats rapportés en figure 10 montrent pour la souche sauvage une baisse de la concentration de DHB dans le milieu de 17.3 mM, partagée entre les deux énantiomères à 60 % de L-DHB et 40 % de D-DHB. La délétion de *dld* ne permet que l'assimilation de 6.1 mM de L-DHB exclusivement. La souche  $\Delta$ *lldD* n'a pu assimiler que 8.1 mM de DHB, et en quasi-totalité sous forme D- (90 %), ce qui est en accord avec les résultats obtenus précédemment (Frazão *et al*, 2019). En revanche, la délétion de *ykgEFG* ne modifie pas le profil de consommation du DHB par rapport à la souche sauvage (16.7 mM consommés à 54 % sous forme de L-DHB), ce qui est également en accord avec de

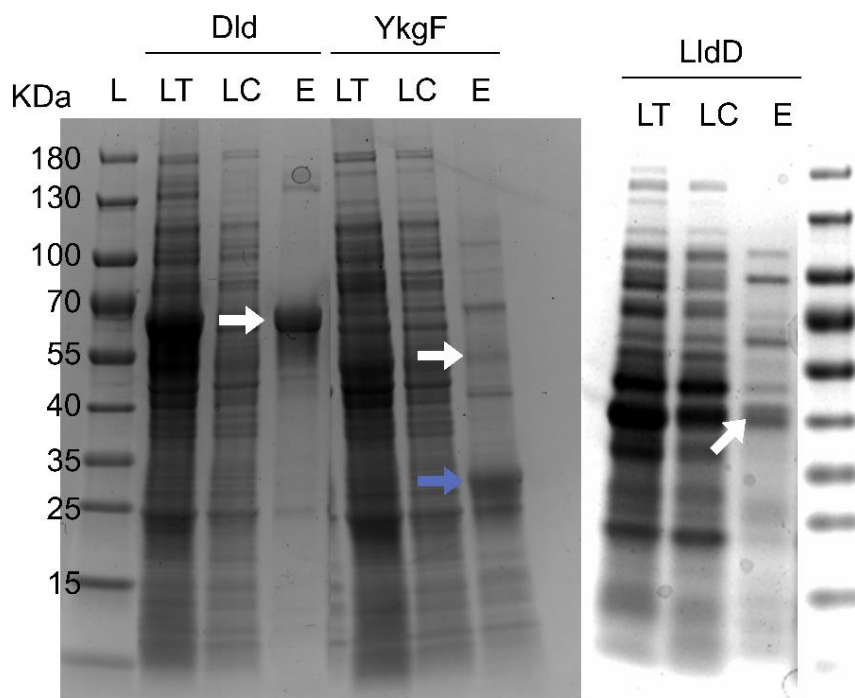
précédents résultats affirmant que cet opéron n'est exprimé qu'en absence d'autres voies d'assimilation du lactate (Sweeney *et al*, 2015). En effet, la délétion de *ykgEFG* n'impacte pas la consommation de DHB par rapport à une souche sauvage, car il n'est pas exprimé dans cette souche. Sa délétion, alors que d'autres voies permettent le catabolisme du lactate, ne fait donc aucune différence. Ceci est confirmé par la combinaison de la délétion de l'opéron *ykg* avec *dld* ou *lldD*, qui ne montre pas de différence significative sur la quantité de DHB assimilé ainsi que sur la forme D- ou L- consommée (93 % et 0 % de forme L- consommée respectivement). En revanche, la combinaison des délétions de *dld* et *lldD* montre une consommation quasi totale (96 %) de DHB. Enfin, la triple délétion des D- et L-lactate déshydrogénases ( $\Delta LO$ ) incluant l'opéron *ykg* permet une quasi-abolition de la consommation de DHB, ce qui semble indiquer que cet opéron interviendrait dans le catabolisme du DHB uniquement lorsqu'aucune autre LO n'est présente, comme cela avait été montré par Sweeney et ses collègues pour le lactate. Ces résultats montrent qu'une souche sauvage d'*E. coli* est capable d'assimiler le DHB, avec une légère préférence pour la forme L- que la forme D-DHB, qui pourrait soit être due à une meilleure efficacité des enzymes catabolisant le L-DHB, soit à une meilleure expression des gènes qui les codent. Enfin, ces résultats montrent que l'oxydation du DHB en OHB est une première étape indispensable à l'assimilation du DHB.



**Figure 10** : Consommation de DHB et production de formate (en mM) en fonction des souches d'*E. coli* sauvages et mutantes pour une ou plusieurs lactate oxydases, après 96 heures d'incubation dans un milieu M9 xylose 2 g/L, DHB 50 mM. WT : souche sauvage,  $3\Delta$  : souche délétée pour *dld*, *lldD* et l'opéron *ykg*.

## 2. Production et caractérisation des lactates déshydrogénases sur lactate et DHB

Afin de démontrer que les enzymes codées par *lldD* et *dld* agissent effectivement sur le DHB, je les ai caractérisées *in vitro* sur ce substrat. J'ai aussi voulu vérifier si les enzymes codées par *ykgE*, *ykgF* et *ykgG* étaient capables d'agir sur le DHB. Pour cela, j'ai transformé une souche d'*E. coli* BL21 DE3 avec chacun des plasmides de la collection ASKA (Kitagawa *et al*, 2006) portant ces gènes, et ai surproduit les enzymes (voir Matériel et méthodes). Brièvement, les souches exprimant les enzymes ont été mises en culture à 37°C dans un milieu riche (LB + Chloramphénicol), et la surproduction a été induite avec 0.5 mM d'IPTG lorsque la DO<sub>600</sub> a atteint 0.4-0.6, suite à quoi les cultures ont été placées à 20°C pendant 48 h. Les cultures ont été centrifugées, et les culots cellulaires utilisés immédiatement ou conservés à -20°C. Les LO ont été purifiées de la même manière que les aldolases. La taille des enzymes purifiées a été vérifiée en SDS-PAGE, ce qui a également permis d'estimer la pureté de l'enzyme (ImageLab, BioRad) (Figure 11). Les enzymes Dld et LldD surproduites ont été retrouvées en excès dans la fraction soluble, à la taille attendue de 64.6 kDa et 42.7 kDa respectivement (*cf* flèches blanches Figure 11), bien qu'elles soient reconnues pour être associées à la membrane plasmique interne des cellules (Dym *et al*, 2000). Les fractions obtenues n'étaient pas pures, mais l'estimation de la pureté de l'échantillon a pu être utilisée pour calculer les constantes enzymatiques. Pour la production de YkgF (53 kDa), on remarque une bande prononcée de la taille attendue pour celle de YkgG (25.2 kDa). Cette bande aspécifique (en bleue sur la Figure 11) a été retrouvée lors de la purification de YkgE et YkgF. Il est possible que l'expression d'un composant de l'opéron *ykg* implique l'expression de l'opéron entier présent dans le génome de la souche de production.



**Figure 11** : SDS-PAGE des différentes étapes de purification de Dld, LldD et YkgF. Les flèches blanches indiquent la bande de taille attendue, la flèche bleue indique la bande de taille attendue pour YkgG. L : échelle de taille ; LT : lysat total obtenu après sonication des culots cellulaires ; LC : lysat clair correspondant à la fraction soluble obtenue après sonication et centrifugation ; E : enzyme purifiée.

## 2.1 Activité enzymatique sur lactate

La constante de Michaelis ( $K_m$ , représentant l'inverse de l'affinité de l'enzyme), la constante de vitesse ( $V_{max}$ ) ainsi que la constante catalytique ( $K_{cat}$ ) des enzymes ont été obtenues dans le sens de l'oxydation du lactate vers le pyruvate, grâce au changement de couleur du DCPIP (2,6-dichlorophénol-indophénol), l'accepteur artificiel d'électrons utilisé dans cette réaction (Tableau 2). En effet, le DCPIP passe de bleu en solution à incolore après réduction (Figure 9). De cette manière, la réaction peut facilement être suivie en spectrophotométrie à 600 nm. Comme attendu, LldD a montré une activité sur le L-lactate ( $V_{max} = 0.78 \mu\text{mol.mn}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ ) et Dld sur le D-lactate ( $V_{max} = 20.3 \mu\text{mol.mn}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ ), avec des  $K_m$  semblables (223  $\mu\text{M}$  et 270  $\mu\text{M}$  respectivement). Les données disponibles dans la littérature montrent pour LldD un  $K_m$  de 120  $\mu\text{M}$  et une  $V_{max}$  de 31  $\mu\text{mol.mn}^{-1}.\text{mg}^{-1}$  (Futai & Kimura, 1977), et pour Dld un  $K_m$  de 720  $\mu\text{M}$  (Futai, 1973), obtenus avec des réactions enzymatiques effectuées à 23°C, contre 37°C dans cette thèse, ce qui pourrait expliquer les différences obtenues.

Parmi les protéines de l'opéron *ykg*, seule YkgF a montré une activité, à la fois sur le L-lactate ( $V_{max} = 2.34 \mu\text{mol.mn}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ ) et sur le D-lactate ( $V_{max} = 0.56 \mu\text{mol.mn}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ ). Elle possède néanmoins une meilleure affinité et une meilleure spécificité pour le D-lactate ( $K_m = 0.19 \text{ mM}$  et  $k_{cat}/K_m = 2893 \text{ s}^{-1}.\text{M}^{-1}$  pour le D-lactate contre 10.7 mM et 202  $\text{s}^{-1}.\text{M}^{-1}$  pour le L-lactate). Ces enzymes n'avaient jamais été caractérisées *in vitro* auparavant. L'activité de LO dans l'opéron *ykg* est donc bien portée par YkgF, qui catalyse l'oxydation des deux formes L- et D-lactate, tout en montrant une préférence pour la forme D-. YkgE et YkgG n'ont montré aucune activité sur aucun des deux énantiomères de lactate, posant la question de savoir quelles sont les fonctions de ces deux autres gènes dans l'opéron *ykgEFG*.

## 2.2 Activité enzymatique sur DHB

De la même manière que précédemment, les constantes enzymatiques de LldD, Dld et YkgF ont été obtenues, dans le sens de l'oxydation du DHB en OHB (Tableau 2). LldD montre une affinité 25 fois plus faible pour le L-DHB que pour L-lactate ( $K_m[\text{DHB}] = 5.5 \text{ mM}$ ), mais une  $V_{max}$  atteignant 2.25  $\mu\text{mol.mn}^{-1}.\text{mg}^{-1}$  sur le L-DHB, soit près de 3 fois plus importante par rapport au L-lactate. N'ayant à disposition qu'un racémique de DHB (mélange 50 % D- et 50 % L-) ainsi que la forme L-DHB, l'activité de Dld n'a pu être testée que sur le racémique. Sur le racémique, Dld montre une activité plus de trois fois plus faible que sur le D-lactate, avec une  $V_{max}$  de 6.5  $\mu\text{mol.mn}^{-1}.\text{mg}^{-1}$  pour le DHB et 20.3  $\mu\text{mol.mn}^{-1}.\text{mg}^{-1}$  pour le L-lactate. En ne prenant en compte que les résultats sur le mélange de DHB, on peut remarquer que Dld montre une meilleure activité que LldD (rapport six entre les deux enzymes), pour une affinité semblable (31.5 mM et 38.5 mM respectivement). Ceci pourrait indiquer que sur le D-DHB, Dld pourrait afficher de meilleurs paramètres cinétiques en comparaison avec LldD sur le L-DHB. En revanche, YkgF n'a montré aucune activité sur le DHB, en forme L- ou mélangée avec la forme D-.

**Tableau 2** : Constantes enzymatiques obtenues pour les enzymes Did, LidD et YkgF sur différents substrats.

	Did			LidD			YkgF		
	DHB	D-Lactate	DHB	L-DHB	L-Lactate	L-Lactate	DHB	D-Lactate	D-Lactate
Km (mM)	31.5 ± 8.4	0.27 ± 0.04	38.5 ± 3.2	5.54 ± 0.31	0.223 ± 0.057	10.68 ± 0.13	0.19 ± 0.03	0.19 ± 0.03	0.19 ± 0.03
Vmax (µmol.mn <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> )	5.86 ± 0.91	20.3 ± 1.8	0.99 ± 0.01	2.25 ± 0.04	0.78 ± 0.04	2.34 ± 0.29	0.595 ± 0.018	0.595 ± 0.018	0.595 ± 0.018
Kcat (s <sup>-1</sup> )	6.538 ± 1.01	22.6 ± 2	0.74 ± 0.01	1.69 ± 0.03	0.58 ± 0.03	2.16 ± 0.27	0.55 ± 0.02	0.55 ± 0.02	0.55 ± 0.02
Kcat/Km (s <sup>-1</sup> .M <sup>-1</sup> )	210 ± 24	83807 ± 5382	19.37 ± 1.89	305 ± 12	2725 ± 831	202 ± 2	2893 ± 48	2893 ± 48	2893 ± 48

Si l'on considère que LldD est inactive sur le D-DHB, et que l'on considère alors que les concentrations de substrat sont divisées par deux lors de l'utilisation du racémique, on s'aperçoit que le  $K_m$  apparent de LldD est de 19 mM pour le L-DHB, soit quatre fois plus important que sur le L-DHB lorsqu'il est seul. Il a toutefois été montré que Dld possédait une activité marginale sur le D-lactate, en plus de la forme L- (Kohn & Kaback, 1973), et donc la possibilité pour LldD d'avoir une activité sur le D-lactate n'est pas écartée. Il est donc possible que ces enzymes ne soient pas complètement stéréospécifiques. Dld pourrait de ce fait avoir une activité sur le L-DHB, et LldD sur le D-DHB.

Bien que la délétion de *lldD*, *dld*, *ykgF*, et *glcD* était nécessaire pour abolir l'assimilation de lactate exogène chez *E. coli* (Sweeney *et al*, 2015), seule la suppression de *lldD*, *dld* et *ykgF* semblait suffisante pour empêcher l'assimilation du DHB dans ce cas. Il est toutefois possible que le DHB résiduel ( $\pm 1$  mM) puisse être attribué à l'activité de LO de GlcD, qui n'a pas été testée lors de ce travail. Ces capacités d'assimilation du DHB ont aussi été confirmées *in vitro*, où à l'inverse de YkgF, Dld et LldD ont effectivement montré une activité sur le DHB. Les résultats *in vivo* montrent une préférence d'*E. coli* pour le L-DHB, ce qui pourrait s'expliquer si LldD a une meilleure activité sur le DHB que Dld. Mais les études enzymatiques semblent montrer une meilleure efficacité de Dld sur le D-DHB, que LldD sur le L-DHB. Cette différence pourrait alors être due au niveau d'expression inégal des deux enzymes : si LldD est produite en plus grande quantité dans les cellules en présence de DHB, que Dld, alors elle pourrait compenser son infériorité catalytique en comparaison avec Dld. Globalement, la cellule aurait alors une préférence pour le L-DHB, malgré des constantes enzymatiques individuelles tendant vers une préférence pour le D-DHB. Ceci pourrait être confirmé par qRT-PCR sur les transcrits de ces gènes. Ces données montrent que la stéréospécificité de Dld et LldD sur le lactate est retrouvée sur le substrat synthétique qu'est le DHB.

L'absence d'activité *in vitro* de YkgE, YkgF et YkgG sur le DHB pourrait être expliquée par le fait que ces enzymes ne reconnaissent pas ce substrat dans les conditions de tests employées, empêchant de voir une activité, surtout si très faible. Il est aussi possible que plusieurs enzymes codées par l'opéron fonctionnent ensemble, permettant d'une part d'obtenir une meilleure activité de YkgF sur le lactate, et d'autre part d'être active sur le DHB. Une première réponse à cette question pourrait être obtenue en effectuant les essais enzymatiques sur des extraits bruts issus de cellules mutantes pour *dld* et *lldD* mais cultivées en présence de lactate, induisant ainsi la transcription de l'opéron *ykg* (Sweeney *et al*, 2015). Une culture de la même souche en présence de DHB pourrait également avoir le même effet sur la transcription de ces gènes.

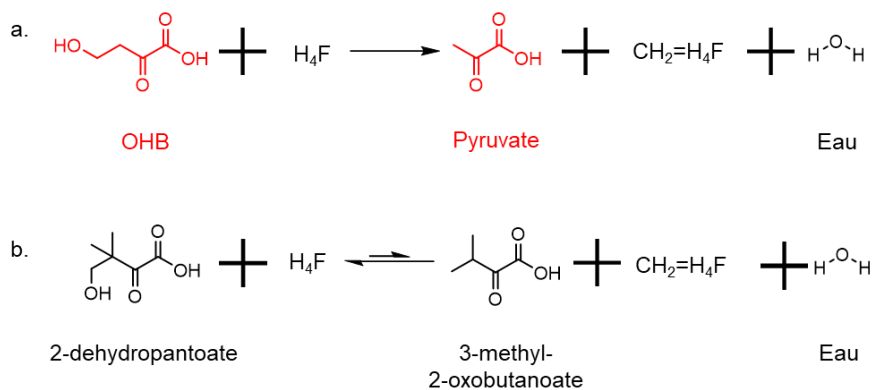
### III. Autres voies d'assimilation de l'OHB

Quelques autres voies qui pourraient être impliquées dans l'utilisation de l'OHB résultant de l'oxydation du DHB ont aussi été brièvement évaluées.

#### 1. Production de pyruvate *via* PanB

Une autre possibilité pour l'utilisation de l'OHB pourrait être par l'intermédiaire de PanB, une 3-méthyl-2-oxobutanoate hydroxyméthyltransférase, intervenant

naturellement dans la voie de biosynthèse du phosphopantothénate. La réaction qu'elle catalyse dans cette voie est le transfert d'un hydroxy-méthyl depuis le 5,10-méthylentetrahydrofolate ( $\text{CH}_2=\text{H}_4\text{F}$ ) vers le 3-méthyl-2-oxobutanoate, pour produire du tétrahydrofolate ( $\text{H}_4\text{F}$ ) et du 2-déhydropantoate (Figure 12.a). Cette enzyme a déjà été montrée *in vitro* comme catalysant la conversion de l'OHB en pyruvate et en  $\text{CH}_2=\text{H}_4\text{F}$ , en présence de  $\text{H}_4\text{F}$  (Bouzon *et al*, 2017) (Figure 12.b).



**Figure 12** : a. La transformation de l'OHB en pyruvate par PanB en présence de  $\text{H}_4\text{F}$ . b. La réaction naturelle catalysée par PanB tend à produire du 2-déhydropantoate et  $\text{H}_4\text{F}$  à partir de 3-méthyl-2-oxobutanoate,  $\text{CH}_2=\text{H}_4\text{F}$  et d'eau. (Adapté de Bouzon *et al.*, 2017)

Une souche d'*E. coli*  $\Delta panB$  a pu être construite, et une croissance sur un milieu LB a été observée. Toutefois, en milieu M9 (glucose 4 g/L, ou glycérol 10 g/L), cette délétion rend les cellules auxotrophes pour le pantothénate, le pantoate ou le cétopantoate, qui deviennent précurseurs de coenzyme A dans ces cellules (Cronan *et al*, 1982). La même auxotrophie a été obtenue sur un milieu M9 + xylose 2 g/L. Les effets *in vivo* de la délétion de *panB* sur l'utilisation d'OHB et sa possible conversion en pyruvate n'ont donc pas pu être déterminés, mais les expériences *in vitro* menées précédemment par Bouzon et ses collègues confirment qu'une activité est bien possible. Cependant, à l'inverse de *yagE* dont l'expression est augmentée significativement dans une souche qui produit le DHB, l'expression de *panB* n'est pas modifiée dans ces conditions. Il est donc tentant de conclure que bien que l'enzyme soit effectivement active *in vitro* sur l'OHB, cette réaction est peu efficace *in vivo* au regard des autres aldolases, et ne montrerait d'effets qu'en absence de ces dernières et surtout si elle était produite.

## 2. Retour à l'homosérine *via* une transaminase

Comme vu dans l'introduction, des enzymes naturelles d'*E. coli* sont capables de catalyser la transamination entre l'homosérine et un  $\alpha$ -cétoacide en OHB et un acide aminé. C'est d'ailleurs l'une d'entre elles qui est utilisée dans la voie de biosynthèse du DHB *via* l'homosérine (Figure 3). Il est donc probable que les mêmes enzymes candidates catalysent la même réaction dans le sens inverse (Figure 13). Quinze d'entre elles sont annotées chez *E. coli* (EcoCyc). Elles catalysent leur réaction sur des acides aminés linéaires, branchés ou aromatiques.

Les activités de plusieurs d'entre elles sur l'homosérine ont été rapportées comme faibles : il s'agit de TyrB, AlaC et AspC (Walther *et al*, 2020). De plus, *ybdL* est surexprimé lors de la production de DHB par fermentation. Afin d'estimer leur implication dans le



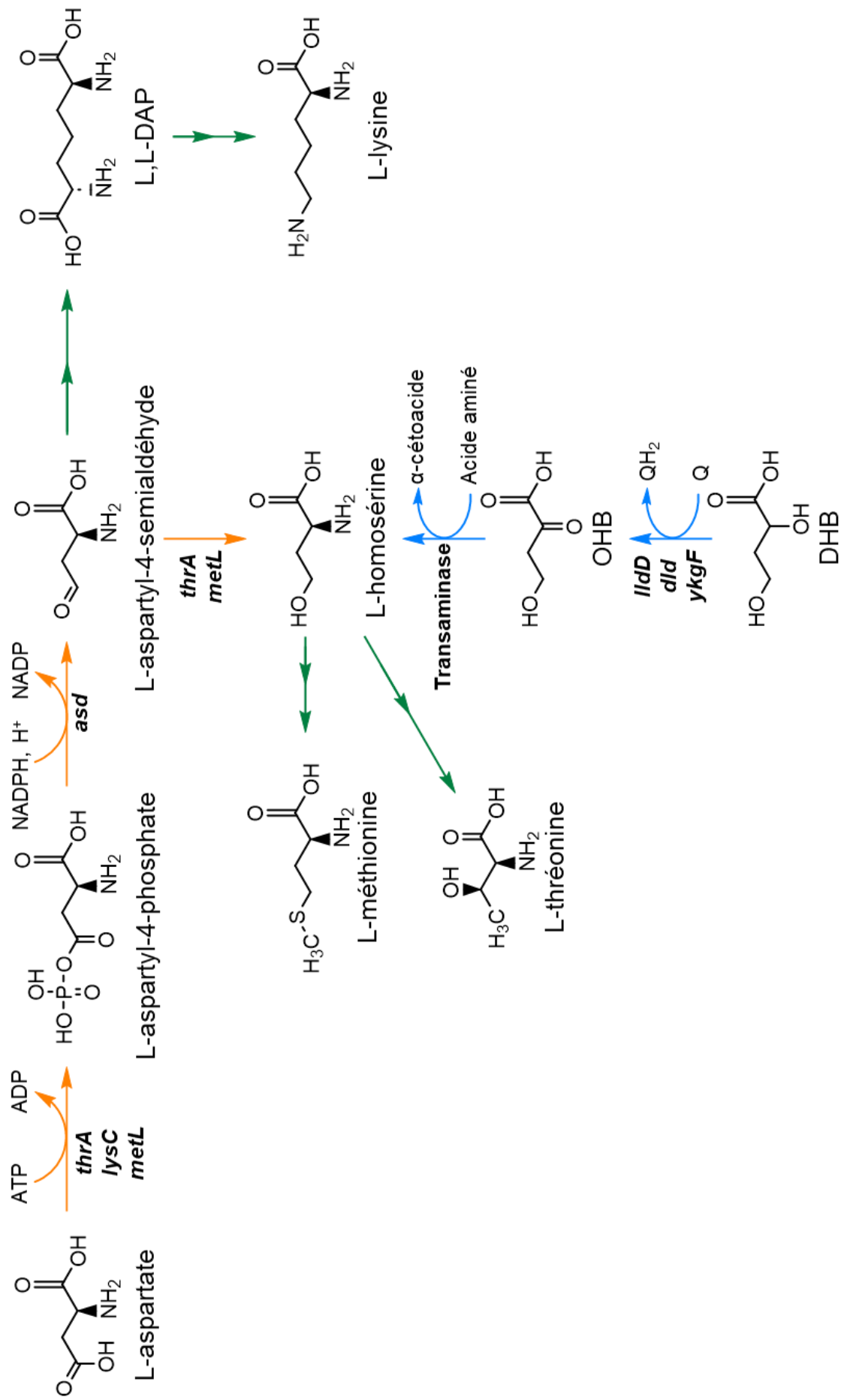
catabolisme de l'OHB, les quatre gènes codant pour ces aminotransférases (*aspC*, *tyrB*, *alaC* et *ybdL*) ont été supprimés chez *E. coli*. Toutefois, la suppression simultanée de ces quatre gènes chez *E. coli* a empêché la croissance de la souche sur un milieu M9 xylose 2 g/L. La croissance n'a pu être restaurée qu'en supplémentant le milieu avec 1 g/L d'extraits de levure, très certainement en raison des acides aminés contenus dans cet extrait. Je n'ai pas encore mené à bien cette caractérisation, mais il est légitime de proposer que le fait que la plupart de ces transaminases sont actives sur l'OHB suggère que cette voie est aussi une alternative dans l'assimilation de DHB. Celle-ci serait toutefois moins active, car elle conduit à l'homosérine, qui n'est *a priori* pas une source de carbone efficace pour les cellules.

#### IV. Import du DHB extracellulaire dans le cytoplasme d'*E. coli*

Avant de pouvoir subir les réactions décrites jusqu'à présent, il est évident que le DHB doit se retrouver dans le cytoplasme, à l'intérieur d'*E. coli*. Dans les conditions du milieu de culture, à pH 7, le DHB est chargé, et requiert des structures protéiques dédiées pour être transporté (Warnecke & Gill, 2005). Le transport peut ainsi être de deux types : facilité ou actif. Le DHB étant une molécule non naturelle, son transport devrait s'effectuer par l'intermédiaire d'un transporteur dont la promiscuité de ligand permet une certaine affinité pour le DHB.

Une souche d'*E. coli* contrainte d'utiliser le DHB a permis de mettre en évidence un transporteur de DHB. Elle a dans un premier temps été obtenue en rendant une souche d'*E. coli* auxotrophe pour l'homosérine, précurseur d'acides aminés comme la L-thréonine et la L-méthionine. En effet, la délétion de quatre gènes, *thrA*, *lysC*, *metL* et *asd* rend impossible la biosynthèse d'homosérine à partir de L-aspartate (Figure 14). Il ne reste alors pour la cellule que la possibilité d'utiliser le DHB pour générer de l'homosérine, en le transformant d'abord en OHB, pour ensuite synthétiser la thréonine et la méthionine essentielles à sa croissance. Une telle souche devient dans le même temps auxotrophe à la lysine, qu'elle n'est plus non plus capable de synthétiser à partir de L-aspartate par la voie de biosynthèse classique de la lysine. Mais ceci peut être toutefois facilement contourné par l'ajout externe de diaminopimélate (DAP, 0.2 g/L), un acide aminé non protéinogène précurseur de la lysine (Figure 14).

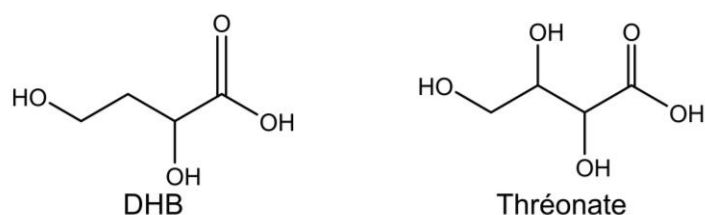
Cette souche mutante, ci-après dénommée souche 1135, auxotrophe pour l'homosérine, est capable de croître, mais de manière très faible en présence de 50 mM de DHB dans le milieu (taux de croissance inférieur à 0.02 h<sup>-1</sup>, (Ceren Alkim, données communiquées)). Cette souche a dès lors subi une évolution expérimentale dans un système semi-automatique GM3 de la société Altar, disponible au Toulouse White Biotechnology (TWB, Toulouse, France) (Mutzel & Marlière, 2004), qui pouvait conduire à : (1) améliorer la transaminase si celle-ci venait à être limitante ; (2) améliorer la LO si elle est limitante ; (3) améliorer le transport ; (4) d'autres effets non prévisibles *a priori*.



**Figure 14** : Résumé des voies de biosynthèse des acides aminés essentiels méthionine, thréonine et lysine. En jaune, la voie de biosynthèse naturelle de la L-homosérine ; en bleu, la voie de biosynthèse de l'homosérine à partir de DHB ; en vert, les voies menant à la synthèse des acides aminés essentiels mentionnés.

Plusieurs clones de la souche issue de cette évolution (souche 1475) ont été récupérés et séquencés, et leur génome comparé à celui de la souche d'origine 1135. Environ une dizaine de mutations dont des SNPs (polymorphisme nucléotidique) dans les régions intergéniques et dans quelques gènes ont été identifiés. N'ayant pas réalisé cette expérience moi-même, je ne m'attarderai pas plus sur ces données.

En revanche, je me suis intéressé au gène *ygbI*, qui présentait une délétion dans la souche évoluée 1475. La fonction de YgbI proposée dans une étude précédente suggérait un rôle de répresseur transcriptionnel de l'opéron *ygbJK* ainsi que de l'opéron *ygbLM* et du gène *ygbN*, supposés intervenir dans le catabolisme du thréonate (Zhang *et al*, 2016). La suppression de *ygbI* mène à la dérégulation de ces mêmes gènes et opérons (Gao *et al*, 2021). Or le DHB est une molécule proche du thréonate, car elle peut aussi s'appeler 3-déhydrothréonate (Figure 15).

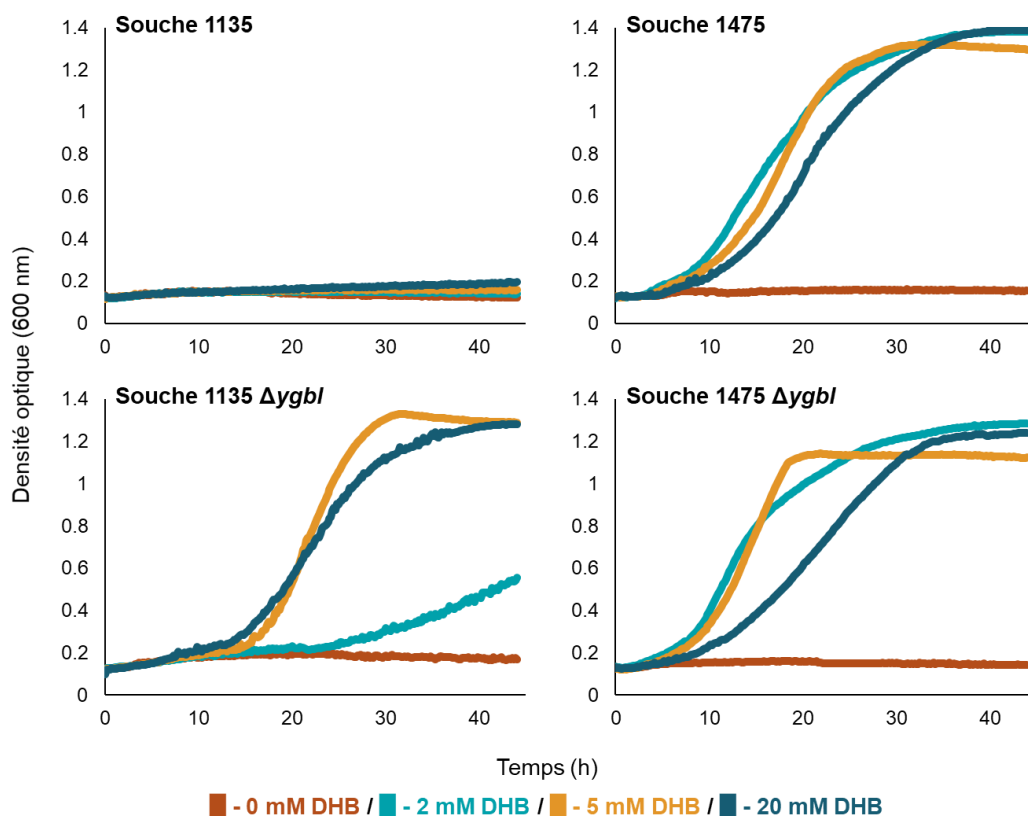


**Figure 125** : Structures du DHB (3-déhydrothréonate) et du thréonate.

Pour valider la mutation dans la souche évoluée, une amplification par PCR de *ygbI* a été réalisée sur les souches MG1655 (WT), 1135 (souche originale non évoluée) et 1475 (souche 1135 évoluée). Une bande unique spécifique de 1250 bp a été obtenue pour les souches MG1655 et 1135 comme attendu. Mais cette bande s'est avérée être de l'ordre de 2000 bp pour la souche 1475. Le séquençage de ces amplicons a permis de mettre en évidence l'insertion d'un transposon (plus précisément l'élément d'insertion IS1, constitué de *insABI*) dans la séquence de *ygbI*, rendant ce gène inopérant, de la même manière qu'une invalidation par insertion (« knock-in »). *insABI* code pour trois protéines : InsA, InsB et InsAB', laquelle est la transposase de cet élément génétique mobile (Escoubas *et al*, 1994). Les effets de la délétion de *ygbI* par transduction par lysat de phage P1 dans les souches 1135 et 1475 sur leur croissance, en présence de différentes concentrations de DHB dans un milieu M9 glucose 20 g/L, supplémenté avec du DAP ont donc été testés. Les courbes de croissance de ces différentes souches et conditions sont présentées en Figure 16 et les taux de croissance calculés sont résumés dans le tableau 3.

Les courbes de croissance obtenues montrent que, comme attendu, la souche 1135 croît à peine, même en présence de fortes teneurs en DHB ajoutées dans le milieu de culture. À l'inverse, la croissance de la souche 1475 est remarquablement restaurée dès la présence de 2 mM de DHB, avec un taux de croissance de 0.15 h<sup>-1</sup>. Des concentrations supérieures en DHB n'accélèrent pas cette croissance ( $\mu = 0.13$  h<sup>-1</sup> à 5 mM et 0.12 h<sup>-1</sup> à 20 mM, Tableau 3). Ce comportement de croissance est à peu près retrouvé chez la souche 1135 délétée de *ygbI*, hormis le fait que 5 mM de DHB sont nécessaires pour atteindre le taux de croissance maximal, alors que 2 mM suffisaient à la souche 1475. Enfin, lorsque le gène *ygbI* muté, qui porte le transposon, est entièrement enlevé par transduction dans la souche 1475 (1475  $\Delta$ *ygbI*), le comportement de croissance de cette souche ne semble pas

être très différent de la souche initiale 1475 (0.19 et 0.18 h<sup>-1</sup> respectivement). On peut toutefois noter une croissance moins rapide en présence de 20 mM de DHB (Tableau 3).



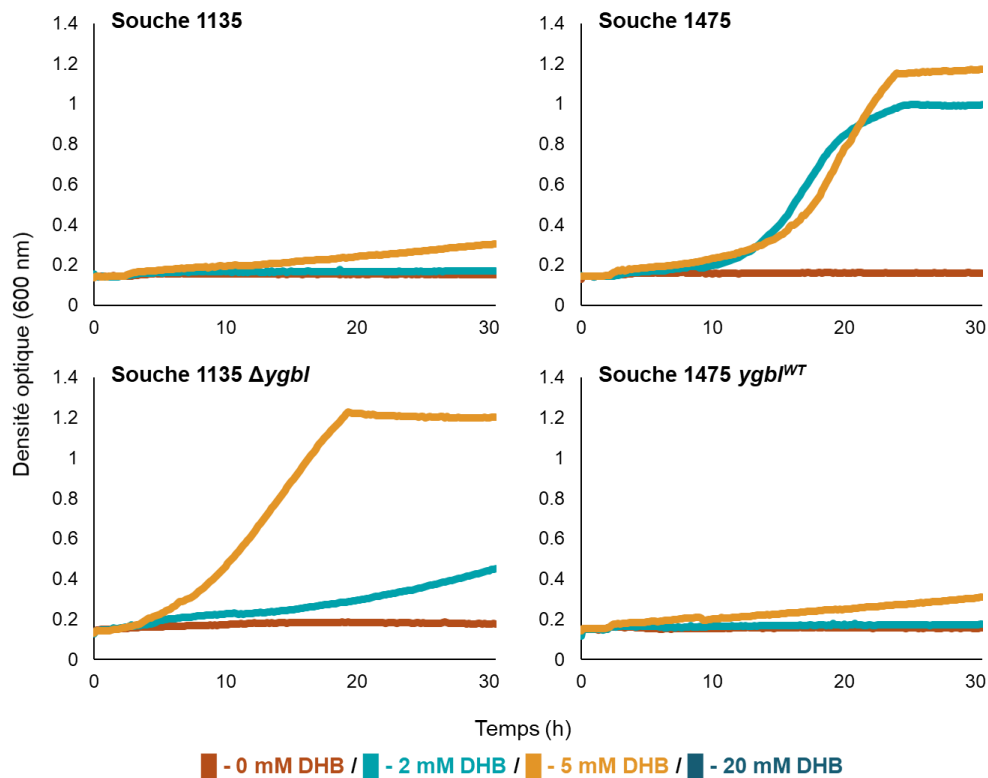
**Figure 126** : Courbes de croissance (densité optique en fonction du temps (h)) des souches auxotrophes à l'homosérine, en présence de différentes concentrations de DHB. (n = 2)

**Tableau 3** : Taux de croissance des différentes souches selon la quantité de DHB présent dans le milieu. X : pas de croissance.

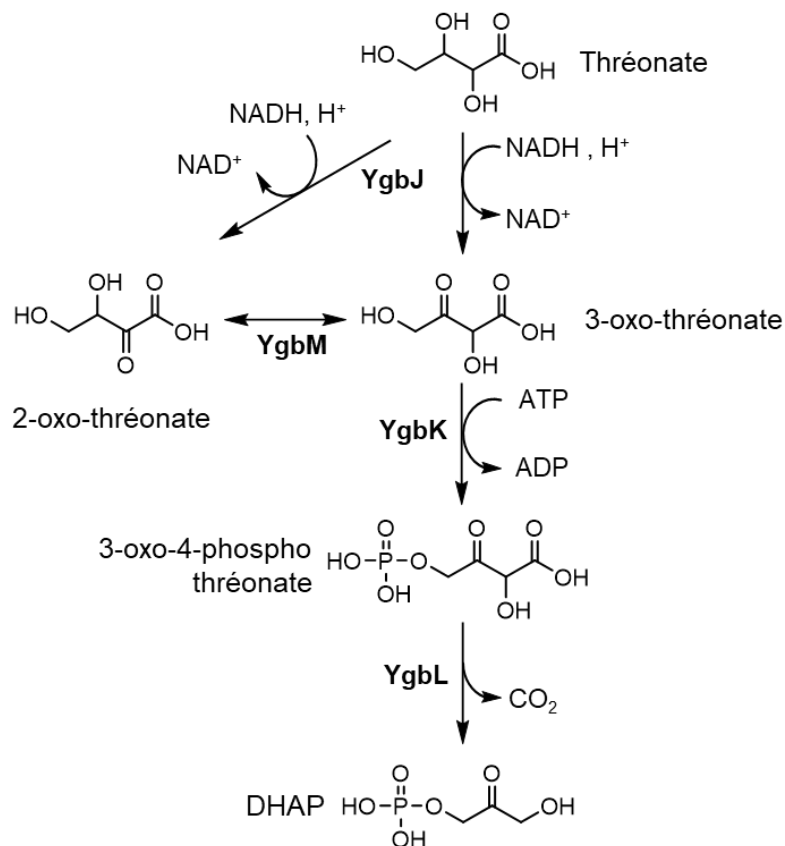
$\mu$ (1/h)	1135	1135 $\Delta ygbI$	1475	1475 $\Delta ygbI$
<b>Contrôle</b>	X	X	X	X
<b>2 mM DHB</b>	X	0,04	0,15	0,19
<b>5 mM DHB</b>	X	0,19	0,13	0,18
<b>20 mM DHB</b>	X	0,13	0,12	0,10

Afin de confirmer que ce phénotype est effectivement dû à l'inactivation de *ygbI*, le gène muté a été remplacé par l'allèle sauvage dans la souche 1475 (souche 1475\_ *ygbI*<sup>WT</sup>). Les cultures, réalisées dans un milieu M9 glucose 0.4 % et supplémenté en DAP (0.2 g/L), et avec différentes concentrations de DHB, montrent un phénotype identique entre la souche 1135 et la souche 1475\_ *ygbI*<sup>WT</sup> (Figure 17). Cette souche a perdu sa capacité à croître en présence de DHB, même à de fortes concentrations (50 mM). Cela signifie donc que c'est bien l'inactivation de *ygbI* qui permet l'utilisation du DHB, nécessaire à la croissance de la souche.

*YgbI* est annoté comme répresseur de la transcription de *ygbJK*, *ygbLM*, et *ygbN* (Gao *et al*, 2021). Ces gènes codent pour des enzymes *a priori* requises pour la métabolisation du thréonate en DHAP (Figure 18). Cette voie contient une déshydrogénase codée par *ygbJ*, une kinase codée par *ygbK*, une décarboxylase codée par *ygbL* et une isomérase codée par *ygbM*.

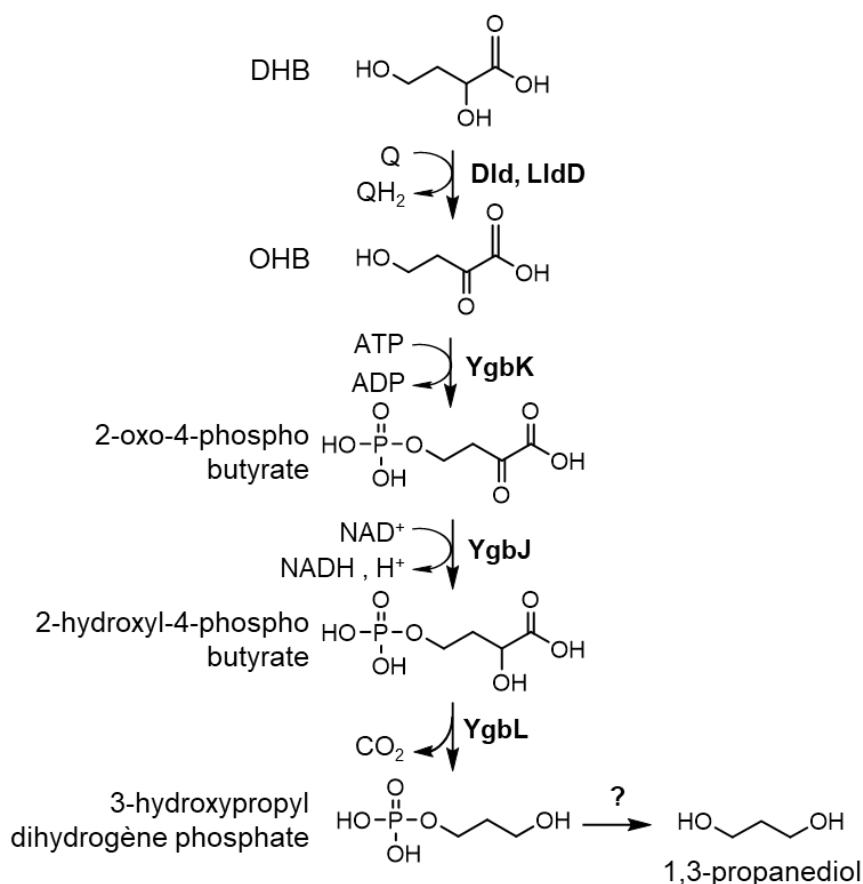


**Figure 17 :** Courbes de croissance (densité optique en fonction du temps (h)) montrant l'effet de l'allèle sauvage de *ygbI* dans la souche 1475. La souche 1135 sert de contrôle négatif pour l'effet de *ygbI*<sup>WT</sup>, la 1475 de contrôle positif pour la version mutée de *ygbI*, et la 1135  $\Delta ygbI$  de contrôle de l'effet de la délétion de *ygbI*. (n = 2)



**Figure 18 :** Voie supposée d'assimilation du thréonate, dont les enzymes sont codées par *ygbJK* et *ygbLM*. Le thréonate est en premier lieu importé dans les cellules par YgbN.

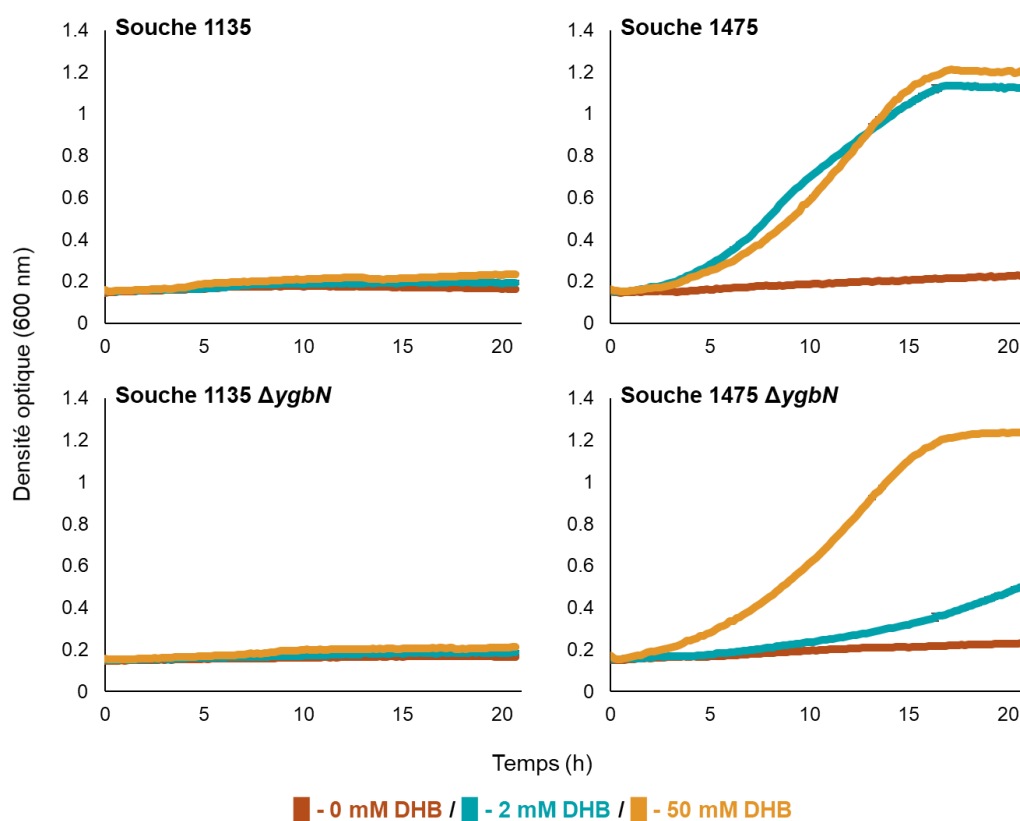
Comme le DHB est aussi le 3-déoxythréonate, l'expression de l'ensemble de ces gènes pourrait éventuellement permettre la mise en place d'une nouvelle voie métabolique active sur le DHB. Dld et LldD catalysent l'oxydation du DHB en OHB, qui serait à son tour phosphorylé en OHB-Pi par YgbK. YgbJ pourrait intervenir dans la réduction de l'OHB-Pi en DHB-Pi. Enfin, la réaction de décarboxylation catalysée par YgbL transformerait donc le DHB-Pi en 3-hydroxypropyl dihydrogène phosphate (Figure 19). L'utilisation d'OHB-Pi et de DHB-Pi par *E. coli* serait à déterminer, puisque ces molécules ne semblent pas avoir déjà été étudiées auparavant. Il en va de même pour le produit final puisque le 3-hydroxypropyl dihydrogène phosphate n'apparaît pas comme étant une molécule naturellement rencontrée chez *E. coli*. Si cette voie venait toutefois à être démontrée, elle pourrait constituer un intérêt pour la production de 1,3-propanediol, puisqu'une seule déphosphorylation du 3-hydroxypropyl dihydrogène phosphate le sépare de cette molécule d'intérêt.



**Figure 19** : Proposition de voie d'utilisation du DHB par les enzymes codées par *ygbJK* et *ygbLM*.

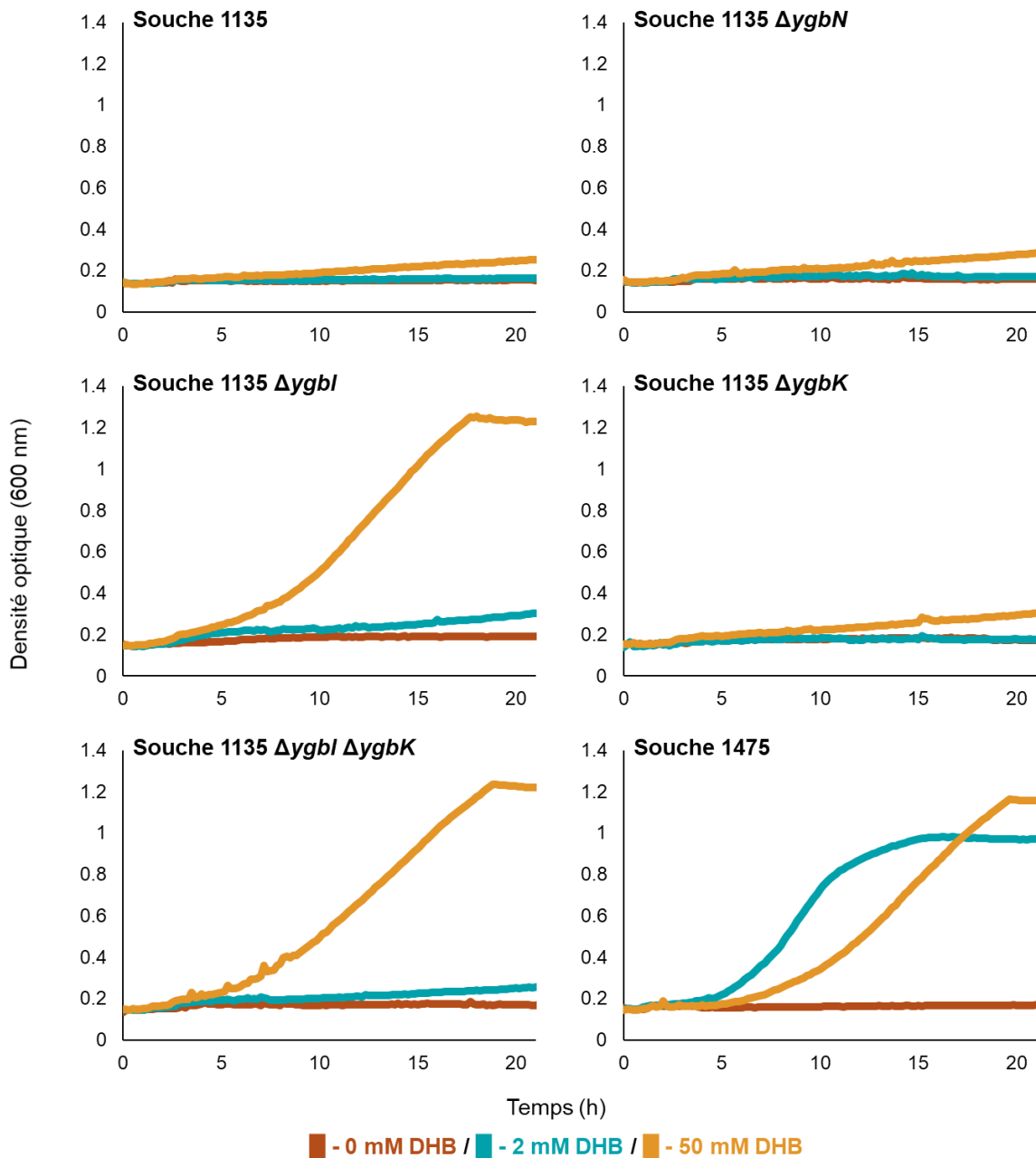
Enfin, *ygbN* a été décrit comme appartenant à la famille des symporteurs gluconate:H<sup>+</sup>, mais son ligand n'a pu être caractérisé (Peekhaus *et al*, 2006). L'hypothèse émise est qu'il pourrait transporter le DHB, et c'est cette hypothèse qui a d'abord été testée. Des mutants des souches 1135 et 1475 pour *ygbN* ont alors été construits. Notons toutefois que du fait de la proximité entre les gènes *ygbI* et *ygbN*, la délétion de *ygbN* par transduction de lysat de phage P1 entraînerait automatiquement la réversion de *ygbI* à son allèle sauvage (les fragments recombinés par cette méthode ayant une taille avoisinant les 100 kb). La délétion de *ygbN* a donc été effectuée en CrispR-Cas9. Brièvement, la souche d'intérêt a été transformée avec un plasmide exprimant la machinerie permettant la coupure et la recombinaison de l'ADN de la cellule hôte. Après

expression de cette machinerie, les cellules ont à nouveau été transformées avec le fragment utilisé pour la recombinaison de l'ADN endommagé par Cas9, et un autre plasmide exprimant un ARN guide, servant à cibler le gène à supprimer (Jiang *et al*, 2015). Les résultats de croissance de ces souches en milieu M9 glucose 4 g/L, DAP 0.2 g/L et différentes concentrations de DHB sont illustrés dans la Figure 20. Sans surprise, le phénotype de croissance de la souche 1135  $\Delta ygbN$  ne présente aucune différence avec la souche 1135, puisque l'allèle sauvage de *ygbI* est présent dans les deux souches. L'expression de *ygbN* est alors de toute manière réprimée. La délétion de *ygbN* dans la souche 1475 la rend bien moins sensible à la présence de DHB à faible concentration. En effet, à 2 mM de DHB, la croissance ne commence qu'après 12 h, alors que dans la même condition, la souche 1475 non modifiée commence à croître après 4 h. Toutefois, à 50 mM, le phénotype de croissance présenté par la souche 1475  $\Delta ygbN$  est le même que la souche 1475 contrôle. Cela indique d'une part que YgbN contribue au transport de DHB, mais qu'il existe d'autres transporteurs pour l'import de DHB dans les cellules.



**Figure 20** : Courbes de croissance (densité optique en fonction du temps (h)) montrant la capacité d'importeur de DHB de YgbN. La souche 1135 sert de contrôle négatif (*ygbN* est réprimé par YgbI), la 1475 de contrôle positif pour la version mutée de *ygbI* permettant l'expression de *ygbN*. (n = 2)

Enfin, comme déjà remarqué, *ygbJK* et *ygbLM* devraient aussi être exprimés lorsque *ygbI* est supprimé. Ces opérons pourraient avoir un effet sur le DHB (voir plus haut). Afin de tester cette hypothèse, les souches 1135  $\Delta ygbK$  et 1135  $\Delta ygbI \Delta ygbK$  ont été construites par CrispR-Cas9. Leur culture dans un milieu M9 + glucose 4 g/L et DAP 0.2 g/L montre que la délétion de *ygbK* ne modifie sensiblement pas la croissance en présence de 50 mM de DHB, signifiant alors que cette voie de catabolisme du thréonate ne semble pas être impliquée, sinon très peu, dans le catabolisme du DHB (Figure 21).



**Figure 21 :** Courbes de croissance (densité optique en fonction du temps (h)) montrant l'implication de YgbK dans le catabolisme du DHB. Les souches 1135, 1135  $\Delta ygbN$ , 1135  $\Delta ygbI$  et 1475 servent de contrôle. (n = 2)

De ces résultats, on conclut que le DHB n'est sans doute pas assimilé par la voie du thréonate. Cependant, cette conclusion est à considérer avec précautions, car la souche utilise le glucose, et le DHB est apporté parce qu'il sert indirectement pour alimenter la production en acides aminés *via* l'homosérine. Cette voie est essentielle et est donc favorisée, au détriment de la voie thréonate, qui destinerait le DHB à l'assimilation de carbone dans la biomasse. Il conviendrait de réaliser une expérience où le DHB est la seule source de carbone à disposition. Mais d'autres voies métaboliques, comme celle initiée par le clivage de l'OHB en pyruvate et formaldéhyde par les aldolases d'*E. coli*, sont toujours présentes dans les souches utilisées, et permettent la synthèse de pyruvate à partir de DHB, ce qui devrait pourtant permettre la croissance. L'étude de l'utilisation du DHB comme seule source de carbone devrait donc être étudiée en prenant en compte ces considérations, car plusieurs voies indépendantes pourraient jouer un rôle.



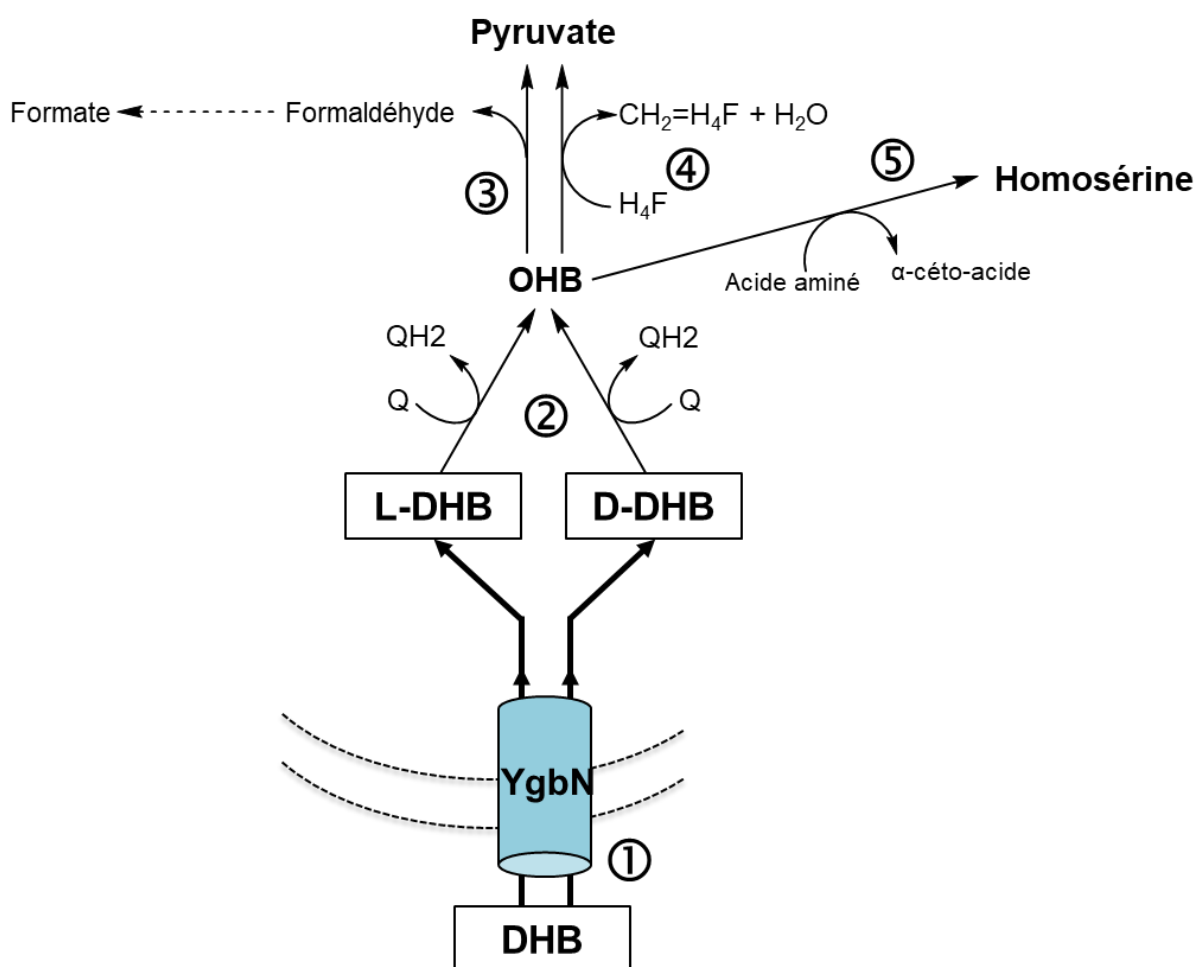
En conclusion, tous ces résultats montrent que (1) la construction d'une souche dépendant du DHB pour sa croissance est possible, ce qui pourrait permettre son utilisation pour d'autres buts que ceux visés originellement ; (2) la répression de YgbI sur *ygbJK*, *ygbLM*, *ygbN*, mais en particulier sur *ygbN* inhibe le transport de DHB dans les cellules ; (3) YgbN contribue au transport du DHB, mais il ne semble pas être le seul transporteur de cette molécule dans la cellule, vu les données de la souche évoluée 1475 portant la délétion de *ygbN*. Pour tenter de valider le rôle de YgbN, sa surexpression a été réalisée *via* le plasmide de la collection ASKA (Kitagawa *et al*, 2006) dans la souche 1135, mais sans résultat concluant sur l'amélioration de sa croissance. Comme ces plasmides sont présents dans les cellules à un très haut nombre de copies, et que l'expression du transporteur est inductible à l'IPTG, il est possible que cette surexpression ait été délétère pour la croissance de la souche. Un nombre de copies plus faible ou l'expression de *ygbN* sous un promoteur moins fort pourrait permettre d'affiner ce travail et de montrer qu'il permet à la souche 1135 de croître en présence de DHB. Enfin, il serait intéressant de construire une souche qui utilise le DHB comme unique source de carbone, tout en sachant déjà que la perte de fonction de YgbI serait nécessaire. Cette possibilité pourra être testée, par exemple, sur une souche déficiente pour les aldolases ainsi que pour *ygbI*. De cette manière, les enzymes associées au catabolisme du thréonate et possiblement actives sur le DHB, seront de ce fait surproduites, et le DHB pourrait alors servir de substrat à cette nouvelle voie. Ces enzymes pourraient aussi être testées sur le DHB *in vitro*, après avoir été surproduites et purifiées.

## V. Perspectives

Les résultats rapportés dans ce chapitre montrent clairement que le DHB, non connu et non produit naturellement par *E. coli*, peut être assimilé par cette bactérie au travers de son réseau métabolique. Cette assimilation peut s'expliquer par la promiscuité de certaines protéines de ce réseau. En l'occurrence, l'import du DHB peut se faire *via* le transporteur YgbN (Figure 22). Ce transporteur n'est toutefois pas constitutivement produit, et ne l'est pas non plus lors des productions fermentaires de DHB (non publié). La condition requise pour sa production est l'impossibilité pour le répresseur YgbI de se fixer au niveau du promoteur des gènes qu'il régule. Ceci est possible expérimentalement par la suppression artificielle du gène, mais les molécules interagissant avec YgbI *in vivo* n'ont pas encore déterminées. Il est toutefois vraisemblable que ce soit le thréonate qui puisse permettre l'activation de la transcription de ces gènes, puisque ceux-ci sont sensés permettre son assimilation.

Les cellules sont ensuite capables d'oxyder le DHB par l'intermédiaire de lactate déshydrogénases. Cette réaction est indispensable pour initier l'assimilation du DHB, et j'utiliserai cette particularité plus tard pour permettre au DHB de servir de précurseur pour sa polymérisation (voir Chapitre 4). Cette réaction est catalysée par LldD pour le L-DHB, Dld pour le D-DHB, et YkgF, mais la spécificité de substrat pour cette dernière n'a pas encore pu être déterminée (Figure 22.2). L'OHB qui résulte de cette première réaction, est aussi une molécule non naturelle, et peut être employée dans diverses réactions que j'ai détaillées : dans le clivage par une aldolase, en pyruvate et en formaldéhyde (Figure

22.3), qui sont respectivement exploités dans le cycle du citrate et pris en charge par le système de détoxification du formaldéhyde intrinsèque à *E. coli* ; l'OHB peut être transformé en homosérine par une aminotransférase, dont près d'une quinzaine d'isoenzymes sont présentes chez *E. coli* (Figure 22.5) ; ou transformé en pyruvate et H<sub>2</sub>O par PanB, avec une molécule de H<sub>4</sub>F transformée en CH<sub>2</sub>=H<sub>4</sub>F (Figure 22.4).



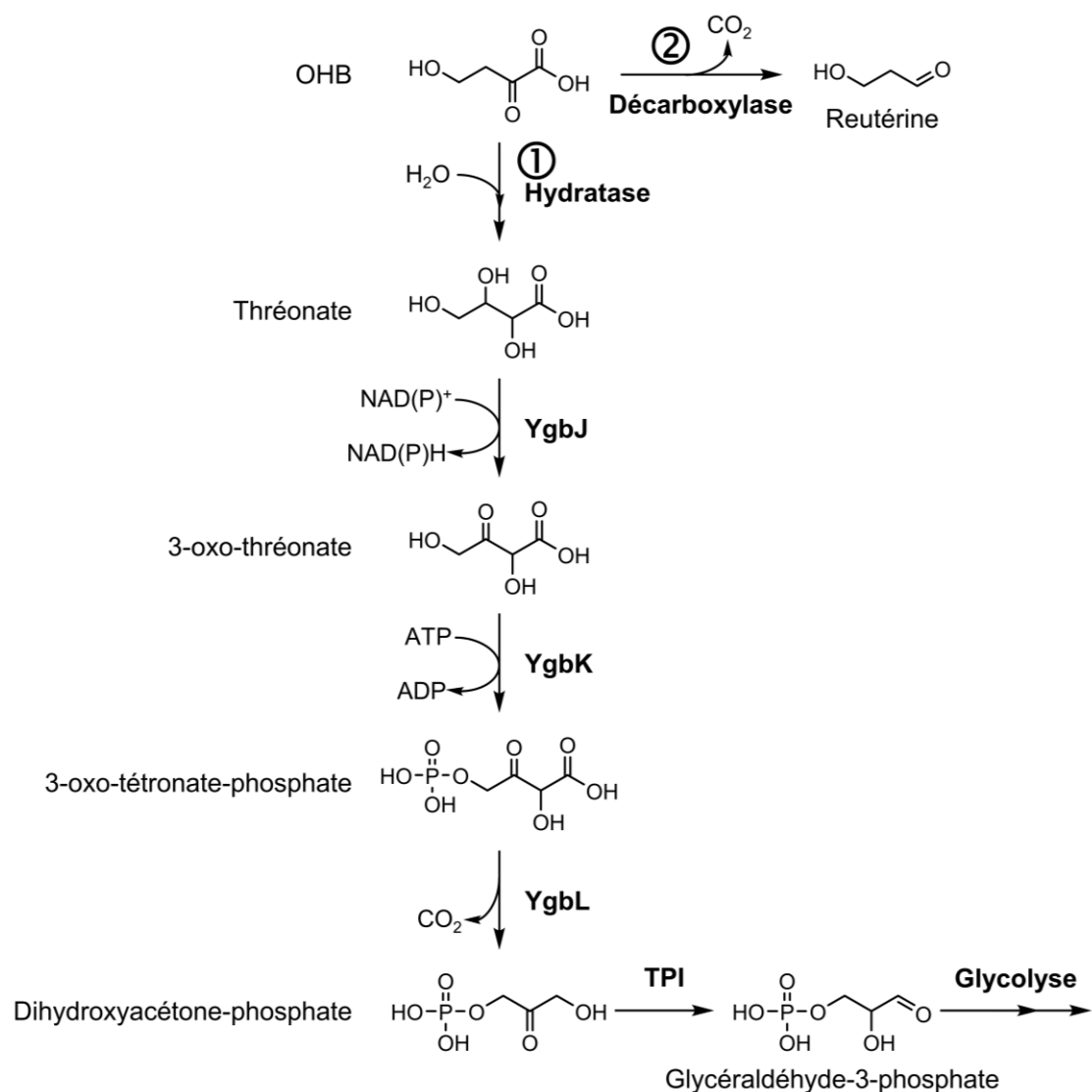
**Figure 22** : Voies identifiées à date permettant l'assimilation du DHB. 1 : le transporteur YgbN au moins assure l'import du DHB dans les cellules. 2 : L'oxydation ubiquinone dépendante du DHB en OHB est assurée par Dld pour le D-DHB et LldD pour le L-DHB, la spécificité de YkgF est encore incertaine. 3 : Le clivage de l'OHB est catalysé par six aldolases chez *E. coli*. Cette réaction produit du pyruvate, directement assimilable dans la biomasse, et du formaldéhyde, détoxifié en formate par les enzymes codées dans l'opéron *frm*. 4 : L'OHB peut aussi être transformé en pyruvate par l'intermédiaire de PanB, et cette réaction requiert un H<sub>4</sub>F. 5 : L'OHB peut aussi retourner à l'état d'homosérine, grâce à l'activité d'une transaminase, transformant dans le même temps un acide aminé en α-céto-acide.

Toutefois, l'ensemble des réactions utilisant potentiellement l'OHB n'est pas encore connu. Il est en effet possible qu'une réaction d'hydratation permette la conversion de l'OHB en thréonate, qui comme pour la transamination, prend exemple sur une des voies de biosynthèse du DHB (voie glycolaldéhyde, voir Figure 2). Dans la voie de biosynthèse du DHB à partir du glycolaldéhyde chez *E. coli*, l'hydratation du thréonate en OHB est catalysée par une enzyme exogène de *A. avenae*. Mais il existe plusieurs hydratases codées chez *E. coli* qui pourraient aussi catalyser cette réaction. FumA ou FumC, qui catalysent l'hydratation du fumarate en malate dans le cycle du citrate, pourraient également catalyser l'hydratation de l'OHB. Leurs gènes sont surexprimés pendant la production de DHB en fermentation, en comparaison à la souche non productrice : jusqu'à 9 fois pour *fumA* et jusqu'à 4.7 fois pour *fumC* (données non publiées). C'est également le cas pour un

gène de l'opéron *yjh* vu précédemment : *yjhG*. Ce gène code pour une D-xylonate déshydratase, et est surexprimé 2,5 fois par rapport aux conditions de non-production du DHB (non publié). Le thréonate qui résulterait de cette hydratation pourrait vraisemblablement être pris en charge par *E. coli*. La transformation du thréonate en dihydroxyacétone phosphate (DHAP) final chez *E. coli* (Figure 23.1) serait alors catalysé par les diverses enzymes codées par l'opéron *ygb*, identifié bio-informatiquement (Zhang *et al*, 2016), mais dont aucune preuve expérimentale n'existe à ce jour.

Le thréonate serait oxydé en 3-oxo-thréonate par une déshydrogénase spécifique (YgbJ), avant d'être phosphorylé par une kinase (YgbK) en 3-oxo-tetronate-4-phosphate. La dernière réaction serait catalysée par YgbL, une 3-oxo-tetronate-4-phosphate décarboxylase, et produirait ainsi une molécule de DHAP, qui pourrait directement rejoindre la glycolyse. Bien que cet opéron ne semblait pas actif dans l'assimilation du DHB, il est nécessaire de rappeler que ces expérimentations avaient été produites dans une souche dépendante du DHB pour la biosynthèse de méthionine et thréonine protéinogène. Dans cette hypothèse, le DHB pourrait être catabolisé par cette voie dans le cas où il serait utilisé comme source de carbone. Cette hypothèse pourrait être testée, dans une souche déficiente pour *ygbI*, permettant la surexpression de la voie du catabolisme du thréonate, et exprimant par exemple l'hydratase de *A. avenae* déjà montrée comme fonctionnelle. L'assimilation du DHB devrait dans ce cas être accrue, en comparaison d'une souche contrôle. Des tests avec les hydratases d'*E. coli*, FumA, FumC ou YjhG par exemple, pourront par la suite être comparés à cette première expérience contrôle. La réaction d'hydratation catalysée par ces enzymes pourrait également être testée *in vitro* sur l'OHB.

Une autre voie possible d'utilisation de l'OHB pourrait se faire par l'intermédiaire d'une décarboxylase. Comme décrit précédemment, la décarboxylation de l'OHB produit une molécule de 3-hydroxypropanal (également appelée reutérine) (Frazão *et al*, 2019), et une molécule de CO<sub>2</sub> (Figure 23.2). La reutérine est une molécule toxique pour les micro-organismes (Cleusix *et al*, 2007) : le groupement aldéhyde est très réactif et peut former d'autres composants dans le cytoplasme des cellules, et elle peut se dimériser ou encore être spontanément déshydratée en acroléine également toxique et mutagène. Elle est pour ces raisons utilisée notamment comme antibactérien et antifongique dans l'industrie agroalimentaire (Vollenweider & Lacroix, 2004). Mais si elle est rapidement utilisée dans une réaction biochimique, la reutérine peut alors servir de précurseur à la production de 1,3-propanediol, grâce à l'expression de déshydrogénases exogènes à *E. coli* (Frazão *et al*, 2019). Toutefois, il n'a pas encore été montré que cette réduction de la reutérine soit possible naturellement chez *E. coli*, mais serait facilement décelable par la détection de 1,3-propanediol dans les surnageants de culture en présence de DHB. Dans le cas contraire, la reutérine pourrait alors s'accumuler et être toxique pour les cellules. Cette hypothèse reste cependant possible, puisque deux gènes codant des carboxylases sont surexprimés pendant la production de DHB en fermentation : *gadA* (jusqu'à 22,8 fois l'expression dans une souche non productrice de DHB), et *gadB* (jusqu'à 41.7 fois). Ces enzymes catalysent la même réaction : la décarboxylation du glutamate en 4-aminobutanoate et CO<sub>2</sub>.



**Figure 23 :** Voies hypothétiques d'assimilation de l'OHB. 1 : voie utilisant l'opéron d'assimilation du thréonate récemment découvert. La conversion de l'OHB en thréonate pourrait être catalysée par une hydratase comme FumA ou FumC. Les réactions suivantes permettent d'arriver à une molécule de DAHP, qui peut ensuite rejoindre la glycolyse par sa conversion en glycéraldéhyde-3-phosphate. 2 : voie faisant appel à une décarboxylase (possiblement GadA ou GadB) pour convertir l'OHB en reuterine. OHB 2-oxo-4-hydroxybutyrate ; YgbJ thréonate déshydrogénase ; YgbK 3-oxo-thréonate kinase ; YgbL 3-oxo-tréonate décarboxylase ; TPI triose-phosphate isomérase.

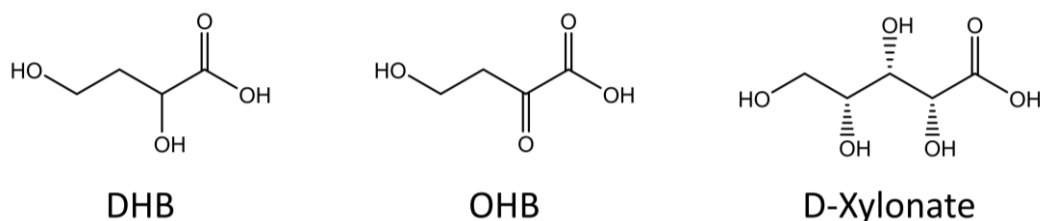
Il convient toutefois de rappeler que ces voies d'assimilation proposées ne seraient que secondaires en comparaison de la voie aldolase, puisque nous avons vu que sur une souche sauvage, 68 % du DHB assimilé était transformé en formate. Ces voies ne seraient donc que des « relais » à une voie aldolase défaillante, expliquant ainsi une consommation de DHB semblable dans une souche sauvage et une souche délétées des aldolases incriminées dans le clivage de l'OHB.

Pour conclure, si le DHB, mais de manière plus élargie l'OHB, peuvent être utilisés par *E. coli*, c'est bien grâce à la promiscuité des protéines d'*E. coli*. En effet, bien que ces deux molécules soient toutes les deux non naturelles pour cet organisme, cela n'empêche pas des transporteurs, puis plusieurs classes d'enzymes, de catalyser leur réaction sur ces molécules. Ceci donne plusieurs possibilités aux cellules pour assimiler le DHB, mais complexifie fortement le travail d'identification de ces mécanismes. Ainsi, bien que certaines voies soient déjà identifiées, d'autres restent à découvrir. Cependant, comme

l'accumulation de délétions pour toutes ces voies rendra vraisemblablement non viable *Escherichia coli*, d'autres approches s'avèreront nécessaires pour mettre au jour les différentes voies d'assimilation du DHB. Celles-ci impliqueraient l'utilisation d'approches intégratives combinées à l'emploi de molécules marquées au  $^{13}\text{C}$ , permettant de suivre le devenir de ces substrats marqués dans le métabolome.

## Chapitre 2 : Développement d'un biosenseur d'OHB

Les résultats présentés dans le Chapitre 1.I ont montré que le gène *yagE*, qui code pour une aldolase fortement impliquée dans l'assimilation du DHB, était surexprimé plus de 13 fois lors de la production de DHB en fermentation en comparaison avec la souche non productrice. Par conséquent, je me suis interrogé sur la possibilité que le DHB, ou un de ses produits de dégradation puissent agir comme activateur de la transcription de *yagE*. En effet, ce gène fait partie d'un des deux opérons *yag*, dont la transcription est négativement régulée par XynR. XynR est un facteur de transcription spécifique, dont l'unique cible de régulation est un promoteur bidirectionnel (pYag), situé entre les opérons *yagAB* et *yagEFGH*. Le gène *xynR* est situé en aval de l'opéron *yagEFGH*, qui provient du prophage CP4-6 et code pour des enzymes impliquées dans la dégradation du D-xylonate (Shimada *et al*, 2017) (Figure 25.a). Dans un contexte physiologique normal, XynR est constitutivement produit et se fixe sur le promoteur des opérons *yag*, ce qui a pour conséquence de bloquer l'accès aux ARN polymérase et l'initiation de la transcription des gènes (Shimada *et al*, 2017). En présence de D-xylonate, celui-ci se fixe à XynR et l'empêche d'aller lui-même se fixer sur pYag. Ceci laisse donc la possibilité aux ARN polymérase de se fixer et d'initier la transcription des gènes. Mon hypothèse est donc que le DHB ou l'OHB pourraient imiter l'action du D-xylonate en se fixant à XynR. Cette hypothèse se base aussi sur la comparaison des structures de ces molécules par rapport au D-xylonate (Figure 24), bien qu'il s'agisse d'un sucre à cinq carbones alors que le DHB et l'OHB sont des acides à quatre carbones.



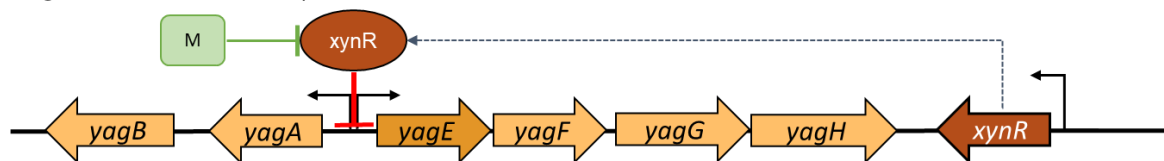
**Figure 24** : Structures du DHB, OHB et D-xylonate.

Pour tester cette hypothèse, j'ai construit un biosenseur basé sur l'utilisation de pYag en amont d'un gène codant une protéine fluorescente. Ce biosenseur, en plus de répondre à une question physiologique liée à la présence de DHB dans les cellules, pourrait aussi être utilisé comme outil, par exemple pour l'identification de transporteurs de DHB, ou encore permettre le criblage de transaminases efficaces dans une banque de mutants, pour la production de DHB. Ces deux applications ont été développées plus en profondeur, et seront développées dans la partie II de ce chapitre. Un biosenseur similaire, permettant les mêmes applications, avait déjà été construit, mais basé sur la région promotrice de *yjhH*, en raison d'une expression basale beaucoup plus basse que *yagE*, et un temps de réponse à l'induction de D-xylonate plus rapide (Bañares *et al*, 2019). Cependant, cette étude n'avait pas pris en compte la nécessité d'un équilibre entre quantité de répresseur et quantité de promoteur disponible. De plus, pour établir un biosenseur sensible à la présence de DHB (ou un de ses précurseurs/produits de dégradation, notamment l'OHB), j'ai pris comme référence les niveaux d'expression de *yagE* et de *yjhH* lors de la production de DHB en fermentation. En comparaison d'une souche contrôle, ces gènes étaient pour rappel surexprimés jusqu'à 13.33 fois et 3.33 fois, respectivement.

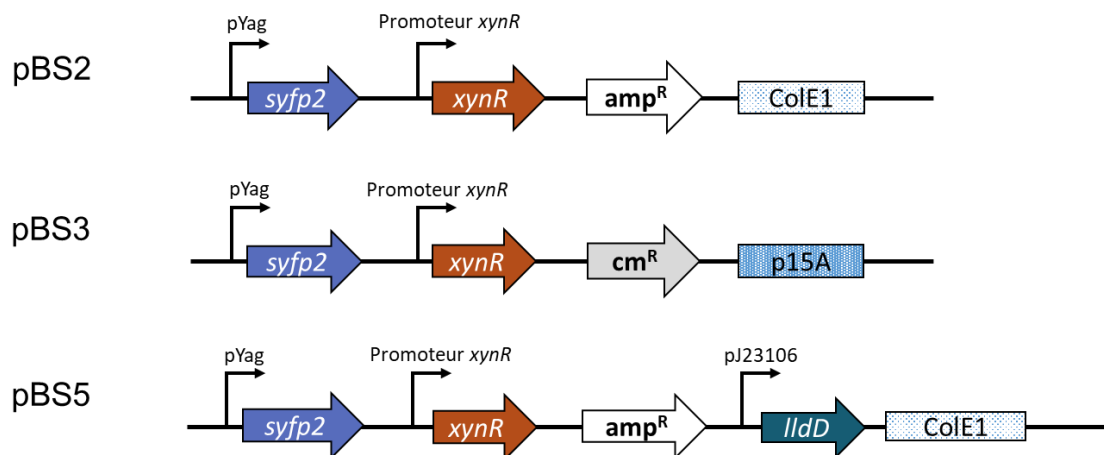
## I. Mise au point

Plusieurs biosenseurs ont été construits. Tous sont basés sur l'utilisation de pYag, situé en amont d'un gène codant pour une SYFP2, une protéine dérivée de la YFP (Yellow Fluorescent Protein) (Kremers *et al*, 2006), et qui émet dans le jaune/vert (527 nm) après excitation (515 nm). Une différence majeure entre les biosenseurs construits dans ce travail et celui construit dans une étude antérieure (Bañares *et al*, 2019) est la prise en compte du fait qu'une copie de *xynR* permet la répression d'une copie de pYag. Ainsi, sur un plasmide multicopies, il est donc peu vraisemblable que la copie génomique de *xynR* produise suffisamment de protéines pour inhiber la transcription de toutes les copies de pYag présentes dans la cellule. C'est pourquoi sur le même plasmide j'ai également rajouté une copie de *xynR*, avec son promoteur naturel (Figure 25.b).

a. CP4-6 prophage (longueur de 34,308 bp entre les positions 262,898 et 297,204 sur le génome de MG1655)



b. Constructions de biosenseurs sensibles aux molécules interagissant avec XynR



**Figure 25** : a. Insertion génétique du prophage CP4-6 chez *E. coli* MG1655. *xynR* en aval de l'opéron *yagEFGH* exprime la protéine XynR, qui réprime les opérons *yagEFGH* et *yagAB*. M représente l'inducteur, qui se fixe à XynR et permet la transcription des deux opérons. b. : les trois constructions de biosenseurs sensibles aux molécules interagissant avec XynR. Amp<sup>R</sup> cassette de résistance à l'ampicilline (code une  $\beta$ -lactamase) ; cm<sup>R</sup> : cassette de résistance au chloramphénicol (code une chloramphénicol acétyl-transférase) ; ColE1 origine de réPLICATION haut nombre de copies ; p15A origine de réPLICATION moyen nombre de copies.

Ce module a été cloné sur un vecteur à haut nombre de copies (origine de réPLICATION ColE1), pour donner le plasmide pBS2, présentant également une cassette de résistance à l'ampicilline. Le plasmide pBS3 consiste en une construction comportant le même module, intégré dans un vecteur à moyen nombre de copies (origine p15A), et une cassette de résistance au chloramphénicol. Enfin, un dernier plasmide a été construit, pour permettre une conversion du DHB en OHB plus efficace et rapide en portant le gène *lldD* sous le contrôle d'un promoteur constitutif fort (pJ23106) pour donner pBS5 (voir Matériel et méthodes). Ces constructions ont été testées dans différentes souches d'*E. coli* en présence

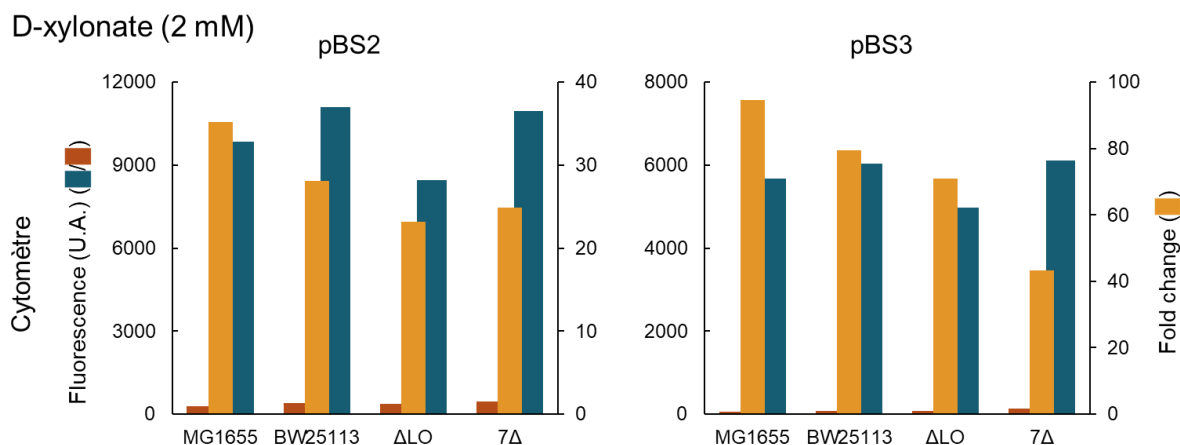
de différents inducteurs afin d'estimer (1) la spécificité d'inducteur de pYag, (2) l'affinité de pYag pour ses inducteurs, (3) la gamme de détection du biosenseur, (4) sa gamme dynamique.

## 1. Spécificité de substrat du biosenseur

### 1.1 Sensibilité, et méthodes de mesure

#### a. Sensibilité du biosenseur

Le D-xylonate a été utilisé comme contrôle de validation des biosenseurs construits et pour comparer leur sensibilité selon le type de plasmide : haut (pBS2) et moyen nombre de copies (pBS3), sur différentes souches d'*E. coli* : MG1655, BW25113, la souche délétée des lactates oxydases ( $\Delta$ LO), et la souche mutante pour les sept aldolases identifiées précédemment (7 $\Delta$ ). Les souches ont été mises en culture dans un milieu M9 + xylose 2 g/L, et 2 mM de D-xylonate ont été ajoutés lorsque la DO<sub>600</sub> a atteint 0.6-0.8. Après 6 h d'induction, les résultats obtenus en cytométrie indiquent que le plasmide à bas nombre de copies semble plus sensible, et donc meilleur pour l'expression de la SYFP2. En effet, le changement de fluorescence entre la condition contrôle et la condition testée est bien plus important avec pBS3 (en moyenne 2,5 fois plus important qu'avec pBS2), notamment en raison d'un bruit de fond plus faible avec le plasmide moyen nombre de copies. Le biosenseur pBS3 exprime donc une meilleure sensibilité au D-xylonate que pBS2 (Figure 26). La réduction du nombre de copies du biosenseur semble donc bénéfique pour la réduction du bruit de fond, et permet une intensité de fluorescence plus basse, mais un rapport de la fluorescence avec l'inducteur sur la fluorescence sans inducteur plus élevé qu'avec un plasmide haut copies.



**Figure 26** : Comparaison des fluorescences basales (rouge) et en présence de 2 mM de D-xylonate (bleu) émises et des Fold change (rapport entre la fluorescence avec et sans inducteur, orange) entre une MG1655 d'*E. coli* et la même souche déficiente pour les lactates oxydases identifiées (*dld*, *lldD*, *ykg*) ( $\Delta$ LO), ou pour les aldolases pyruvate spécifiques (*yfaU*, *yjhH*, *yagE*, *eda*, *garL*, *dgoA*, *mhpE*) (7 $\Delta$ ), et une autre souche d'*E. coli*, la BW25113, mesurées en cytométrie de flux. n = 1

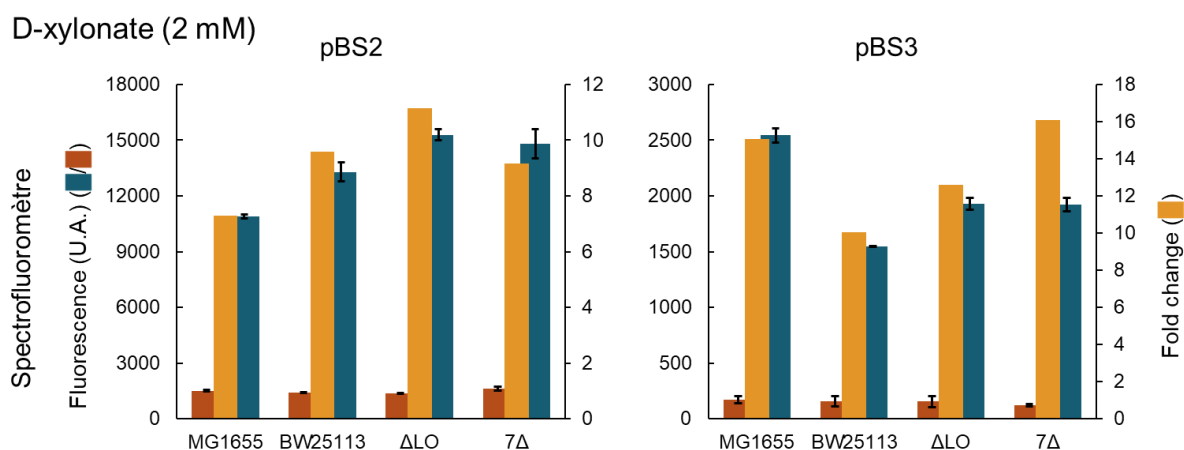
#### b. Le spectrofluoromètre permet de faciliter les expérimentations

Les utilisations du cytomètre et du spectrofluoromètre pour ces études du biosenseurs ont été réalisées, dans la mesure où les appareils étaient fortement sollicités



dans le laboratoire. Il était donc tout à fait judicieux d'effectuer cette comparaison. En effet, le cytomètre est un appareil plutôt dédié à l'analyse de cellules uniques (« single cell »), impliquant un traitement de l'échantillon en amont du passage au cytomètre. Le résultat est la fluorescence médiane d'un nombre fixe de cellules passant au travers du laser, alors que l'analyse au spectrofluoromètre prend en compte la population entière et peut être réalisée en continu.

Les cultures effectuées pour mesurer la fluorescence au spectrofluoromètre ont été faites de la manière suivante : lorsqu'une culture de la souche d'intérêt transformée avec le biosenseur adéquat atteignait une  $DO_{600}$  de 0.6-0.8, une unité de DO était prélevée et resuspendue dans un tampon phosphate salin (PBS), avant d'être incubée avec l'inducteur désiré. La fluorescence était ensuite monitorée par un spectrofluoromètre.



**Figure 27** : Comparaison des fluorescences basales (rouge) et en présence de 2 mM de D-xylonate (bleu) émises et des fold change (rapport de fluorescence entre les cellules incubées avec et sans inducteur, orange) entre une MG1655 d'*E. coli* et la même souche déficiente pour les lactates oxydases identifiées (*dld*, *lldD*, *ykg*) ( $\Delta LO$ ), ou pour les aldolases pyruvate spécifiques (*yfaU*, *yjhH*, *yagE*, *eda*, *garL*, *dgoA*, *mhpE*) ( $7\Delta$ ), et une autre souche d'*E. coli*, la BW25113, mesurée en spectrofluorométrie. n = 2

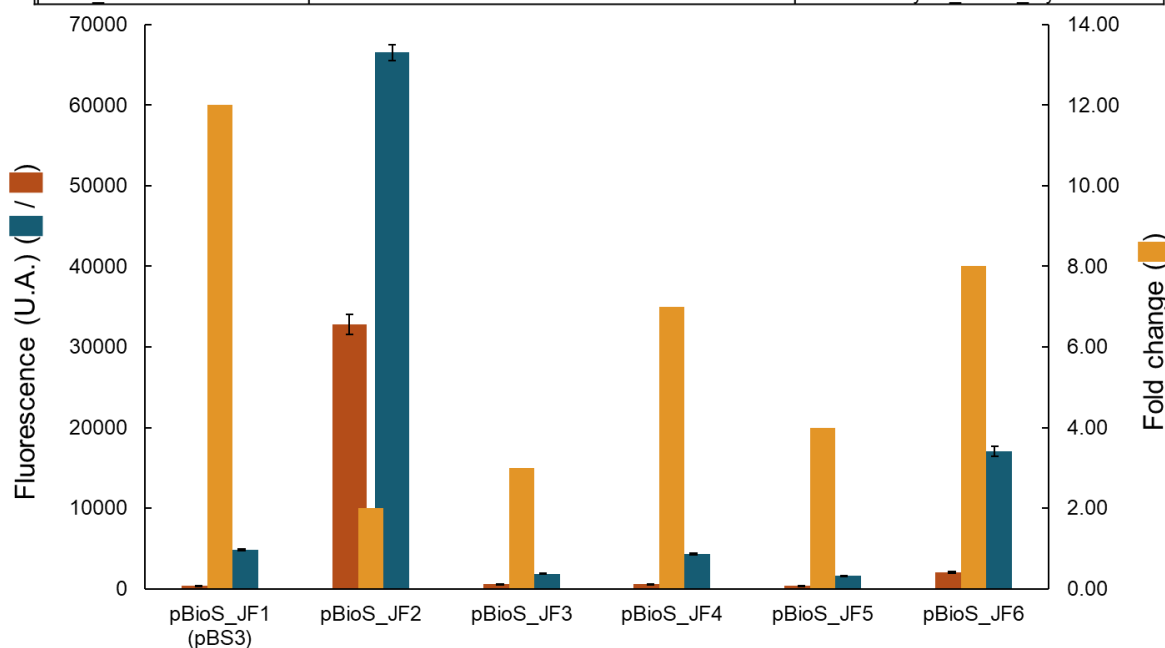
Avec le D-xylonate comme inducteur (2 mM et 6 h d'incubation), bien que l'intensité de fluorescence et le rapport entre les souches incubées avec et sans inducteur ne suivent pas la même tendance entre les souches, on retrouve bien en revanche un bruit de fond plus faible et un meilleur accroissement de la fluorescence pour pBS3 que pour pBS2 (Figure 27). Ces deux paramètres sont par contre plus importants en cytométrie (Figure 26). L'utilisation du spectrofluoromètre plutôt que le cytomètre est donc possible, si une praticité et facilité de manipulation est souhaitée plutôt qu'une précision dans la mesure de la fluorescence. L'utilisation du cytomètre permet une analyse plus précise et un facteur d'accroissement plus important et net qu'avec un spectrofluoromètre. L'analyse cellule par cellule d'une population offerte par la cytométrie pourrait aussi permettre d'observer l'émergence de sous-populations de cellules, plus ou moins fluorescentes de la moyenne, ce qui n'a toutefois pas été remarqué ici.

### c. Étude de la gamme dynamique du biosenseur

L'optimisation du rapport de la fluorescence entre la condition test et la condition contrôle a été recherchée. En effet, le bruit de fond peut être dû notamment à un

déséquilibre entre la quantité de répresseurs de transcription XynR et le nombre de promoteurs. Ainsi, si XynR n'est pas saturant et ne se fixe pas sur toutes les copies présentes dans la cellule, une transcription non spécifique, traduite par une fluorescence basale augmentée, pourra se manifester. À l'inverse, un déséquilibre en faveur du facteur de transcription nécessitera une plus grande quantité d'inducteurs pour interagir avec toutes les copies de XynR et permettre la transcription de *SYFP2* et exprimer une fluorescence. Des essais de modification de l'expression de XynR sur le biosenseur ont alors été entrepris, en changeant le promoteur naturel du gène par des promoteurs constitutifs synthétiques (iGem registry), ou en modifiant la puissance du RBS optimisé (Frazão *et al*, 2018b). Testées dans les mêmes conditions que précédemment, ces nouvelles constructions n'ont pas permis d'améliorer le facteur d'accroissement de la fluorescence, indiquant soit que l'équilibre déjà en place dans pBS3 était suffisamment stable, soit qu'un contrôle encore plus fin de l'expression de XynR est nécessaire (Figure 28).

Nom du biosenseur	Origine de répllication	Nombre de copies	Résistance	Structure du promoteur
pBioS_JF1 (pBS3)	p15A	moyen	CmR	Promoteur naturel de xynR_nt-rbsxynR_sfyP2
pBioS_JF2	p15A		CmR	Promoteur naturel de xynR_St-rbs_sfyP2
pBioS_JF3	p15A		CmR	J23119 promoter of xynR_St-rbs_sfyP2
pBioS_JF4	p15A		CmR	J23100 promoter of xynR_St-rbs_sfyP2
pBioS_JF5	p15A		CmR	J23104 promoter of xynR_St-rbs_sfyP2
pBioS_JF6	p15A		CmR	J23106promoter of xynR_St-rbs_sfyP2



**Figure 28** : Comparaison des fluorescences basales (rouge) et en présence d'inducteur (bleu) émises et des fold change (rapport entre la fluorescence en présence d'inducteur et basale, orange) entre les différentes constructions de biosenseur avec différents promoteurs constitutifs et RBS. St\_RBS : RBS synthétique. n = 2

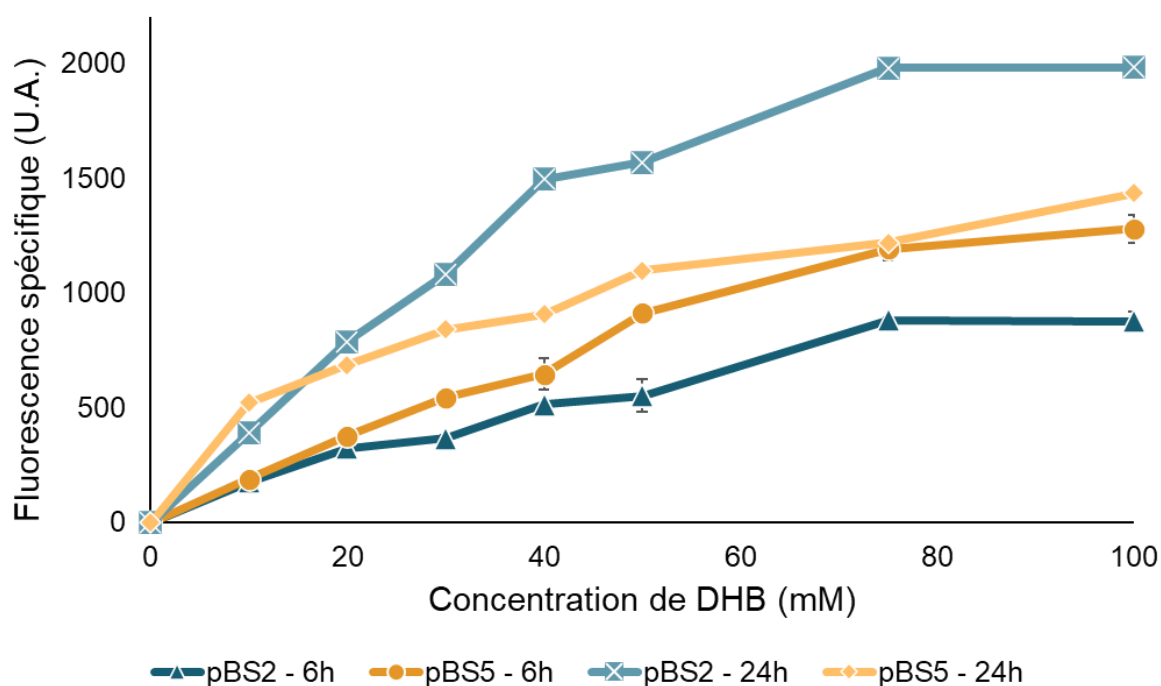
En effet, les plasmides permettant une réduction du bruit de fond (donc une augmentation de l'expression de XynR) ne permettaient pas d'exprimer une fluorescence significativement différente en présence de D-xylonate : la balance penchait alors du côté du répresseur (pBios\_JF3, pBios\_JF5). L'inverse a également été observé avec pBios\_JF2, où le bruit de fond était bien supérieur à la condition contrôle, signifiant un déséquilibre en faveur de la quantité de promoteur pYag dans la cellule. D'autres points pourraient cependant être modifiés afin d'éviter de moduler la concentration en facteur de

transcription, comme l'affinité de XynR pour pYag ou pour le D-xylonate/l'OHB, ou encore la force promotrice de pYag.

#### d. Étude de la spécificité du biosenseur

##### d.1. Réponse du biosenseur au DHB

Les plasmides pBS2 et pBS5 ont d'abord été testés sur la souche d'*E. coli* substr. K12 MG6155. Les transformants ont été mis en culture dans un milieu M9 xylose 2 g/L jusqu'à l'obtention d'une  $DO_{600} \approx 0.4 - 0.6$ , où différentes concentrations de DHB ont été ajoutées au milieu. Après incubation, la fluorescence émise par les cellules a été analysée (voir Matériel et méthodes). Les résultats de la figure 29 montrent que la fluorescence spécifique (obtenue au cytomètre, en soustrayant la fluorescence de la condition contrôle à la fluorescence en présence de DHB) dépend de la concentration de DHB, et augmente au fil du temps. Le facteur d'accroissement obtenu lors de l'induction du biosenseur en présence de DHB confirme la possibilité d'utiliser la construction pBS2 pour souligner la présence de DHB. Dès 10 mM de DHB, le facteur obtenu entre la condition avec DHB et la condition contrôle était de 2.35 et atteignait un plateau à partir de 75 mM, à 7.35. Le biosenseur pBS5 est également fonctionnel, mais sans différence de fluorescence entre 6 h et 24 h après le début de l'induction au DHB. Il se peut que la production de LldD par pBS5 représente un fardeau métabolique trop important pour les cellules.

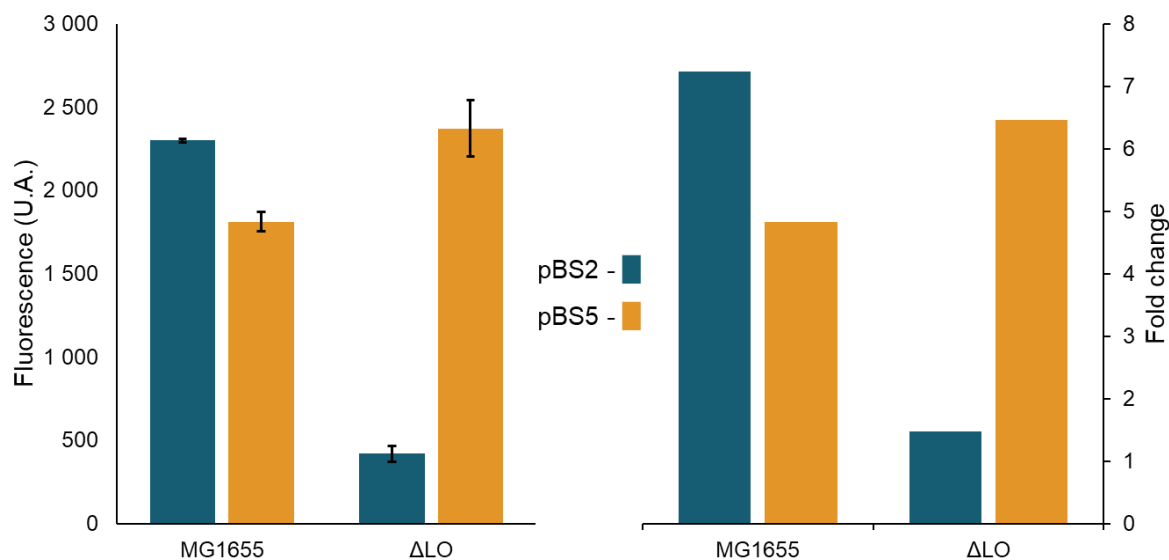


**Figure 29** : Fluorescence spécifique émise par une souche MG1655 d'*E. coli* transformée avec pBS2 ou pBS5, en fonction de différentes concentrations de DHB, après 6 h et 24 h d'induction. n = 2

L'affinité de ces biosenseurs pour le DHB à 24 h était de 58 mM pour pBS2 et 33 mM pour pBS5. Le biosenseur pBS5 est donc plus sensible au DHB après 24 h d'incubation, mais présente une moins bonne gamme dynamique que pBS2 (facteur d'accroissement maximum de 4.8 contre 7.2 pour pBS2). Cette très faible réponse au DHB, en comparaison de celle obtenue avec le D-xylonate, laisse supposer que d'autres molécules que le DHB lui-même seraient à l'origine de l'expression de la SYFP2.

### d.2. L'OHB est un meilleur activateur du biosenseur que le DHB

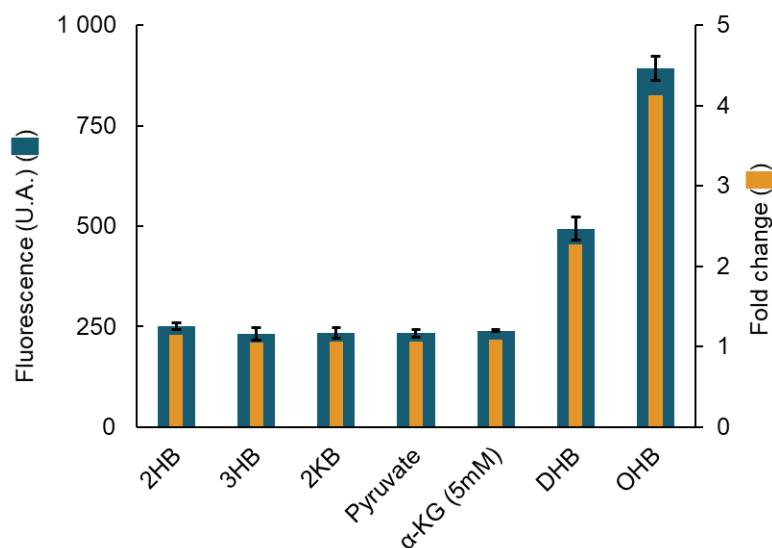
Étant donnée la faible affinité du biosenseur pour le DHB, j'ai entrepris de vérifier si la fluorescence observée était effectivement due à la présence de DHB lui-même, ou si un de ces produits de dégradation pouvait être à l'origine de cet effet. J'ai pour cela testé pBS2 et pBS5 sur une souche MG1655 et une souche déficiente pour les lactates oxydases. En effet, puisque le seul moyen pour le DHB d'être métabolisé est d'abord en étant oxydé par une lactate oxydase (LO), et si le biosenseur est sensible à un produit de dégradation du DHB plutôt qu'au DHB lui-même, alors une souche déficiente pour les lactate oxydases n'émettra pas de fluorescence en présence de DHB. En revanche, en complétant cette déficience en utilisant le pBS5 qui surexprime LldD, un certain niveau de fluorescence devrait être retrouvé. Le pBS5 est donc ici utilisé afin de compléter la déficience en LO dans une souche  $\Delta LO$ . Ces différentes combinaisons ont été testées par la mesure de la fluorescence en cytométrie après 24 h d'incubation avec 100 mM de DHB (Figure 30). Comme attendu, la souche MG1655 transformée avec pBS5 ne semblait pas exprimer une fluorescence plus importante que la même souche transformée avec pBS2 (Figure 30). En revanche la fluorescence est beaucoup moins importante dans le cas de pBS2 transformé dans la souche déficiente pour les lactates oxydases, et est similaire à celle de la condition contrôle sans DHB (rapport de 1.5). À l'inverse, avec pBS5 transformé dans la même souche, on retrouve une meilleure fluorescence que dans la souche MG1655, et un meilleur rapport entre les fluorescences également. Ces résultats indiquent donc que le biosenseur est spécifique, non pas du DHB, mais d'un de ses produits de dégradations. Il pourrait s'agir de l'OHB, mais d'autres comme le pyruvate, le formaldéhyde ou le formate ne sont pas à exclure.



**Figure 30** : Comparaison des fluorescences émises et des fold change (rapport de la fluorescence entre la condition avec et sans inducteur) entre une MG1655 *d'E. coli* et la même souche déficiente pour les trois lactates oxydases identifiées précédemment, transformées avec pBS2 ou pBS5, 24 h après induction en présence de 100 mM de DHB.  $\Delta LO$  lactate oxydase (*dld*, *lldD*, *ykg*).

Des tests préliminaires d'inducteurs ont été effectués avec différents inducteurs structurellement semblables au DHB, ajoutés à une culture de MG1655 transformées avec pBS2. Après 24 h d'incubation avec 10 mM de ces inducteurs, la fluorescence a été mesurée en cytométrie en flux. Du fait que la forme saline de l' $\alpha$ -cétoglutarate nécessite deux ions sodium pour une molécule d' $\alpha$ -cétoglutarate (acide dicarboxylique), seuls 5 mM de cette

molécule (donc 10 mM de sodium) ont été ajoutés au milieu de culture, afin de garder une cohérence entre les conditions contrôles et les conditions testées. Le 2-hydroxybutyrate, le 3-hydroxybutyrate, le 2-cétobutyrate, le pyruvate et l' $\alpha$ -cétoglutarate ne modifient pas la fluorescence émise par les cellules (Figure 31).



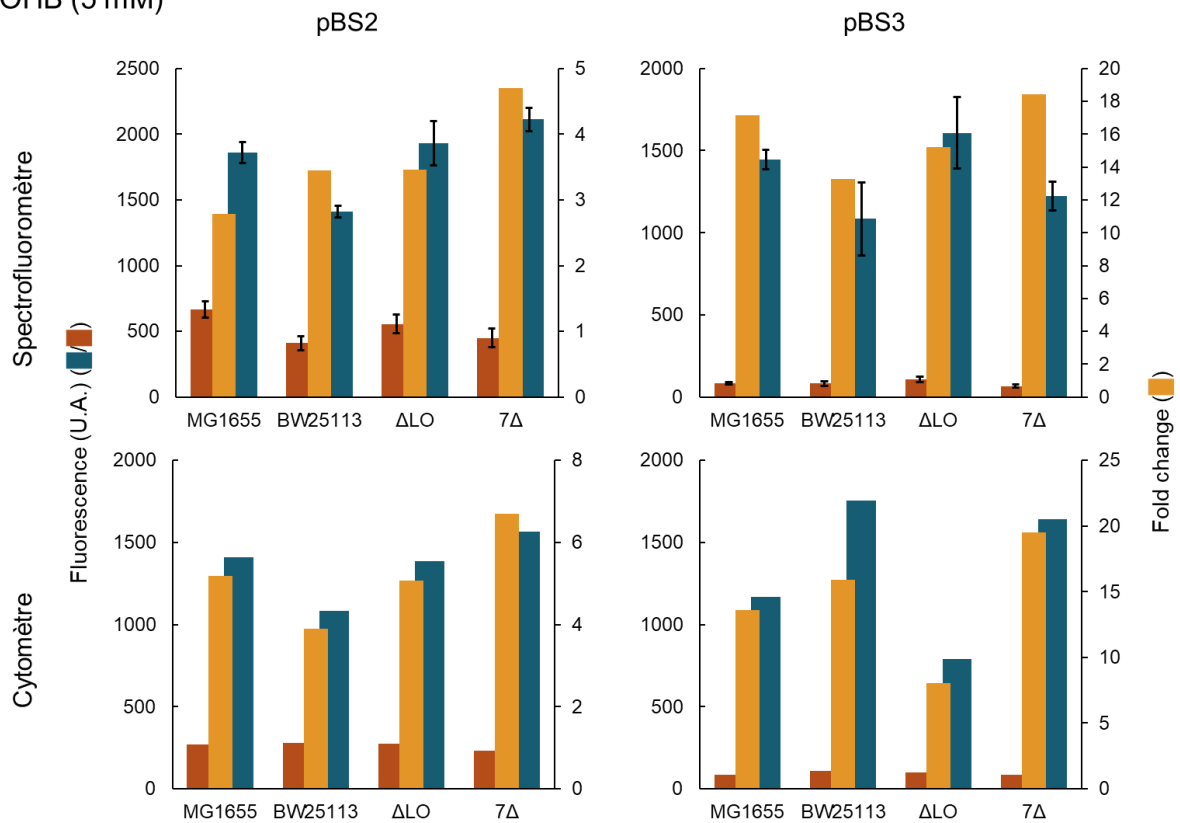
**Figure 31 :** Fluorescence émise par une souche MG1655 *d'E. coli* transformée avec pBS2, en fonction de différents inducteurs. Le fold change représente le rapport entre la fluorescence en présence d'inducteur et sans. 2HB 2-hydroxybutyrate ; 3HB 3-hydroxybutyrate ; 2KB 2-cétobutyrate ;  $\alpha$ -KG  $\alpha$ -cétoglutarate ; DHB 2,4-dihydroxybutyrate ; OHB 2-oxo-4-hydroxybutyrate

Un facteur d'accroissement plus de deux fois plus important pour le DHB est observé, ce qui est en accord avec les précédents résultats. En revanche, une fluorescence 4 fois plus élevée que la condition contrôle est observée après ajout d'OHB. Ce résultat confirme qu'il s'agit bien d'un produit issu de l'oxydation du DHB, et probablement l'OHB, qui permet l'activation du biosenseur.

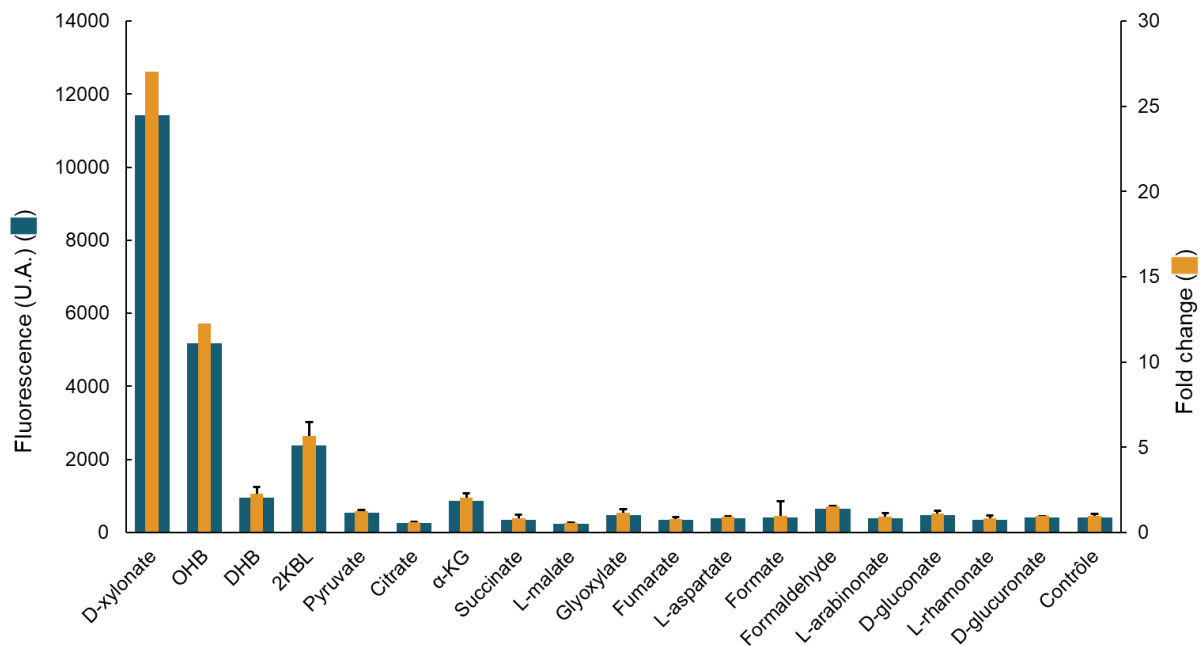
De ces constats, la réponse des biosenseurs pBS2 et pBS3 en présence de 5 mM d'OHB a été mesurée (Figure 32). Ces expériences montrent que les biosenseurs répondent effectivement à la présence d'OHB dans le milieu. Elles montrent aussi qu'en présence d'OHB, la souche 7 $\Delta$ , déficiente pour les aldolases, qui évite donc la dégradation de l'OHB, exprime globalement une fluorescence plus importante par rapport à la condition contrôle sans inducteur que les autres souches, confirmant le rôle de l'OHB dans l'activation du biosenseur. De la même manière qu'en présence de D-xylonate, pBS3 est plus sensible que pBS2, et l'analyse avec le spectrofluoromètre permet l'obtention de mesures significativement différentes des conditions contrôles, bien qu'elles soient moins sensibles.

Une étude plus approfondie de la spécificité du biosenseur a ensuite été réalisée avec la souche 7 $\Delta$  transformée avec le pBS3, afin d'éviter la dégradation de l'OHB. Une liste d'acides organiques (et un aldéhyde) variés, structurellement proches du DHB et présents dans le métabolisme d'*E. coli* a été testée. 10 mM de ces possibles inducteurs ont été incubés, et les fluorescences, mesurées au spectrofluoromètre, sont résumées dans la figure 33.

OHB (5 mM)



**Figure 32** : Comparaison des fluorescences basales (rouge) et en présence d'inducteur (bleu) émises et des fold change (rapport entre la fluorescence en présence d'inducteur et sans, orange) entre une MG1655 d'*E. coli* et la même souche déficiente pour les lactates oxydases identifiées (*dld*, *lldD*, *ykg*) ( $\Delta LO$ ), ou pour les aldolases pyruvate spécifiques (*yfaU*, *yjhH*, *yagE*, *eda*, *garL*, *dgoA*, *mhpE*) (7 $\Delta$ ), et une autre souche d'*E. coli*, la BW25113. (Cytomètre n = 1, spectrofluoromètre n = 2)

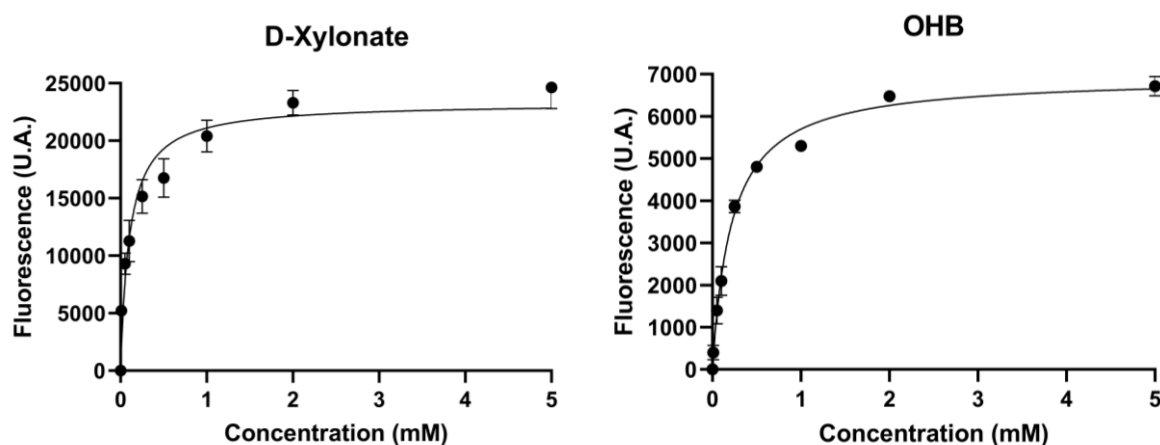


**Figure 33** : Comparaison de la fluorescence et des fold change (rapport de fluorescence entre les conditions avec et sans inducteur), en fonction de différents inducteurs émis par une MG1655 d'*E. coli* déficiente pour les aldolases (7 $\Delta$ ) transformée avec pBS3 (spectrofluoromètre, 6 h après induction, n = 2)

Ces résultats montrent qu'outre le D-xylolate, seul l'OHB permet une induction significative du biosenseur (fluorescence 27 fois et 12 fois supérieure à la souche sans inducteur). L'induction due à la présence de DHB est faible (rapport de fluorescence de 2.3), mais attendue puisque dans ces conditions, LldD n'étant pas surexprimée, l'oxydation du DHB en OHB n'est donc pas accélérée. La réponse du biosenseur à l'ajout de 2-cétobutyrolactone (2KBL) et d' $\alpha$ -cétoglutarate peut en revanche être surprenante (fluorescence 5.67 fois et 2 fois supérieure à la souche sans inducteur). Toutefois, la 2KBL peut être utilisée pour générer chimiquement de l'OHB en présence d'hydroxyde de sodium, impliquant que l'équilibrage du pH d'une solution de 2KBL au NaOH génèrerait alors de l'OHB. Il a de plus été montré que la 2KBL s'hydrolyse spontanément en OHB lorsqu'elle est en solution dans l'eau (données non publiées). Une quantité marginale d'OHB pourrait alors être présente dans la solution de 2KBL et être à l'origine de la réponse du biosenseur observée. Bien que la réponse à l' $\alpha$ -cétoglutarate soit faible et se situe dans la marge d'erreur de mesure, elle pourrait être due à l'activité de certaines transaminases. Nous avons en effet déjà vu que certaines transaminases naturelles d'*E. coli* sont capables de catalyser la réaction de transamination d'une L-homosérine vers un acide organique pour produire de l'OHB et un acide aminé, qui serait en l'occurrence du L-glutamate. La très faible fluorescence mesurée pourrait donc être due à la présence d'OHB résultant de la conversion subie par l' $\alpha$ -cétoglutarate et l'homosérine présente dans les cellules. Il reste toutefois possible que ces deux molécules soient également des activateurs naturels du biosenseur.

## 2. Affinité de substrat du biosenseur

Le biosenseur pBS3 a été testé avec une gamme de concentrations en D-xylolate et OHB et les courbes de réponse sont présentées en Figure 34. Les affinités de substrat du biosenseur pBS3 ont ainsi pu être obtenues pour le D-xylolate et l'OHB, et sont respectivement de  $0.11 \pm 0.04$  mM et  $0.22 \pm 0.04$  mM.



**Figure 34** : Courbes d'affinité obtenues pour le D-xylolate et l'OHB. Les courbes en trait plein représentent la régression non linéaire (GraphPad,  $R^2 = 0.95$  (D-xylolate) et  $0.99$  (OHB)).

Ces courbes permettent aussi l'obtention d'autres données importantes concernant ce biosenseur :

- sa gamme de détection : des concentrations entre au moins 0.01 mM et au maximum 2 mM sont détectables pour les deux molécules ;

- sa gamme dynamique, comprise entre la fluorescence basale et la fluorescence mesurée à concentration maximale de substrat (Zhou & Zhang, 2023). Elles sont comprises entre 718 et 24631, soit un rapport de 35.3 pour le D-xylonate, et entre 498 et 7216.5, soit un rapport de 14.5 pour l'OHB.

### 3. Conclusion : le biosenseur est spécifique du D-xylonate et de l'OHB

Lors du développement d'un biosenseur, un certain nombre de facteurs sont à prendre en compte (Zhou & Zhang, 2023). En l'occurrence, ont été étudiées (1) sa spécificité, et les molécules qui permettent son activation ; (2) sa sensibilité et la concentration minimale requise pour son activation ; (3) sa gamme de détection, et les concentrations minimales et maximales détectables ; (4) sa gamme dynamique et la concentration nécessaire pour obtenir un rapport de fluorescence maximal entre la condition avec inducteur et la condition sans inducteur ; (5) quelques données sur son temps de réponse ont pu être obtenues, et méritent toutefois d'être complétées ; (6) la coopérativité, qui détermine si plusieurs facteurs de transcription peuvent coopérer dans l'activation du biosenseur, ce qui n'est pas le cas pour ce biosenseur puisque pYag est exclusif pour XynR, et inversement (Shimada *et al*, 2017). Plusieurs biosenseurs sensibles au D-xylonate et à l'OHB ont donc pu être construits avec succès, et sont utilisables dans diverses conditions.

Il a été mis en évidence le fait que l'utilisation d'un spectrofluoromètre pour la mesure de la fluorescence permettait d'obtenir des résultats moins sensibles, mais des rapports de fluorescence entre condition test et contrôle comparables à ceux obtenus en cytométrie en flux. Les expérimentations ainsi menées ont pu être allégées, et davantage de conditions testées à la fois. L'analyse en microscopie à fluorescence a immédiatement été mise de côté, en raison : (1) d'un photoblanchiment extrêmement rapide sur le microscope utilisé, empêchant une analyse confortable des cellules ; (2) de la disponibilité d'un cytomètre en flux et d'un spectrofluoromètre qui permettent une analyse quantitative en plus de qualitative, et de manière automatisée.

L'absence de fluorescence émise par un mutant pour les lactates oxydases, mais retrouvée en complétant ces mutations par la surproduction de LldD, a permis de démontrer que le DHB n'est pas un inducteur de ce biosenseur. Afin d'en apprendre plus, il conviendrait d'examiner les interactions entre ces différents inducteurs et XynR. En effet, pour rappel, c'est XynR, le répresseur du biosenseur, qui interagit physiquement avec l'inducteur. L'interaction physique pourrait être étudiée directement par la co-cristallisation de XynR en solution avec ces molécules. Les cristaux pourraient ensuite être analysés par diffraction aux rayons X. La cristallisation requiert de grandes quantités de protéines pures, et des conditions très particulières. Aussi, il est possible de ne pas être en mesure de générer de cristaux, ou qu'ils ne diffractent pas à une résolution suffisamment importante pour pouvoir interpréter les résultats. En outre, aucune structure de XynR n'est décrite dans la littérature, les conditions de cristallisation seraient donc à établir. L'étude de cette interaction pourrait également se faire en RMN grâce aux perturbations du déplacement chimique des acides aminés de XynR impliqués dans l'interaction (Williamson, 2013). Cette dernière méthode permettrait en même temps d'identifier les acides aminés impliqués dans l'interaction et l'affinité de la protéine pour



son ligand. Elle nécessite de produire une protéine pure, et au minimum marquée à l'isotope  $^{15}\text{N}$ . Elle s'avère être donc potentiellement plus facilement mise en œuvre que la cristallisation.

La sensibilité du biosenseur a été étudiée sous l'aspect du nombre de copies du biosenseur, et en l'occurrence l'utilisation d'un plasmide à moyen nombre de copies plutôt qu'un haut nombre de copies permet de réduire le bruit de fond et d'augmenter l'accroissement de la fluorescence. L'utilisation de plasmide bas copies pourrait permettre un meilleur équilibre entre le nombre de molécules de XynR produites et le nombre de copies de pYag sur lesquels se lier. Cet effet bénéfique peut aussi très certainement être lié au soulagement du fardeau métabolique que représente la présence d'un grand nombre de copies d'un plasmide : machinerie de réplication, transcription, traduction des gènes de résistance aux antibiotiques, etc. Cet effet est d'autant plus important dans le pBS5, qui porte en complément une cassette d'expression d'une protéine associée à la membrane, sous un promoteur fort (Togna *et al*, 1993). Pour aller plus loin, il pourrait être intéressant de vérifier l'effet d'un plasmide à bas nombre de copies (origine PSC101) sur le niveau de fluorescence et l'accroissement de celle-ci. De même, en insérant la cassette d'expression de LldD sur un plasmide à plus bas nombre de copies, et avec un promoteur moins fort, il pourrait être possible d'obtenir une construction donnant une meilleure réponse à la présence de DHB. La sensibilité a également été étudiée par le niveau d'expression de XynR, qui doit être un point crucial dans l'expression du niveau basal de fluorescence (Mannan *et al*, 2017). Le promoteur d'expression et le RBS de XynR ont donc été modifiés, mais sans gain sur le facteur d'accroissement de la fluorescence.

La gamme de détection de pBS3 pour le D-xylonate et l'OHB a pu être estimée, s'étendant de 0.01 mM à 2 mM pour les deux molécules. Cette gamme pourrait toutefois être diminuée, et des tests supplémentaires seraient nécessaires à une plus faible concentration. Conjointement à la gamme de détection, la gamme dynamique de pBS3 a également pu être obtenue : pour le D-xylonate, le facteur d'accroissement maximal obtenu est de 35.3 alors qu'il est pour l'OHB de 14.5.

## II. Applications

### **1. Identification de transporteurs de DHB**

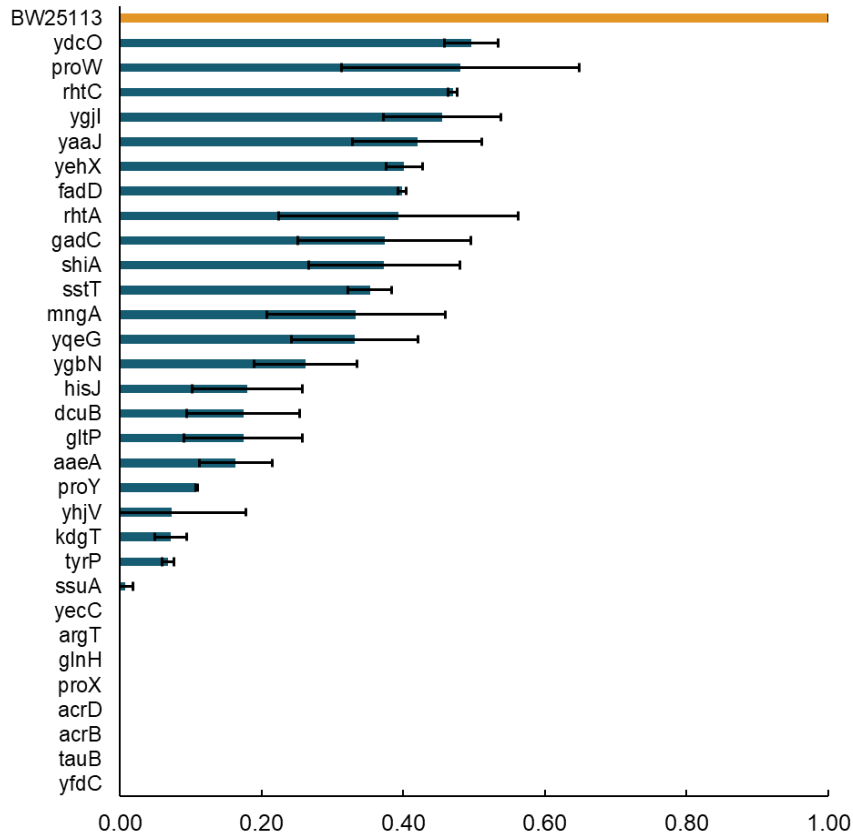
Pour rappel, un transporteur de DHB a plus tôt pu être identifié, nommément YgbN. Il était toutefois aussi fortement suspecté que d'autres transporteurs jouent ce rôle. En dépit d'un biosenseur sensible au DHB, pBS5, plus sensible au DHB que pBS2, a été utilisé afin de cribler une banque de simples mutants pour une sélection de transporteurs d'acides organiques. L'OHB étant l'inducteur du biosenseur, la réaction d'oxydation du DHB en OHB ne devrait pas être limitante, et la surproduction de LldD par pBS5 devrait aider en ce sens. De cette manière, une souche mutante pour un transporteur spécifique du DHB devrait voir son flux de DHB et donc d'OHB diminuer, et la fluorescence résultant de l'activation du biosenseur devrait diminuer également.

Brièvement, une liste de 163 transporteurs pour différents acides mono- et dicarboxyliques a d'abord été établie grâce à Gene Ontology (Ashburner *et al*, 2000). Les souches d'*E. coli* BW25113 mutantes correspondantes pour ces transporteurs ont été

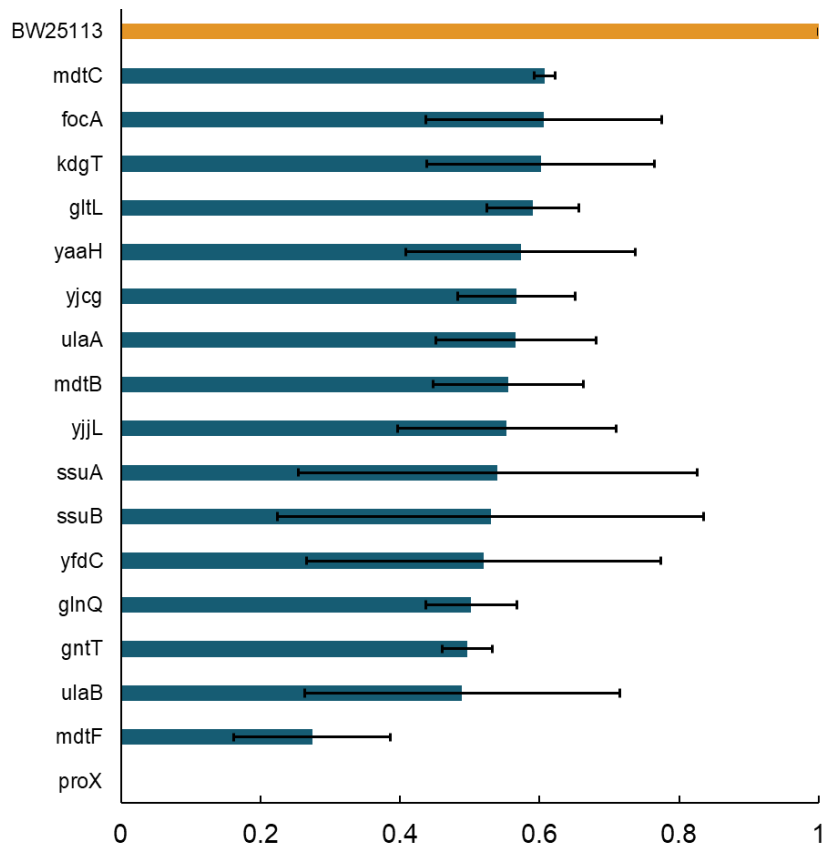
récupérées de la banque KEIO (Baba *et al*, 2006) et transformées avec le pBS5. Les souches ont été mises en culture dans un milieu M9 xylose 2 g/L, et 10 ou 100 mM de DHB ont été rajoutés une fois que la DO<sub>600</sub> avait atteint 0.4-0.6. Après 24 h d'incubation, la fluorescence des cellules a été mesurée par cytométrie. Sur 163 souches testées, 158 ont donné des résultats exploitables, alors que cinq restantes ont montré des défauts de croissance, probablement en raison de la mutation qu'elles portaient et des conditions de croissance employées. Les résultats de cette expérience montrent qu'à 10 mM, 124 souches étaient moins fluorescentes que la souche contrôle. 36 % de ces souches exprimaient une fluorescence deux fois plus faible que la souche contrôle (Figure 35). Parmi elles, la souche mutante pour *ygbN* est retrouvée, avec une fluorescence de 26 % de celle de la souche contrôle. Ce point particulier montre que ce système d'utilisation du biosenseur pour la détection de transporteur de DHB semble fonctionnel. Les souches exposées à 100 mM de DHB étaient moins nombreuses à afficher une fluorescence inférieure à celle de la souche contrôle (99 souches), mais elles étaient surtout moins nombreuses à être significativement moins fluorescentes : ce ne sont que 17 % d'entre elles qui affichaient moins de 0.6 fois la fluorescence de la souche contrôle. Dans ces conditions en revanche, le mutant *ygbN* montrait une fluorescence de 103 % de celle de la souche contrôle. Ceci, avec le fait qu'il y ait moins de souches moins fluorescentes que la souche contrôle, pourrait être dû au fait que la concentration de 100 mM de DHB utilisée est trop importante : les transporteurs d'ordinaire peu affins pour le DHB se retrouvent saturés dans ces conditions et peuvent facilement compléter la mutation qui serait visible avec seulement 10 mM de DHB. On retrouve toutefois dans ces deux conditions quelques souches mutantes pour les mêmes transporteurs et qui sont significativement moins fluorescentes que le contrôle. Il s'agit des souches mutantes pour les gènes *mdtF*, *proX*, *ssuA*, *kdgT* et *yfdC*. Ces gènes codent respectivement pour une sous-unité d'une perméase présumée, un transporteur glycine-bétaïne, un transporteur présumé de sulfonate aliphatique, un symporteur 2-dehydro-3-deoxy-D-gluconate:H<sup>+</sup> et une protéine membranaire supposée membre des transporteurs formate-nitrite (EcoCyc; Keseler *et al*, 2017). En particulier, *kdgT* semble être un candidat intéressant : son ligand naturel, le 2-déhydro-3-déoxy-D-gluconate, est structurellement proche du thréonate, lui-même proche du DHB (Figure 36).

Or *ygbN*, qui code pour un transporteur supposé du thréonate chez *E. coli*, et originellement attribué comme appartenant à la famille des transporteurs de gluconate, a déjà été caractérisé comme transporteur de DHB (qui est également retrouvé dans ce crible). De plus, la surexpression de ce transporteur s'était avérée bénéfique pour la production de DHB à partir de glycolaldéhyde, et ce bénéfice était inhérent à la présence de thréonate dans le milieu (voir Introduction, II.1.4) (Frazão *et al*, 2023). Enfin, YagE avait déjà été identifiée comme étant active sur l'OHB, alors que son substrat naturel était le même que celui rapporté pour le transporteur KdgT : le 2-déhydro-3-déoxygluconate. Il est donc pertinent de supposer que *kdgT* coderait pour un transporteur dont la « promiscuité de ligand » s'étendrait au DHB, et que ce transporteur pourrait éventuellement être à l'origine de flux de DHB vers ou en-dehors de la cellule.

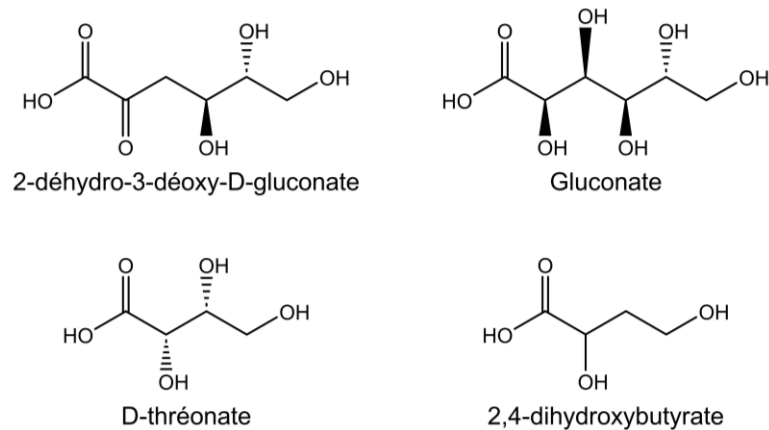
A. [DHB] 10 mM



B. [DHB] 100 mM



**Figure 35** : Rapport de la fluorescence entre les souches BW25113 délétées pour les gènes indiqués et la souche contrôle BW25113, transformées avec pBS5, en présence de 10 mM (a) ou 100 mM (b) de DHB, après 24 h d'induction. (n = 2)



**Figure 36** : Comparaison des structures moléculaires de composés semblables au DHB.

Un inconvénient majeur de cette méthode de criblage est bien entendu le fait qu'une étude de délétion combinatoire s'avèrerait compliquée, quoique nécessaire. En effet, comme déjà précisé, certains transporteurs pourraient avoir une affinité faible pour le DHB, et une synergie entre plusieurs d'entre eux pourrait être à l'origine d'un transport du DHB observé dans une souche sauvage d'*E. coli*. La suppression d'un seul transporteur à la fois ne réduirait que trop peu la fluorescence associée à la présence d'OHB, et pourrait retourner dans ce cas un faux négatif. L'utilisation de concentrations moins élevées de DHB, ainsi qu'une construction d'un biosenseur sur un plasmide à moyen ou bas nombre de copies, pourrait permettre d'améliorer la spécificité et la sensibilité de la réponse, comme cela avait été fait avec pBS3, et mettre en évidence les transporteurs les plus affins. Nous avons aussi vu dans ces résultats que certaines souches émettaient une fluorescence plus importante que la souche contrôle (jusqu'à deux fois). Une hypothèse permettant de répondre à ce point repose sur la manière dont ont été construits les mutants de la banque KEIO. Chacun des gènes ciblés dans la banque a été remplacé par une cassette de résistance à la kanamycine, constituée d'un promoteur constitutif et du gène de résistance à la kanamycine (la néomycine phosphotransférase II) (Baba *et al*, 2006). Cela signifie que n'importe quel gène, s'il est situé en aval du gène remplacé par cette cassette dans l'opéron, subit le même niveau d'expression constitutif que le gène de résistance à la kanamycine. Ainsi, des transporteurs qui transporteraient potentiellement le DHB pourraient être surexprimés si un gène en amont dans l'opéron était supprimé et remplacé par cette cassette. En l'occurrence, cela peut être le cas pour les souches mutantes pour *mdtE* et *proV* par exemple (fluorescence relative de 2.2 et 1.9), qui se situent dans leurs opérons en amont de *mdtF* et *proX*, dont j'ai suspecté le rôle dans le transport du DHB suite au premier crible. Il est alors tout à fait possible que dans ce contexte, *mdtF* et *proX* soient surexprimés du fait de l'expression constitutive du gène de résistance à la kanamycine, ayant remplacé un gène en amont dans l'opéron. Pour résoudre ce problème, il faudrait débarrasser les souches de cette banque de la cassette de résistance, opération facilement rendue faisable grâce aux séquences FRT situées de part et d'autre de celle-ci (Datsenko & Wanner, 2000). Toutefois, la suppression de cette résistance lors d'un crible peut s'avérer fastidieuse, et la perte de la résistance pourrait également favoriser le risque de contamination, qui est plus élevé du fait du grand nombre de souches à manipuler. C'est de la même manière qu'il faut prendre en considération le risque que la banque KEIO contienne des erreurs. En effet, elle rassemble 3985 clones mutants, basés sur une

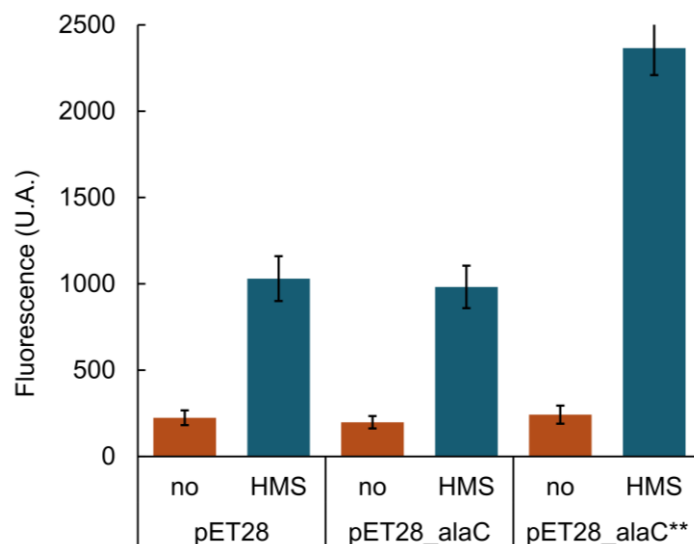
annotation qui a depuis été révisée et modifiée. Il est alors possible que certains mutants aient été inversés ou que les mutations ne soient pas correctement ciblées (Yamamoto *et al*, 2009). De plus, les mutations de transporteurs fatals pour la survie des cellules n'ont pas pu être testées non plus. Pour confirmer les résultats obtenus par ce crible, il pourrait être envisageable de sélectionner quelques candidats et d'investiguer sur leurs effets individuels dans des conditions de surproduction de ces transporteurs : dans ce cas, si les transporteurs ciblés s'avéraient affins pour le DHB, une augmentation de la fluorescence des cellules devrait être observée, de même qu'une diminution de DHB extracellulaire plus prononcée que dans la culture contrôle. Enfin, comme dans tout crible, il est naturel que des résultats faux négatifs et faux positifs ressortent. De plus, parmi la liste de transporteurs que j'ai criblés, seuls les transporteurs d'acides carboxyliques étaient recensés. Il est possible que certains n'aient pas encore été annotés en tant que tel, ou que d'autres transporteurs (spécifiques d'autres molécules comme des sucres par exemple), puissent agir sur le DHB.

## 2. Criblage de transaminases modifiées pour la production d'OHB

Une deuxième façon d'utiliser le biosenseur développé comme outil serait de s'en servir dans le cadre du criblage d'une banque de transaminases modifiées. Ce travail interviendrait dans l'optimisation de la production de DHB. En effet, nous avons vu dans la partie II.1.3 de l'introduction que la transaminase était très certainement l'enzyme limitante de la voie homosérine dans la production de DHB. La question du criblage d'une banque de transaminases modifiées a donc été investiguée. Lors de ce crible, les meilleures enzymes productrices d'homosérine *in vivo* seraient sélectionnées grâce à la plus forte intensité de fluorescence qu'exhiberait la cellule, et qui serait directement liée à l'efficacité de production d'OHB de l'enzyme criblée.

En guise de preuve de concept, plusieurs souches d'*E. coli* substr. K12 MG1655  $\Delta alaC$  co-transformées avec différents plasmides de surexpression (pET28, pET28\_alaC, pET28\_alaC\*\* (A142P:Y275D)) et pBS3 ont été mises en culture. Pour rappel, l'enzyme mutante AlaC A142P:Y275D avait montré une meilleure activité d'aminotransférase sur l'homosérine que l'enzyme sauvage (Bouzon *et al*, 2017), et était préférée pour une meilleure production de DHB *in vivo* par cette voie (Malfoy *et al*). Les cellules ont été mises en culture dans un milieu M9 + xylose 5 g/L, et lorsque la DO<sub>600</sub> a atteint 0.5-0.6, 0.5 mM d'IPTG ont été ajoutés pour induire l'expression de la transaminase. Après 16 h d'induction, les cellules ont été récupérées et resuspendues dans un tampon phosphate salin (PBS) et mises en contact avec 10 mM d'homosérine. La fluorescence a ensuite été analysée au spectrofluoromètre (Figure 37).

Les résultats montrent que la fluorescence obtenue en présence d'homosérine avec un pET28 vide est, de manière surprenante, plus importante d'un facteur 4.6 par rapport à la condition contrôle. La fluorescence obtenue avec le plasmide pET28 exprimant AlaC sauvage est de la même intensité qu'avec le plasmide contrôle, ce qui signifie qu'aucune production significativement différente d'OHB n'a eu lieu. En revanche, les cellules co-transformées avec pBS3 et pET28 exprimant AlaC\*\* montrent une fluorescence après incubation avec de l'homosérine bien plus importante que dans la condition contrôle (près de 10 fois), et 2.6 fois plus importante qu'avec un pET28 vide.



**Figure 37** : Fluorescence émise par des souches d'*E. coli* transformées avec pBS3 et un pET28 exprimant différentes transaminases, après 5 heures d'incubation avec (HMS, bleu) ou sans (« no », rouge) homosérine. (n = 2)

Ces résultats montrent que l'utilisation de pBS3 comme outil pour le criblage de transaminases mutantes pour la production d'OHB est réalisable. Une vigilance particulière devra sûrement être apportée à la conception de la banque de mutants générée, en favorisant une approche rationnelle plutôt que complètement aléatoire. Ceci dans le but de réduire la quantité de mutants à cribler et donc de diminuer la moyenne du bruit de fond dont il faudra discriminer les mutants intéressants. De la même manière que précédemment, l'utilisation d'un plasmide à bas nombre de copies pourrait présenter certains avantages notamment sur la diminution du bruit de fond (sans homosérine). Le bruit de fond observé avec le pET28 vide en présence d'homosérine pourrait certainement être dû à l'activité naturelle des transaminases d'*E. coli*, probabilité déjà évoquée plus tôt dans ce manuscrit. Un criblage dans une souche déficiente pour ces activités de transaminases serait bénéfique pour la réduction de ce bruit de fond, bien que difficile à obtenir.

### III. Perspectives

Les deux applications présentées ci-dessus montrent que les biosenseurs développés sont fonctionnels et utiles à d'autres applications. Mais on peut imaginer d'autres utilisations de pBS3 telle que l'estimation de la production d'OHB *in vivo* obtenu par la voie qui condense le pyruvate et le formaldéhyde, issu de la réduction du méthanol (Hift & Mahler, 1952). Bien que des aldolases naturelles catalysent cette condensation, l'optimisation de cette réaction est toujours souhaitable (He *et al*, 2020; Guo *et al*, 2021; Jeong *et al*, 2023). La génération de mutants de ces aldolases en une banque pourrait alors facilement être criblée grâce au pBS3, avec la même méthode expérimentale que décrite ici. Pour de telles utilisations, la gamme dynamique du biosenseur pour l'OHB devrait être étendue pour permettre une discrimination plus efficace dans le cadre d'un criblage. Bien qu'un facteur d'accroissement plus important serait souhaitable pour l'OHB, un compromis devra certainement être fait entre la gamme dynamique possible du biosenseur et sa sensibilité, l'évolution de l'un interférant avec l'autre (Zhou & Zhang, 2023). On

pourrait aussi imaginer utiliser cet outil pour rendre la production de DHB plus efficace : en prenant par exemple la voie de production du DHB empruntant l'homosérine, remplacer SYFP2 dans ce biosenseur par l'OHB réductase réduisant l'OHB en DHB permettrait une expression spécifique de cette enzyme, seulement lorsque son substrat est présent.

Bien que le développement de ces biosenseurs génère un nombre d'applications restreint dans le monde des biotechnologies du fait de sa spécificité, il reste toutefois intéressant puisqu'il a permis de mieux comprendre le fonctionnement des cellules vis-à-vis de molécules non naturelles. Il a aussi permis de montrer une fois de plus que la « promiscuité de ligand » de certaines protéines, qui ne sont pas des enzymes, mais en l'occurrence des facteurs de transcription (XynR), pour des molécules non naturelles a un impact considérable sur la physiologie de la cellule. En effet, XynR constitue un facteur de transcription clairement identifié comme sensible à la présence d'OHB. Une meilleure sensibilité du biosenseur en réponse à la présence d'OHB serait souhaitable et pourrait être effectuée sur XynR. En effet, une ingénierie de protéine sur XynR pourrait être réalisée afin de modifier son affinité pour l'OHB, ou bien pour pYag, afin d'optimiser soit l'activation du biosenseur, soit sa répression. Toutefois, cela nécessiterait d'autres types d'études (évolution systématique de ligands par enrichissement exponentiel (SELEX) (Kohlberger & Gadermaier, 2022), gels retard, études bio-informatiques pour l'évolution de XynR), et la modification de XynR pourrait plus certainement induire l'apparition d'interactions non spécifiques avec le génome, par l'activation ou la répression d'autres gènes par exemple.

Il est également possible que d'autres facteurs de transcription de la cellule, dont le ligand est structurellement proche de l'OHB, soient également affectés par sa présence dans les cellules. Par exemple, XynR intervient dans le catabolisme du xylonate, mais j'ai identifié des composants d'autres voies (YgbN, KdgT, YagE), intervenant dans le catabolisme du thréonate, du gluconate et de son dérivé le 2-déhydro-3-déoxygluconate. On pourrait alors imaginer que les enzymes et les protéines ayant pour substrat ou ligand une de ses molécules pourraient également se lier à l'OHB. Cette généralité devrait être étudiée avec minutie, puisque par exemple *eda*, un gène codant pour une 2-déhydro-3-déoxygluconate aldolase avérée, ne semble pas active *in vitro* sur l'OHB. Le développement d'un biosenseur sensible au DHB lui-même pourrait également permettre d'enrichir le choix d'outils à disposition pour l'étude de son catabolisme, et pourrait se faire en identifiant les gènes dont la transcription est impactée en sa présence.

## Chapitre 3 : Le D-DHB comme source utile pour la biosynthèse de polymère de DHB

Si la synthèse de polymères comme le PLA en chimie permet l'utilisation de monomères aussi bien de forme D- que L- (Castro-Aguirre *et al*, 2016), la synthèse biotechnologique de nouveaux polyesters, utilisant des monomères innovants, est un projet ambitieux, nécessitant avant toute chose la capacité de produire la forme D- du monomère. En effet, malgré le travail déjà produit sur l'ingénierie des PHA synthases, elles ne catalysent toutefois que la réaction de polymérisation sur la forme (*R*) (*rectus*, ou D-) des substrats activés (Rehm, 2003; Tajima *et al*, 2009). Ceci n'empêche toutefois pas les PCT d'être aspécifiques, et donc de pouvoir activer à la fois les formes (*S*) (*sinister*) et (*R*) des monomères, bien que la PCT<sub>RE</sub> par exemple semble tout de même avoir une préférence envers le (*R*)-LA que le (*S*)-LA<sup>1</sup> (Volodina *et al*, 2014). Le DHB étant bioproduit sous forme L-, et sa synthèse chimique ne permettant que de produire un racémique, cette particularité devra être prise en compte pour la biosynthèse d'un (co)polymère de DHB.

À ce jour, les voies de biosynthèse du DHB ne produisent que la forme L- puisque sur les quatre voies existantes : la voie homosérine et la voie glycolaldéhyde font intervenir une L-malate déshydrogénase modifiée pour la réduction de l'OHB (Frazão *et al*, 2018a, 2023), et les deux autres, les voies malyl-Pi et malyl-CoA, utilisent le L-malate comme précurseur (Walther *et al*, 2015, 2017).

Ce chapitre porte donc sur deux problématiques. D'une part, malgré le fait que les voies conçues conduisent à la synthèse de L-DHB, les analyses de surnageants de fermentation font état de la présence d'entre 5 % (voie homosérine) et 15 % (voie malyl-Pi) de la forme D-DHB (TBI et Adisseo, données communiquées). Comment alors expliquer la présence de cette forme de DHB ? D'autre part, il est indispensable de produire *in vivo* le D-DHB pour permettre par la suite sa polymérisation. De ce fait, les informations obtenues en répondant à la première question pourraient-elles fournir des pistes pour l'ingénierie de producteurs spécifique du D-DHB ?

### I. D'où vient la forme D- du DHB lors de sa production fermentaire ?

#### 1. Activités racémase d'*E. coli*

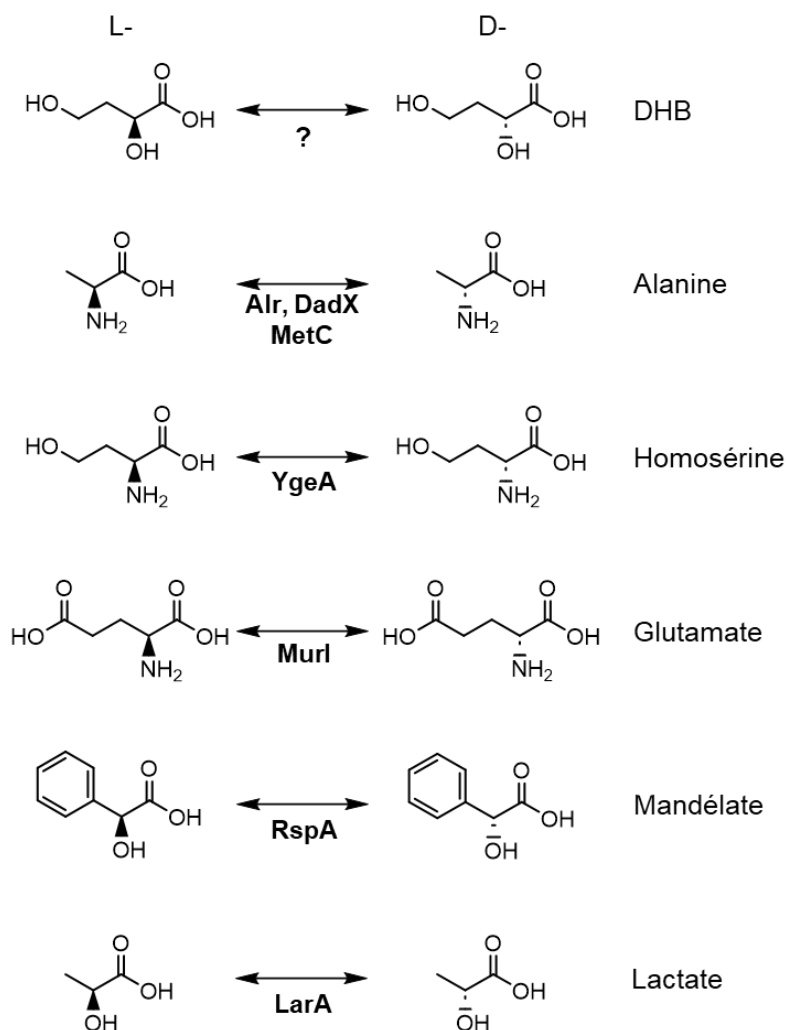
*E. coli* possède six racémases, qui catalysent la conversion entre la forme D- et L- de leur substrat (EcoCyc; Keseler *et al*, 2017). Ces enzymes pourraient potentiellement catalyser la conversion de L-DHB en D-DHB. Elles sont codées par *alr*, *dadX*, *metC*, *murI*, *rspA* et *ygeA*, et catalysent l'interconversion entre les formes D- et L- de l'alanine (Alr, DadX, MetC) (Wild *et al*, 1985; Kang *et al*, 2011), du glutamate (MurI) (Doublet *et al*, 1993), du mandélate (RspA) (Narmandakh & Bearne, 2010) et de l'homosérine (YgeA, racémase à large spectre) (Miyamoto *et al*, 2017) (Figure 38). Les gènes codant ces enzymes

---

<sup>1</sup> À partir de ce point, bien que la nomenclature Cahn-Ingold-Prelog (*RS*) permette de définir la configuration absolue des molécules en chimie organique, je préférerai pour des soucis de cohérence avec les noms des enzymes, utiliser la nomenclature relative d'énantiométrie : D et L.



ont été clonés dans un pET28, et les racémases ont été surexprimées chez *E. coli* BL21 DE3. Les cellules ont été mises en culture dans un milieu riche (LB) jusqu'à l'obtention d'une DO<sub>600</sub> de 0.5-0.7, suite à quoi 1 mM d'IPTG a été rajouté pour induire l'expression des enzymes. Les cultures ont été incubées sous agitation pendant 4 h avant de récupérer les culots cellulaires qui ont ensuite été conservés à -20°C. Les enzymes ont ensuite été extraites du culot cellulaire par sonication, puis purifiées par affinité grâce à l'étiquette histidine située à leur extrémité N-terminale, sur une résine de cobalt (voir Matériel et méthodes).



**Figure 38 :** Les réactions catalysées par les racémases identifiées chez *E. coli* (Alr, DadX, MetC, MurI, RspA) et *L. lactis* (LarA).

Les activités naturelles de certaines racémases ont pu être testées *in vitro* : Alr, DadX et MetC fonctionnaient sur L- et D-alanine. Les enzymes RspA et MurI semblaient agir sur le mandélate et le glutamate, mais la résolution chirale de ces composés par une colonne Chirex (Phenomenex), qui permet la séparation des énantiomères D- et L- des acides organiques, en HPLC n'a pas abouti. Leur activité n'a donc pas pu être dosée. Par ailleurs, aucune activité de YgeA sur l'homosérine n'a pu être mesurée. Enfin, aucune des racémases testées n'a catalysé la conversion du L-DHB en D-DHB.

Ces expérimentations indiquent qu'*a priori*, les racémases d'*E. coli* ne sont pas responsables de la présence de D-DHB. Des efforts supplémentaires, et notamment un développement approfondi de méthode d'analyse du glutamate et mandélate en HPLC permettrait de mettre au point une résolution chirale de ces composés pour confirmer

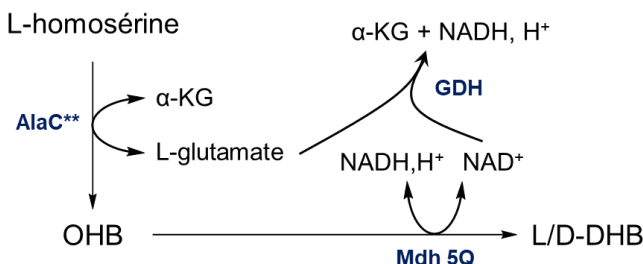
l'activité naturelle de MurI et RspA. Une recherche approfondie sur YgeA est également nécessaire, afin d'établir les bonnes conditions permettant la catalyse de la conversion entre D- et L-homosérine, qui n'ont ici pas été retrouvées. Les seules différences notables entre le test effectué et ceux décrits dans la littérature sont la présence de DTT, et un pH de 8.5 au lieu de 8 ici (Miyamoto *et al*, 2017). La non-production de D-DHB à partir de l'énantiomère L- par ces enzymes pourra de ce fait être attribuée à une non-spécificité de substrat de leur part, ou d'un problème d'activité intrinsèque de ces enzymes.

Bien que toutes ces racémases n'aient pas toutes pu être vérifiées avec certitude, la faible quantité de D-DHB mesurée en fermentation ne coïncide pas avec le fait que ces enzymes fonctionnent à l'équilibre (eQuilibrator, (Beber *et al*, 2022)), impliquant que l'on devrait alors retrouver une proportion de D-DHB proche de 50 %. En effet, des mesures effectuées précédemment indiquent que les concentrations intracellulaires et extracellulaires de DHB sont équivalentes (non publié). Or une activité racémase devrait amener à un équilibre entre les formes L- et D- du DHB, à moins qu'un export L- spécifique du DHB existe chez *E. coli*. Pour ces raisons, la présence de D-DHB pourrait très certainement être plutôt due à une réaction secondaire prenant place pendant la fermentation.

## 2. La Mdh modifiée n'a pas perdu sa stéréospécificité

La malate déshydrogénase utilisée pour la réduction de l'OHB en L-DHB, dans les voies homosérine et éthylène glycol, est décrite comme étant L-spécifique (Takahashi-Íñiguez *et al*, 2016), c'est-à-dire qu'elle devrait systématiquement produire du L-DHB. L'enzyme utilisée pour la biosynthèse de DHB est un variant de la Mdh d'*E. coli*, portant les mutations suivantes : I12V:R81A:M85Q:G179D:D86S (Mdh 5Q). Or, il a été montré que la modification de certaines enzymes pouvait modifier la stéréospécificité de la réaction qu'elles catalysent. Par exemple, la L-lactate déshydrogénase sauvage de *Bacillus stearothermophilus* est incapable de catalyser la réduction du pyruvate en D-lactate. Cependant, le variant I240K:R171Y permettait la conversion de pyruvate en D-lactate à hauteur de 2.3 % du lactate total (Sakowicz *et al*, 1995). De la même façon, une carbonyle réductase (BaSDR1) de *Bacillus aryabhatai* montrait une stéréospécificité de 73.9% dans la réduction de l'éthyl-3-oxobutanoate en éthyl-(L)-3-hydroxybutanoate. Des mutations ponctuelles ont permis de modifier cette stéréospécificité, pour amener à une sélection pour la forme D- allant de 25.3 à 99.6 % (Li *et al*, 2021). J'ai alors émis l'hypothèse que l'introduction de ces mutations dans la Mdh d'*E. coli* pourrait avoir accidentellement modifié sa stéréospécificité, lui permettant de produire une certaine proportion de D-DHB. Pour vérifier cette hypothèse, j'ai établi un test *in vitro* de la manière suivante : dans un volume de 2 mL, 20 µg de transaminase purifiée (AlaC A142P:Y275D), 250 µg de Mdh 5Q purifiée, 0.1 mM NADH, 1 mM NAD, 0.1 mM pyridoxal-5-phosphate (PLP), 20 mM L-homosérine, 10 mM de glutamate et 1 mM α-cétoglutarate ont été ajoutés dans un tampon 50 mM HEPES, 50 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub> pH 7.5. La réaction contenait également 2 U/mL de glutamate déshydrogénase commerciale, qui permettait la régénération du NAD<sup>+</sup> issu de la réduction de l'OHB en NADH, et du glutamate issu de la transamination de l'homosérine en α-cétoglutarate (Figure 39, voir Matériel et méthodes). Les produits de la réaction ont ensuite été analysés en HPLC (colonnes chirale (Chirex) et H<sup>+</sup> (Rezex)

(Phenomenex)). L'analyse sur une colonne H<sup>+</sup> montrait que du DHB avait bien été produit, et la résolution chirale montrait qu'il ne s'agissait que de L-DHB.



**Figure 39** : Réactions pour la synthèse *in vitro* de DHB à partir de L-homosérine. AlaC\*\* : glutamate aminotransférase (*E. coli*) A142P:Y275D, Mdh 5Q : malate déshydrogénase (*E. coli*) I12V:R81A:M85Q:G179D:D86S, GDH : glutamate déshydrogénase

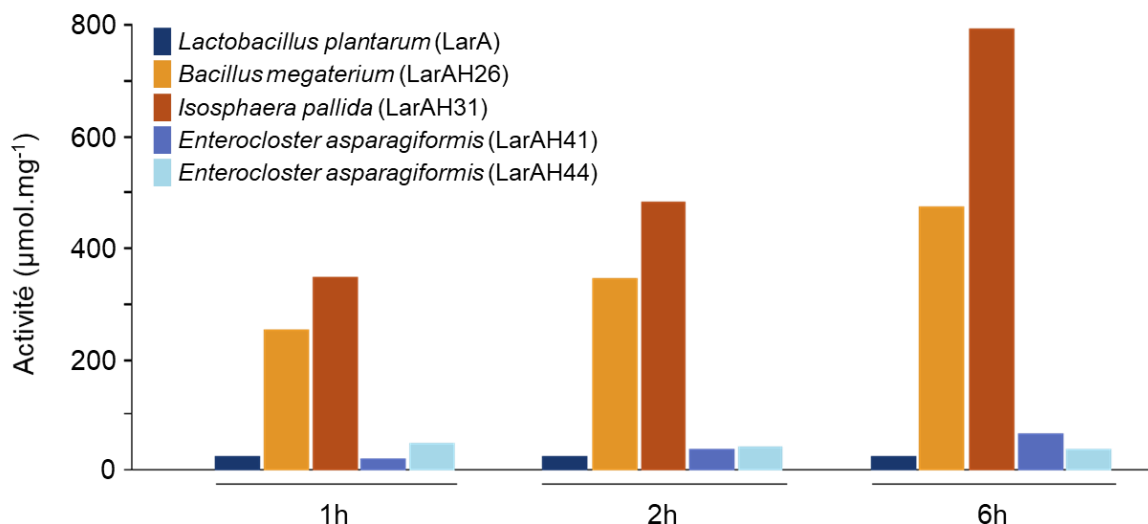
Il semble donc que l'introduction des mutations présentes dans la Mdh 5Q n'ait pas impacté sa stéréospécificité pour la réduction de l'OHB en L-DHB. D'autres enzymes ayant le potentiel de réduire l'OHB en D-DHB existent, chez *E. coli* ou d'autres organismes. Cette capacité particulière a été étudiée et est présentée plus loin dans ce chapitre (voir II.2).

## II. Comment produire le D-DHB ?

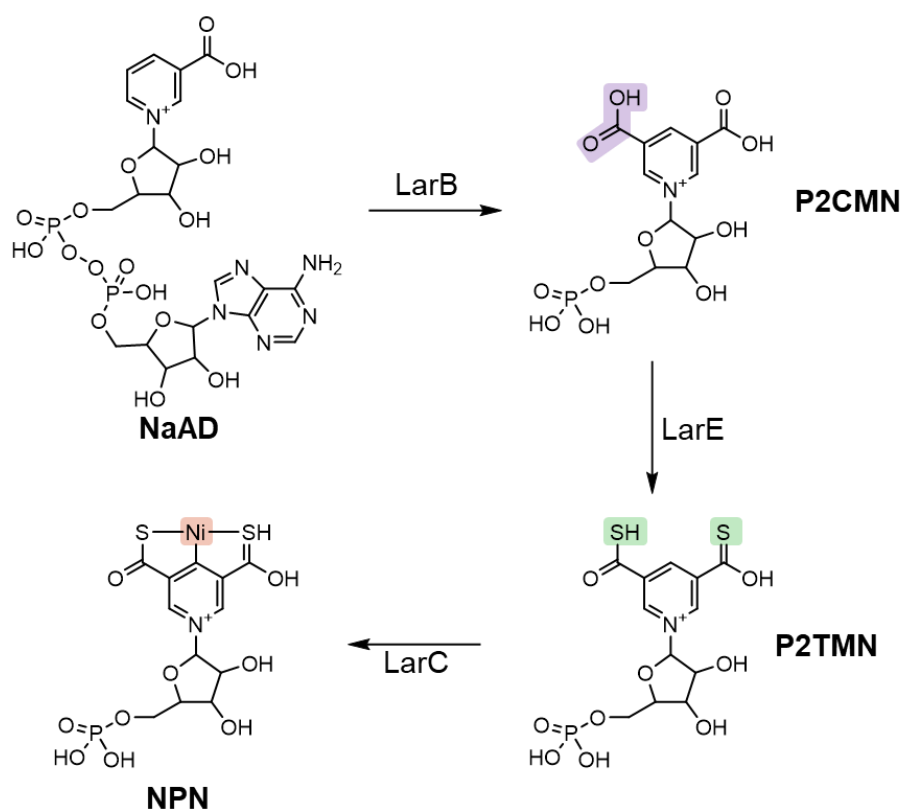
### 1. Par la racémisation du L-DHB

Si *a priori*, aucune des racémases présentes chez *E. coli* n'est capable d'agir sur le L-DHB, la conversion vers le D-DHB pourrait être réalisée grâce à une enzyme exogène. En effet, une catégorie d'enzymes, les lactate racémases, capables de catalyser l'interconversion du D- et L-lactate ont d'abord été découvertes chez *Lactococcus* (Desguin *et al*, 2020) (Figure 38). Après l'avoir contacté, le Dr Benoît Desguin a généreusement accepté de tester un échantillon de L-DHB sur une sélection de lactates racémases que son groupe avait précédemment identifiées. La conversion du L-DHB en D-DHB a été testée avec onze lactate racémases isolées d'organismes différents, et deux d'entre elles catalysaient avec succès la réaction. Il s'agit des lactate racémases de *Isosphaera pallida* et de *Bacillus megaterium*, qui après 6h d'incubation avaient pu convertir jusqu'à 800 et 500 μmol.mg<sup>-1</sup> respectivement (Figure 40).

Un inconvénient majeur de l'utilisation de ce type d'enzyme est qu'elles requièrent un cofacteur unique intégrant un atome de nickel (nickel-pincer nucleotide, NPN). La biosynthèse de ce cofacteur est spécifique des organismes exprimant ces lactate racémases, et nécessite l'expression de trois autres gènes : *larB*, *larC* et *larE* (Desguin *et al*, 2014; Hausinger *et al*, 2018). La voie de synthèse du NPN débute avec un acide nicotinique adénine dinucléotide (NaAD), transformé en acide pyridinium-3,5-biscarboxylique mononucléotide (P2CMN) par LarB, qui catalyse une réaction de carboxylation et d'hydrolyse phosphoanhydride. Deux atomes de soufre sont ensuite incorporés par LarE pour produire du pyridinium-3,5-bisthiocarboxylique mononucléotide (P2TMN). Enfin, LarC catalyse l'insertion d'un atome de nickel pour finalement produire le NPN (figure 41).



**Figure 40** : Résultats obtenus par le laboratoire du Dr Desguin : racémisation du L-DHB par des hydroxyacides racémases de diverses espèces.



**Figure 41** : Voie de biosynthèse du NPN. NaAD : acide nicotinique adénine dinucléotide, P2CMN : pyridinium-3,5-biscarboxylique mononucléotide, P2TMN : pyridinium-3,5-bisthiocarboxylique mononucléotide, NPN : nickel-pincer nucleotide

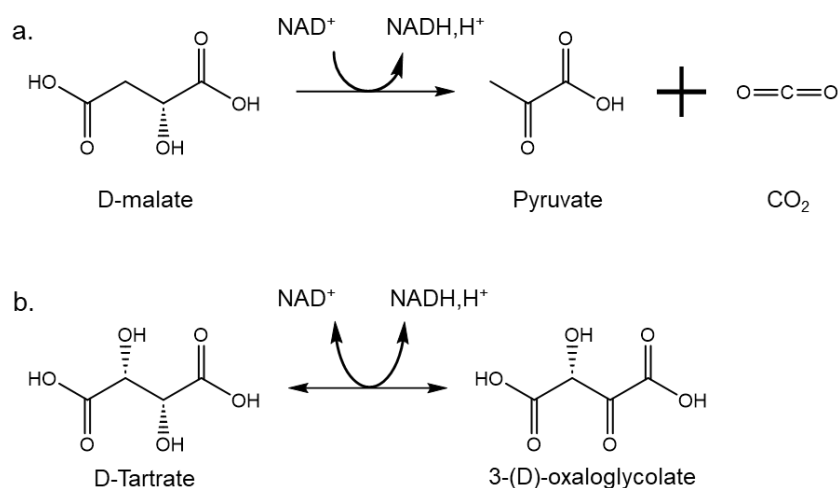
La racémisation *in vivo* du DHB dans une souche productrice, pour la biosynthèse de polymère de DHB, devrait donc être modifiée pour : (1) produire suffisamment de DHB ; (2) produire le NPN et la racémase, nécessaires pour la conversion du L-DHB en D-DHB ; (3) synthétiser le polymère de DHB à partir du D-DHB. Il y a fort à parier que le fardeau métabolique apporté par toutes ces voies sera lourd à supporter pour la cellule, et que malgré l'attrait biotechnologique que leur combinaison représente, leur mise en place *in vivo* pourrait être contre-productive du point de vue de la physiologie de la cellule. De plus, l'implémentation d'un nouveau type de cofacteur, et d'une enzyme apportant une nouvelle

fonction dans le métabolisme d'*E. coli*, pourrait l'impacter de diverses manières, que nous n'aurions pas prévues. Des solutions plus faciles à intégrer pourraient être envisagées.

## 2. Par l'oxydation D-spécifique de l'OHB

### 2.1 Par l'intermédiaire d'une D-malate déshydrogénase d'*E. coli*

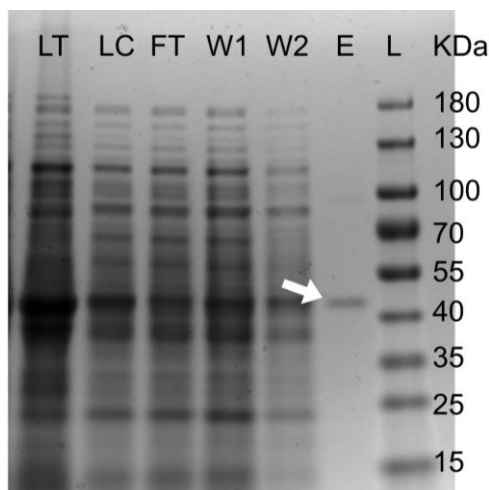
Durant la production de DHB en fermentation, une petite proportion du DHB synthétisé est obtenu sous sa forme D-, qui doit être le résultat d'une réaction secondaire. Pendant cette même expérience, le gène *dmlA*, qui code pour une D-malate déshydrogénase (décarboxylase) était légèrement surexprimé (entre 1.39 et 1.95 fois la condition contrôle, données non publiées). DmlA est une enzyme généraliste qui catalyse notamment la décarboxylation du D-malate en CO<sub>2</sub> et pyruvate, et l'oxydation réversible du D-tartrate en 3-(D)-oxaloglecolate en présence de NAD<sup>+</sup> (Figure 42) (Kohn & Jakoby, 1968; Vorobieva *et al*, 2014). Nous avons vu que la Mdh d'*E. coli* avait la possibilité d'exercer son activité sur l'OHB pour produire du L-DHB, son activité naturelle étant la réduction de l'oxaloacétate en L-malate. J'ai alors émis l'hypothèse que DmlA, une oxydoréductase capable d'utiliser également le malate comme substrat, pourrait alors aussi être active sur l'OHB et catalyser sa réduction en présence de NADH, pour produire du D-DHB.



**Figure 42** : Les deux principales réactions catalysées par DmlA. a. Décarboxylation du D-malate en pyruvate et en CO<sub>2</sub>. La décarboxylation est exercée sur l'oxaloacétate qui est un produit intermédiaire issu de l'oxydation du D-malate. b. Oxydation réversible du D-malate en 3-(D)-oxaloglecolate.

Le plasmide portant le gène *dmlA* issu de la collection ASKA (Kitagawa *et al*, 2006) a été transformé et l'enzyme surproduite dans une souche BL21 DE3 d'*E. coli*, de la même manière que décrit pour les racémases. Elle a ensuite été purifiée, et le résultat de la purification a été analysé en SDS-PAGE (Figure 43). DmlA a été testée *in vitro* et son activité naturelle sur D-malate a été confirmée. Une activité sur OHB a pu être observée, mais pas sur DHB. Les constantes enzymatiques de DmlA ont été obtenues sur D-malate et OHB (Tableau 4). Le K<sub>m</sub> de DmlA pour le D-malate obtenu est de 280 μM, soit trois fois plus élevé que celui rapporté précédemment (96 μM), avec une constante catalytique de 4,25 s<sup>-1</sup>, soit presque trois fois inférieure à celle mesurée précédemment (Vorobieva *et al*, 2014). Il convient toutefois de noter que les conditions du test enzymatique, et notamment la température (25°C contre 37°C dans cette étude), étaient différentes de celles employées

par Vorobieva et ses collègues. La spécificité que j'ai calculée sur le D-malate s'en retrouve donc diminuée d'un rapport 10 par rapport à celle calculée précédemment.

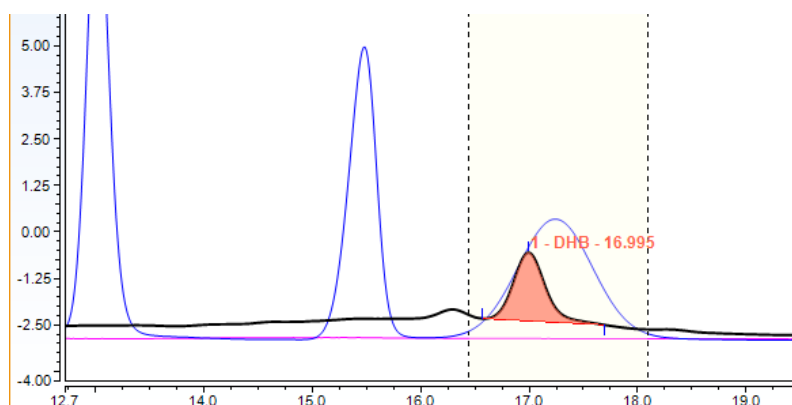


**Figure 43** : SDS-PAGE des étapes de purification de DmlA. LT : lysat total, LC : lysat clair, FT : fraction non fixée sur la résine de la chromatographie d'affinité, W1 : premier lavage de la résine, W2 : second lavage de la résine, E : enzyme purifiée, L : échelle de poids moléculaire

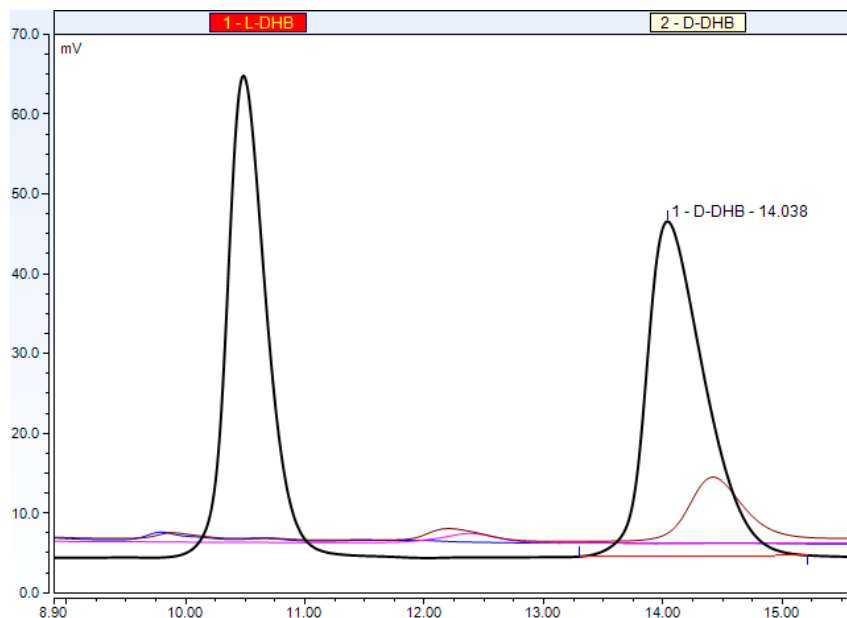
**Tableau 4** : Constantes enzymatiques obtenues pour DmlA sur D-Malate et OHB. n = 2

	D-Malate	OHB
K <sub>m</sub> (mM)	0.28 ± 0.003	17.37 ± 4.3
V <sub>max</sub> (μmol.mn <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> )	12.7 ± 0.06	1.34 ± 0.18
K <sub>cat</sub> (s <sup>-1</sup> )	4.25 ± 0.02	0.45 ± 0.06
K <sub>cat</sub> /K <sub>m</sub> (s <sup>-1</sup> .M <sup>-1</sup> )	15126 ± 100	26.3 ± 3.1

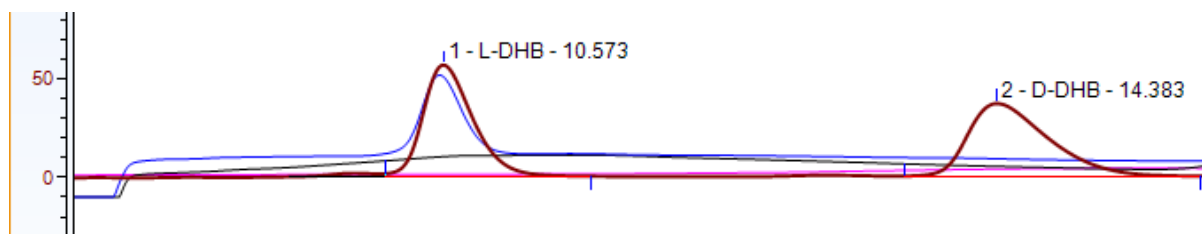
Une activité sur l'OHB a pu également être mesurée, avec un K<sub>m</sub> de 17.37 mM et une vitesse également, de 1.34 μmol.mn<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>. La stéréospécificité de l'enzyme a été testée, de deux façons : (a) de la même manière que pour la Mdh (Figure 39), en couplant la transamination de l'homosérine à l'activité de DmlA ; (b) directement sur l'OHB. Les réactions (a) et (b) ont été analysées en HPLC, à la fois sur une colonne dédiée à l'analyse des acides organiques (H<sup>+</sup> (Rezex, Phenomenex)) et sur une colonne de résolution chirale (Chirex, Phenomenex, voir Matériel et méthodes). En ce qui concerne la réaction (b), DmlA est effectivement capable de synthétiser du DHB (Figure 44). De plus, l'analyse en HPLC sur une colonne chirale indique un pic apparaissant avec le même temps de rétention que celui associé au D-DHB (Figure 45). Ces résultats tendent à dire que DmlA est capable de catalyser la réduction D-spécifique de l'OHB en D-DHB.



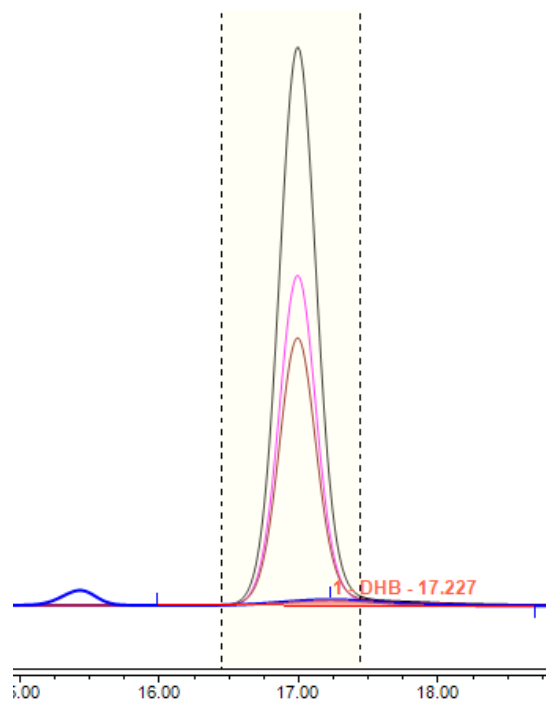
**Figure 44** : Chromatogramme de l'analyse de la réaction (b) sur une colonne H<sup>+</sup>. En bleu l'échantillon standard, en rose la réaction sans enzyme, en noir la réaction complète.



**Figure 45 :** Chromatogramme de l'analyse de la réaction (b) sur une colonne de résolution chirale (Chirex). En noir l'échantillon standard, en rose la réaction sans enzyme, en bleu la réaction sans substrat, en brun la réaction complète.



**Figure 46 :** Chromatogramme de l'analyse de la réaction (a) sur une colonne de résolution chirale (Chirex). En brun l'échantillon standard, en rose la réaction à  $t = 0$ , en noir la réaction après 24h, en bleu la réaction après 48h.



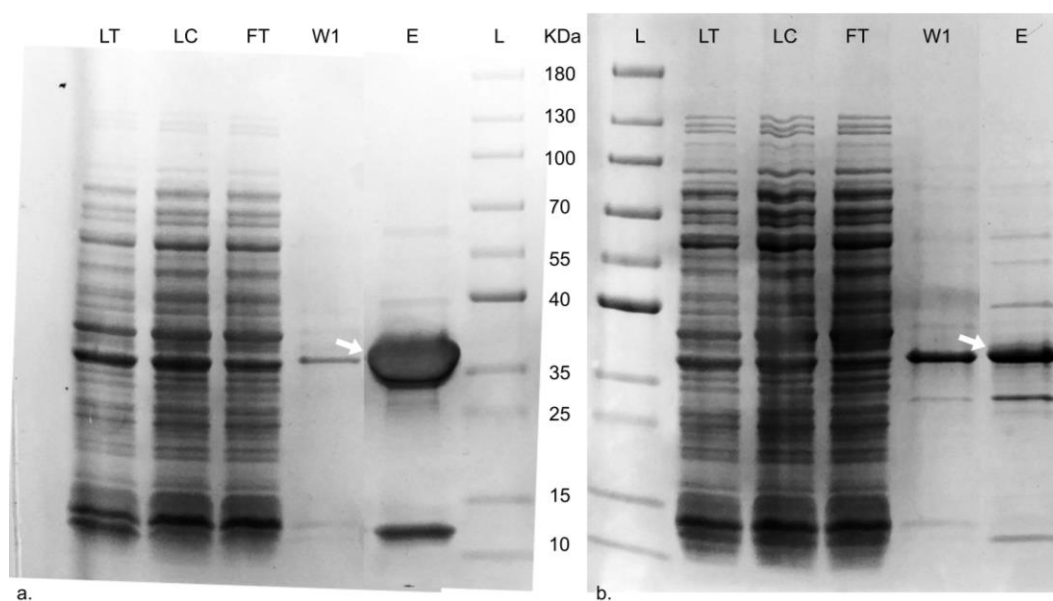
**Figure 47 :** Chromatogramme de l'analyse de la réaction (a) sur une colonne  $H^+$ . En bleu l'échantillon standard, en noir la réaction complète à  $t = 0$ , en rose la réaction après 24h, en brun la réaction après 48h. La zone en surbrillance correspond au temps de rétention du DHB.

En revanche, lorsque la réaction (a), qui part de la L-homosérine, a été réalisée, l'analyse sur une colonne chirale semble indiquer la production de L-DHB, et pas de D-DHB (Figure 46). Cependant, l'analyse sur une colonne H<sup>+</sup> indique qu'un composé ayant le même temps de rétention que le DHB est déjà présent au début de la réaction, et dont la concentration diminue au cours du temps (Figure 47), alors que le L-DHB n'apparaît qu'au bout de 48 h sur l'analyse en Chirex (figure 46). De plus, la concentration correspondant à l'aire sous la courbe du pic visible en H<sup>+</sup> serait 100 fois supérieure à la concentration mesurée en Chirex, indiquant la présence d'un autre composé. Ce pic parasite gêne pour la vérification de la production de DHB sur la colonne H<sup>+</sup>. Il est probable qu'il s'agisse de l' $\alpha$ -cétoglutarate ou du glutamate, présents en quantité importante dans la réaction, et qui pourraient apparaître au même temps de rétention que le DHB. Le changement de matériel effectué entre les analyses faites pour Mdh et DmlA pourrait expliquer le fait qu'aucun pic parasite n'avait été visible lors de la première analyse de ce genre. De ce fait, nous ne sommes pas en mesure de confirmer que le pic de L-DHB observé en Chirex est bien du DHB issu de la L-homosérine.

Cette expérience et les conditions d'analyse en HPLC devront être améliorées pour se convaincre que DmlA produit du D-DHB à partir de L-homosérine, ce qui est à ce jour validé à partir d'OHB.

## 2.2 D-2-hydroxyacide déshydrogénases : enzymes alternatives pour la synthèse de D-DHB

D'autres enzymes, issues d'autres organismes, ont été rapportées comme catalysant une activité de D-2-hydroxyacide déshydrogénase (Domenech & Ferrer, 2006; Lee *et al*, 2019; Moreno *et al*, 2023). Deux de ces enzymes, issues du travail de Lee et ses collègues, ont été testées sur l'OHB. Les hydroxyacides déshydrogénases (HADH) d'*Oenococcus oeni* (OO), et de *Weseilla confusa* (WC) ont été clonés dans un plasmide pET28, et les enzymes associées ont été surproduites dans une souche BL21 DE3 d'*E. coli*, puis purifiées (Figure 48).



**Figure 48** : SDS-PAGE des étapes de purification ds HADH de *O. oeni* (a., 37.3 kDa) et *W. confusa* (b., 37,4 kDa). LT : lysat total, LC : lysat clair, FT : fraction non fixée sur la résine de la chromatographie d'affinité, W1 : premier lavage de la résine, W2 : second lavage de la résine, E : enzyme purifiée, L : échelle de poids moléculaire

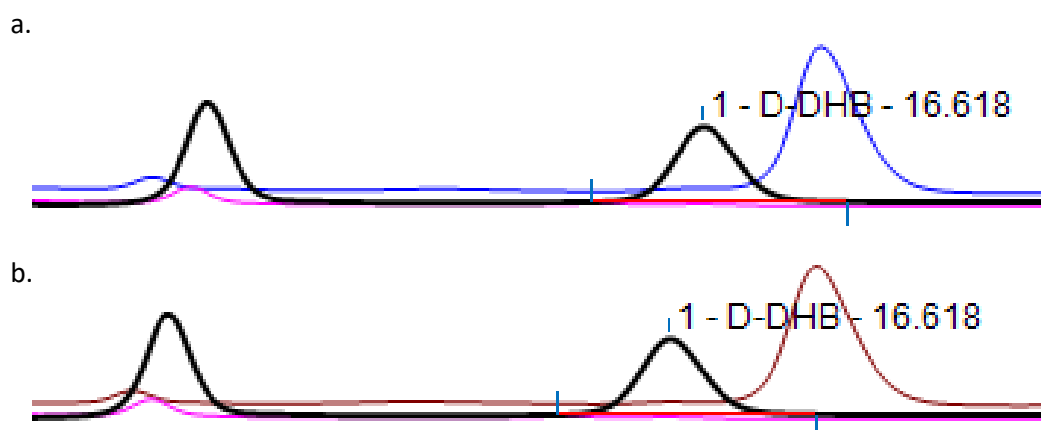


Les enzymes (1  $\mu\text{g}$ ) ont été testées dans une réaction contenant 0.2 mM de NADH ainsi que du pyruvate ou de l'OHB, dans un tampon HEPES 50 mM, KCl 50 mM et  $\text{MgCl}_2$  5 mM, pH 7.5 (volume réactionnel de 250  $\mu\text{L}$ ). Une diminution de l'absorbance à 340 nm a pu être observée sur les deux substrats pour les  $\text{HADH}_{\text{OO}}$  et  $\text{HADH}_{\text{WC}}$ , indiquant une activité effective. La mesure des constantes enzymatiques a alors été entreprise sur l'OHB pour les deux enzymes. Toutefois, les concentrations d'OHB utilisées étaient trop faibles pour permettre d'atteindre la  $V_{\text{max}}$ . Les constantes ainsi obtenues devront donc être répétées afin d'être correctement estimées (Tableau 5). Bien que le  $K_m$  de ces enzymes pour l'OHB soit élevé en comparaison de ceux rapportés pour le pyruvate ( $K_m[\text{pyruvate}]$  de 1.12 mM pour  $\text{HADH}_{\text{OO}}$  et 1.28 mM pour  $\text{HADH}_{\text{WC}}$ ), le  $k_{\text{cat}}/K_m$  de  $\text{HADH}_{\text{OO}}$  est plus élevé pour l'OHB que pour le pyruvate (1199  $\text{s}^{-1}.\text{M}^{-1}$  contre 674  $\text{s}^{-1}.\text{M}^{-1}$ ). Pour  $\text{HADH}_{\text{WC}}$ , le  $k_{\text{cat}}/K_m$  reste meilleur sur le pyruvate que sur l'OHB (1434  $\text{s}^{-1}.\text{M}^{-1}$  contre 292  $\text{s}^{-1}.\text{M}^{-1}$  pour l'OHB) (Lee *et al*, 2019).

**Tableau 5** : Constantes enzymatiques obtenues pour les HADH de *O. oni* (OO) et *W. confusa* (WC) sur OHB.  
n = 1

	HADH OO	HADH WC
Km (mM)	25.47	15.9
Vmax ( $\mu\text{mol.mn}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ )	98	14.9
Kcat ( $\text{s}^{-1}$ )	30.5	4.6
Kcat/Km ( $\text{s}^{-1}.\text{M}^{-1}$ )	1199	292

Le DHB issu de cette réaction a été analysé sur une colonne chirale en HPLC (Chirex, Phenomenex). Les chromatogrammes obtenus semblent montrer qu'il s'agit de la forme D- du DHB qui a été produite (figure 49). Bien que le pic du DHB apparaisse décalé par rapport au standard de D-DHB, les mêmes échantillons analysés sur une colonne  $\text{H}^+$  montrent bien une apparition d'un pic spécifique au temps de rétention du DHB. Ce décalage pourra it être dû à une différence de tampon dans le solvant des échantillons, et des variations peuvent occasionner des décalages dans les temps de rétention des molécules analysées.



**Figure 49** : Chromatogramme de l'analyse des réactions catalysées par les HADH de *O. oni* (a) et *W. confusa* (b). En noir l'échantillon standard, en rose la réaction sans enzyme, en bleu la réaction complète avec  $\text{HADH}_{\text{OO}}$ , en brun la réaction complète avec  $\text{HADH}_{\text{WC}}$ .

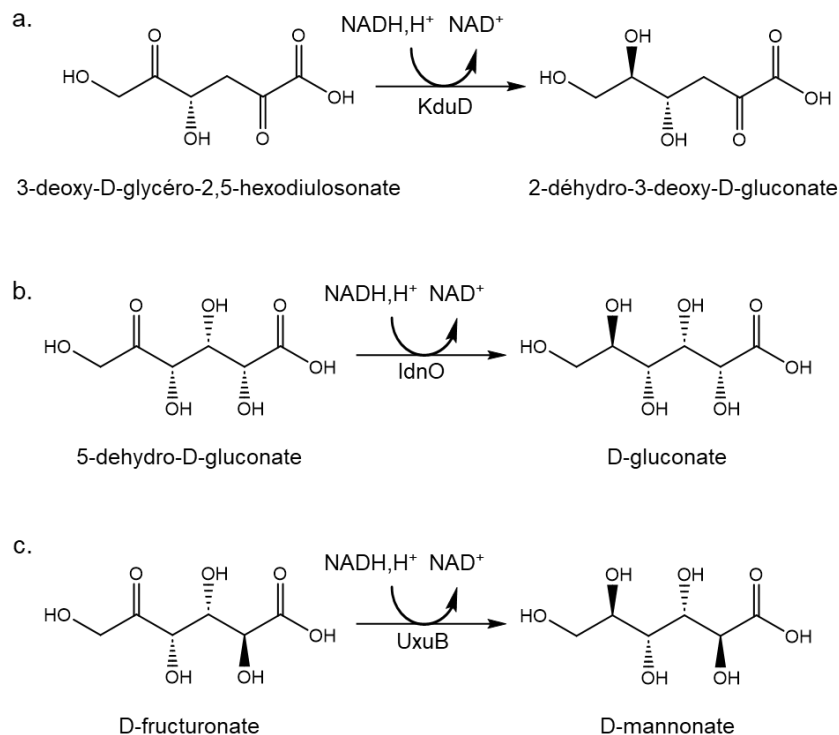
Il est donc envisageable d'utiliser ces HADH pour catalyser la réduction de l'OHB en D-DHB à la place de la Mdh 5Q jusqu'alors utilisée dans les voies homosérine et éthylène glycol. Une ingénierie enzymatique pourrait être nécessaire afin d'améliorer le  $K_m$  de ces enzymes envers l'OHB, afin d'optimiser la production de D-DHB, comme cela avait été fait avec l'ingénierie rationnelle de la Mdh 5Q (Frazão *et al*, 2018a). D'autres HADH pourraient être envisagées pour catalyser la réaction de réduction de l'OHB en D-DHB : celle de *Haloferax mediterranei* (Domenech & Ferrer, 2006) ou bien de *Pseudomonas syringae* (Moreno *et al*, 2023), qui a notamment permis la réduction d'OHB en D-2-hydroxy- $\gamma$ -butyrolactone, la forme cyclisée du D-DHB. Il semble toutefois que cette cyclisation se soit produite durant la phase de purification des composés produits, qui a été effectuée à pH acide, et maintenue dans la phase mobile utilisée dans l'analyse en HPLC (pH  $\approx$  1.9), mais que le produit réellement obtenu de cette réaction soit effectivement le D-DHB linéaire.

### III. Perspectives

La faible production de D-DHB par un organisme producteur de DHB en fermentation n'est vraisemblablement pas due à la conversion du L-DHB en D-DHB par une des racémases d'*E. coli*. J'ai cependant mis en évidence le fait que DmlA peut produire du DHB *in vitro*. Il serait utile de valider *in vivo* cette question, par la suppression de *dmlA* dans une souche productrice et de vérifier si le D-DHB est toujours présent dans les surnageants de culture. D'autre part, en utilisant DmlA plutôt que Mdh 5Q pour produire du DHB en fermentation, l'analyse chirale du DHB produit pourrait aider à estimer la stéréospécificité de DmlA. Toutefois leurs constantes enzymatiques sur OHB ne sont pas comparables. En effet, Mdh 5Q (Frazão *et al*, 2018a) est bien plus efficace sur l'OHB ( $k_{cat}/K_m = 37 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ ) que DmlA, en raison d'un meilleur  $K_m$  (1.6 mM) et d'une meilleure constante de vitesse ( $k_{cat} = 59.4 \text{ s}^{-1}$  pour Mdh et  $0.45 \text{ s}^{-1}$  pour DmlA). Les quantités de DHB qui seraient ainsi produites *in vivo* avec DmlA comme OHB réductase pourraient ne pas permettre la détection du DHB, et donc une résolution chirale correcte en HPLC. Une ingénierie visant à rendre DmlA plus efficace sur l'OHB sera à réaliser pour permettre une production significative de DHB *in vivo*.

D'autres enzymes catalysent l'oxydoréduction D-spécifique d'acides organiques chez *E. coli*. Parmi elles, une en particulier pourrait éventuellement catalyser la réduction d'OHB en D-DHB : KduD. En effet, cette déshydrogénase catalyse naturellement l'oxydoréduction NAD/NADH dépendante du 3-deoxy-D-glycero-2,5-hexodiulosonate en 2-déhydro-3-deoxy-D-gluconate (Figure 50.a). Or une enzyme catalysant son activité à la fois sur cette même molécule et sur l'OHB a déjà été étudiée : l'aldolase YagE. Le gène codant cette enzyme, *kduD* est par ailleurs surexprimé jusqu'à 2.28 fois lors de la production de DHB, par rapport à une souche contrôle. D'autres enzymes, également surexprimées lors de la production de DHB, pourraient intervenir dans la réduction D-spécifique de l'OHB et expliquer la faible proportion de D-DHB retrouvée (Tableau 6). Il s'agirait de IdnO, une 5-déhydro-D-gluconate réductase, et UxuB, une D-mannonate oxydoréductase (Figure 50.b et c.). La promiscuité de substrat que possèdent les enzymes pourrait leur permettre

d'être actives sur l'OHB et de permettre une production de DHB parallèle à celle provoquée par la voie de biosynthèse désirée.



**Figure 50** : Les réactions d'oxydoréduction catalysées par différentes HADH d'*E. coli*.

**Tableau 6** : Niveaux d'expression minimum et maximum de différentes HADH d'*E. coli* lors de la production de DHB en fermentation.

HADH d' <i>E. coli</i>	Expression minimale	Expression maximale
KduD	1.43	2.28
IdnO	0.91	3.91
UxuB	1.51	2.97

En plus de DmlA, la production de D-DHB pourrait être obtenue en exploitant des D-hydroxyacides déshydrogénases exogènes en lieu et place de l'actuelle OHB réductase utilisée dans les voies de biosynthèse du DHB. Plusieurs candidats sont à l'étude, et deux en particulier se montrent déjà comme fonctionnels sur l'OHB et capables de produire l'énantiomère D- du DHB (*O. oeni*, *W. confusa*, *P. syringae*). Un travail supplémentaire est toutefois nécessaire pour permettre la bonne caractérisation de ces enzymes sur l'OHB dans un premier temps. Ceci constituera un travail préliminaire à celui de leur intégration dans la voie de biosynthèse de D-DHB, en remplacement de la Mdh 5Q actuellement utilisée. Cette dernière partie nécessitera certainement un travail conséquent, notamment en matière d'ingénierie enzymatique, pour permettre une meilleure conversion de l'OHB, plus affine, dans le but de tirer toute la voie de biosynthèse jusqu'à la production finale de D-DHB.

La racémisation du L-DHB peut aussi permettre la biosynthèse de D-DHB. Bien qu'aucune enzyme d'*E. coli* n'ait encore été démontrée pour catalyser une telle réaction, des 2-hydroxyacides racémases d'autres organismes pourraient être utilisées. Les racémases identifiées chez *I. pallida* et *B. megaterium* requièrent cependant des conditions particulières pour leur fonctionnement, notamment la production d'un

cofacteur unique, le NPN. Ceci implique l'expression de quatre gènes étrangers chez *E. coli*, et dont la combinaison avec la voie de biosynthèse du L-DHB pourrait être délétère pour la physiologie des cellules, en raison d'un fardeau métabolique important. Enfin, cette possibilité ne devrait être envisagée que dans l'optique de produire un racémique de DHB *in vivo*, notamment pour la synthèse de P(DHB), plutôt qu'une forme ou l'autre de celui-ci.

Malgré les efforts investis dans la résolution des deux questions relatives à la production de D-DHB (l'explication de la présence de D-DHB et la possibilité de le produire), des travaux plus poussés sont nécessaires. Cet aspect revêt une certaine importance, du fait de la stéréospécificité des PHA synthases, décrites comme ne pouvant qu'utiliser des monomères de type D- pour la polymérisation. De plus, la production de D-DHB est également plus avantageuse que la racémisation du L-DHB du fait que les PCT ne sont pas décrites comme énantiosélectives et donc pourraient activer un monomère en l'état inutile pour la polymérisation : le L-DHB-CoA. Ceci pourrait avoir comme conséquence d'amenuiser les quantités de donneurs de CoA (acétyl-CoA) disponibles pour l'activation de D-DHB-CoA, et ainsi diminuer sa disponibilité pour la polymérisation.

## Chapitre 4 : Polymérisation *in vivo* du DHB

Ce chapitre porte sur les travaux préliminaires visant à montrer que le DHB peut être un monomère pour la biosynthèse de nouveaux polymères, donc un précurseur de biopolymères. Ces travaux suivent logiquement ceux présentés dans le premier chapitre qui a consisté à comprendre comment le DHB est métabolisé par les cellules et comment il y pénètre. Car dans un premier temps, la démonstration de l'utilisation du DHB comme précurseur de biopolymère s'est faite en ajoutant ce dernier dans le milieu de culture des bactéries. Il était donc nécessaire d'une part de s'affranchir des voies qui dégradent le DHB, et d'autre part, de comprendre comment il entre dans les cellules.

### I. Identification des enzymes nécessaires

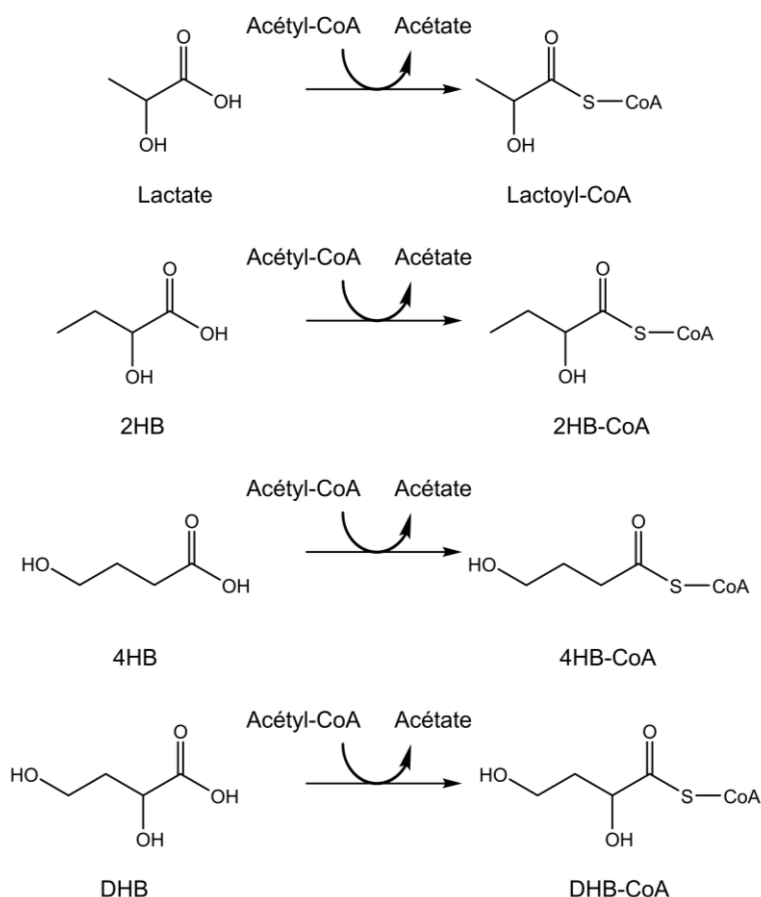
Comme décrit dans l'introduction, les voies de biosynthèses de polymères chez *E. coli* sont multiples (Chen *et al*, 2015). Je me suis tourné vers l'option qui semblait la plus aisée pour l'organisme hôte, qui ne consiste qu'à utiliser un monomère disponible dans le milieu, à l'activer et à le polymériser, en deux étapes (Figure 4.d). Pour rappel, ces étapes consistent en l'activation du DHB en DHB-CoA, à partir d'une molécule d'acétyl-CoA, et par l'intermédiaire d'une acétyl/propionyl-CoA transférase (PCT), et la polymérisation du DHB-CoA, le substrat activé, par une polyhydroxyalcanoate synthase (PHA synthase, PhaC). Cette voie est également plus simple à mettre en œuvre du point de vue expérimental, et peut plus facilement s'inspirer de travaux déjà publiés, utilisant des monomères semblables au DHB (lactate, 2-hydroxybutyrate, 4-hydroxybutyrate). Il a donc été nécessaire d'identifier quelles CoA transférases et quelles PHA synthases employer pour arriver à la synthèse de polymère de DHB.

Le DHB est un monomère particulier pour la synthèse de biopolymères, puisqu'à l'inverse des monomères classiquement utilisés, il possède deux fonctions hydroxyles potentiellement exploitables pour la polymérisation. De plus, ses fonctions hydroxyles sont situées au carbone 2 et 4 du butyrate, alors que les PHA synthases acceptent préférentiellement les monomères hydroxylés en carbone 3, comme le 3-hydroxybutyrate (3HB) (voir Introduction III.1.2) (Madison & Huisman, 1999). Il fallait alors compter sur une spécificité de substrat large des PCT naturelles, ou une spécificité de substrat dédiée aux 2- ou 4-hydroxyacides qui soit naturelle, ou obtenue par ingénierie enzymatique. L'utilisation de monomères comme le 2HB, le lactate (2-hydroxypropionate) ou le 4HB est possible pour la biosynthèse de PHA empruntant la voie PCT/PHA synthase. Toutefois, rappelons que la réaction d'activation se produit au niveau de l'acide carboxylique porté par le monomère. La position des fonctions hydroxyles du monomère pourrait alors ne pas être aussi importante que sa taille (C2, C3, C4) pour son activation par une PCT (Figure 51).

# 1. Recherche d'acyl-CoA transférase pour l'activation du DHB

## 1.1 Identification à partir de la littérature

J'ai donc dans un premier temps sélectionné cinq enzymes candidates dont le fonctionnement sur le 2HB, le lactate ou le 4HB avait déjà été montré : la PCT de *Ralstonia eutropha* (Taguchi *et al*, 2008b; Lindenkamp *et al*, 2013; Volodina *et al*, 2014), OrfZ de *Clostridium kluyveri* (Hein *et al*, 2006), la PCT de *Clostridium propionicum* (Selmer *et al*, 2002), la PCT de *Megasphaera elsdenii* (Matsumoto *et al*, 2013; Zhang *et al*, 2019) et la PCT de *Thermus thermophilus* (Tajima *et al*, 2016). Parmi ces PCT, la surproduction chez *E. coli* de celle de *C. propionicum* rendait les cellules non viables (Selmer *et al*, 2002). Elle a donc pour l'instant été écartée de cette étude.

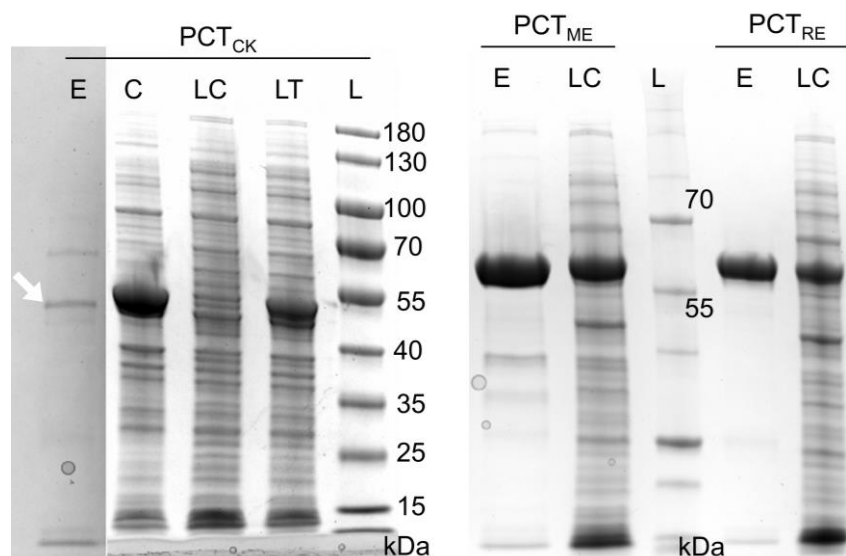


**Figure 51** : Activation de différents substrats par les PCT identifiées dans la littérature. *R. eutropha* : lactate, 4HB, *C. kluyveri* : 4HB, *M. elsdenii* : 2HB, lactate, *T. thermophilus* : lactate

## 1.2 Purification et tests *in vitro* des PCT produites

Les gènes optimisés codant les PCT de *R. eutropha* (PCT<sub>RE</sub>), *C. kluyveri* (PCT<sub>CK</sub>) et *M. elsdenii* (PCT<sub>ME</sub>) ont été clonés dans un plasmide pET28. Des cellules BL21 DE3 d'*E. coli* ont été transformées avec ces plasmides et ont permis la surproduction des PCT (milieu riche LB, ajout de 1 mM d'IPTG à DO<sub>600</sub> 0.5-0.7, puis expression à 37°C pendant 4 h), qui ont pu être purifiées (Figure 52) et testées *in vitro* sur un substrat homologue à leur substrat naturel, ainsi que sur le DHB. Les PCT<sub>ME</sub> et PCT<sub>RE</sub> ont été retrouvées en excès dans la fraction soluble, aux tailles attendues (55.6 kDa et 57 kDa respectivement). Il est toutefois nécessaire de noter que le protocole de surproduction de PCT<sub>CK</sub> a dû être révisé pour une production plus douce (0.5 mM d'IPTG, expression sur la nuit à 20°C),

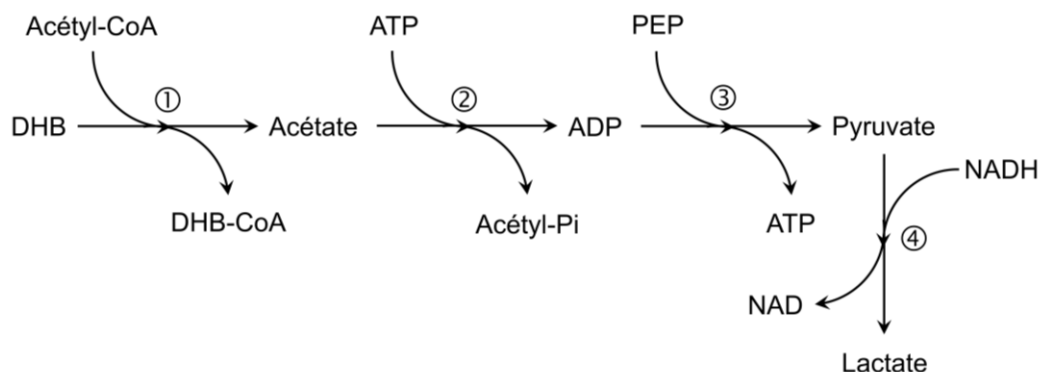
sans quoi la protéine était en totalité produite sous forme de corps d'inclusion. On remarque toutefois que la majorité de PCT<sub>CK</sub> produite se retrouve dans le culot insoluble. Des ajustements sur les protocoles d'induction et de purification pourraient permettre d'améliorer son rendement.



**Figure 52** : SDS-PAGE des étapes de purification des PCT de *C. kluyveri* (CK), *M. elsedenii* (ME), *R. eutropha* (RE). LT : lysat total, LC : lysat clair, C : fraction non soluble, E : enzyme purifiée, L : échelle de poids moléculaire. La flèche blanche indique la bande correspondant à PCT<sub>CK</sub>.

Le dosage des activités pour ces enzymes pourrait se faire selon différentes méthodes :

- Le dosage du DHB-CoA issu de la réaction. Il n'existe toutefois pas de DHB-CoA commercialement disponible pour référence.
- La mesure indirecte de la concentration en acétyl-CoA résiduel, en faisant appel au réactif d'Ellman (acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque, ou DTNB) (Ellman, 1959; Srere *et al*, 1963).
- Le couplage au NADH *via* l'acétate produit selon un principe réactionnel faisant intervenir trois enzymes supplémentaires pour le transformer en lactate. La réduction en lactate est alors suivie à 340 nm par l'oxydation du NADH en NAD (Figure 53) (Aceti & Ferry, 1988).



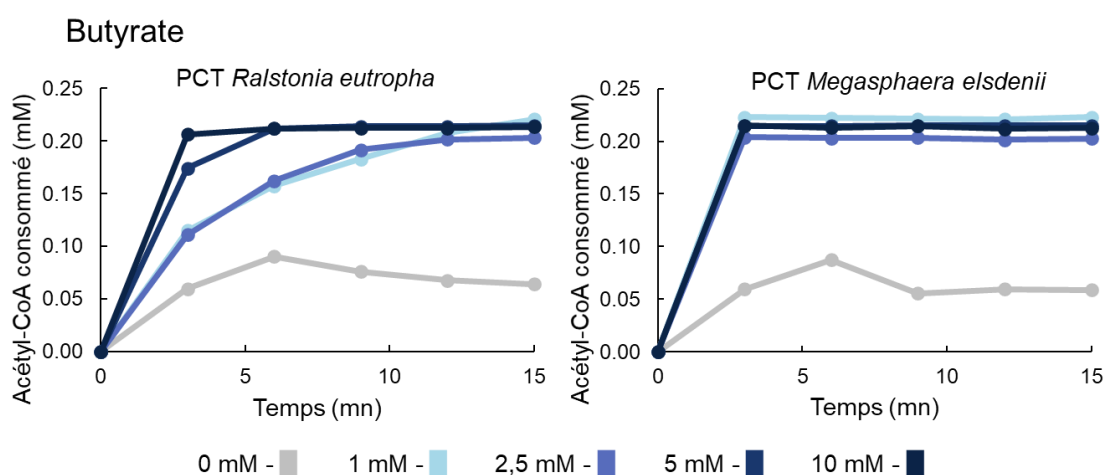
**Figure 53** : Complexe de réactions enzymatiques permettant le suivi en temps réel par absorbance à 340 nm de l'oxydation du NADH, stœchiométrique à l'apparition de l'acétate. 1 : CoA transférase, 2 : acétate kinase, 3 : pyruvate kinase, 4 : lactate déshydrogénase.

#### a. Mesure par la détermination de l'acétyl-CoA résiduel

PCT<sub>RE</sub> et PCT<sub>ME</sub> ont été testées, dans un premier temps par la méthode utilisant le DTNB. La réaction a été réalisée en deux temps : en premier, la réaction du transfert de la coenzyme A, à partir de l'acétyl-CoA vers le substrat testé. Ensuite, la réaction (arrêtée par chauffage) a été incubée avec de l'oxaloacétate en excès et quelques dizaines de milliunités de citrate synthase commerciale. Ceci permet à l'acétyl-CoA résiduel de condenser avec l'oxaloacétate en citrate et de libérer la coenzyme A, exposant le groupement thiol (-SH) de celle-ci. Ce groupement thiol de la coenzyme A clive le lien S-S de l'acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque (DTNB), créant un disulfide mixte (CoA-S-S-TNB), et libérant du TNB<sup>2-</sup>, dont l'absorbance est mesurée à 412 nm.

Ces enzymes ont d'abord été testées avec cette méthode en utilisant le butyrate comme substrat, car elles avaient déjà été rapportées comme fonctionnelles sur ce substrat (Trachsel *et al*, 2016; Kataoka *et al*, 2017; Lindenkamp *et al*, 2013; Volodina *et al*, 2014; Stadtman, 1953; Rössle *et al*, 1981). Les mélanges réactionnels des tests enzymatiques des PCT (volume total 1 mL) contenaient 0.2 mM d'acétyl-CoA, 15 µg d'enzyme et des concentrations variables de substrat (butyrate 0 à 5 mM ; DHB racémique 0 à 100 mM), dans un tampon 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM MgCl<sub>2</sub> et 50 mM KCl, pH 7.5. Les réactions ont été incubées à 37°C pendant 15 min, et un échantillon (100 µL) a été prélevé toutes les trois minutes et immédiatement dénaturé pendant 10 min à 95°C. Les échantillons prélevés ont ensuite été mis en présence de 100 µL d'une solution contenant 1 mM d'oxaloacétate, 1 mM de DTNB, 1 mM d'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) et 0.04 U de citrate synthase commerciale, dans un tampon sodium phosphate pH 8. Cette seconde réaction a permis la synthèse de citrate et de coenzyme A libre à partir d'oxaloacétate et d'acétyl-CoA. Elle a été incubée à 37°C puis l'absorbance du TNB libre mesurée à 412 nm. Les concentrations obtenues ont été ajustées selon les dilutions effectuées au cours de l'échantillonnage.

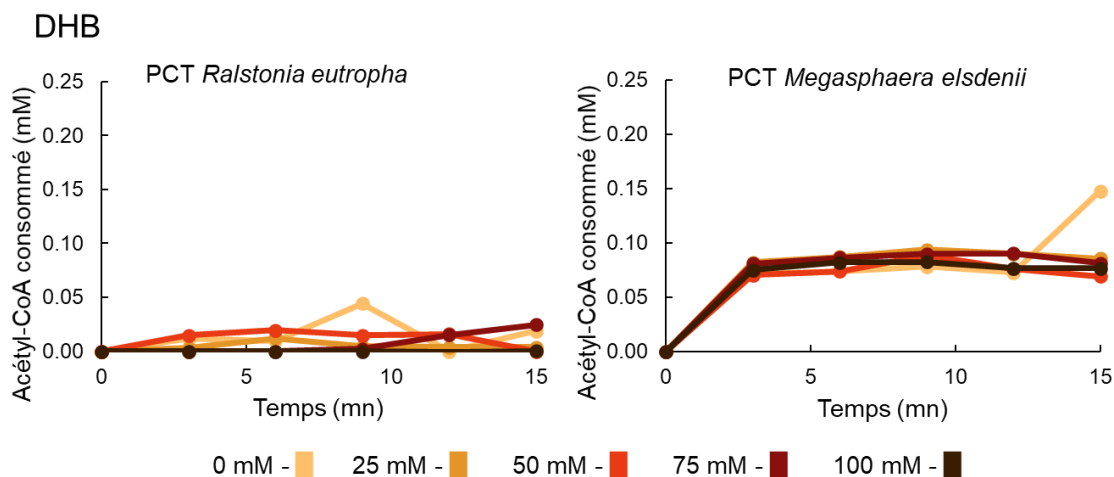
Les résultats obtenus avec cette méthode de dosage montrent que les enzymes purifiées de *R. eutropha* et *M. elsdenii* sont actives sur le butyrate : la quantité d'acétyl-CoA consommée augmente au cours du temps (Figure 54).



**Figure 54 :** Suivi de la consommation de l'acétyl-CoA au cours du temps par les PCT de *R. eutropha* et *M. elsdenii* en présence de diverses concentrations de butyrate. L'acétyl-CoA est présent en concentration fixe (0.2 mM) n = 1



Par contre, en utilisant du DHB comme co-substrat avec l'acétyl-CoA, la réaction ne semble pas consommer d'acétyl-CoA (Figure 55). La quantité d'enzyme présente (15 µg) et la très forte concentration en substrat (jusqu'à 100 mM) peuvent suggérer : (1) une activité excessivement faible et indétectable de ces PCT sur le DHB, (2) que la méthode de mesure ne rend pas précisément compte de la disparition du substrat, notamment en raison des manipulations nécessaires entre la réaction initiale et la mesure de l'absorbance du TNB (prélèvement, chauffage, dilution).



**Figure 55 :** Suivi de la consommation de l'acétyl-CoA au cours du temps par les PCT de *R. eutropha* et *M. elsdenii* en présence de diverses concentrations de DHB. L'acétyl-CoA est présent en concentration fixe (0.2 mM) n = 1

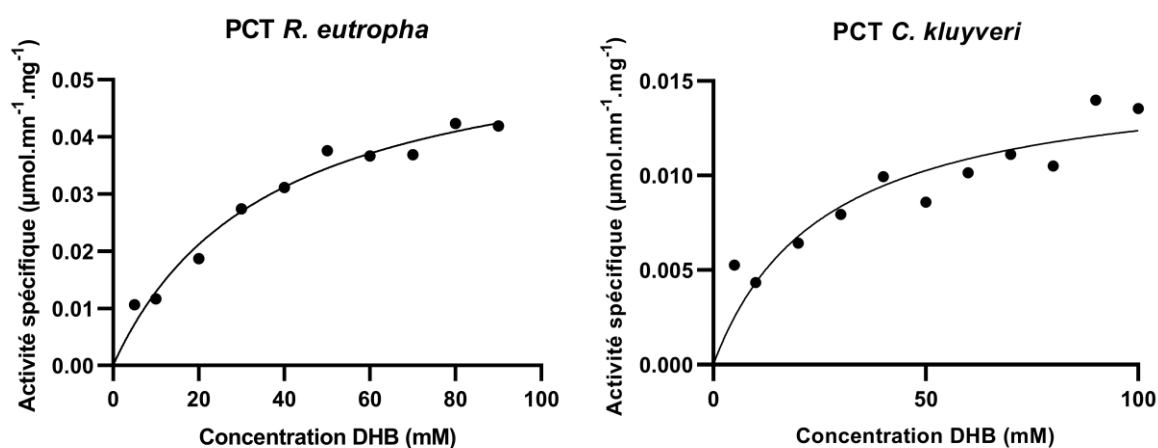
Vu l'incertitude de cette méthode, une seconde méthode a été mise au point, basée sur le couplage d'un des produits de la réaction (l'acétate) à la réduction de NADH. Cette méthode, bien qu'impliquant trois enzymes de couplage, dont deux sont disponibles commercialement, a semblé plus sûre, car elle pouvait être suivie en continu à 340 nm.

### b. Mesure par couplage enzymatique

Ce test repose sur le couplage de trois enzymes supplémentaires à celle dont on souhaite mesurer l'activité. La première réaction est catalysée par la PCT et devrait produire du DHB-CoA ainsi que de l'acétate, lequel est phosphorylé en acétate-phosphate par l'intermédiaire d'une acétate kinase, en présence d'ATP, relarguant de l'ADP. Ce dernier, en présence de phosphoénolpyruvate (PEP) et d'une pyruvate kinase, est transformé en ATP et en pyruvate. Enfin, la dernière réaction est catalysée par une lactate déshydrogénase, qui réduit le pyruvate en lactate, et oxyde une molécule de NADH en NAD (Figure 53). Cette dernière transformation de NADH en NAD peut être suivie en continu par spectrophotométrie à 340 nm, et est stœchiométrique à la production d'acétate. Cette réaction, plus fastidieuse à mettre au point, à l'avantage de mesurer la production d'acétate, qui est le produit direct de la réaction. Le mélange réactionnel (250 µL) contenait 15 µg de transférase, 0.3 mM d'ATP, 1 mM de PEP, 0.2 mM de NADH, 0.2 mM d'acétyl-CoA, 1 µL de mélange de pyruvate kinase (0.8 U) et lactate déshydrogénase (1 U) commercial et 7 µg d'acétate kinase d'*E. coli* purifiée. La réaction a été incubée à 37°C et initiée par l'ajout de différentes concentrations de substrat (0 à 100 mM de DHB).

La réaction a d'abord été montrée comme étant entièrement dépendante de la présence d'acétate, lui-même produit uniquement en présence à la fois d'acétyl-CoA de

DHB, et des PCT testées, avant d'être utilisée dans cette étude. Cette méthode a permis le dosage des activités enzymatiques de *R. eutropha*, *C. kluveri*, et *M. elsdenii*. Les trois enzymes ont montré une activité sur le butyrate, ce qui confirme qu'elles étaient effectivement fonctionnelles. PCT<sub>ME</sub> n'a pas montré d'activité sur le DHB, appuyant les résultats obtenus précédemment lors du dosage au DTNB. Toutefois, en présence de DHB, l'utilisation de PCT<sub>CK</sub> et PCT<sub>RE</sub> permettait bien l'observation d'une diminution de l'absorbance à 340 nm, signifiant qu'elles étaient effectivement aptes à produire de l'acétate, et logiquement du DHB-CoA. J'ai ainsi pu tracer les courbes de Michaelis-Menten correspondantes (Figure 56) et déduire les constantes enzymatiques de ces PCT sur le DHB (GraphPad, Tableau 7). J'ai pu déterminer que l'affinité de PCT<sub>CK</sub> pour le DHB ( $K_m = 25.89$ ) est meilleure que celle de PCT<sub>RE</sub> ( $K_m = 36.14$  mM). PCT<sub>RE</sub> s'est en revanche montrée plus efficace ( $k_{cat}/K_m = 1.55$  s<sup>-1</sup>.M<sup>-1</sup>) que PCT<sub>CK</sub> ( $k_{cat}/K_m = 0.483$  s<sup>-1</sup>.M<sup>-1</sup>). À titre de comparaison, la PCT<sub>RE</sub> a été décrite comme ayant un  $K_m$  de 4.3 mM et un  $k_{cat}/K_m$  de 375 s<sup>-1</sup>.M<sup>-1</sup> pour le 3HB (en présence toutefois de 1 mM d'acétyl-CoA et à 30°C) (Volodina *et al*, 2014). L'affinité et l'activité montrées sur le DHB sont donc très faibles.

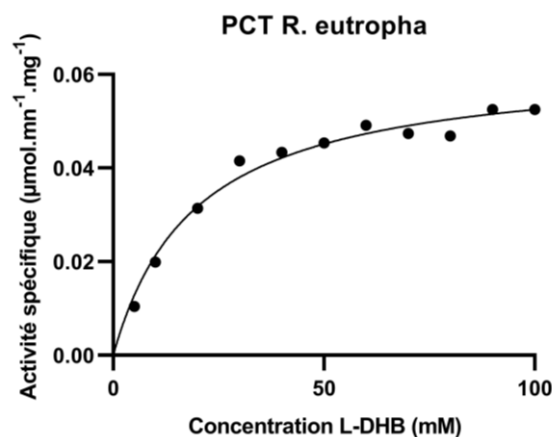


**Figure 56** : Courbes de Michaelis-Menten obtenues pour les PCT de *R. eutropha* et *C. kluveri* sur DHB. Les points représentent les vitesses effectivement mesurées, et la courbe est le résultat du calcul de la régression non linéaire sur ces points (Graphpad) (PCT<sub>re</sub>  $R^2 = 0.97$ , PCT<sub>ck</sub>  $R^2 = 0.82$ ).  $n = 1$

**Tableau 7** : Constantes enzymatiques obtenues pour les PCT de *C. kluveri* sur le racémique de DHB, et *R. eutropha* sur L-DHB et le racémique de DHB.  $n = 1$

	<i>C. kluveri</i>		<i>R. eutropha</i>	
	DHB	DHB	DHB	L-DHB
K <sub>m</sub> (mM)	25.89	36.14	36.14	19.46
V <sub>max</sub> (µmol.mn <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> )	0.016	0.059	0.059	0.063
K <sub>cat</sub> (s <sup>-1</sup> )	12.5.10 <sup>-3</sup>	0.056	0.056	0.06
K <sub>cat</sub> /K <sub>m</sub> (s <sup>-1</sup> .M <sup>-1</sup> )	0.483	1.55	1.55	3.08

La stéréosélectivité de ces enzymes est mal décrite, et peu d'informations à ce propos sont disponibles. Par exemple, la PCT de *C. propionicum* possède une préférence pour le D-lactate plutôt que pour le L-lactate (Schweiger & Buckel, 1984) et PCT<sub>RE</sub> une préférence pour la forme D-3HB plutôt que pour la forme L- (Volodina *et al*, 2014). Ne disposant que du racémique de DHB et du L-DHB, l'activité de PCT<sub>RE</sub> a été testée sur le L-DHB (Figure 57).



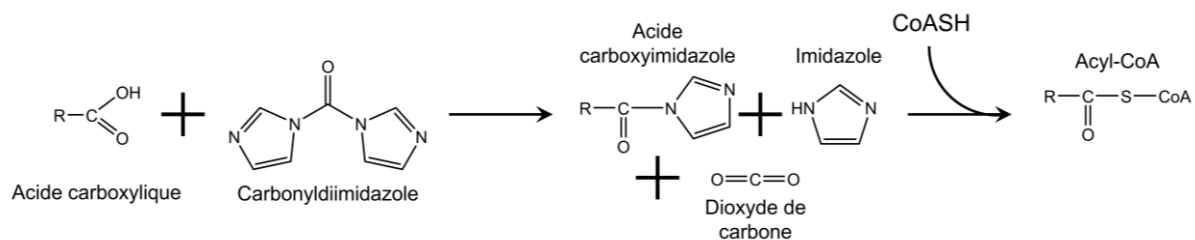
**Figure 57** : Courbe de Michaelis-Menten obtenue pour la PCT de *R. eutropha* sur L-DHB. Les points représentent les vitesses effectivement mesurées, et la courbe est le résultat du calcul de la régression non linéaire sur ces points (Graphpad) ( $R^2 = 0.98$ ).  $n = 1$

Cette « énantio-préférence » a pu être en partie confirmée : le  $K_m$  de PCT<sub>RE</sub> pour le L-DHB est de 19.46 mM, soit près de deux fois moins élevé que pour le racémique de DHB, alors que la  $V_{max}$  est restée dans le même ordre de grandeur (0.059 contre 0.063  $\mu\text{mol.mn}^{-1}.\text{mg}^{-1}$  pour le racémique et le L-DHB respectivement) (Tableau 7). Le  $K_m$  mesuré pour le racémique peut donc correspondre à celui du L-DHB, représentant lui-même 50 % du racémique. Avec la  $V_{max}$  restée quasi identique, la comparaison du  $K_m$  permet alors d'affirmer que la PCT<sub>RE</sub> privilégie effectivement la forme L- du DHB.

### 1.3 Conclusion : l'activation du DHB en DHB-CoA peut être catalysée par une PCT naturelle

Grâce à ces résultats, le suivi de la réaction catalysée par la PCT a été démontré comme plus fiable en suivant la formation du produit que la disparition du substrat. En effet la méthode de couplage enzymatique est plus précise et plus sensible, car elle ne nécessite pas de manipuler l'échantillon avant de procéder à la mesure. L'activité des PCT étant aussi très faible, cette méthode est donc privilégiée. Elle était toutefois plus complexe à appliquer du fait des nombreux composants qui permettent sa mise en place, mais le protocole désormais établi peut-être reproduit en routine. Le seul inconvénient qui subsiste est le fait qu'on ne mesure pas directement la formation de DHB-CoA, mais celle d'acétate. Toutefois, la formation d'acétate a été montrée comme dépendante de la présence d'à la fois la PCT, le DHB et l'acétyl-CoA. Il est donc très peu probable que l'acétate puisse être produit autrement que *via* le DHB. La synthèse de DHB-CoA pouvant servir de standard permettrait toutefois une quantification directe de la molécule par HPLC couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) (Rivera & Bartlett, 2018). La synthèse chimique de DHB-CoA pourrait être testée, avec la synthèse à base de carbonylimidazole. Brièvement, cette méthode consiste en deux réactions successives : une première durant laquelle un acide carboxylique libre est activé avec un carbonylimidazole, et une seconde où cet acide activé est thioesterifié avec une coenzyme A libre (Figure 58). L'acyl-CoA ainsi produit peut par la suite être séparé des contaminants restants (CoA-SH et carbonyldiimidazole) grâce à une colonne préparative en HPLC (Kawaguchi *et al*, 1981). Cette méthode a été testée avec succès sur le butyrate, et a montré des rendements de 54 % et 57 % sur le D- et L-3HB respectivement (Peter *et al*, 2016). On peut alors supposer

que cette méthode de préparation chimique pourrait également s'appliquer au DHB et permettre l'obtention de DHB-CoA pure utilisable comme standard.



**Figure 58** : Synthèse chimique d'acyl-CoA à partir d'acide carboxylique et de carbonyldiimidazole. La réaction se fait en deux étapes, et produit des intermédiaires : un carboxyimidazole, un imidazole et un dioxyde de carbone.

PCT<sub>ME</sub> n'a pas donné de résultats significatifs permettant d'établir une activité sur le DHB, quel que soit le test utilisé. PCT<sub>CK</sub> et PCT<sub>RE</sub> ont montré des activités et des affinités très faibles en comparaison de leurs substrats naturels (le  $K_m$  de PCT<sub>CK</sub> est 8 fois plus petit, et sa  $V_{max}$  100 fois plus petite sur le DHB que sur le 3HB). Ce sont toutefois des résultats prometteurs et une ingénierie enzymatique pourrait permettre d'améliorer leurs caractéristiques sur le DHB. Elles peuvent alors être considérées pour la production *in vivo* de DHB-CoA pour la biosynthèse de polymère de DHB, à condition de compenser leurs faibles constantes avec une production en large excès. Des études approfondies, en testant PCT<sub>TT</sub>, devraient être effectuées, notamment sur la capacité des PCT à préférer un énantiomère plutôt qu'un autre, comme a semblé le montrer PCT<sub>RE</sub>. Le D-DHB n'étant pour l'instant pas disponible, l'énantiopréférence des PCT pourrait être confirmée avec d'autres substrats, comme le 3HB ou le 2HB par exemple, et sur toutes les enzymes à notre disposition. Ces caractéristiques sont très peu décrites dans la littérature, alors que l'intérêt pour le transfert de la coenzyme A sur un substrat D- plutôt que L- est important puisque les PHA synthases sont rapportées comme D- spécifiques.

De cette étude *in vitro*, on peut retenir que les PCT de *R. eutropha* et *C. kluyveri* sont actives sur le DHB, elles ont donc été choisies pour l'étude *in vivo*, en tandem avec la PHA synthase. La PCT de *T. thermophilus* a également été utilisée dans cette étude *in vivo*, de même que celle de *M. elsdenii*. En effet, elles ont déjà été utilisées pour l'activation de monomères comme le lactate (Tajima *et al*, 2016; Li *et al*, 2016; Zhang *et al*, 2019), qui est un 2-hydroxyacide.

## 2. Choix de PHA synthases

Les PHA synthases sont différenciées en quatre catégories selon leurs caractéristiques. Entre autres, les PhaC de classe I, III et IV sont privilégiées pour synthétiser des PHA à chaînes courtes (scl, monomères de trois à cinq carbones), tandis que les PhaC de classe II des PHA à chaînes moyennes (mcl, monomère de six à dix carbones) (Rehm, 2003). Des travaux d'ingénierie enzymatiques ont aussi été menés sur ces enzymes afin de diversifier leurs activités, et notamment sur une PhaC de classe II, dont un variant a permis la polymérisation d'un monomère à chaîne courte, le lactate (Taguchi *et al*, 2008b).

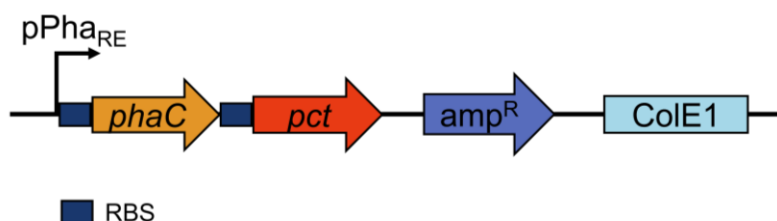
Quatre PHA synthases ont donc été considérées pour la biosynthèse de polymère de DHB, basées sur les conseils du Professeur Taguchi, leur classe d'appartenance et sur les substrats qu'elles étaient capables d'utiliser. Une PhaC capable de synthétiser des

PHA-scl, puisque le DHB est un monomère à chaîne courte, était recherchée. Les PhaCRE, PhaCAC, et PhaCSTQK ont donc été retenues. En effet, PhaCRE et PhaCAC sont des PHA synthases de classe I, qui synthétisent des PHA-scl (Rehm, 2003). Ces PhaC pourraient ainsi permettre la polymérisation du DHB par l'hydroxyle présent en C2 aussi bien qu'en C4. PhaCRE a de plus déjà été utilisée pour synthétiser des P(4HB) et P(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate-co-2,3-dihydroxybutyrate), ce qui rend son activité sur le DHB-CoA plausible (Hein *et al*, 2006; Insomphun *et al*, 2016, 2017). PhaCAC a été utilisée pour produire des oligomères de 3-HB, *in vivo* chez *E. coli* et *in vitro* (Miyahara *et al*, 2019). Elle représente un intérêt puisque la polymérisation du DHB étant incertaine, autant sous forme d'homopolymère que de copolymère, la possibilité de produire des oligomères serait une alternative, et permettrait malgré tout de démontrer la possibilité de l'utilisation du DHB dans un polymère. PhaCSTQK est une PHA synthase modifiée issue de *Pseudomonas* sp. 61-3 mutante (S325T Q481K), dont les mutations ont permis son utilisation pour l'incorporation de 2-hydroxy acides dans des PHA, bien qu'étant une PhaC de classe IV (Taguchi *et al*, 2008b; Matsumoto *et al*, 2013). Sa promiscuité de substrat pourrait de ce fait s'étendre au DHB et permettre sa polymérisation par l'hydroxyle situé en C2. Un autre mutant considéré est PhaCAR, une enzyme chimère composée de 26 % de la séquence N-terminale de PhaCAC et de 74 % de la séquence C-terminale de PhaCRE (Matsumoto *et al*, 2009). Elle permet notamment l'incorporation de 2- et 4-hydroxy acides dans la chaîne de polymères (Sato *et al*, 2022). Il est donc fortement probable qu'elle exerce également son activité sur le DHB.

Avec ces quatre PHA synthases, je disposais alors de quatre PCT et quatre PhaC pour tester l'homopolymérisation d'une part, et la co-polymérisation du DHB avec le 3HB d'autre part. En effet, ces PhaC sont naturellement capables de synthétiser du P(3HB), et l'incorporation de DHB dans ce type de PHA pourrait aussi amener à de nouveaux biopolymères. J'ai alors entrepris la construction d'une collection de plasmides permettant l'expression des différents couples PCT/PhaC possibles.

### 3. Constructions des combinaisons PCT et PhaC

Les gènes codant les PCT et les PhaC ont été clonés dans un plasmide de type pUC19 (origine *ori* de pMB1 et marqueur de résistance à l'ampicilline ( $\beta$ -lactamase)) de la manière suivante : les PhaC ont été clonées en aval du promoteur naturel de l'opéron *pha*



**Figure 59** : Modèle de construction pour les combinaisons de PCT et PhaC, basé sur pUC19. pPhaRE : promoteur naturel de l'opéron *phaCAB* chez *R. eutropha*, amp<sup>R</sup> : cassette de résistance à l'ampicilline ( $\beta$ -lactamase), RBS : site de fixation du ribosome, ColE1 : origine de répllication à haut nombre de copies, phaC : PHA synthase, pct : propionyl-CoA transférase.

de *R. eutropha*, suivi par un RBS et de la PCT désirée (Figure 59). La construction de cet opéron est basée sur ceux construits précédemment pour la biosynthèse de P(LA) par le laboratoire du Prof Taguchi (Taguchi *et al*, 2008b).

Onze combinaisons, résumées dans le tableau 8, ont pu être construites, ainsi qu'un plasmide contrôle ne portant que le gène codant la PCT<sub>CK</sub>. Seules les constructions contenant PhaC<sub>AC</sub> et celle combinant PCT<sub>RE</sub> et PhaC<sub>AR</sub> n'ont pas pu être obtenues. Il convient de noter que lors du clonage de *phaC*<sub>RE</sub>, une mutation de type substitution est apparue. Elle transforme le nucléotide 121 : A121T, ce qui modifie l'acide aminé du codon dans lequel il est impliqué, transformant la thréonine à la position 41 en sérine. Ce mutant a cependant été utilisé, car il apparaît que cet acide aminé ne serait pas conservé lors de l'alignement de plusieurs PhaC (Rehm, 2003). De plus, cet acide aminé intervient dans la partie N-terminale de la protéine, qui ne joue pas un rôle prépondérant dans l'activité de PhaC<sub>RE</sub> (Kim *et al*, 2017; Chek *et al*, 2017). Cette mutation ne devrait donc pas affecter l'activité de l'enzyme. L'obtention à l'avenir de constructions sans mutation sera tout de même souhaitable. Ces plasmides n'ont pas tous été obtenus en même temps, certains n'ont donc pas pu être testés dans toutes les conditions décrites.

**Tableau 8** : Récapitulatif des différentes combinaisons de PCT et PhaC. En gras, les plasmides effectivement construits. En gris, les plasmides n'ont pas encore pu être obtenus. \* : plasmide construit, mais porteur d'une mutation dans le gène *phaC*.

	PhaC <i>R. eutropha</i>	PhaC <i>A. caviae</i>	PhaC "Chimera" (CAR)	PhaC STQK	Sans PhaC
PCT <i>C. kluyveri</i>	<b>A1*</b>	B1	<b>C1</b>	<b>D1</b>	<b>1</b>
PCT <i>M. elsdenii</i>	<b>A2*</b>	B2	<b>C2</b>	<b>D2</b>	2
PCT <i>R. eutropha</i>	<b>A3*</b>	B3	C3	<b>D3</b>	3
PCT <i>T. thermophilus</i>	<b>A4*</b>	B4	<b>C4</b>	<b>D4</b>	4

L'utilisation du DHB comme monomère nécessite d'empêcher son oxydation en OHB. C'est pourquoi la souche  $\Delta LO$  ( $\Delta dld \Delta lldD \Delta ykg$ ) a été d'abord utilisée. De plus, comme discuté précédemment, les PHA synthases sont spécifiques des formes D-monomères alors que les PCT ont la possibilité d'activer à la fois les monomères de types L- ou D-. J'ai donc également utilisé une souche  $2\Delta$  ( $\Delta dld \Delta ykg$ ), en conservant le gène *lldD* codant la L-lactate oxydase qui peut oxyder le L-DHB. En quelque sorte, cette souche « filtrerait » le L-DHB du racémique pour n'activer que le D-DHB.

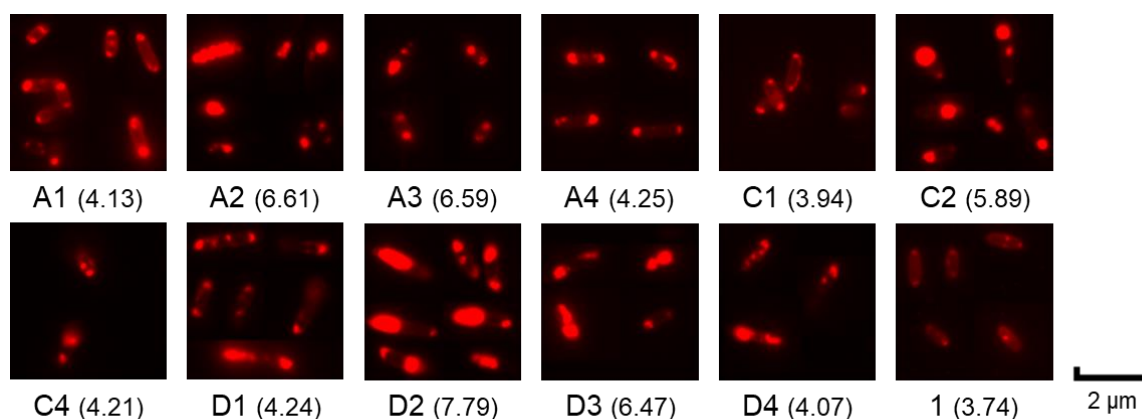
## II. Mise au point de méthodes d'analyses de la production de biopolymères

La méthode la plus simple afin de discerner des souches capables d'accumuler des PHA de celles qui n'en produisent pas est par la mesure de la densité optique à 600 nm (DO<sub>600</sub>). En effet, les granules de PHA qui se forment au fur et à mesure de la polymérisation opacifient les cellules, aussi bien chez *Ralstonia eutropha* que chez *Escherichia coli* (Schlegel *et al*, 1970; Schubert *et al*, 1988). Cette différence n'est en revanche pas toujours facilement discriminée, et tous les PHA n'ont pas nécessairement les mêmes capacités opacifiantes, ce qui pourrait probablement être le cas du P(DHB). De plus, cette méthode implique que la même quantité de cellules soit prise en compte pour la mesure entre les différentes conditions, et que la DO<sub>600</sub> ne peut alors plus être utilisée comme indicateur de la croissance d'une souche (Martinez & Déziel, 2020). Il a donc fallu mettre au point une méthode complémentaire pour vérifier la présence de PHA dans les cellules.

Une méthode alternative utilisée pour vérifier la présence de PHA dans une cellule productrice est celle de la coloration au rouge du Nil (Spiekermann *et al*, 1999). Le rouge du Nil (NR) est un colorant hydrophobe qui se complexe aux composants lipophiles des cellules. Il est utilisé comme marqueur des lipides (Greenspan & Fowler, 1985), et a rapidement été utilisé pour marquer les PHA *in vivo*, car ils forment des granules très hydrophobes, tout en permettant de conserver la viabilité des cellules (Spiekermann *et al*, 1999). L'analyse de la fluorescence permet alors de rendre compte de la différence de production de PHA entre une souche incubée avec ou sans monomères. J'ai pour cela comparé différentes méthodes d'analyse des cellules ainsi colorées, selon divers protocoles, pour en établir un fiable dans mes conditions.

## 1. Analyse par microscopie à fluorescence

J'ai d'abord voulu vérifier que les bactéries  $\Delta$ LO transformées avec mes plasmides pouvaient produire du PHA à partir de 3HB. Pour cela, les bactéries portant les différentes constructions ont été cultivées en milieu riche (LB) en présence de 20 g/L de glucose et de 3 g/L de 3HB pendant 48h, avant d'être mises en contact avec le NR : 3  $\mu$ L de ces cultures ont été prélevés et mélangés à 1  $\mu$ L de NR (0.5 mg/mL dans du diméthylsulfoxyde (DMSO)). Le mélange a été directement placé sur lame et observé au microscope à fluorescence. Les images de ces échantillons montrent que les cellules émettent plus de fluorescence lorsqu'elles expriment les combinaisons de PCT et de PhaC, que lorsqu'elles n'expriment que la PCT de *Clostridium kluyveri* seule, bien qu'on détecte quelques points ponctuels de fluorescence dans cette souche contrôle (Figure 60, 1). Ces points semblent toutefois bien plus faibles que ceux présents dans les autres souches, et seront considérés comme du bruit de fond par la suite.



**Figure 60** : Observation en microscopie à fluorescence des souches d'*E. coli* transformées avec les différents plasmides construits et ayant produit du P(3HB). Entre parenthèses est indiquée la DO<sub>600</sub> de la culture associée à l'échantillon.

La fluorescence est bien visible sous forme de granules de PHA qui se forment naturellement lors de la polymérisation. Les constructions semblent donc être fonctionnelles lorsque le milieu est supplémenté en monomère (3HB). Les plasmides présentant une mutation du gène *phaCRE* sont également fonctionnels (plasmides D1 à D4). Ainsi, la méthode de mesure de la fluorescence par microscopie ne permet qu'une analyse qualitative, et rend complexe la comparaison entre différentes souches, analysées à des moments différents, et avec des paramètres différents d'un échantillon à un autre.

Conjointement à l'analyse en microscopie, la densité optique à 600 nm a également été mesurée afin de vérifier si l'opacité des cellules suivait la fluorescence apparente observée en microscopie. On constate alors que globalement, la  $DO_{600}$  tend à être corrélée avec la fluorescence apparente : tous les plasmides permettent aux cultures de croître à une  $DO_{600}$  plus importante qu'une souche transformée avec un plasmide n'exprimant que la PCT<sub>CK</sub>. Cette  $DO_{600}$  augmente lorsque la fluorescence observée semble importante (Figure 60). Une exception peut être faite pour la construction A3, puisque malgré une  $DO_{600}$  élevée, la fluorescence observée ne semble pas si importante. Ceci pourrait être expliqué de deux manières :

- (1) pour des raisons de qualité d'image (éviter la saturation, la surexposition, etc.), les paramètres de gain et d'exposition ne sont pas absolument identiques entre les images. Par exemple, avec des paramètres permettant une bonne observation des cellules C1, une augmentation du gain et de la luminosité étaient nécessaires. L'utilisation des mêmes paramètres pour observer les cellules D2 aurait résulté en une image inexploitable bien trop brillante (c'est-à-dire une image complètement rouge). Ces modifications systématiques peuvent potentiellement déprécier la qualité fluorescente de certains granules pourtant bien présents et en quantité dans les cellules.
- (2) la souche transformée avec A3 n'a pas été capable d'accumuler des granules de PHA, comme le montre l'observation en microscopie, mais elle a pu compenser sa  $DO_{600}$  avec une concentration cellulaire plus importante. Cette hypothèse conforte l'incertitude quant à la donnée mesurée avec la  $DO_{600}$  : nous ne sommes pas en mesure, sans comptage parallèle des cellules dans la culture, ou mesure du poids sec des cellules, d'estimer si un changement dans la  $DO_{600}$  correspond à une croissance des cellules ou à une modification dans l'accumulation ou les propriétés du PHA.

## 2. Analyse de la fluorescence en cytométrie de flux

L'accès à un cytomètre de flux m'a donné l'occasion de développer un protocole de coloration des cellules d'*E. coli* au rouge du Nil (NR) pour une analyse au cytomètre. Cette méthode permet d'analyser quantitativement la fluorescence, qui est fonction de la quantité de PHA accumulé dans les cellules. En effet, pour rappel, la fluorescence due au NR lié aux autres constituants lipophiles des cellules est considérée comme un bruit de fond identique entre les échantillons d'une même souche. Plusieurs solutions de coloration et temps d'incubation ont été testés (voir Matériel et méthodes). Brièvement, un échantillon de cellules productrices de PHA (construction D1 dans une souche  $\Delta LO$ ) a été prélevé après 48h de culture, centrifugé, et débarrassé de son surnageant. Afin de perméabiliser la membrane des cellules et d'optimiser la pénétration du NR, le culot a été repris dans trois solutions différentes : éthanol 35 % ou 50 % (v/v) dans du PBS, ou du TSE (Tris-HCl, sucrose, EDTA) (protocoles adaptés de Tyo *et al*, 2006; Lagares Jr. & Valverde, 2017). Après 10, 20, ou 45 min d'incubation, les cellules ont été centrifugées et les culots ont été resuspendus dans du NR dilué à 3  $\mu\text{g/mL}$  dans du PBS. Après 30 min d'incubation, l'analyse a été faite immédiatement sur le cytomètre (voir Matériel et méthodes). Une



coloration simple sans prétraitement a également été réalisée, de la même manière que pour l'analyse en microscopie.

La quantification de la fluorescence de ces diverses techniques est présentée dans le tableau 9. La coloration par contact direct, comme appliqué pour l'observation au microscope à fluorescence, ne semble pas suffisante pour la cytométrie. En effet, là où l'on peut observer une nette différence au microscope entre une souche cultivée sans monomère et une souche cultivée en présence de 3HB (Figure 60), il ne semble pas y avoir de différence entre ces deux souches en cytométrie (rapport de fluorescence de 1.06). Le même constat peut être fait pour la coloration après traitement du culot au TSE, qui ne semble pas adéquate pour *E. coli*. Dans le cas du traitement à l'éthanol/PBS, une coloration significativement différente entre une souche contenant des granules de PHA et une souche contrôle est obtenue. Incubées avec 35 % d'éthanol pendant 10 min, les cellules productrices montraient une fluorescence 2.72 fois supérieure à la souche contrôle. Avec une solution à 50 % d'éthanol, ce changement de la fluorescence par rapport à la souche contrôle a pu augmenter jusqu'à 5.21 fois. Le temps d'incubation avec la solution à 50 % d'éthanol ne modifie pas significativement le changement de la fluorescence des cellules. Le protocole utilisé par la suite a donc consisté à incuber les cellules avec 50 % (v/v) d'éthanol dans du PBS, pendant 10 min, avant de les incuber avec du NR à 3 µg/mL dilué dans du PBS pendant 30 min.

**Tableau 9** : Fluorescence mesurée après différents protocoles de coloration au NR pour une souche ayant produit ou non du P(3HB). Fold change : rapport de fluorescence entre les cellules cultivées avec 5 g/L de 3HB et sans.

	Concentration	Temps d'incubation	Monomère		Accroissement
			Sans	3HB (5 g/L)	
Contact direct			915	967	<b>1.06</b>
TSE	1X	20 mn	1 433	1 405	<b>0.98</b>
Ethanol	35 %	10 mn	3 589	9 778	<b>2.72</b>
		10 mn	2 179	11 357	<b>5.21</b>
	50 %	20 mn	2 267	11 799	<b>5.20</b>
		45 mn	2 061	11 517	<b>5.59</b>

Ce protocole a été appliqué aux échantillons précédemment observés en microscopie, et la fluorescence émise par les cellules a été mesurée en cytométrie (Tableau 10). Les résultats indiquent, comme attendu, que les souches transformées avec les plasmides sont plus fluorescentes que la souche contrôle. La mesure en cytométrie montre toutefois des différences avec la souche contrôle bien plus importantes qu'avec la microscopie, comme la construction D2, dont la fluorescence était supérieure de 15.4 fois la fluorescence de la souche contrôle alors que pour la construction C1, ce changement de la fluorescence n'est plus important que d'un facteur 1.2.

**Tableau 10** : Récapitulatif de la fluorescence apparente, de la DO<sub>600</sub> mesurée et de la fluorescence mesurée en cytométrie pour les différentes souches transformées avec les plasmides exprimant les couples PCT/PhaC, après leur culture en présence de 3HB (*cf* photographies de microscopie en figure 59). Accroissement : rapport de fluorescence entre les cellules transformées avec les constructions co-exprimant les PCT/PhaC et le plasmide 1.

	Fluorescence apparente	DO <sub>600</sub>	Fluorescence (U.A.)	Fold change
1	-	3.74	4 736	
A1	+	4.13	7 855	1.7
A2	++	6.61	44 985	9.5
A3	+	6.59	45 000	9.5
A4	+	4.25	12 366	2.6
C1	+/-	3.94	5 841	1.2
C2	++	5.89	27 915	5.9
C4	+/-	4.21	7 819	1.7
D1	+	4.24	6 138	1.3
D2	++	7.79	72 936	15.4
D3	++	6.47	56 636	12.0
D4	+	4.07	7 536	1.6

### 3. Conclusion : la microscopie et la cytométrie sont complémentaires dans l'analyse phénotypique de PHA marqués au rouge du Nil

Ces expériences préliminaires m'ont permis de mettre en place les bonnes conditions permettant de valider que les plasmides construits fonctionnaient pour la production de PHA, et dans le même temps de mettre au point les méthodes de visualisation et quantification de ces granules de PHA. Bien que la mesure de la densité optique à 600 nm puisse être utilisée dans certaines conditions pour valider la formation de PHA, elle ne paraît pas fiable, car elle ne permet pas de distinguer des cultures de souches ayant pu croître à de fortes concentrations cellulaires de celles ayant pu produire du PHA.

L'analyse de la fluorescence causée par l'interaction entre NR et PHA peut être un moyen de doser qualitativement et quantitativement la présence de granules de PHA. Ces méthodes reposent sur l'affinité de nature lipophile entre le NR et les PHA. Or, le contrôle négatif, n'exprimant que la PCT<sub>CK</sub> et qui ne peut donc pas produire de PHA, montre quelques points fluorescents, qui pourraient être confondus avec des granules fluorescents. Ces points non spécifiques pourraient en fait résulter de l'interaction entre des corps d'inclusion de protéines et le NR. En effet, il a été vu précédemment que la PCT<sub>CK</sub>, lors de certaines conditions de surproduction, pouvait se retrouver dans les cellules sous forme de corps d'inclusion. Le même phénomène d'agrégation semble se produire lors de la surexpression de *phaC*, qui génère une majorité (95 %) de protéines insolubles (Gerngross *et al*, 1994). De plus, le NR a la possibilité d'être utilisé pour la détection de corps d'inclusion (Sutter *et al*, 2007; Steinmann *et al*, 2010). Il se pourrait donc dans notre cas que le NR ait la possibilité de colorer les corps d'inclusion produits par ces deux enzymes. L'observation directe de la fluorescence par microscopie peut être un moyen de vérifier qualitativement la présence de granules de PHA, mais requiert donc une analyse soignée des données obtenues ainsi qu'une certaine minutie de la part de l'expérimentateur pour la préparation des échantillons. Une autre manière d'utiliser le

NR pour attester de la présence de granules de PHA dans les cellules est par sa présence dans le milieu gélosé des boîtes de Pétri sur lesquelles les souches à tester ont été étalées. Ceci permet ensuite d'analyser la boîte de Pétri par fluorescence et d'estimer la fluorescence des colonies (Spiekermann *et al*, 1999). Toutefois, comme pour la microscopie, cette analyse est laissée au jugement de l'expérimentateur et n'est ni objective ni quantitative. De plus, lors des quelques essais réalisés et du fait de la différence tenue entre les différentes souches, j'ai préféré me concentrer vers des techniques plus fiables.

La coloration des granules de PHA peut aussi être analysée en cytométrie en flux. C'est cette méthode, pour laquelle j'ai établi un protocole fonctionnel, que je retiendrai principalement pour la quantification de PHA produit par les différentes souches et plasmides. En effet, malgré la préparation des échantillons, qui pourrait s'avérer fastidieuse pour un criblage conséquent, cette méthode de mesure reste toutefois plus robuste, précise et spécifique, et a l'avantage d'être automatique, mais aussi et surtout quantitative. Toutefois, il convient d'utiliser des contrôles corrects afin de pouvoir comparer les différentes constructions. En effet, il est possible que la surproduction de PCT et PhaC mène à la présence de corps d'inclusion de ces protéines, qui peuvent se lier au NR et émettre une fluorescence. Il est donc essentiel de vérifier dans un premier temps que l'augmentation de la fluorescence en présence de monomères est effectivement due à la présence du monomère et à la production de PHA, plutôt qu'à la coloration des agrégats formés par les enzymes. Pour cela, la fluorescence lors de l'incubation des cellules sans monomère devrait rester la même lorsque les enzymes sont produites ou non. En prenant ces paramètres en compte, il est possible de quantifier la fluorescence spécifiquement due à l'interaction entre le NR et le PHA. C'est pourquoi les résultats obtenus en cytométrie seront ici considérés comme plus fiables, dès l'instant où un changement remarquable existe entre : le changement de la fluorescence entre les constructions et le plasmide n'exprimant que la PCT, cultivées sans monomères, et le même changement de la fluorescence des mêmes souches cultivées avec le monomère choisi.

Les résultats obtenus seraient toutefois à reproduire, puisque la condition contrôle, sans le monomère, devrait être mise en culture en présence de la même concentration de contre-ion du monomère (la forme sodium de 3HB a été ici utilisée), ce qui n'a pas été fait ici. Cela pourrait impliquer une faible modification de la fluorescence mesurée dans ce contrôle, et les accroissements calculés pourraient alors être légèrement sur- ou sous-estimés.

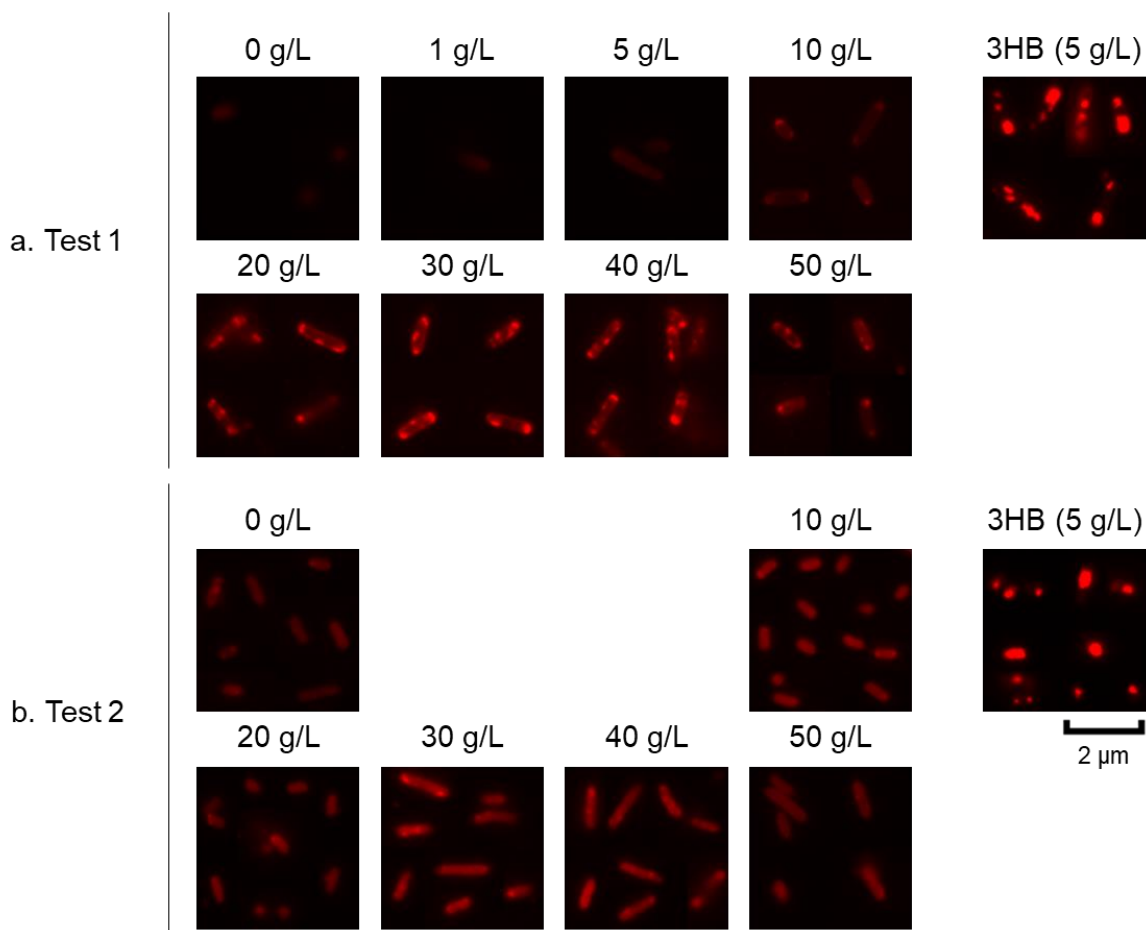
### III. Tentative d'homopolymérisation du DHB

Les premiers travaux ont consisté à tester l'homopolymérisation du DHB en exploitant les constructions plasmidiques portant les différentes PCT et PhaC, et en suivant la production par la fluorescence après coloration au NR en cytométrie et par microscopie.

#### 1. Effet de la concentration de DHB ajoutée au milieu

Afin d'estimer l'effet de l'addition de DHB lors de son homopolymérisation, j'ai commencé par tester la construction D1, en raison (1) de l'activité avérée de PCT<sub>CK</sub> sur le

DHB, (2) la capacité étendue de la PhaC<sub>STQK</sub> à accepter des monomères 2- ou 4-hydroxylés. La souche choisie dans ce contexte est une souche 2Δ ( $\Delta dld \Delta ykg$ ), en supposant que cela permette aux cellules de cataboliser le L-DHB en ne laissant à la PCT la possibilité de n'activer que le D-DHB. Les cellules transformées avec les plasmides exprimant les couples PCT/PhaC ont été mises en culture dans un milieu LB complété en présence de 20 g/L de glucose et de différentes concentrations de DHB. Après coloration au NR par contact direct, la fluorescence a été observée en microscopie à fluorescence, car pour cette première expérience, je ne disposais pas encore du cytomètre.



**Figure 61** : Observation en microscopie à fluorescence des cellules de souche 2Δ transformées avec le plasmide D1 et cultivées en présence de différentes concentrations de DHB ou 3HB 5 g/L. a. Premier test effectué sans suivi en cytométrie. b. Second test avec suivi en cytométrie en parallèle (cf Table 10).

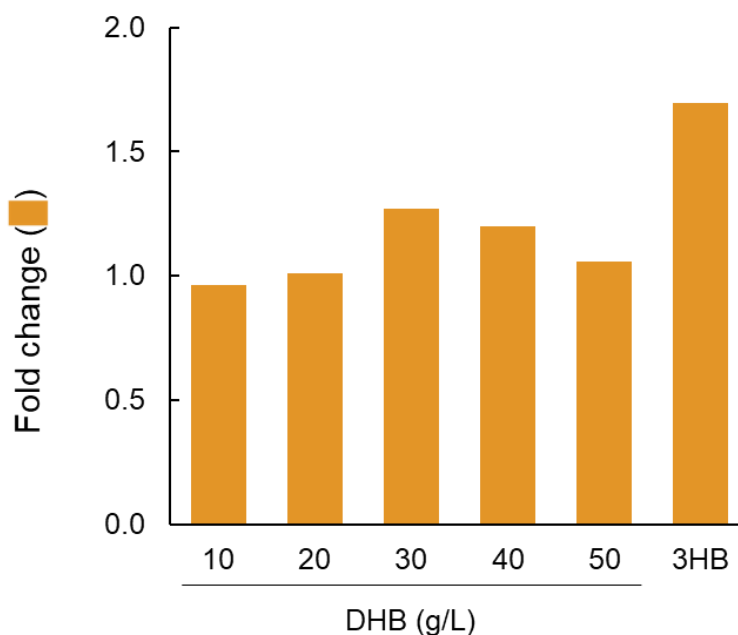
Les résultats présentés en figure 61.a montrent des granules fluorescents plus gros et plus intenses dans les cellules lorsqu'elles ont été cultivées en présence de 20 à 30 g/L de DHB, alors qu'à 10 g/L, quasiment aucun granule fluorescent n'est visible. La fluorescence obtenue par microscopie dans les souches incubées avec 1 à 10 g/L de DHB n'est pas significativement différente de la souche contrôle (0 g/L). À partir de 40 g/L, l'intensité de la fluorescence s'amenuise, suggérant qu'à cette concentration le DHB pourrait causer une inhibition du processus de sa polymérisation. La concentration de 30 g/L semble donc être une concentration optimale pour cette possible polymérisation du DHB dans une souche exprimant la PCT<sub>CK</sub> et la PhaC<sub>STQK</sub>. Toutefois, il n'est pas possible de savoir avec certitude si la fluorescence des cellules observée en microscopie correspond effectivement à une polymérisation. Il est nécessaire de pousser plus loin ces analyses, par

une mesure quantitative de la fluorescence en cytométrie, et ensuite par une caractérisation chimique du polymère synthétisé.

Alors qu'à ce stade de l'étude, la caractérisation chimique du polymère potentiellement formé était en cours d'analyse, j'ai répété la même expérience, mais en tirant parti de la méthode de quantification en cytométrie que j'avais mise en place précédemment, et décrite dans ce chapitre (voir II.2). Ces résultats indiquent que la fluorescence n'augmente qu'à des concentrations de DHB de 30 et 40 g/L, et diminue au-delà de cette concentration (Figure 62). Il est toutefois important de noter que le changement de la fluorescence par rapport à la souche contrôle (sans monomère), n'est que d'un facteur 1.27 au maximum, ce qui est beaucoup plus faible que la fluorescence en présence de 3HB, dont le rapport de fluorescence atteint presque 1.7. Ceci pourrait indiquer que la polymérisation en présence de DHB conduit à la production de moins de polymère qu'avec le 3HB. Ces mesures sont donc en accord avec celles observées en microscopie avec une concentration apparemment optimale de 30 g/L (Figure 61.b). C'est pourquoi la concentration de 30 g/L de DHB a été retenue pour les futurs essais d'homopolymérisation et de copolymérisation du DHB.

On peut également noter que c'est à partir de 30 g/L que la  $DO_{600}$  des cultures diminue, contrairement à la fluorescence. Ce résultat confirme que l'utilisation seule de la  $DO_{600}$  ne nous permet pas de conclure sur la production de polymère de DHB. La  $DO_{600}$

DHB (g/L)	Fluorescence (U.A.)	Fold Change	$DO_{600}$
0	3730		6.22
10	3592	0.96	6.86
20	3760	1.01	6.99
30	4744	1.27	3.56
40	4477	1.20	3.75
50	3948	1.06	3.41
3HB (5 g/L)	6330	1.70	8.25



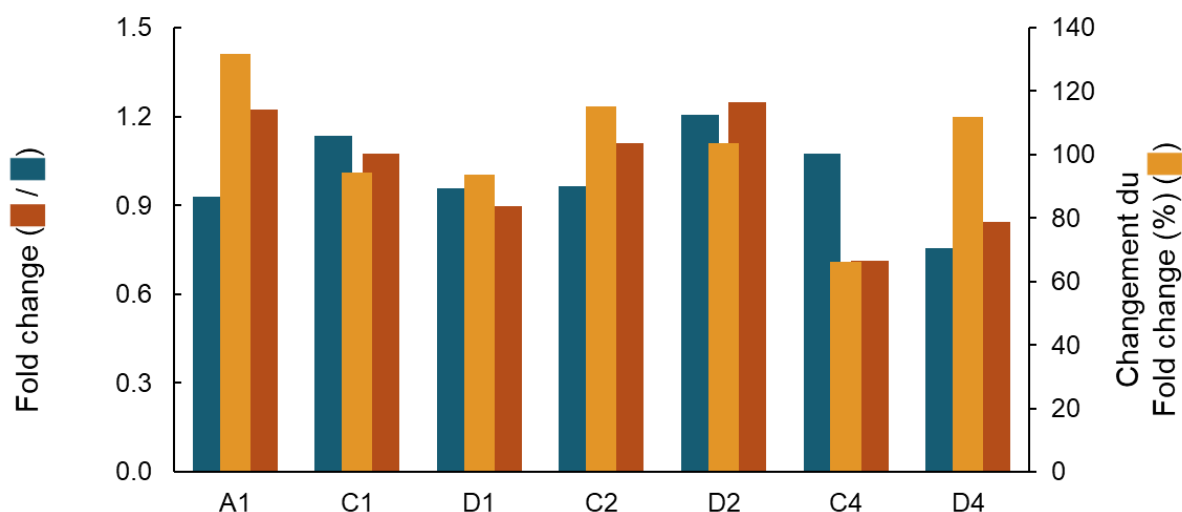
**Figure 62** : Fluorescence et  $DO_{600}$  mesurées après culture de cellules de souche  $2\Delta$  transformées avec le plasmide D1, en présence de différentes concentrations de DHB ou de 3HB 5 g/L. Le fold change correspond au rapport entre la fluorescence des cellules incubées avec un monomère et sans.

sera donc fournie de manière indicative, mais ne permet d'établir de lien ni avec la production de polymère ni avec la croissance des cellules.

## 2. Comparaison des constructions pour la polymérisation du DHB

Suite aux premiers tests d'homopolymérisation du DHB réalisés avec le plasmide D1 portant la PCT<sub>CK</sub> et la PhaC<sub>STQK</sub>, j'ai poursuivi cette étude de l'homopolymérisation avec d'autres constructions plasmidiques : A1, C1, D1, co-exprimant les différentes PhaC (*R. eutropha*, chimère et « STQK » respectivement) et la PCT<sub>CK</sub>, C2 et D2 co-exprimant les PhaC<sub>AR</sub> et PhaC<sub>STQK</sub> et la PCT<sub>ME</sub>, et C4 et D4 co-exprimant les PhaC<sub>AR</sub> et PhaC<sub>STQK</sub> et la PCT<sub>TT</sub>, avec comme contrôle le plasmide 1, qui ne porte que le gène codant la PCT<sub>CK</sub>. Les cellules de la souche 2Δ ont été transformées avec ces plasmides et mises en culture 48h dans un milieu LB complété avec 20 g/L de glucose, avec ou sans DHB à 30 g/L. Après coloration des cellules au NR, la fluorescence a été mesurée au cytomètre (Figure 63).

Plasmide	Fluorescence (U.A.) Sans monomère	Fold change	Fluorescence (U.A.) DHB 30 g/L	Fold change	Changement du Fold change (%)
1	3 791		3 289		
A1	3 520	0.93	4 019	<b>1.22</b>	132
C1	4 306	1.14	3 529	1.07	94
D1	3 631	0.96	2 951	0.90	94
C2	3 652	0.96	3 653	<b>1.11</b>	115
D2	4 569	1.21	4 108	1.25	104
C4	4 076	1.08	2 346	0.71	66
D4	2 862	0.75	2 779	<b>0.84</b>	112



**Figure 63** : Fluorescence mesurée après culture de cellules de souche 2Δ transformées avec les différents plasmides construits précédemment, en présence de 30 g/L de DHB. Bleu : accroissement sans monomère ; rouge : accroissement en présence de DHB, orange : changement de l'accroissement. Le fold change correspond au rapport entre la fluorescence des constructions et le plasmide 1. Le changement du fold change correspond à l'augmentation ou à la diminution (en %) du fold change entre la condition sans monomère et avec DHB.

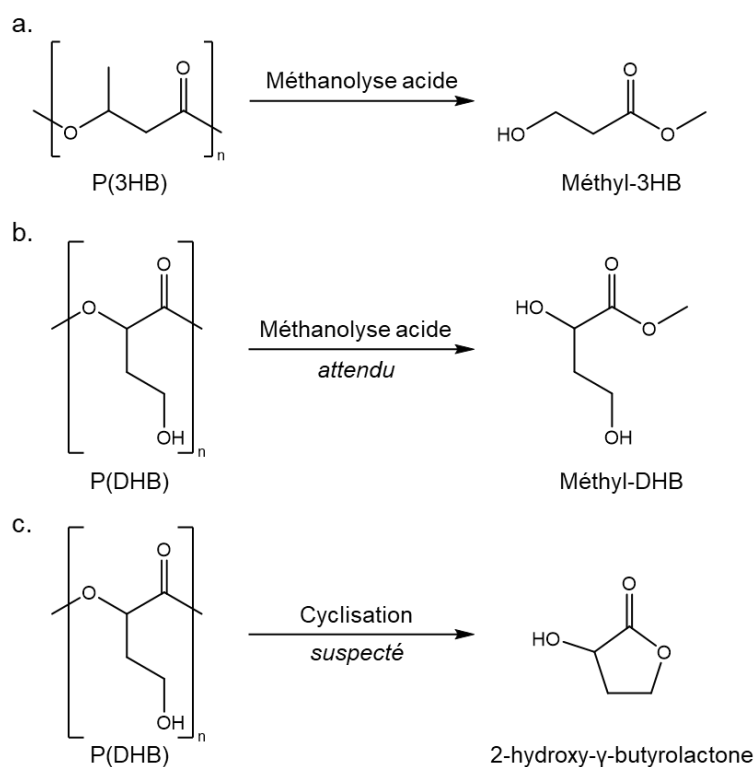
En absence de DHB, la fluorescence des cellules cultivées qui co-expriment le gène codant PhaC (conditions A1, C1 et D1) avec le gène codant la PCT<sub>CK</sub> est très proche des cellules exprimant la PCT<sub>CK</sub> seule (condition 1) (changement de 0.93 fois, 1.14 fois et 0.96 fois par rapport au plasmide 1), ce qui indique que l'expression de PhaC n'influe pas sur la fluorescence d'une souche n'exprimant que PCT<sub>CK</sub>. Il en va de même pour les autres plasmides C2, D2, C4 et D4, même s'il eut été préférable d'avoir les plasmides 2 et 4, n'exprimant que les PCT<sub>ME</sub> et PCT<sub>TT</sub> afin de pouvoir contrôler correctement la fluorescence

due à la présence des PhaC dans ces plasmides. Ce rapport de fluorescence va servir de base pour la comparaison à celui mesuré en présence de DHB.

En présence de DHB, les cellules portant les plasmides A1, C2 et D4 montrent un changement de la fluorescence par rapport à la souche contrôle (plasmide 1) plus important en présence de DHB que sans (1.22 contre 0.93, 1.11 contre 0.96 et 0.84 contre 0.75, soit une augmentation de 131 %, 115 % et 112 %). Ce changement du rapport de la fluorescence est indicateur de la production de polymère. En revanche, les cellules transformées avec le plasmide C4 (PCT<sub>TT</sub> et PhaC<sub>STQK</sub>) montrent un changement moins important de la fluorescence par rapport à la souche contrôle en présence de DHB (0.71, et 1.08 sans DHB). Je n'ai pas d'explication à ce résultat, mais cette expérience n'a été réalisée qu'une fois avec ce plasmide.

### 3. Tentative de caractérisation du polymère produit avec le DHB

Une analyse chimique, reposant sur des techniques analytiques permettant une mesure quantitative et qualitative du polymère produit est nécessaire, dans l'optique de s'assurer que la fluorescence mesurée est bien due à la polymérisation catalysée par les enzymes produites. La chromatographie gazeuse (GC) est utilisée pour quantifier et déterminer la composition monomérique des PHA. Toutefois, la plupart des PHA se décomposent à des températures inférieures à leur point d'ébullition, il est donc nécessaire de les convertir en produits stables et volatils à la température de la colonne de la GC. Ceci est réalisé par la conversion du PHA en un composé volatil, le méthyl-ester acide hydroxycarboxylique, obtenu en présence d'acide sulfurique et de méthanol (Brandl *et al*, 1988) (Figure 64.a).



**Figure 64** : Conversion du P(3HB) en méthyl-3HB grâce à la méthanolyse acide, conversion du P(DHB) en méthyl-DHB attendue par le même procédé, cyclisation suspectée du DHB lors de la méthanolyse acide.

La forme méthyl-ester du monomère interagit spécifiquement avec la phase stationnaire solide, et permet la séparation des différentes formes de monomères le cas échéant. Cette analyse globale permet de rendre compte des quantités de monomères incorporées ainsi que du genre de monomère dont il s'agit. Brièvement, la méthode consiste à prélever environ 50 mg de culot cellulaire ayant produit du PHA, qui est lyophilisée. La poudre est ensuite traitée avec une solution méthanolique préparée avec 1 mL de chloroforme et 1 mL de méthanol contenant 15 % d'acide sulfurique. Après incubation à 100°C, 1 mL d'eau MilliQ et 1 mL de chloroforme contenant 0.2 % (v/v) de méthyl-benzoate (standard interne) sont rajoutés (Juengert *et al*, 2018). La phase organique est par la suite été prélevée et analysée en GC (voir Matériel et méthodes).

Ce protocole, bien établi pour l'extraction des PHA a été appliqué aux cellules incubées avec le DHB et qui étaient les plus fluorescentes après coloration au NR (cellules transformées avec les plasmides A1, C2 et D4). Aucune trace de DHB n'a pu être toutefois mesurée en GC. En comparaison, le contrôle produisant le P(3HB) montrait bien un pic spécifique du 3HB. Plusieurs raisons pourraient expliquer l'absence de pic correspondant au DHB. La première raison pourrait être que simplement aucun P(DHB) n'ait été produit, et que l'augmentation de la fluorescence constatée serait à due à un autre phénomène. En effet le NR engendre aussi de la fluorescence au contact de matières lipophiles comme les membranes, ainsi que les corps d'inclusion. Une seconde possibilité est que la méthanolyse, qui se déroule en milieu très acide (pH = 3.3), pourrait conduire à la cyclisation du DHB en 2-hydroxy- $\gamma$ -butyrolactone (2-HBL) (Figure 64.c) et empêcher sa méthylation (Figure 64.b). Ce phénomène a déjà été rencontré lors de l'analyse de P(4HB), dont la majorité de 4HB subissait une cyclisation pour se retrouver sous forme de  $\gamma$ -butyrolactone (Koller & Rodríguez-Contreras, 2015). La détection de 2-HBL en HPLC dans ces conditions pourrait être une alternative, quoique moins sensible que la GC. Une dernière possibilité serait que lors de cette même étape, au contact du chloroforme, censé solubiliser le PHA, le P(DHB), pouvant être potentiellement plus hydrophile que les PHA, ne serait pas récupéré dans la phase organique, mais resterait dans la phase aqueuse. Ce cas de figure a déjà été rencontré, lorsqu'un polymère de 3-hydroxy-undec-10-énoate insaturé a été chimiquement hydroxylé. Lors de cette étude, il a été montré que l'hydroxylation de chacun des monomères constituant le polymère permettait de le rendre presque totalement soluble dans l'eau (Eroğlu *et al*, 2005). Cette hypothèse serait toutefois à vérifier, car le même protocole impliquant une extraction au chloroforme a déjà été appliqué pour analyser des polymères partiellement constitués de 2,3-DHB (Insomphun *et al*, 2016).

#### 4. Conclusion

Selon les données obtenues par la mesure de la fluorescence, il semblerait que certains plasmides (A1, C2 et D4) pourraient permettre la polymérisation du DHB. Les autres plasmides obtenus devront aussi être testés. De plus, les expériences visant à contrôler la fluorescence sans inducteur ont été faites en absence du contre-ion du DHB, qui est l'ammonium. Enfin, une fois construits, les plasmides 2, 3 et 4 qui n'expriment que les PCT<sub>ME</sub>, PCT<sub>RE</sub> et PCT<sub>TT</sub>, feront de meilleurs contrôles pour les constructions contenant les PCT correspondantes.



L'accumulation de polymère semble pouvoir s'effectuer à partir de 30 g/L de DHB présent dans le milieu de culture. Or le  $K_m$  des PCT pour le DHB mesuré plus tôt est très élevé (~30 mM, soit 4.14 g/L), ce qui pourrait rendre difficiles l'activation du DHB et sa polymérisation ultérieure. Une meilleure caractérisation des enzymes de la voie *in vitro*, dans le but d'obtenir des enzymes avec de meilleures constantes sur le DHB pourrait permettre l'établissement d'une voie fonctionnelle *in vitro*, et par la suite *in vivo*.

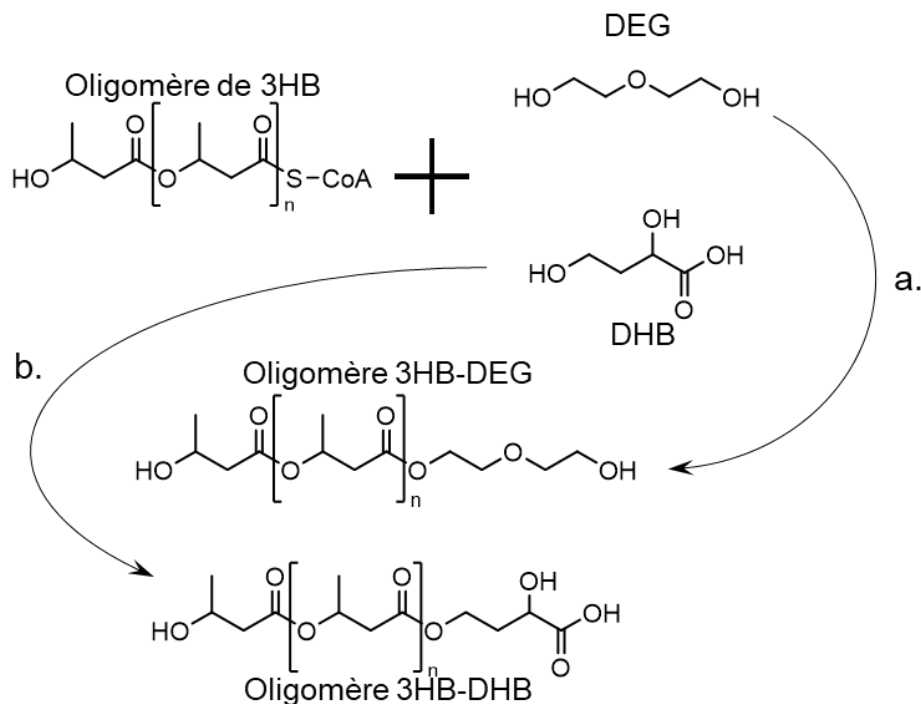
De plus, il conviendra de mettre au point une méthode de dosage du DHB issu de polymères qui soit fiable, afin de pouvoir confirmer que si un polymère est produit, il s'agit effectivement de polymère de DHB. La caractérisation de la masse moléculaire de ce potentiel polymère est également souhaitable, et devra être faite en chromatographie par exclusion de taille (SEC) : cette analyse sur des polymères extraits grâce à un traitement au chloroforme seulement (voir Matériel et méthodes), a été tentée en SEC, mais le matériel nécessaire sur place n'était pas fonctionnel durant ma mobilité. Une alternative à la GC serait d'analyser le polymère extrait en RMN, comme cela a déjà pu être fait (Insomphun *et al*, 2016). Ces deux dernières approches requièrent toutefois la purification du polymère, et elle est conditionnée au fait que le P(DHB) soit effectivement soluble dans le chloroforme, sans quoi d'autres méthodes d'extraction devront être mises en place avant de pouvoir songer à analyser le polymère.

#### IV. Enrichissement de P(3HB) avec du DHB

Les procédés d'extraction, les analyses chimiques et la quantification du P(3HB) biosynthétisé par *E. coli* sont désormais bien connus et les protocoles associés sont efficaces. De ce constat, et sur les conseils du Prof Taguchi, je suis parti du principe qu'un copolymère de 3HB et de DHB (P(3HB-co-DHB)) serait plus facilement analysable. En effet, les caractéristiques physiques et chimiques du polymère devraient *a priori* rester similaires à celles du P(3HB). La présence de DHB pourrait alors être plus facilement identifiable, et constituerait une preuve de concept concernant la possibilité d'incorporer le DHB dans une chaîne de polymères.

##### 1. Terminaison de polymérisation avec un DHB non activé

Cette possibilité a d'abord été testée dans une souche capable de produire du P(3HB) à partir de glucose. Ceci est possible en transformant une souche avec un plasmide portant les gènes *phaCAB*, codant pour les gènes de la biosynthèse naturelle de P(3HB) chez *Ralstonia eutropha* (pGEM\_*phaCREAB*), ou en combinaison avec la PhaC d'*Aeromonas caviae* (pGEM\_*phaCACAB*). L'expression de ces voies permet la synthèse de P(3HB) chez *E. coli* (Agus *et al*, 2006). La voie ne nécessite alors plus la PCT pour activer le DHB qui sera ajouté dans le milieu. Avec ce système, il est aussi possible de générer des oligomères, en fournissant aux cellules une autre molécule qui pourrait arrêter prématurément la réaction de polymérisation. C'est le cas avec l'ajout de diéthylène glycol dans le milieu des cellules d'*E. coli* exprimant *phaCAB* pour la production de P(3HB) (Figure 65.a) (Hiroe *et al*, 2021), qui a permis la production d'oligomères (2 à 7 unités) de 3HB-diéthylène glycol en même temps que de P(3HB).

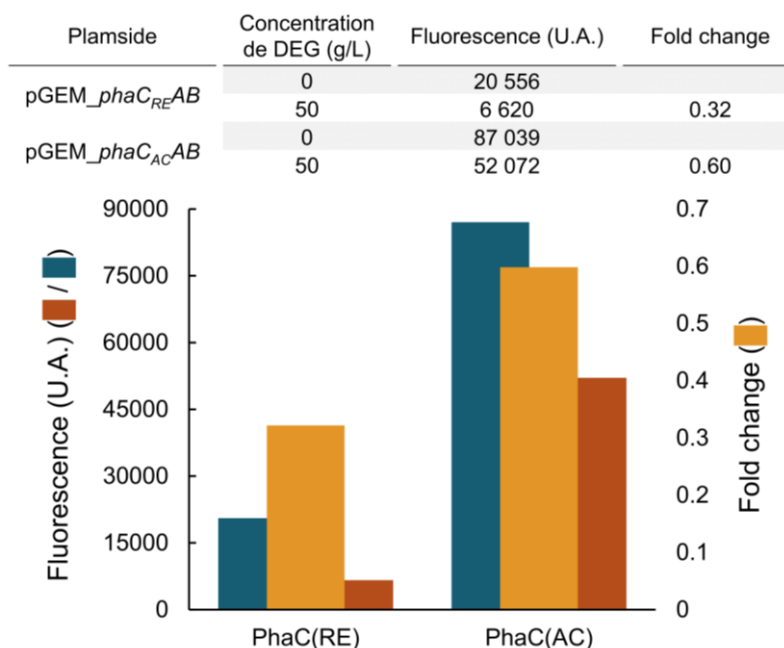


**Figure 65** : Production d'oligomères hétérogènes à partir d'oligomère de 3HB *via* une PhaC naturelle. a : production d'oligomère de 3HB-Diéthylène glycol ; b : production d'oligomère de 3HB-DHB. DEG : diéthylène glycol ;  $n = 2$  à 7 répétitions

De la même façon, j'ai alors réalisé une expérience en supplémentant le milieu avec du DHB, en émettant l'hypothèse que ce dernier pourrait terminer prématurément la polymérisation du 3HB en allant s'insérer dans la chaîne et former des oligomères de 3HB-DHB (Figure 65.b), puisqu'il n'est pas sous forme activée (DHB-CoA). Ceci aurait pour conséquence de réduire la taille des granules de PHA produits, voire de les faire disparaître, conduisant à trois effets : une diminution de la densité optique des cellules productrices, une réduction de la fluorescence après coloration au NR, et une réduction de la taille des PHA extraits.

L'expérience a donc consisté à utiliser les souches  $2\Delta$ ,  $\Delta LO$  et sauvages d'*E. coli* transformées avec les plasmides pGEM\_*phaCREAB* ou pGEM\_*phaCACAB*, et à les mettre en culture dans un milieu riche (LB) supplémenté avec 20 g/L de glucose et différentes concentrations de DHB ou de diéthylène glycol (DEG). Après 48h de culture, les cellules ont été colorées au NR et observées en microscopie et analysées en cytométrie (Figure 66).

Pour la condition contrôle, qui est la souche  $\Delta LO$  transformée avec pGEM\_*phaCREAB* ou pGEM\_*phaCACAB* cultivée en présence de 50 g/L de DEG, la présence de ce dernier provoque une diminution de la fluorescence (Figure 66), ce qui est en accord avec les résultats obtenus précédemment (Hiroe *et al*, 2021). De plus, la souche utilisée ici n'étant pas la même que celle employée par Hiroe et ses collègues (délétion dans leur cas du gène *adhE*, codant notamment une alcool déshydrogénase), un effet plus prononcé du DEG sur la souche transformée avec pGEM\_*phaCREAB* peut être remarqué. La diminution de la fluorescence est plus forte pour la souche exprimant *phaCREAB* (facteur de 0.32) que *phaCACAB* (0.60), ce qui m'a poussé à poursuivre ces expériences avec le plasmide pGEM\_*phaCREAB*.

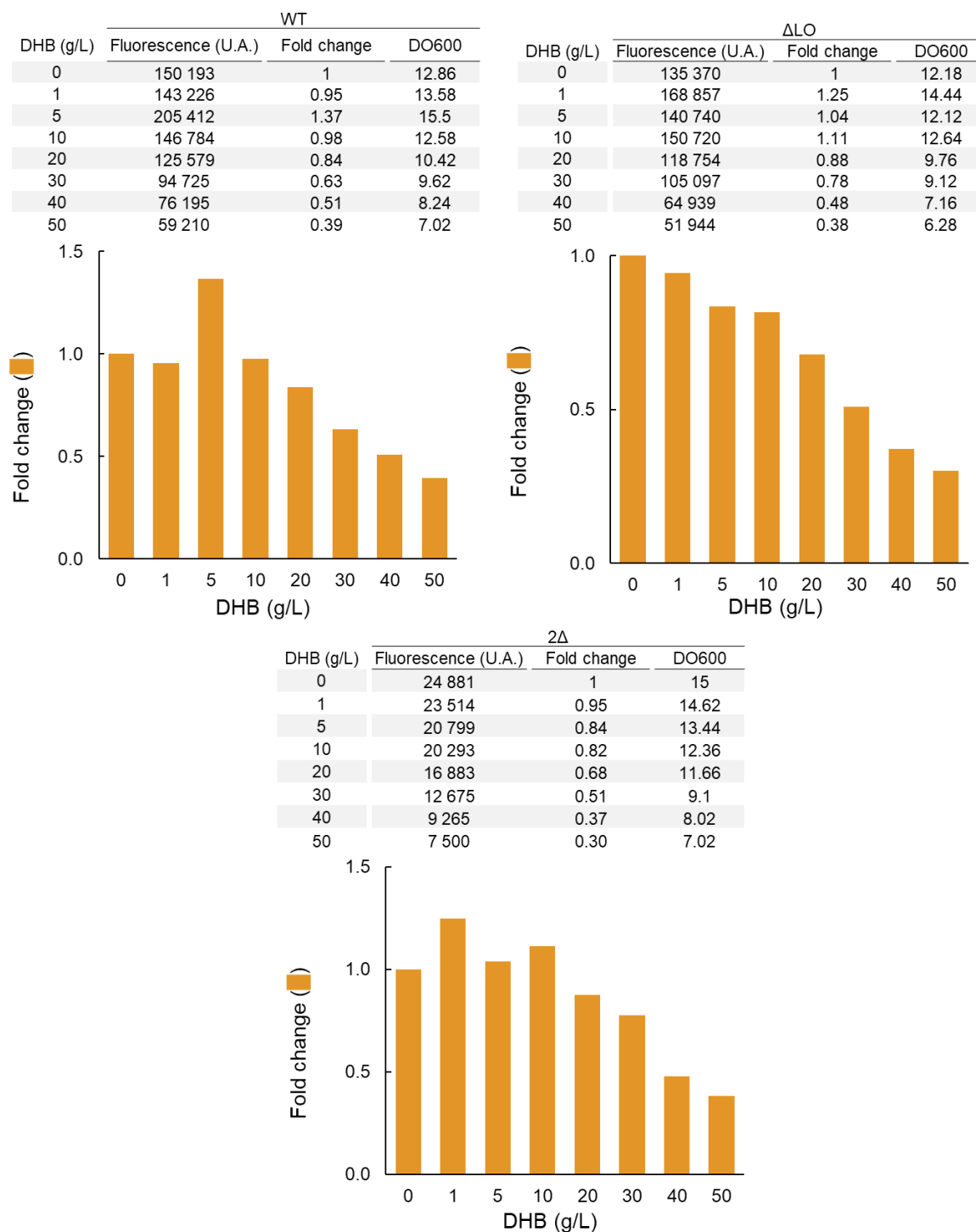


**Figure 66** : Fluorescences et accroissements des souches  $\Delta$ LO exprimant les opérons *phaCAB*, avec la PhaC de *R. eutropha* (PhaC(RE)) ou la PhaC d'*A. caviae* (PhaC(AC)), en présence de 50 g/L de diéthylène glycol. En bleu la fluorescence basale, en rouge la fluorescence après incubation avec le DEG, en orange fold change, qui correspond au rapport entre la fluorescence des cellules incubées avec le diéthylène glycol et sans.

Pour ce qui concerne les expériences avec l'ajout de DHB, on constate que pour les trois différentes souches transformées avec pGEM\_*phaC<sub>RE</sub>AB*, il y a également une diminution de la fluorescence, qui semble proportionnelle à l'augmentation de la concentration en DHB ajouté (Figure 67). De manière surprenante, les cellules de la souche  $2\Delta$  sont six fois moins fluorescentes, indiquant qu'elles seraient bien moins aptes à produire du P(3HB) que les souches sauvage et  $\Delta$ LO. Pourtant, on remarque que bien que la fluorescence soit moins importante pour la souche  $2\Delta$ , la densité optique est équivalente entre les souches, confirmant que la relation entre PHA produit et densité optique n'est pas systématiquement prouvée. De la même manière que précédemment, plus la concentration avec laquelle les cellules sont incubées est grande, plus la fluorescence mesurée est faible. Ceci indique une possible baisse de la production de PHA dans les cellules, qui pourrait se traduire par une quantité plus faible de PHA produits, par une diminution de la taille des PHA, ou par la production d'oligomères de 3HB-DHB, ou bien les trois à la fois.

La diminution de la fluorescence après exposition au NR des souches d'*E. coli* exprimant PhaA, PhaB et PhaC de *R. eutropha*, pourrait donc être attribuée à la terminaison prématurée de la polymérisation du 3HB par le DHB. Toutefois, cette baisse de fluorescence pourrait également être due à une inhibition d'au moins une des enzymes de la voie de biosynthèse du P(3HB) par le DHB. Les conséquences seraient une baisse de la production de P(3HB) qui se traduirait par une baisse de la fluorescence. Le DHB pourrait également avoir un effet inhibiteur global sur la physiologie d'*E. coli*, notamment sur sa croissance, impactant alors la synthèse de polymère. Cette dernière éventualité devrait être vérifiée en suivant la croissance des cellules, par exemple par comptage, puisque la  $DO_{600}$  ne rend pas bien compte de ce paramètre en condition de production de polymère. Le cytomètre dont je disposais ne permettait pas de calculer la concentration

cellulaire des échantillons, mais un tel outil serait idéal afin de tester la possibilité que le DHB puisse inhiber la croissance.



**Figure 67** : Fluorescence,  $DO_{600}$  et accroissements de la fluorescence en fonction de la culture sans DHB des souches sauvage (WT),  $2\Delta$  ( $\Delta dld \Delta ykg$ ) et  $\Delta LO$  ( $\Delta dld \Delta ykg \Delta lldD$ ). L'accroissement correspond au rapport entre la fluorescence des cellules incubées avec du DHB et sans.

C'est pourquoi l'analyse chimique des polymères synthétisés est essentielle à la validation de l'origine de l'effet inhibiteur du DHB. L'analyse des potentiels oligomères synthétisés pourrait également être envisagée (Miyahara *et al*, 2019; Hiroe *et al*, 2021). Ces résultats montrent également que la souche  $2\Delta$ , pour des raisons encore inconnues, semble toutefois moins encline à la biosynthèse de polymère que la souche  $\Delta LO$  ou même la souche sauvage. En effet, à 0 g/L, la fluorescence mesurée pour la souche  $2\Delta$  est bien

inférieure à celle mesurée pour les deux autres souches (environ 5.5 fois). Sur ce constat, j'ai préféré par la suite employer la souche  $\Delta LO$  pour les expérimentations de polymérisation *in vivo*. Enfin, cette expérience manque encore de robustesse puisque les contrôles à 0 g/L auraient dû contenir une concentration équivalente de contre-ion (ammonium) afin de permettre la bonne comparaison avec les conditions exposées au DHB.

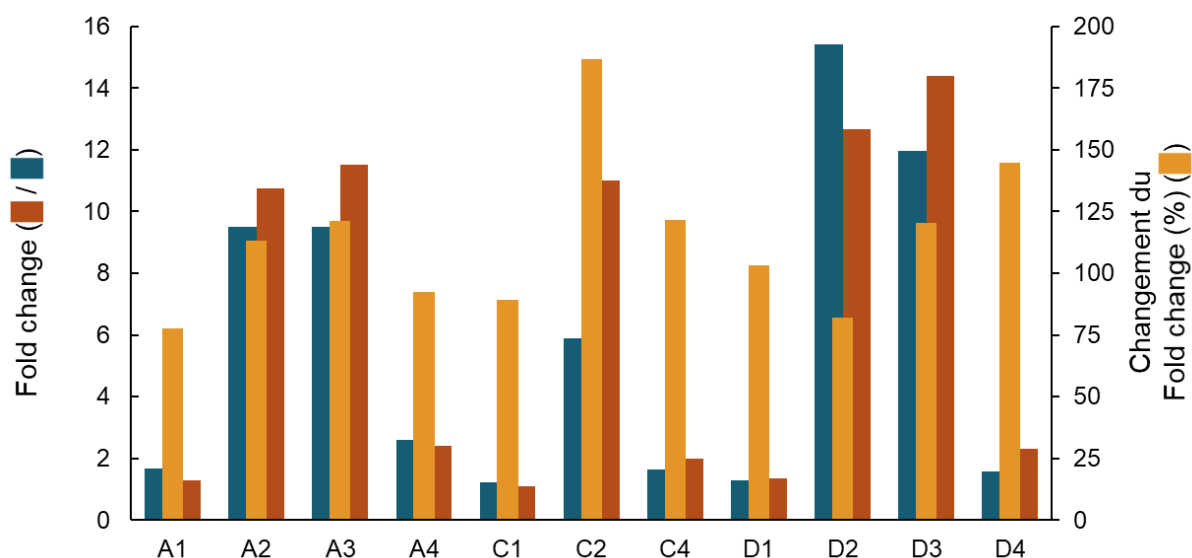
## 2. Copolymérisation de DHB activé

Les résultats obtenus précédemment ont fait émerger le doute que la terminaison prématurée de la synthèse de PHA pourrait être un effet inhibiteur du DHB sur le métabolisme. J'ai pour cette raison répété cette expérience en permettant au DHB d'être potentiellement activé en DHB-CoA, en exprimant dans la souche  $\Delta LO$  les couples PCT/PhaC à ma disposition. Les différentes souches transformées ont été mises en culture en présence de 3HB (3 g/L) et 30 g/L de DHB (condition test) ou équivalent ammonium (condition contrôle) dans un milieu LB supplémenté avec 20 g/L de glucose. La fluorescence a été mesurée en cytométrie. En présence de 3HB et d'ammonium (à une concentration équivalente au DHB), on constate que toutes les constructions émettent une fluorescence supérieure à la condition contrôle ne produisant que la PCT<sub>CK</sub>. Cela implique que toutes les constructions sont capables de synthétiser du PHA à partir de 3HB libre dans le milieu. C'est en particulier le cas des constructions A2 et A3, qui codent pour les PCT<sub>ME</sub> et PCT<sub>RE</sub> avec la PhaC<sub>RE</sub>, C2 et D2 qui codent pour les PhaC<sub>AR</sub> et PhaC<sub>STQK</sub> avec la PCT<sub>ME</sub>, et D3 qui code pour les PCT<sub>RE</sub> et PhaC<sub>STQK</sub>, dont l'augmentation de la fluorescence par rapport au plasmide 1 sont de facteurs respectifs de 9.5, 9.5, 5.89, 15.4 et 11.96.

En présence de DHB, certaines souches voient leur changement de fluorescence par rapport à la souche n'exprimant que la PCT augmenter de manière plus importante qu'en présence d'ammonium. Ce changement est supérieur à 120 % pour sept des constructions testées : A3 (PCT<sub>RE</sub> et PhaC<sub>AR</sub>, 121.3 %), C2 (PCT<sub>ME</sub> et PhaC<sub>AR</sub>, 186.8 %), C4 (PCT<sub>TT</sub> et PhaC<sub>AR</sub>, 121.4 %), D3 (PCT<sub>RE</sub> et PhaC<sub>STQK</sub> 120.4 %) et D4 (PCT<sub>TT</sub> et PhaC<sub>STQK</sub>, 144.6 %). En revanche, les plasmides A1 (PCT<sub>CK</sub> et PhaC<sub>RE</sub>) et D2 (PCT<sub>ME</sub> et PhaC<sub>STQK</sub>) le font diminuer (77.6 % et 82.2 % de l'accroissement contrôle sans DHB) (Tableau 11 et Figure 68). De ces résultats, on peut distinguer que la PCT<sub>RE</sub> semble bénéfique pour l'augmentation de la fluorescence (plasmides A3 et D3), de même que la PhaC<sub>AR</sub> (plasmides C2 et C4) et que la PhaC<sub>STQK</sub> (plasmides D3 et D4). Alors que l'on s'attendait à un impact négatif de la part du DHB sur la fluorescence comme cela est le cas pour les plasmides A1 et D2, il paraît curieux que pour certains plasmides, une fluorescence plus élevée, traduisant une production de PHA plus importante, soit relevée.

Une comparaison de la fluorescence en microscopie a été effectuée, afin d'estimer l'impact produit par le DHB (Figure 69). Les cellules transformées avec les constructions obtenues, cultivées en présence de 3HB et NH<sub>4</sub>Cl, présentent toutes des granules de PHA, dont l'intensité de fluorescence en permet la bonne identification. À l'inverse, la souche contrôle (plasmide 1), ne produit pas de granules dans ces conditions, comme attendu. Aucune différence n'est toutefois visible lorsque ces mêmes souches sont cultivées en présence de DHB. Il semble donc difficile d'observer une différence entre la condition contrôle sans DHB, et avec DHB sur la seule base des photographies prises en microscopie.

Il sera enfin nécessaire de répéter ces expériences afin de contrôler que l'expression des PhaC dans les constructions n'impacte pas la fluorescence en comparaison des plasmides 2, 3 et 4, qui n'expriment que les PCT<sub>ME</sub>, PCT<sub>RE</sub> et PCT<sub>TT</sub>.



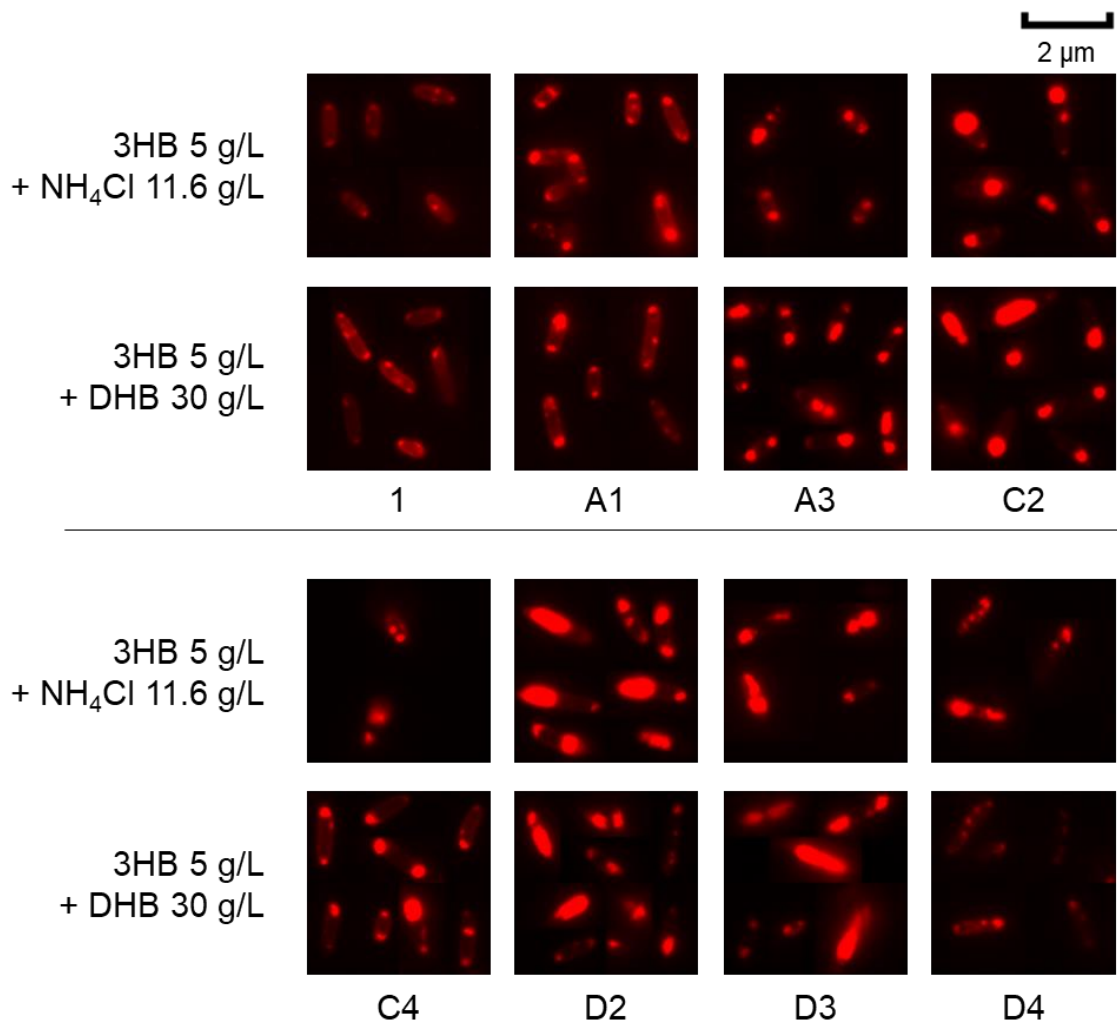
**Figure 68** : Changement de fluorescence mesuré après culture de cellules de souches  $\Delta$ LO transformées avec les plasmides construits, en présence de 30 g/L de DHB ou équivalent ammonium et 3 g/L de 3HB. En bleu, le changement de la fluorescence (fold change) en présence de 3HB et de NH<sub>4</sub> par rapport à la souche n'exprimant que la PCT<sub>CK</sub>, en rouge le même changement de la fluorescence (fold change) en présence de 3HB et de DHB, en orange, le rapport entre ces deux changements de fluorescence.

**Tableau 11** : Fluorescence mesurée après culture de cellules de souches  $\Delta$ LO transformées avec les plasmides construits, en présence de 30 g/L de DHB ou équivalent ammonium et 3 g/L de 3HB. En gras, les plasmides dont le changement de fluorescence est supérieur en présence DHB, et inférieur en italique souligné. Le fold change correspond au rapport entre la fluorescence des souches co-exprimant les couples PCT/PhaC et la souche ne portant que le plasmide 1.

Plasmide	NH <sub>4</sub> Cl 11.6 g/L + 3HB 3 g/L		Changement du Fold change (%)
	Fluorescence (U.A.)	Fold change	
1	4 736	1.00	
A1	7 855	<u>1.66</u>	77.6
A2	44 985	9.50	113.2
A3	45 000	<b>9.50</b>	<b>121.3</b>
A4	12 366	2.61	92.3
C1	5 841	1.23	89.0
C2	27 915	<b>5.89</b>	<b>186.8</b>
C4	7 819	<b>1.65</b>	<b>121.4</b>
D1	6 138	1.30	103.3
D2	72 936	<u>15.40</u>	<u>82.2</u>
D3	56 636	<b>11.96</b>	<b>120.4</b>
D4	7 536	<b>1.59</b>	<b>144.6</b>

Plasmide	DHB 30 g/L + 3HB 3g/L		Changement du Fold change (%)
	Fluorescence (U.A.)	Fold change	
1	4 267	1.00	
A1	5 489	<u>1.29</u>	77.6
A2	45 899	10.76	113.2
A3	49 169	<b>11.52</b>	<b>121.3</b>
A4	10 282	2.41	92.3
C1	4 685	1.10	89.0
C2	46 992	<b>11.01</b>	<b>186.8</b>
C4	8 552	<b>2.00</b>	<b>121.4</b>
D1	5 715	1.34	103.3
D2	54 024	<u>12.66</u>	<u>82.2</u>
D3	61 456	<b>14.40</b>	<b>120.4</b>
D4	9 815	<b>2.30</b>	<b>144.6</b>



**Figure 69** : Observation en microscopie à fluorescence des cellules de souche 3Δ transformées avec les plasmides ayant permis un accroissement de fluorescence significativement différent en présence de DHB.

### 3. Conclusion

Les résultats que je viens de présenter sur les effets du DHB, lorsqu'il est non activé lors de la synthèse de P(3HB), et lors des tests de copolymérisation avec du 3HB, ne permettent pas à ce jour de conclure et d'affirmer que le DHB est un monomère capable de participer à la synthèse de biopolymères. En effet, si la présence de DHB ajouté dans le milieu de culture de cellules produisant le P(3HB) à partir de glucose provoque une baisse de la fluorescence, nous ne sommes pas absolument certains que cette baisse est uniquement due à l'incorporation de DHB dans le polymère. Ce changement pourrait aussi être attribué à un effet de toxicité ou d'inhibition du DHB sur la polymérisation, ou la physiologie générale (croissance) d'*E. coli*. Vérifier la croissance des cellules dans les conditions testées permettrait de répondre à cette question. De même, l'utilisation de plasmides codant différentes combinaisons de PCT et PhaC permettant au DHB d'être potentiellement activé, et donc de pouvoir s'insérer dans la synthèse de P(3HB) comme copolymère, montre des résultats de fluorescence qui restent difficilement exploitables. J'ai tout de même pu mettre en évidence que certains plasmides étaient à l'origine d'une augmentation significative de la fluorescence après coloration au NR, mesurée en

cytométrie. Ces données peuvent suggérer que le DHB peut être incorporé dans un polymère, accumulé dans les cellules. J'ai tout de même essayé d'extraire les potentiels polymères produits par les cellules les plus fluorescentes dans cette expérience, afin d'analyser leur taille en SEC et leur composition en RMN. Les analyses sont en cours au sein du LCPO (Pessac, France), qui dispose des technologies et du savoir-faire permettant l'analyse chimique de polymères. Au-delà de reproduire les expériences, il sera avant tout essentiel de vérifier par des essais *in vitro* que la machinerie de polymérisation, c'est-à-dire les PCT et PhaC, sont capables d'accepter le DHB comme substrat.

## V. Perspectives

Cette étude a tout d'abord permis de mettre en lumière la possibilité pour les PCT<sub>CK</sub> et PCT<sub>RE</sub> d'activer le DHB en DHB-CoA, bien que les affinités et activités mesurées étaient très faibles sur ce substrat en comparaison de leur substrat naturel ( $K_m$  8 fois inférieur et  $V_{max}$  100 fois inférieure). Le criblage d'autres PCT, naturelles ou modifiées, pourrait permettre d'améliorer les conditions de cette réaction. Compenser la faible activité de ces enzymes avec une expression forte pourrait constituer une solution, mais la surproduction des PCT effectuée en amont (voir ce chapitre I.1.2) a permis de réaliser qu'une trop grande surexpression de ces enzymes pouvait produire des corps d'inclusion, qui interféraient avec la mesure au NR. De plus, comme déjà mentionné, les problèmes causés par la surexpression de la PCT de *Clostridium propionicum* semblent trouver leur origine dans la production par l'enzyme de lactoyl-CoA (issu de l'activation du lactate) et d'autres dérivés CoA à chaîne courte. Ceci aurait pour conséquence une diminution forte des réserves d'acétyl-CoA de la cellule, et entrerait en compétition avec des voies métaboliques essentielles et occasionnerait des défauts de croissance (Selmer *et al*, 2002). Aussi, la surexpression de PCT ayant une faible affinité pour le DHB pourrait activer d'autres molécules endogènes qui interféreraient ou empêcheraient la synthèse de polymères dépendant du DHB. D'autres enzymes pour l'activation du DHB pourraient aussi être envisagées, comme une CoA-ligase, qui condenserait le DHB avec une coenzyme A libre en présence d'ATP (Valentin *et al*, 2000).

Du fait que les méthodes d'analyse conventionnelles ne sont peut-être pas applicables au P(DHB), il apparaît difficile de juger du fonctionnement et de l'efficacité des PHA synthases sélectionnées sur le DHB. Alternativement, la polymérisation *in vitro* par l'intermédiaire d'une PhaC et d'une PCT purifiées, à partir de DHB et d'acétyl-CoA pourrait être développée pour aborder à la fois les aspects enzymologique et analytique de cette problématique. Dans cette optique, l'utilisation d'une PhaC seule pourrait également être envisagée, pour la polymérisation du DHB-CoA qui pourrait être produit chimiquement (Kawaguchi *et al*, 1981), faute de référence commerciale disponible. Ceci permettrait de s'affranchir de la nécessité d'une PCT efficace produisant du DHB-CoA pour se concentrer sur la réaction de polymérisation elle-même, qui pourrait être suivie en temps réel. Les résultats produits pour l'instant sur l'homopolymérisation du DHB ont permis d'observer une augmentation de la fluorescence pour les constructions A1, C2 et D4. Ces résultats semblent donc indiquer que certaines PHA synthases sélectionnées pourraient permettre l'accumulation de P(DHB), en l'occurrence la PhaC naturelle de *R. eutropha*, la chimère d'*A. caviae* et *R. eutropha*, ainsi que la PhaC « STQK » modifiée de



*Pseudomonas* sp.63. Les résultats générés nécessitent toutefois une confirmation, par l'analyse chimique des polymères produits, qui se voudra quantitative et qualitative, sur la composition monomérique du polymère (RMN, GC), et sur sa taille (SEC). Ces enzymes pourront donc aussi être testées *in vivo*, et l'accumulation de P(DHB) pourrait être suivie en temps réel (absorbance à 600 nm (Han *et al*, 2009, 2011)).

Si on revient aux conditions de production *in vivo*, les PhaC ont également la tendance à produire des corps d'inclusion lorsque surproduites chez *E. coli*. Bien que cela ne semble pas impacter la production de P(3HB) à partir de 3HB libre dans le milieu, la quantité d'enzyme soluble pourrait être limitante au regard de la faible affinité pour le DHB. Une augmentation de la quantité d'enzyme disponible pour catalyser la réaction sur le DHB pourrait être un atout permettant une meilleure activation et polymérisation *in vivo*. Une manière de résoudre ce problème serait de fusionner leur expression à un facteur de déclenchement (trigger factor), sous le contrôle d'un promoteur à choc froid. Cela a permis d'exprimer plus de PhaC<sub>RE</sub> solubles et de produire plus de P(3HB) chez *E. coli* (Boontip *et al*, 2021).

Le choix de la souche de production de P(DHB) est également crucial. En effet, l'oxydation du L-DHB pourrait être un atout lorsqu'un racémique de DHB est fourni aux cellules, mais les résultats que j'ai obtenus semblaient montrer que la souche 2Δ était moins apte à la production de P(3HB) à partir de glucose que les souches sauvage ou ΔLO, pour des raisons encore non identifiées. Bien qu'une explication à cet effet pourrait permettre de mieux comprendre la physiologie et les mécanismes en place lors de la production de polymère, il sera avant tout nécessaire de réussir à biosynthétiser du D-DHB chez *E. coli* qui servirait directement de monomère. Enfin, il sera essentiel de terminer les constructions envisagées, et notamment les plasmides 2, 3 et 4, qui n'expriment que les PCT de *M. elsdenii*, *R. eutropha* et *T. thermophilus* respectivement. La construction des plasmides arborant la PhaC d'*Aeromonas caviae* sera également nécessaire afin de compléter la collection de combinaisons que nous souhaitions initialement tester. Il faudra aussi obtenir des constructions intégrant la PhaC sauvage de *R. eutropha*, bien qu'il semble que la mutation avec laquelle j'ai dû travailler ne semblait pas délétère pour l'activité de l'enzyme.

L'analyse *in vivo* de ces combinaisons reste difficile, et peu fiable, du fait que le NR n'est pas absolument spécifique des PHA, et du fait que l'incorporation du DHB dans la chaîne de polymère peut modifier les propriétés du PHA produit de manière inattendue. Il reste également la possibilité pour les cellules de ne produire que des oligomères, qui pourraient échapper à la coloration au NR, car (1) ils se retrouvent excrétés dans le surnageant de culture ; (2) ils n'interagissent pas avec le NR. Il en résulterait alors un maintien du niveau de fluorescence entre la condition sans monomère et en présence de monomères dans le milieu de culture. Une alternative au NR serait l'utilisation de bore-dipyrrrométhène (BODIPY), un colorant qui au contraire du NR est insensible à la polarité de son environnement et serait ainsi plus spécifique des gouttelettes lipidiques et des granules de PHA (Rumin *et al*, 2015). Les modifications apportées par le DHB au PHA peuvent influencer les interactions entre celui-ci et le NR d'une part, mais peuvent aussi limiter la manière d'extraire et analyser le polymère par la suite. En effet, une augmentation de l'hydrophilie du PHA pourrait compliquer son extraction par le

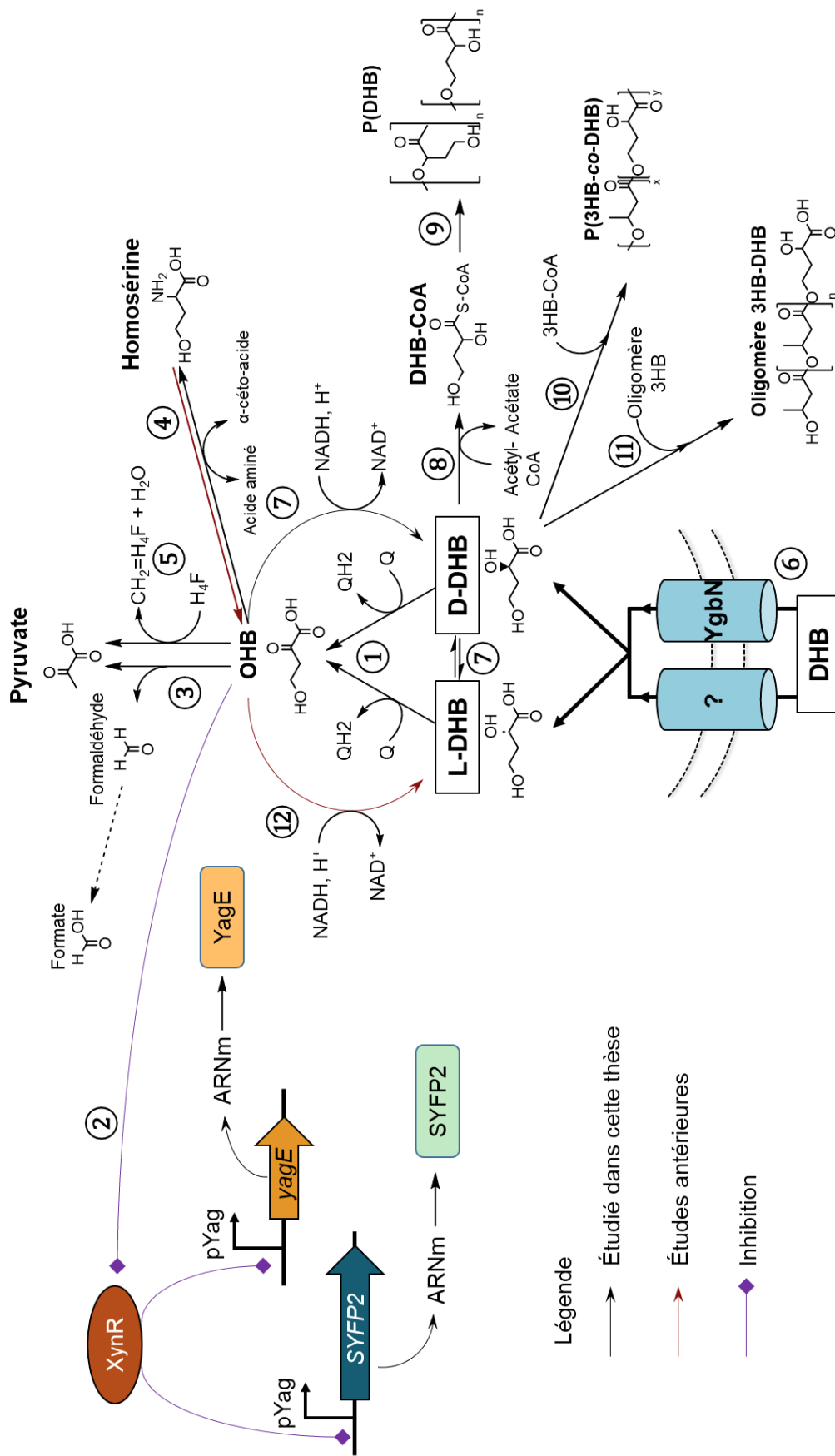
chloroforme, et la possible cyclisation du DHB lors de la méthanolyse acide rend impossible sa détection en GC. C'est pourquoi une analyse chimique, en RMN par exemple, est indispensable à la confirmation de la nature des monomères incorporés dans la chaîne de polymère, et que la fluorescence résultant de l'interaction avec le NR n'est qu'indicative et préliminaire à une analyse plus poussée. Pour ces raisons, les tests effectués avec le plasmide pGEM\_phaCAB, qui ne nécessitent pas de PCT et n'utilisent que le DHB non activé, peuvent permettre de rendre compte de l'existence d'une affinité des PhaC pour le DHB *in vivo*, et le changement de taille des polymères produits pourrait être visible en chromatographie en SEC. Le suivi en direct de la polymérisation par RMN dans un extrait brut pourrait également permettre de fournir des indications sur la possibilité d'utiliser le DHB comme monomère pour la polymérisation par les différents couples de PCT et PhaC (Cox, 2021).

# Conclusion générale

## I. Apports de la thèse

Ce travail de thèse a permis de mettre en évidence l'importance de la prise en compte de la flexibilité du métabolisme chez *E. coli*, en particulier au regard de composés non naturels comme le DHB ou l'OHB. En effet, parmi les études traitant de la production de molécules non naturelles par des approches d'ingénierie des systèmes et de biologie de synthèse, il existe très peu de travaux qui s'interrogent sur la répercussion de ces molécules étrangères, au niveau du réseau métabolique. Seul l'effet toxique (inhibition de croissance), que ces molécules provoquent à forte concentration, est généralement relevé. Or nous avons vu que dans le cas du DHB, plusieurs mécanismes complexes se mettent en place en sa présence, alors qu'il s'agit d'une molécule inconnue du point de vue d'*E. coli*. Ces mécanismes semblent en grande partie être expliqués par la promiscuité que possèdent les protéines de l'organisme. À travers cette étude, je n'ai observé que des cas de promiscuité de substrat, ou de ligand dans le cas des protéines non-enzymes comme les facteurs de transcription ou les transporteurs. De manière intéressante, je n'ai identifié qu'une seule catégorie d'enzymes exprimant une promiscuité de substrat sur le DHB : les lactates oxydases ubiquinone-dépendantes. Ces enzymes, naturellement actives sur le lactate, montrent toutefois une promiscuité de substrat avec le DHB (Figure 70.1). Cette activité sur le DHB permet de produire une autre molécule non naturelle, l'OHB. Leurs constantes enzymatiques pour ce nouveau substrat sont toutefois bien plus faibles que sur leur substrat naturel. Cet aspect est d'ailleurs systématique dans la promiscuité enzymatique, et sert de point de départ au développement de nouvelles fonctions naturelles ou synthétiques (Gupta, 2016).

Suite à la production de l'OHB, une nouvelle batterie de protéines va intervenir pour permettre à son tour de cataboliser cette molécule inconnue. C'est d'abord avec un facteur de transcription, XynR, que l'OHB va pouvoir interagir, probablement en mimant l'action du D-xylonate, qui se fixe sur le facteur de transcription et qui va conduire à la dépression de *yagE* (Figure 70.2). Le produit de ce gène est une aldolase, qui permettra le clivage aldolytique de l'OHB en pyruvate et formaldéhyde (Figure 70.3). L'expression de *yagE* est vraisemblablement accompagnée de l'expression de *yagF*, une D-xylonate déshydratase, mais son rôle dans le catabolisme de l'OHB est incertain. Il semble que la voie aldolase soit la voie préférentielle des cellules pour le catabolisme de l'OHB. Cette réaction génère deux composés. Le premier est le pyruvate, directement assimilable dans la biomasse, ce qui fait de l'OHB, et *a fortiori* du DHB, une source de carbone potentielle pour les cellules. Le second composé issu de ce clivage est le formaldéhyde. À l'inverse, ce composé est toxique pour les cellules et requiert d'être rapidement éliminé. La détoxification est réalisée par un mécanisme efficace chez *E. coli*, qui rejette dans le surnageant de culture du formate, qui est la forme oxydée du formaldéhyde. Nous avons également vu que d'autres types d'enzymes (avérées comme les aminotransférases (Figure 70.4, hydroxy-méthyltransférases (Figure 70.5), ou potentielles comme des hydratases, décarboxylases) peuvent entrer en jeu, mais une étude plus approfondie du métabolisme



**Figure 70** : Résumé des voies orbitant autour du DHB étudiées au cours de cette thèse. 1 : oxydation du DHB en OHB (Dld, LldD, YkgF) ; 2 : interaction de l'OHB avec XynR, permettant l'expression des gènes sous le promoteur pYag ; 3 : clivage aldehydique de l'OHB en pyruvate et formaldéhyde (notamment YagE, YjhH et YfaU) ; 4 : transamination de l'OHB en homosérine (flèche noire, AlaC, TyrB, AspC) ; méthylation de tétrahydrofolate ( $\text{H}_4\text{F}$ ) à partir d'OHB pour produire du  $\text{CH}_2=\text{H}_4\text{F}$  et de l'eau (PanB) ; 6 : import de DHB dans les cellules *via* YgbN notamment ; 7 : réduction D-spécifique de l'OHB en D-DHB ; 8 : activation du DHB en DHB-CoA par divers PCT ; 9 : homopolymérisation du DHB par divers PhaC ; 10 : co-polymérisation du DHB et 3 HB ; 11 : production d'oligomères de 3HB-DHB.

d'*E. coli* en présence d'OHB est nécessaire pour s'en assurer. Également, le transport de DHB a été étudié et les résultats indiquent que ce transport fait intervenir plusieurs perméases naturellement dédiées au transport d'autres molécules (Figure 70.6). Un en particulier, YgbN, qui est rapporté pour être un symporteur de gluconate:H<sup>+</sup>, a pu être identifié de manière génétique. Plusieurs autres ont été suspectés grâce à l'élaboration d'un biosenseur développé au cours de cette thèse. En effet, du fait de l'effet activateur de l'OHB sur le gène *yagE*, nous avons montré que l'OHB pouvait prendre la place du régulateur transcriptionnel naturel de *yagE* (le D-xylonate) *via* l'inhibition du facteur de répression XynR (Figure 70.2). Ce biosenseur a été mis en application pour la recherche de transporteurs de DHB, puisqu'une fois dans les cellules, le DHB est forcément transformé en OHB. Le transporteur codé par *ygbN* a ainsi été retrouvé, mais bien d'autres ont pu être identifiés. Il restera à valider par des approches plus spécifiques, de type génétique et biochimique, l'importance de ces transporteurs pour le DHB. Une autre application, dont le fonctionnement n'a pu être prouvé que conceptuellement, consiste à utiliser cet outil pour cribler des enzymes productrices d'OHB. Ce biosenseur serait alors utile pour la détection de transaminases efficaces dans le cadre de la production de DHB (Figure 70 : réaction 4 puis 2). Mais il pourrait aussi trouver une utilité dans d'autres projets, comme l'assimilation de C1 par *E. coli*, qui requiert des aldolases efficaces, catalysant la condensation de pyruvate et de formaldéhyde (Bouzon *et al*, 2017).

Lorsqu'il s'agit de produire une molécule, la promiscuité peut être un frein lorsqu'elle apparaît de manière inopinée et causer une réassimilation involontaire de cette molécule. Elle peut toutefois aussi être une alliée puissante, permettant de développer de nouvelles voies métaboliques jusqu'alors inexistantes. C'est grâce à elle que l'ingénierie métabolique a pu connaître un remarquable essor, et permettre la production de nombreuses molécules d'intérêt économique (Walther *et al*, 2017; Glasner *et al*, 2020). C'est aussi grâce à la promiscuité de substrat que nous pourrions prochainement arriver à la biosynthèse de D-DHB, grâce à des enzymes déjà existantes chez *E. coli* ou à d'autres, exogènes, qui ont pu être mises en lumière lors de ce travail de thèse (Figure 70.6). Ces enzymes, provenant d'*Oenococcus oeni* et *Weissella confusa*, ont en effet montré une activité sur un substrat qui n'avait pas encore été testé, l'OHB, et qui n'est pas leur substrat naturel. Avec de l'ingénierie, ces enzymes pourraient permettre la réduction D-spécifique efficace de l'OHB pour la production de D-DHB chez *E. coli*, ce qui serait une alternative à l'actuelle production de L-DHB, notamment pour la synthèse de nouveaux polymères. La production de D-DHB pourrait également se faire par l'intermédiaire du L-DHB, que les racémases de *I. pallida* ou *B. megaterrium* convertiraient en D-DHB jusqu'à l'obtention d'un racémique de DHB (Figure 70.7).

Il en va de même pour la biosynthèse de polymères de DHB. J'ai pu grâce à cette thèse amorcer la problématique de l'activation et de l'incorporation du DHB dans un polymère de type PHA. Cette possibilité reste toutefois complexe, puisque de par la faible affinité et activité des enzymes sur ce substrat (avérée pour les PCT (Figure 70.8), et supposée pour les PhaC (Figure 70.9)), cumulée au large spectre de substrats tolérés par les enzymes, une compétition entre des substrats potentiels présents dans les cellules et le DHB peut s'installer. J'ai tout de même été en mesure de mettre au point quelques techniques d'observation de la biosynthèse des PHA, et d'établir que le DHB permettait

d'interférer avec le phénomène de polymérisation (Figures 70.10 et 70.11). Comme pour tout projet d'ingénierie métabolique, le remaniement du métabolisme pour la synthèse de nouveaux polymères nécessite beaucoup d'efforts, et ce que j'ai pu achever au cours de ma thèse ne représente qu'un travail préliminaire à sa réussite.

## II. Perspectives et continuité de la thèse

Tout ce métabolisme alternatif mis en place par la simple présence d'une molécule non naturelle ne semble pas avoir d'incidence problématique pendant la production de DHB, tout au pire une légère perte de produit qui se retrouve réassimilé par l'organisme (Malfoy *et al*). Dans le cadre de la polymérisation du DHB, il était indispensable d'identifier les enzymes responsables de la première réaction du catabolisme du DHB, sans quoi le monomère fourni et destiné à la biosynthèse de polymère, aurait été dissimilé et redirigé vers d'autres voies. Il est même possible de dire que j'ai été chanceux de les identifier. Car sur la totalité des enzymes actuellement caractérisées, un tiers sont considérées comme orphelines : aucune séquence génétique ou protéique ne leur est associée (Lespinet & Labedan, 2005). À l'inverse, de nombreuses séquences dans le génome, identifiées bio-informatiquement, n'ont pas de produit de transcription ou de protéine associée démontrés. Prises ensemble, ces deux caractéristiques rendent la recherche de possibles réactions catalysées sur des molécules inconnues complexe. Il n'est donc pas possible de chercher au hasard un gène ou une protéine qui pourrait se lier au DHB. À la place, il est nécessaire d'être attentif aux modifications apportées par la présence de cette molécule. En l'occurrence, j'ai pu bénéficier et su me servir de plusieurs indices : la production de formate par les cellules et la surexpression de certains gènes qui pourraient être liés à cette production de formate m'ont permis de mettre en lumière la voie aldolase du catabolisme de l'OHB. La similarité structurelle entre le lactate et le DHB, ainsi que la nécessité de la présence d'OHB pour la voie aldolase, m'a permis d'identifier les lactates oxydases. Il a également fallu diriger l'évolution de cellules auxotrophes pour le DHB afin de mettre en lumière certains mécanismes comme le transporteur YgbN.

En somme, c'est grâce à l'association de plusieurs angles de recherche que j'ai pu entamer la question du catabolisme du DHB : génétique, transcriptomique, protéomique, métabolomique, ingénierie évolutive... C'est par l'intégration de toutes ces approches que l'étude de l'impact de molécules non naturelles sur un organisme peut se faire. Et par corolaire, c'est grâce à la combinaison de ces approches qu'il est possible de modifier efficacement un organisme pour lui faire produire un composé en particulier. Ce sont donc ces approches qui m'ont guidées dans l'ingénierie d'*E. coli* pour la biosynthèse de nouveaux polymères. Néanmoins, là où pour un organisme, l'intégration de ces concepts et leur application pour modifier leur comportement revient à « simplement » évoluer, l'application en « biologie synthétique » est bien plus complexe (Yamada *et al*, 2012; Copley *et al*, 2023).

C'est pourquoi l'analyse globale du catabolisme du DHB requiert encore de nombreux efforts. L'essor de techniques comme la fluxomique pourrait faciliter la résolution de cette question : grâce à un apport en DHB marqué au  $^{13}\text{C}$ , il est ensuite

possible de retrouver quelles molécules du métabolome d'*E. coli* sont enrichies (Heux *et al*, 2017). Ceci permettrait alors l'identification de presque n'importe quelle molécule issue de l'assimilation du DHB, pour tenter de les mettre en rapport au travers de réactions enzymatiques. Ces réactions hypothétiques pourraient être confortées ou non, grâce à l'étude du transcriptome d'*E. coli* en présence de DHB. Un gène ainsi surexprimé dans ces conditions, et dont l'enzyme est supposée comme exerçant une activité dans une voie d'assimilation du DHB, aura alors de fortes chances d'être effectivement impliqué (Hanke *et al*, 2013). L'obtention de DHB marqué reste toutefois compliquée : aucune référence commerciale n'est disponible, et sa production serait coûteuse. Une option consisterait à bioproduire le DHB, à partir de glucose lui-même marqué. Mais les quantités nécessaires pourraient être dissuasives pour cette méthode. Une autre option serait la biocatalyse de l'OHB par une aldolase par exemple, suivi d'une OHB réductase. L'OHB pourrait être formé à partir de formaldéhyde et de pyruvate marqués. Des essais ont déjà été faits afin de générer *in vitro* de l'OHB par l'intermédiaire de YagE, mais les quantités produites ne laissent pas penser que sa production à plus grande échelle pourrait permettre d'accumuler suffisamment d'OHB pour effectuer un test de consommation *in vivo*. Il semble également que le sens de réaction soit plus favorable dans le sens du clivage que de la condensation, il serait alors nécessaire de « forcer » la condensation avec de grandes quantités pour l'un des substrats. On pourrait alors envisager comme alternative une synthèse enzymatique de DHB en partant de L-homosérine <sup>13</sup>C, en combinant une aminoacide oxydase avec l'OHB déshydrogénase. Dans les deux cas de figure, le NAD généré doit être recyclé pour permettre de tirer tout l'OHB en DHB et cela ne peut se faire que par l'ajout d'une enzyme et de substrat supplémentaire, qui peuvent compliquer la production et la purification du DHB marqué. Ce sont des manipulations faisables, mais coûteuses et risquées.

L'étude du catabolisme du DHB pourrait également se faire par RMN, en temps réel ou en point final. En effet, l'avantage de la RMN est la détection simultanée de tous les métabolites présents dans un extrait cellulaire. De cette manière en ajoutant de l'OHB exogène à un extrait cellulaire d'*E. coli*, il serait possible de suivre la dynamique du métabolome, et donc d'identifier quels métabolites sont produits en conséquence (Cox, 2021). Cette méthode présente toutefois un inconvénient majeur, puisque dans cet extrait, on ne se contente que du réseau métabolique présent au moment de l'obtention de l'extrait cellulaire. Il conviendrait alors d'exposer au préalable les cellules au DHB, sans quoi la réponse transcriptomique, qui n'est plus dynamique dans un extrait, risquerait de mettre de côté des réactions qui s'opéreraient spécifiquement en présence d'OHB, du fait que les enzymes responsables sont produites en réponse à sa présence (comme YagE). L'étude des mécanismes d'assimilation du DHB réserve encore assurément du travail. L'approche intégrative des différents domaines existants aujourd'hui en biotechnologie permettra de mettre en lumière un véritable réseau métabolique alternatif, en veille, composé de protéines déjà identifiées et annotées, mais aussi de protéines orphelines ou de gènes supposés. C'est par exemple de cette manière que le catabolisme du quinate chez *Acinetobacter baylyi* ADP1 été élucidé. Les auteurs ont pu, lors du changement de substrat, du succinate au quinate, repérer une réponse transcriptionnelle spécifique au catabolisme du quinate, qui engendrait des perturbations dans le métabolome des cellules.

Ces modifications permettraient d'identifier certains gènes ou protéines impliquées dans des voies métaboliques d'ordinaire dissimulées (Stuani *et al*, 2014). Cette étude est un exemple parmi d'autres, et représente la philosophie qu'il conviendrait d'adopter afin de découvrir les interactions dissimulées entre une nouvelle molécule et un organisme.

De la même manière, la biosynthèse de polymère incorporant du DHB n'en est qu'à ses débuts. L'ingénierie nécessaire pour prouver la faisabilité de cette incorporation devra nécessiter des outils et des protocoles adéquats et innovants pour permettre l'extraction et l'analyse de ces nouveaux types de polyesters. De plus, de la même façon que pour la présence de DHB, l'expression de protéines étrangères chez *E. coli* devrait être investiguée. J'ai pu constater que la solubilité des enzymes pouvait être améliorée, et que la spécificité de substrat pour certaines molécules naturelles chez *E. coli* pourrait permettre une utilisation accidentelle de molécules essentielles pour d'autres buts que les voies auxquelles elles sont destinées. Une ingénierie enzymatique sera nécessaire pour rendre la production de P(DHB) possible *in vivo*, notamment pour améliorer les constantes cinétiques des enzymes naturelles comme la PCT et la PhaC, pouvant alors activer le DHB en DHB-CoA et le polymériser sans trop affecter la physiologie d'*E. coli*. Enfin, nous pouvons aussi imaginer que des interactions entre protéines pourraient apparaître, et d'autant plus perturber la physiologie des cellules, que ce soit sur le plan transcriptomique, de la signalisation cellulaire ou bien encore de compétition enzymatique. L'utilisation d'un promoteur exogène, comme cela été fait avec le promoteur de *phaCAB* de *R. eutropha*, pourrait être positive comme négative pour la cellule. *E. coli* et *R. eutropha* sont des organismes différents, et les mécanismes intervenant dans la régulation de l'expression de gènes en aval d'un promoteur naturel pourraient être tout à fait différents entre ces deux organismes, et compromettre la bonne expression des gènes qu'il contrôle. L'utilisation de ce genre de promoteurs pourrait tout aussi bien permettre de réguler l'expression des gènes qu'il contrôle, sans interaction de la part de l'organisme hôte.

En définitive, une vision globale de l'organisme est nécessaire, quand bien même nous ne souhaiterions modifier qu'une petite parcelle d'une voie métabolique, afin par exemple d'en détourner le flux. La cellule peut être vue comme un orchestre, où la partition régit le bon ordre au sein de ses instruments. L'effet papillon engendré par la moindre fausse note pourrait bouleverser toute la physiologie en place. La modification par des procédés faisant appel à l'évolution dirigée (Sellés Vidal *et al*, 2023) semble être un des meilleurs moyens de mimer l'ingénierie naturelle à disposition des êtres vivants : l'évolution. L'évolution dirigée fait ainsi appel à des principes fondamentaux de modifications non ciblées, aléatoires, mais dont le système de sélection efficace permet l'obtention d'organismes aux propriétés désirées. Cette même évolution, naturelle, a permis au fil des millénaires d'arriver aux organismes et à leurs particularités que nous étudions aujourd'hui. Les enzymes promiscuitaires seraient ainsi le fruit d'une évolution en cours depuis des millions d'années, que nous avons la chance de pouvoir étudier, tenter de comprendre, de s'en inspirer et d'utiliser à nos propres fins (Newton *et al*, 2018).



### III. Ouverture

J'ai utilisé à plusieurs reprises le terme de souche ou organisme « évolué ». Il convient toutefois de préciser que ce ne sont pas les organismes à proprement parler qui évoluent, mais le génome. Et par extension les protéines qui en découlent. C'est en effet le patrimoine génétique qui est amené à évoluer, dans l'unique but d'optimiser le fitness et la probabilité qu'il soit transmis aux générations suivantes. Ces évolutions se font surtout par la mutation des gènes, ce qui modifie les caractéristiques des protéines pour lesquelles ils codent. Chez les bactéries, cette évolution peut également se produire grâce au transfert de gène horizontal. L'intégration de prophages dans le génome d'*E. coli* en est une bonne représentation. Par ce moyen, *E. coli* a pu intégrer de nombreux opérons et gènes, comme l'opéron *yag* par exemple, qui code entre autres pour *yagE*, qui comme nous l'avons vu intervient dans le catabolisme de l'OHB. Cependant, au moment de l'intégration de cette mutation, et donc de l'évolution de l'organisme, ces fonctions apportées par ce groupe de gènes étaient-elles indispensables à la survie de l'organisme ? Apportaient-elles un avantage en termes de fitness sur les autres membres de la population ? Il est même possible d'aller plus loin et de se demander si c'est la fonction en elle-même apportée par l'opéron qui était intéressante, ou bien l'emplacement dans lequel cette séquence s'est insérée.

S'agit-il alors d'adaptation évolutive ou d'exaptation ? L'exaptation est une forme de préadaptation de caractères qui sont utiles pour une nouvelle fonction, mais pour laquelle ils n'ont pas été initialement sélectionnés. C'est le cas par exemple des plumes d'oiseaux, originellement utiles pour le maintien de la température corporelle, mais qui ont par la suite montré leur utilité pour le développement du vol. C'est aussi le cas pour le pouce opposable chez *Homo sapiens*, qui a originellement permis la préhension d'objets, permettant à son tour l'invention de l'écriture. L'intégration de ces portions de gènes chez la bactérie, de même que l'évolution d'enzymes promiscuitaires, pourrait alors s'intégrer dans cette notion. En effet, la modification, du nombre de fonctions ou de substrats pour une enzyme, revêt-elle de l'adaptation, ou de l'exaptation ? Est-elle conservée car bénigne et utile « au cas où » ?

Une autre question revêt un intérêt crucial : dans quel sens les enzymes évoluent-elles ? La réponse consensus semble être le fait que l'évolution s'est faite à partir d'enzymes généralistes, promiscuitaires, vers des enzymes spécialistes (Lazcano *et al*, 1995; Szilágyi *et al*, 2012; Nam *et al*, 2012). En extrapolant, cela pourrait signifier que les enzymes généralistes sont vouées à évoluer pour donner des enzymes spécialistes, et que cette particularité serait donc vouée à disparaître. À l'inverse de ce qui semble être pour la Vie, cette capacité de promiscuité constitue un formidable outil d'ingénierie métabolique, et plus largement de biologie synthétique. Dans la même optique, il est possible de rétroévoluer certaines enzymes spécialistes, afin de leur rendre cette promiscuité (qui peut se traduire comme nous l'avons vu par une perte de stéréospécificité par exemple), créant des protéines mutantes aux nouvelles capacités ou capables d'accepter de nouveaux substrats. Par exemple, la modification d'un seul acide aminé dans une racémase de *Geobacillus stearothermophilus* a permis de modifier son activité en aldolase (Seebeck & Hilvert, 2003). En maintenant de cette manière un caractère que la

Vie semble motivée à faire disparaître, l'Homme, à travers ses scientifiques, est bien déterminé à donner raison à Victor Hugo : « Qui prend le passé pour racine, a pour feuillage l'avenir ».

# Matériel et méthodes

## I. Matériel

### 1. Souches

La collection complète de la KEIO (Baba *et al*, 2006) et de l'ASKA (Kitagawa *et al*, 2006) ont été acquises auprès de l'Institut National de Génétique du Japon (National BioResource Project, National Institute of Genetics, Japan).

**Tableau 11** : Souche d'*E. coli* utilisées ou construites au cours de la thèse

<b>Souche</b>	<b>Modifications génétiques</b>	<b>Provenance</b>
<i>E. coli</i> substr. K12 MG1655	F- lambda- <i>ilvG- rfb-50 rph-1</i>	ATCC n°47046
NEB® 5-alpha competent <i>E. coli</i>	<i>fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	New England BioLabs
BL21 (DE3)	<i>fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS λ DE3 = λ sBamHI ΔEcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5</i>	New England BioLabs
BW25113	<i>Δ(araD-araB)567 ΔlacZ4787(::rrnB-3) λ- rph-1 Δ(rhaD-rhaB)568 hsdR514</i>	CGSC#7636
<i>ΔyagE</i>	MG1655 <i>ΔyagE::FRT</i>	Cette étude
<i>ΔyjhH</i>	MG1655 <i>ΔyjhH::FRT</i>	Cette étude
<i>Δeda</i>	MG1655 <i>Δeda::FRT</i>	Cette étude
<i>ΔmhpE</i>	MG1655 <i>ΔmhpE::FRT</i>	Cette étude
<i>ΔyfaU</i>	MG1655 <i>ΔyfaU::FRT</i>	Cette étude
<i>ΔgarL</i>	MG1655 <i>ΔgarL::FRT</i>	Cette étude
7Δ	MG1655 <i>ΔyagE::FRT ΔyjhH::FRT Δeda::FRT ΔdgoA::FRT ΔyfaU::FRT ΔgarL::FRT ΔmhpE</i>	Cette étude
6Δ mhpE	MG1655 <i>ΔyagE::FRT ΔyjhH::FRT Δeda::FRT ΔdgoA::FRT ΔyfaU::FRT ΔgarL::FRT</i>	Cette étude
6Δ yfaU	MG1655 <i>ΔyagE::FRT ΔyjhH::FRT Δeda::FRT ΔdgoA::FRT ΔgarL::FRT ΔmhpE</i>	Cette étude
6Δ yagE	MG1655 <i>ΔyjhH::FRT Δeda::FRT ΔdgoA::FRT ΔyfaU::FRT ΔgarL::FRT ΔmhpE</i>	Cette étude
6Δ yjhH	MG1655 <i>ΔyagE::FRT Δeda::FRT ΔdgoA::FRT ΔyfaU::FRT ΔgarL::FRT ΔmhpE</i>	Cette étude
6Δ garL	MG1655 <i>ΔyagE::FRT ΔyjhH::FRT Δeda::FRT ΔdgoA::FRT ΔyfaU::FRT ΔmhpE</i>	Cette étude
6Δ eda	MG1655 <i>ΔyagE::FRT ΔyjhH::FRT ΔdgoA::FRT ΔyfaU::FRT ΔgarL::FRT ΔmhpE</i>	Cette étude
6Δ dgoA	MG1655 <i>ΔyagE::FRT ΔyjhH::FRT Δeda::FRT ΔyfaU::FRT ΔgarL::FRT ΔmhpE</i>	Cette étude
<i>ΔpanB</i>	MG1655 <i>ΔpanB::FRT</i>	Cette étude
<i>Δdld</i>	MG1655 <i>Δdld::FRT</i>	Cette étude
<i>ΔlldD</i>	MG1655 <i>ΔlldD::FRT</i>	Cette étude
<i>Δykg</i>	MG1655 <i>Δykg::FRT</i>	Cette étude
<i>Δdld Δykg</i>	MG1655 <i>Δdld::FRT Δykg::FRT</i>	Cette étude
<i>ΔlldD Δykg</i>	MG1655 <i>ΔlldD::FRT Δykg::FRT</i>	Cette étude
<i>Δdld ΔlldD</i>	MG1655 <i>Δdld::FRT ΔlldD::FRT</i>	Cette étude
ΔLO (3Δ)	MG1655 <i>Δdld::FRT Δykg::FRT ΔlldD::FRT</i>	Cette étude

$\Delta tyrB \Delta aspC$ $\Delta alaC \Delta ybdL$	MG1655 $\Delta tyrB \Delta aspC::FRT \Delta alaC::FRT$ $\Delta ybdL::FRT$	Cette étude
$\Delta alaC$	MG1655 $\Delta alaC::FRT$	Équipe
1135	MG1655 $\Delta thrA::FRT \Delta asd::FRT \Delta metL::FRT$ $\Delta lysC::FRT$	Équipe
1135 $\Delta ygbI$	MG1655 $\Delta thrA::FRT \Delta asd::FRT \Delta metL::FRT$ $\Delta lysC::FRT \Delta ygbI::FRT$	Cette étude
1135 $\Delta ygbN$	MG1655 $\Delta thrA::FRT \Delta asd::FRT \Delta metL::FRT$ $\Delta lysC::FRT \Delta ygbN::FRT$	Cette étude
1135 $\Delta ygbK$	MG1655 $\Delta thrA::FRT \Delta asd::FRT \Delta metL::FRT$ $\Delta lysC::FRT \Delta ygbK::FRT$	Cette étude
1135 $\Delta ygbI \Delta ygbK$	MG1655 $\Delta thrA::FRT \Delta asd::FRT \Delta metL::FRT$ $\Delta lysC::FRT \Delta ygbI \Delta ygbK::FRT$	Cette étude
1475	1135 évolué (GM3, Altar)	Équipe
1475 $\Delta ygbI$	1475 $\Delta ygbI::FRT$	Cette étude
1475 $ygbI(WT)$	1475 $\Delta ygbI::ygbI(WT)$	Cette étude
1135 $\Delta ygbN$	1475 $\Delta ygbN::FRT$	Cette étude

## 2. Plasmides

**Tableau 12** : Plasmides construits ou utilisés au cours de la thèse

Plasmide	Description	Provenance
pBS2	Biosenseur de xylonate/OHB, haut nombre de copies (ColE1)	Cette thèse
pBS3	Biosenseur de xylonate/OHB, moyen nombre de copies (p15A)	Cette thèse
pBS5	Biosenseur de xylonate/OHB, haut nombre de copies (ColE1), + pJ23106_IIID	Cette thèse
pREP22	Modèle pour l'amplification de SYFP2	(Frazão <i>et al</i> , 2018b)
pET28		Novagen
pET28_AlaC	Surproduction d'AlaC ( <i>E. coli</i> )	Équipe
pET28_AlaC**	Surproduction d'AlaC ( <i>E. coli</i> ) modifiée A142P:Y275D	Équipe
pET28_Mdh5Q	Surproduction de Mdh ( <i>E. coli</i> ) modifiée I12V:R81A:M85Q:G179D:D86S	Équipe
pKD3	Amplification de la cassette chloramphénicol	(Datsenko & Wanner, 2000)
pKD43	Expression du système de recombinaison LambdaRED	(Datsenko & Wanner, 2000)
pCA24N	-GFP. Plasmide d'origine de la collection ASKA, pour la production des enzymes indiquées	(Kitagawa <i>et al</i> , 2006)
pCA24N_yfaU		
pCA24N_eda		
pCA24N_garL		
pCA24N_yjhH		
pCA24N_yagE		
pCA24N_dgoA		
pCA24N_ygbN		
pCA24N_dId		
pCA24N_IIID		
pCA24N_ykgE		

pCA24N_ykgF		
pCA24N_ykgG		
pCA24N_ldhA		
pCA24N_ackA		
pCA24N_dmlA		
pCA24N_alr		
pCA24N_dadX		
pCA24N_metC		
pCA24N_rspA		
pCA24N_murl		
pCA24N_ygeA		
pET22_HADH(OO)	Production de la 2-hydroxyacide déshydrogénase de <i>O. oni</i>	(Lee <i>et al</i> , 2019)
pET22_HADH(WC)	Production de la 2-hydroxyacide déshydrogénase de <i>W. confusa</i>	(Lee <i>et al</i> , 2019)
pUC19	Plasmide d'origine de la collection exprimant les couples PCT/PhaC. Contient le promoteur naturel de <i>pha</i> ( <i>R. eutropha</i> )	Biolabs
A1	PCT <i>C. kluyveri</i> - PhaC <i>R. eutropha</i>	Cette thèse
A2	PCT <i>M. elsdenii</i> - PhaC <i>R. eutropha</i>	Cette thèse
A3	PCT <i>R. eutropha</i> - PhaC <i>R. eutropha</i>	Cette thèse
A4	PCT <i>T. thermophilus</i> - PhaC <i>R. eutropha</i>	Cette thèse
C1	PCT <i>C. kluyveri</i> - PhaC "Chimera"	Cette thèse
C2	PCT <i>M. elsdenii</i> - PhaC "Chimera"	Cette thèse
C4	PCT <i>T. thermophilus</i> - PhaC "Chimera"	Cette thèse
D1	PCT <i>C. kluyveri</i> - PhaC "STQK"	Cette thèse
D2	PCT <i>M. elsdenii</i> - PhaC "STQK"	Cette thèse
D3	PCT <i>R. eutropha</i> - PhaC "STQK"	Cette thèse
D4	PCT <i>T. thermophilus</i> - PhaC "STQK"	Cette thèse
1	PCT <i>C. kluyveri</i>	Cette thèse
pTM4		Cette thèse
pTM19		Cette thèse
pTargetF	Plasmide d'origine pour ma synthèse de l'ARN guide nécessaire pour la délétion par CrispR-Cas9	(Jiang <i>et al</i> , 2015)
pTarget_tyrB	Synthèse de l'ARN guide pour délétion de <i>tyrB</i>	Cette thèse
pTarget_mhpE	Synthèse de l'ARN guide pour délétion de <i>mhpE</i>	Cette thèse
pTarget_ygbl	Synthèse de l'ARN guide pour délétion de <i>ygbl</i>	Cette thèse
pCAS	Plasmide d'expression de Cas9	(Jiang <i>et al</i> , 2015)
pGEM_phaC <sub>RE</sub> AB	Production de PhaA, PhaB, PhaC ( <i>R. eutropha</i> ) pour la biosynthèse de P(3HB) à partir de glucose	Pr Taguchi
pGEM_phaC <sub>AC</sub> AB	Production de PhaA <sub>RE</sub> , PhaB <sub>RE</sub> , PhaC <sub>AC</sub> pour la biosynthèse de P(3HB) à partir de glucose	Pr Taguchi
pREP22-pYag	Plasmide intermédiaire pour la construction de pBS2	Cette thèse
pZA33		Expressys

Séquence du plasmide D1 (vecteur pUC19, codant la PCT de *C. kluyveri* et la PhaC « STQK »), synthétisé par Eurofins Genomics :

```
cttgagatccttttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaaacaaaaaaaccaccgctaccagcgggtggtttgtt
tgccggatcaagagctaccaactctttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaaactgttc
ttctagtgtagccgtagtttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgctctgctaattcc
tgttaccagtggtgctgctgccagtgggcgataagtcgtgcttaccgggttgactcaagacgatagttaccggata
aggcgcagcggctcgggctgaacggggggttcgtgacacagcccagcttgagcgaacgcctacaccgaaactga
gatacctacagcgtgagctatgagaaaagcgccacgcttcccgaaggagaaaggcggacaggtatccggtaagcg
gcagggctcggaacaggagagcgcacaggggagcttccagggggaaacgcctggatctttatagtcctgtcgggt
ttcgccacctctgacttgagcgtcgatTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCA
acggggcctttttacggttcctggccttttctgctggccttttctcacaatgcttcttctcctgcttaccctgatt
ctgtggataaccgtattaccgcctttgagtgagctgataaccgctcgccgcagccgaacgaccgagcgcagcgagt
cagtgagcgcaggaAGCcccggggcaagtaccttgccgacatctatgctgctggcgcgcacgcgcctggcgcgcgc
ggctgtaccgaggtctacggcggcgacgcctgcaaccgtggccgcagccggtcgttctactcctatcgggcgcgat
ggcgtgaccggccgcgatggccagcctggtctggctggcggactgagcccgcgctgcctcactcgtccttgcccc
tggccgcctgctgctcggcttcagccttgctgctggcggcggccggcgctgcccattgatgtagagcaccacgc
caccggcgccatgccatacatcaggaaggtggcaacgcctgccaccacgttgctgctcggtgatcgccatcatcag
cgccacgtagagccagccaatggccacgatgtacatcaaaaattcatccttctcgcctatgctctggggcctcgg
cagatgagcgcgctgcataaccgtccggtaggtcgggaagcgtgcaagtgccgagggcgattcccgcattgacagcg
cgtgctgtgcaaggcaacaatggactcaaatgctcggaaatcgctgacgattcccagggttctccggcaagcata
gctgatggcgtctccatgctgagaatgctgctgcttggcggataaaaaggggagccgctatcggaatggacgcaagcc
acggccgcagcaggtgctgctgagggcttccagccaggttccagggcagatgtgcccgcagaccctcccgtttgg
gggagggcgaagccgggtccattcggatagcatctccccatgcaagtgcccggccagggcaatgcccggagccgg
ttcgaatctagaaataattttgtttaactttaagaaggagatGAGCTCactagtATGAGTAACAAGAATAGCGAT
GACTTGAATCGTCAAGCCTCGGAAAACACCTTGGGGCTTAACCTGTGCATCGGCCTGCGTGGAAAAGATCTGCTG
ACTTCTGCCC GAATGGTTTTAAACCAAGCCATCAACAACCCATTACAGCGTCAAGCAGCTCGCGCATTTTGGC
ATCGAGCTGAAGAACGTGATGTTTTGGCAAATCGAAGCTGCAACCCGAAAGCGATGACCGTCTGTTCAACGACCCC
GCCTGGAGTCAGAACCCTCTACAAACGTTATCTACAAACCTACCTGGCGTGGCGCAAGGAACTCCACGACTGG
ATCGGCAACAGCAAACCTGTCCGAACAGGACATCAATCGCGCTCACTTCGTGATCACCTGATGACCGAAGCCATG
GCCCCGACCAACAGTGC GGCCAATCCGGCGCGGTCAAACGCTTCTTCGAAACCCGGCGGTAAAAGCCTGCTCGAC
GGCCTCACACATCTGGCCAAGGACCTGGTAAACAACGGCGGCATGCCGAGCCAGGTGGACATGGGCGCTTTCGAA
GTCGGCAAGAGTCTGGGGACGACTGAAGGTGCAGTGGTTTTTCGCAACGACGTCCTCGAATTGATCCAGTACCGG
CCGACCACCGAACAGGTGCATGAGCGACCGCTGCTGGTGGTCCCACCGCAGATCAACAAGTTTTATGTGTTTTGAC
CTGAGCCCGGATAAAAAGCCTGGCGCGCTTCTGCCTGAGCAACAACCAGCAAACCTTTATCGTCAGCTGGCGCAAC
CCGACCAAGGCCAGCGTGAGTGGGGTCTGTGCACTTACATCGATGCGCTCAAAGAAGCCGTCGACGTAGTTTCC
GCCATCACCGGCAGCAAAGACATCAACATGCTCGGCGCCTGCTCCGGTGGCATTACCTGCACCGCGCTGCTGGGT
CACTACGCCGCTCTCGGCGAGAAGAAGGTCAATGCCCTGACCCTTTTGGTCaccGTGCTCGACACCACCTCGAC
TCCCAGGTTGCACTGTTTCGTGATGAGAAAACCTGGAAGCTGCCAAGCGTCACTCGTATCAGGCCGGCGTGCTG
GAAGGCCGCGACATGGCCAAAGTCTTCGCCTGGATGCGCCCTAACGACCTGATCTGGAACACTGGGTCAACAAC
TACCTGCTGGGTAACGAGCCACCGGTCTTCGACATTCTTTTCTGGAACAACGACACCACCCGGTTGCCCTGCTGCG
TTCCACGGCGATCTGATCGAAATGTTCAAAAATAACCCACTGGTGC GCGCCAATGCACTCGAAGTGAGCGGCACG
CCGATCGACCTCAAACAGGTCACTGCCGACATCTACTCCCTGGCCGGCACCAACGATCACATCACGCCCTGGAAG
TCTTGCTACAAGTCGGCGCAACTGTTTCGGTGGCAAGGTGCAATTTGTGCTGTCCAGCAGTGGGCATATCaagAGC
ATTCTGAACCCGCCGGGAATCCGAAATCACGTTACATGACCAGCACCGACATGCCAGCCACCGCCAACGAGTGG
CAAGAAAACCTCAACCAAGCACACCGACTCCTGGTGGCTGCACTGGCAGGCCTGGCAGGCCGAGCGCTCGGGCAAA
CTGAAAAAGTCCCCGACCAGCCTGGGCAACAAGGCCTATCCGTCAGGAGAAGCCGCGCCGGGCACGTATGTGCAT
GAACGTTAAAttaaGAGCTCtaaaaaagaggagaaaGTATACctaggATGGAATGGGAAGAAAATTTACAAGGAAAA
GCTTGTGACCGCGGAGAAGGCGGTCTCTAAGATTGAGAATCACAGTCGGGTGGTCTTTCGCTCACGCTGTTGGCGA
GCCAGTTGACCTGGTTAACGCTCTGGTGAAGAACAAGACAACACTACATCGGTCTGGAGATTGTGCACATGGTTCGC
CATGGGTAAGGGCGAGTACACTAAAGAAGGCATGCAGCGCCACTTCCGGCACAACGCCCTGTTTCGTTGGTGGCTG
CACGCGGATGCCGTCAACAGCGGCCGTGCCGACTACACTCCGTGCTTCTTTTACGAGGTTCCTAGCCTTTTCAA
GGAGAAGCGCTTACCCGTTGACGTGGCTCTCATCCAAGTTTCGGAACCCGACAAGTACGGTTATTGTTCCCTTCGG
TGTATCGAACGATTACACTAAACCCGGCTGCGGAGTCCGCGAAATTTGGTTATAGCCGAGGTTAACAAGAATATGCC
CCGCACCTTAGGCGACTCATTTCATTACGTTAGCGACATCGACTACATTGTCGAGGCGTCGATCCTCTGCTGGA
GCTTCAACCACCGAAGCTGGGTGACGTGGAGAAGGCTATCGGGGAGAATTGCGCGTCCCTGATCGAGGACGGTGC
CACGTTGCAACTGGGTATCGGGGCCATTCCGGACGCAGTGTTACTGTTTCTGAAGAATAAGAAGAACCTCGGTAT
TCACAGTGAAATGATTAGCGACGGCGTTATGGAGCTTGTAAAGCCGGTGAATTAACAATAAGAAGAAAACCTT
GCACCCGGGAAGATTGTAGTTACGTTCTTGATGGGGACGAAGAAGCTGTACGACTTCGTTAATAACAACCCCAT
GGTTGAGACATACTCAGTGGACTACGTTAACAACCCGTTAGTGATAATGAAGAACGATAACATGGTTCAGCATCAA
```

CAGCTGCGTACAGGTTCGATCTGATGGGTCAGGTCTGCTCCGAGTCAATCGGTCTGAAGCAAATTAGCGGCGTTGG  
 CGGTCAAGTGGACTTCATACGTGGGGCCAACTGAGCAAAGGTGGGAAAGCCATAATCGCCATTCATCGACGGC  
 CGGTAAGGGGAAGGTAAGCCGTATTACACCGTTGCTTGACACCGGAGCAGCTGTAACCACGTCGCGTAACGAGGT  
 GGACTACGTTGTGACCGAGTACGGCGTCGCCACTTAAAAGGTAAGACCCTGCGTAACCGGGCGCGCGCTTAT  
 TAACATAGCCCACCCGAAGTTTCGTGAGAGCCTTATGAACGAGTTCAAGAAACGTTTCTAAGAATTCt cgaGtat  
 aCTAGAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTTGTCGGTGA  
 ACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGCCCTAGAcatatgggtgcactctcagtacaatctgctctgatgccgc  
 atagttaagccagccccgacaccgcccaacaccgctgacgcgccctgacgggcttgctctgctccccggcatccgc  
 ttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagaggttttcaccgctcatcaccgaaacgcgcgag  
 acgaaagggcctcgtgatacgcctatTTTTataggttaatgtcatgataataatggtttcttagacgtcaggtgg  
 cacttttcggggaaatgtgcgcggaaccctatTTgtttatTTTTctaaatacattcaaatatgtatccgctcat  
 gagacaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtatgagtattcaacatttccgtgtcgc  
 ccttattccctTTTTtgccgcatTTTTgccttctgTTTTgtcaccagaaacgctgggtaaagtaaaagatgc  
 tgaagatcagttgggtgcacgagtggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagttttcg  
 ccccgaagaacgTTTTccaatgatgagcactTTTaaagttctgctatgtggcgcggtattatcccgtattgacgc  
 cgggcaagagcaactcggtcgcgcgatacactattctcagaatgacttgggttgagtactcaccagtcacagaaaa  
 gcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccataaccatgagtataactgcggccaa  
 cttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagtaaccgctTTTTgcacaacatgggggatcatgtaactcg  
 ccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaat  
 ggcaacaacgTTgcgcaaactattaactggcgaactacttactctagcttcccggcaacaattaatagactggat  
 ggaggcggataaaagttgcaggaccacttctgcgctcggcccttccggctggctggtttattgctgataaatctgg  
 agccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggccagatggtaagccctcccgatcgtagtatt  
 ctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgtgagatagggtgcctcactgattaa  
 gcattggtaactgtcagaccaagtttactcatatatacttttagattgatttaaaacttcatttttaatttaaaag  
 gatctaggtgaagatcTTTTgataatctcatgacaaaatcccttaacgtgagttttcgttccactgagcgtc  
 agaccccgtagaaaagatcaaagatcct

### 3. Amorces

Toutes les amorces ont été commandées chez Eurofins Genomics.

**Tableau 13** : Amorces utilisées au cours de la thèse

Nom	Séquence (5'→3')	Utilisation
CA2976	GTCCCTAGGTATAAATACTAGTTTCGCCAA ATCATCCTTGAGAGTTTTAGAGCTAGA AATAGC	PCR inverse sur pTarget pour remplacement de <i>ygbI</i>
CA2977	GTGGAAGAAACCATTACT	Amplification de l'ADN donneur <i>ygbI</i> _WT
CA2978	TGGTTTACGTCGGTTAAAGG	Amplification de l'ADN donneur <i>ygbI</i> _WT
CA2979	CCAGCATTTCCAGATCGAAT	Vérification du remplacement de <i>ygbI</i>
CA7980	TGATCGTGGACCGGAGAGTC	Vérification du remplacement de <i>ygbI</i>
JFR64	GTGAGCAAAGGCCAGACCTAGGGATA TATTCCGCTTCC	Amplification de pZA33
JFR65	CGTCAGGTGGCACTTTtagacgtcgg attgccag	Amplification de pZA33
JFR66	CAGATTTTCGTGATGCTTGTC	Séquençage
JFR67	ATGGTGAAAGTTGGAACCTC	Séquençage
TM10	aactaagatcgggtactacgc	Séquençage
TM130	CGCCAGTAAATCTGCC	Vérification de la suppression de <i>mhpE</i>
TM131	AGGCGGGATGAAGATG	Vérification de la suppression de <i>mhpE</i>
TM14	ttgctggcctTTTTgctcacaGCGCCGC TACAGGGCGCG	Clonage du terminateur T7
TM146	tggccttttgctc	Circularisation du pBS2 (pour pBS3)
TM15	ctatggaaaaacgccagc	Séquençage du biosenseur
TM153	TGATAGGTAACCTGAAGGC	Vérification de la suppression de <i>alaC</i>
TM154	TGCCCTTGTCTCGTTTC	Vérification de la suppression de <i>alaC</i>

TM155	GGCGCAACCTACTACTTC	Vérification de la suppression de <i>aspC</i>
TM156	CGTGATATTTATTCCGGGTC	Vérification de la suppression de <i>aspC</i>
TM157	AAGTAAGCGCTTACGAAC	Amplification de la région de <i>tyrB</i>
TM158	GAAAGTCACAGGCAATAAGG	Amplification de la région de <i>tyrB</i>
TM159	AAATATGCTTTGCCCTG	Vérification de la suppression de <i>ybdL</i>
TM16	gttgtttgcggtgaacg	Séquençage
TM160	TTCACCGCCATGAAATTG	Vérification de la suppression de <i>ybdL</i>
TM17	TGCAGCTATCGGGTTTATTG	Vérification de la suppression de <i>yfaU</i>
TM18	TGCTGATATTCCGAAGTGC	Vérification de la suppression de <i>yfaU</i>
TM185	GTCCTAGGTATAAATACTAGTTCAAACC CTTGGCGGCTCCGGTTTTAGAGCTAGA AATAGC	PCR inverse pTarget pour cibler <i>tyrB</i>
TM186	GCGTTTGCTGCGGTG	Suppression de <i>tyrB</i> sur plasmide
TM187	cacGCGATGGTTCTCC	Suppression de <i>tyrB</i> sur plasmide
TM188	TCCGGAAGTACCGATTG	Vérification de la suppression de <i>tyrB</i>
TM189	AACAAAATCAGGGGTAAGAAAG	Vérification de la suppression de <i>tyrB</i>
TM19	CGCCGAAAGAGATTGTTG	Vérification de la suppression de <i>garL</i>
TM20	AGCAATCACGTCAGCAATAG	Vérification de la suppression de <i>garL</i>
TM21	CCGAACAAGTGTTCACTATG	Vérification de la suppression de <i>yagE</i>
TM22	GATAATCAGCACCTCTTTGC	Vérification de la suppression de <i>yagE</i>
TM24	CTGAGCAGTAAAAACCGTC	Vérification de la suppression de <i>yjhH</i>
TM25	TCATTCGTGTGAATGGACAG	Vérification de la suppression de <i>eda</i>
TM26	TAAGCCGAAATTGATGGC	Vérification de la suppression de <i>eda</i>
TM29	AGGTCAGCGAATTTCTCTC	Vérification de la suppression de <i>dgoA</i>
TM30	GATACATCACTTGCCATAAGTC	Vérification de la suppression de <i>dgoA</i>
TM31	AGAATTACAAAAACACGCC	Vérification de la suppression de <i>yjhH</i>
TM32	TGTGCTTAACCCAGCAGAG	Amplification de la région de <i>mhpE</i>
TM33	TACGGGCGAAATGTAGGC	Amplification de la région de <i>mhpE</i>
TM34	GTCCTAGGTATAAATACTAGTCGGTAAA AAACTTTATATCTGTTTTAGAGCTAGA AATAGC	PCR inverse pTarget pour cibler <i>mhpE</i>
TM35	GTCGTTGATCAAAGCTCGCCGCTTG	Séquençage du pTarget
TM36	GATCTGCGCAACAACAAAtaaTG	Suppression de <i>mhpE</i> sur plasmide
TM37	catGCCGCTTCTCCTG	Suppression de <i>mhpE</i> sur plasmide
TM48	CCCCGAATAAGTAGCTCTG	Vérification de la suppression de <i>ykg</i>
TM49	CATTCTGATAGAGAGTGCC	Vérification de la suppression de <i>ykg</i>
TM5	cccggcctgaCAAAGCCCCGAAAGGAAG C	Clonage du terminateur T7
TM50	GGATGGTTGCCGAATAAATC	Vérification de la suppression de <i>dld</i>
TM51	GGAAGATATGGCAACCTTC	Vérification de la suppression de <i>dld</i>
TM53	CCGAAGCCTCACATAACATC	Vérification de la suppression de <i>lldD</i>
TM54	GCGGTAAACTCGTGATAGTC	Vérification de la suppression de <i>lldD</i>
TM60	ACTAGTATTATACCTAGGACTGAG	Antisens pour PCR sur pTarget
TM67	ggagaaatactagATGATTATTTCCGC AGCC	Amplification de <i>lldD</i>
TM68	tcgtaggatgacgCTATGCCGATTCC CTTTC	Amplification de <i>lldD</i>
TM7	ctagctcgaGGACTGCACCGAGCCATC	Clonage de pYag (XhoI)
TM71	AAGTGCCACCTGACGTCTAAG	Circularisation du pBS2



TM72	TTCGGGGAAATGTGCGCG	Circularisation du pBS2
TM8	tgcaagcttGAGATCTCCTTGCTGAAT CATTTTG	Clonage de pYag (HindIII)
TM9	catgagcggatacatatatttg	Séquençage
TMA26	TCACCTGTATTGGTGACGCCCTGAAAT CAAGAATGGCACGAGACTCCGTGttGT GTAGGCTGGAGCTGC	Amplification de la cassette de résistance au chloramphénicol sur pKD3 pour la suppression de <i>ykg</i>
TMA27	CAGGTTTATGTCCAGACTTCATATCTC TCtcaACAATCCTCAATAATCAGcCAT ATGAATATCCTCCTTAGttcc	Amplification de la cassette de résistance au chloramphénicol sur pKD3 pour la suppression de <i>ykg</i>
TMA73	TAAAGCCACCAGTACTTTCC	Vérification de la suppression de <i>panB</i>
TMA74	TACGTTTGTTTAGCTTCTCG	Vérification de la suppression de <i>panB</i>
TMJ1	agcTTAATTAATCATGCCTTGGCTTTG ACGTATCG	Amplification de <i>phaCRE</i> pour restriction Pacl
TMJ10	CTACTCAGGAGAGCGTTC	Vérification de l'insertion de PCT (Cter)
TMJ11	GTTTCGAGAGCTTCGGTC	Vérification de l'insertion de PhaC (via PCTRE)
TMJ12	GAGCTCCACGTTTTCCAG	Vérification de l'insertion de PhaC (via PCTTT)
TMJ13	TGCGGTGTATTGGTATCTAAAAATC	Vérification de l'insertion de PhaC (via PCTME)
TMJ14	CGCCATCGAGCATCAC	Vérification de l'insertion de PCT (via PhacRE)
TMJ15	GAGCACCATGGTTCTTGG	Vérification de l'insertion de PCT (via PhacAR)
TMJ2	tagactagtATGGCGACCGGCAAAGGC	Amplification de <i>phaCRE</i> pour restriction Spel
TMJ3	CTGcctaggATGAGCTACCGCAAGAAG CTCACC	Amplification de <i>pctTT</i> pour restriction AvrII
TMJ4	GAGTgaattcTTACGGCCTCCCGCGCT TTTC	Amplification de <i>pctTT</i> pour restriction EcoRI
TMJ5	gagACTAGTATGAGCCAACCATCTTAT GG	Amplification de <i>phaCAR</i> pour restriction Pacl
TMJ6	GACttaaattaaTCATGCCTTGGCTTTG AC	Amplification de <i>phaCAR</i> pour restriction Spel
TMJ7	GCGTTAACCAGGTCAACTG	Vérification de l'insertion de PhaC (via PCTCK)
TMJ8	cttcagccagttccag	Vérification de l'insertion de PhaC (Nter)
TMJ9	GGGCAACAAGGCCTATC	Vérification de l'insertion de PCT (via PhacSTQK)

#### 4. Produits

Le racémique de DHB (forme ammonium) et le L-DHB (forme sodium) ont été fourni par Adisseo. Sauf indication contraire, tous les autres produits chimiques utilisés ont été obtenus auprès de Sigma-Aldrich. Les enzymes de modification d'acides nucléiques ont été acquises auprès de New England Biolabs.

#### 5. Milieux

### 5.1 Milieux riches : LB, SOB et SOC

Le LB (Lysogeny Broth) utilisé était composé de 10 g/L de peptone, 5g/L d'extraits de levure et 10 g/L de NaCl. Le milieu SOB (Super Optimal Broth) était composé de 20 g/L de tryptone, 5 g/L d'extraits de levure, 0.5 g/L de NaCl, 0.186 g/L de KCl et 10 mM de MgCl<sub>2</sub>. Le milieu SOC (Super Optimal broth with Catabolite repression) consistait en du SOB contenant 20 mM de glucose. Le milieu solide employé en boîtes de Pétri contenait en supplément 1.2 g/L d'agar.

### 5.2 Milieu minimum (M9)

Le milieu M9 employé contenait 50 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 22 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 9 mM de NaCl, 37 mM de NH<sub>4</sub>Cl, 2 mM de MgSO<sub>4</sub>, 0.1 mM de CaCl<sub>2</sub>, 0.06 mM de FeCl<sub>3</sub>, 0.02 mM de thiamine-HCl, 1 μM de Na<sub>2</sub>EDTA, 6 μM de ZnSO<sub>4</sub>, 8 μM de CoCl<sub>2</sub>, 2 μM de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 2 μM de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 7 μM de MnSO<sub>4</sub>, 7 μM de CuCl<sub>2</sub>, 100 mM de MOPS (acide 3-morpholino-1-propanesulfonique, pH 7) et une source de carbone appropriée.

## 6. Synthèse de l'OHB

L'OHB a été synthétisé en incubant 125 mM de D-homosérine avec 4.5 U/mL de D-acide aminé oxydase de rein de porc, 4000 U/mL de catalase de foie de bœuf dans un tampon Tris-HCl 100 mM (pH 8) pendant 90min à 37°C. La réaction a ensuite été purifiée sur un filtre Amicon™ Ultra (seuil 10 kDa, Millipore) afin d'éliminer les enzymes (Wellner & Lichtenberg, 1971; Walther *et al*, 2018). La quantification de l'OHB a été effectuée en RMN par Guy Lippens et Pauline Rouan (EAD17, TBI). L'analyse a consisté en l'utilisation d'un spectromètre Bruker Avance III HD 800 MHz équipé d'une sonde 5 mm à quadruple résonance QCI-P (H/P-C/N/D) refroidie cryogéniquement. Les spectres ont été acquis et retraités avec le logiciel Bruker Topspin 4.1 et ont été calés pour référence sur la fréquence du TSP (Acide triméthylsilylpropanoïque) sur le spectre 1H à 0 ppm. La conversion obtenue était comprise entre 65 et 85 %. De l'homosérine était donc encore présente dans la solution d'OHB.

## II. Protocoles

### 1. Transformation de cellules

#### 1.1 Cellules commerciales

Les clonages de plasmides ont systématiquement été effectués dans des cellules NEB® 5-alpha de Biolabs, en suivant le protocole de transformation du fabricant. Le même protocole a été suivi pour la transformation des cellules BL21 DE3, provenant du même fournisseur. Brièvement, les cellules jusqu'alors conservées à -80°C ont été placées sur la glace et incubées avec maximum 5 μL (200 ng) d'ADN circulaire pendant 15 mn. Un choc thermique a ensuite été appliqué aux cellules à 42°C pendant 30s, ensuite replacées sur glace. Les cellules ont ensuite été incubées à 37°C ou 30°C selon le plasmide utilisé, pendant 1 h. La transformation a par la suite été étalée sur une boîte de Petri de milieu LB + Agar (2 g/L), en présence de l'antibiotique approprié.

#### 1.2 Transformation TSS

Une colonie de la souche à transformer a été utilisée pour inoculer 1 mL de LB. Après 4 h d'incubation à 37°C, les cellules ont été centrifugées et remises en suspension dans 100 µL de solution TSS (tryptone 10 g/L, extrait de levure 5 g/L, NaCl 10 g/L, PEG 10 kDa 10 g/L, DMSO 5 g/L et MgCl<sub>2</sub> 20 mM). Les cellules ont été laissées sur glace pendant 15 minutes avant d'ajouter 100-150 ng de préparation plasmidique. Après 15 minutes sur glace, un choc thermique à 42°C pendant 1 minute a été appliqué aux cellules, après quoi 1 mL de LB a été ajouté. Sauf contre-indication, l'expression phénotypique a été réalisée pendant 1 h à 37°C, avant d'étaler 200 µL de la transformation sur un milieu gélosé contenant l'antibiotique approprié.

### 1.3 Electroporation

50 µL d'une culture saturée de la souche cible ont été utilisés pour inoculer 5 mL de LB + antibiotique approprié, et laissé en culture à 37°C pendant 3 à 4 heures ou jusqu'à ce que la DO<sub>600</sub> atteigne ~0,5 - 0,7. 2 mL de cette culture ont ensuite été prélevés et placés sur la glace, puis centrifugés. Les cellules ont été lavées une fois avec 1 mL d'eau MilliQ glacée puis une fois avec 1 mL de glycérol 10 % glacé. Les cellules ont ensuite été remises en suspension dans 50 µL de glycérol 10 % glacé, et elles ont été transformées avec 100 ng d'ADN plasmidique avec les paramètres suivants : cuvette de 2 mm, 2,5 kV, 200Ω, 25 µF. 2 mL de SOC ont été rajoutés et la réaction a été incubée toute la nuit à 37°C, avant d'être étalées sur un milieu gélosé en présence de l'antibiotique nécessaire.

## 2. **Biologie moléculaire**

### 2.1 Manipulation d'ADN

Les préparations plasmidiques, les extractions d'ADN sur gel ainsi que les purifications d'ADN ont été effectuées avec les kits dédiés obtenus auprès de Biobasic, en suivant le protocole du fabricant. L'extraction d'ADN sur gel a nécessité l'utilisation de SYBR® Safe (Thermo Scientific), à hauteur de 0.01 % (v/v) du gel.

L'analyse de l'ADN issu des réactions de PCR ou de restriction a été effectuée par électrophorèse sur gel d'agarose. Les échantillons (5 µL), chargés 1µL de tampon de chargement (NEB) ont été déposés sur un gel d'agarose (0.8 % m/v dans un tampon Tris-Acétate-EDTA (TAE) 1X (BioBasic)), et l'électrophorèse a été effectuée dans un tampon TAE 1X, à 200 V pendant 20min. L'incubation du gel dans un bain de bromure d'éthidium (BET) a permis d'analyser par la suite spécifiquement les fragments d'ADN sur un ChemiDoc MP (BioRad), avec le protocole préenregistré dédié.

Les modifications d'ADN suivantes ont été effectuées en suivant strictement le protocole du fabricant (NEB) : restriction endonucléique, phosphorylation des extrémités 5' (T4 polynucléotide kinase), déphosphorylation des extrémités 5' (Antarctic phosphatase), NEBuilder HiFi DNA assembly, ligation (HiT4 DNA ligase).

Les PCR ont toutes, sauf mention contraire, été effectuées avec l'ADN polymérase haute-fidélité Q5 (NEB), selon les protocoles suivants. Les réactions de polymérisation (50 µL) contenaient 10 µL de tampon de réaction 5X pour Q5, 1 µL de de solution de dNTPs 10 mM (NEB), 2.5 µL d'amorce « sens » et 2.5 µL d'amorce « anti-sens », 1 à 10 ng d'ADN modèle, et 0.5 µL d'ADN polymérase Q5. La réaction a été incubée dans un thermocycleur

T100 (BioRad). Le programme consistait en une étape de dénaturation de 10 min à 98°C, suivi de 35 fois trois étapes : 98°C pendant 10s, hybridation des amorces à 53°C pendant 15s, polymérisation à 72°C, à raison de 30s/kb. Une dernière étape de polymérisation à 72°C pendant 10min était effectuée avant de conserver les échantillons à 12°C.

## 2.2 Délétion de gène par transduction de phage P1

Les mutants de lactate oxydases, aldolases, *panB*, transaminases, de l'opéron *ygb* ont été obtenues en suivant le protocole de délétion par transduction de phage P1 établi précédemment (Thomason *et al*, 2007). Font exceptions les suppressions de *tyrB*, *ygbI*, *ygbK* et de *mhpE* qui ont été obtenues en employant CrispR-Cas9 (voir ci-après). La souche utilisée pour la délétion de l'opéron *ykg* a été construite par recombinaison homologue (Lambda Red, voir II.2.4), et porte une cassette de résistance au chloramphénicol.

### a. Préparation des lysats

25 µL d'une solution stérile de glucose (20 % w/v) et 25 µL de CaCl<sub>2</sub> 1 M stérile ont été ajoutés à 5 mL de LB (lysogeny broth). Le mélange a été inoculé avec 100 µL de culture saturée de la souche de la collection KEIO (Baba *et al*, 2006) portant une cassette de résistance à la kanamycine à la place du gène cible, ou la souche  $\Delta ykgEFG::Cm^R$ , et a été mis en culture à 37°C sous agitation. Après 45 minutes, 100 µL de lysat de phage P1 ont été ajoutés et la croissance a été poursuivie pendant 3 heures ou jusqu'à observation de déchets cellulaire, correspondant à une lyse complète. La culture lysée a été centrifugée à 4000 g, à 4°C pendant 10 minutes, et le surnageant a été stérilisé par filtration. Le lysat obtenu peut être conservé pendant plusieurs années à 4°C sans perte d'efficacité.

### b. Transduction

1 mL de culture saturée de la souche cible souhaitée a été centrifugé et remis en suspension avec 100 µL de solution stérile de sels P1 (10 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM MgSO<sub>4</sub>) et 100 µL de lysat de phage P1 portant la mutation désirée. Les cellules ont été incubées à 30°C pendant 30 min sans agitation, et 100 µL d'une solution de citrate de sodium 1 M stérile ont été ajoutés pour arrêter la transduction, après quoi 1 mL de LB a été ajouté. Les cellules ont ensuite été incubées à 37°C pendant 1 heure avant d'êtreensemencées sur un milieu gélosé de LB + antibiotique adéquat (Ab).

### c. Élimination de la cassette de résistance à la kanamycine

Étant donné que les cassettes de résistance à la kanamycine de la collection KEIO sont toutes flanquées de part et d'autre de sites FRT, la cassette peut facilement être éliminée en utilisant l'enzyme Flp de *Saccharomyces cerevisiae* (Cox, 1983), codée sur le plasmide pCP20 (Cherepanov & Wackernagel, 1995). Les cellules portant la cassette de résistance à la kanamycine à la place du gène cible ont pu être transformées avec pCP20 selon un protocole décrit auparavant (Chung *et al*, 1989). Plusieurs clones issus de la transduction ont été prélevés de la boîte LB Ab et utilisés pour inoculer 1 mL de LB Ab. Les cellules ont été transformées avec le plasmide pCP20 selon le protocole de transformation au TSS. L'expression phénotypique de la β-lactamase codée par pCP20 a

été réalisée à 30°C pendant 1 à 2 heures sous agitation, avant d'ensemencer les cellules sur LB + Agar + ampicilline (100 µg/mL).

Plusieurs clones de la boîte LB ampicilline ont été prélevés et utilisés pour inoculer 1 mL de LB, qui a ensuite été incubé à 42°C pendant 6-8 heures. Quelques microlitres de la culture ont été ensemencés en stries sur une boîte de LB, ensuite incubée pendant une nuit à 37°C.

Les délétions sur les clones sensibles à l'ampicilline et à l'Ab ont été vérifiées par PCR sur colonie à l'aide du OneTaq® 2X Master Mix with Standard Buffer (BioLabs), en suivant le protocole recommandé par le fabricant, et en utilisant les amorces listées, dans toutes les souches présentant une ou plusieurs délétions.

### 2.3 Délétion de gène par CrispR-Cas9

L'édition du génome par CrispR-Cas9 a été réalisée selon un protocole décrit précédemment (Jiang *et al*, 2015). La cellule cible a d'abord été transformée avec le plasmide pCas, codant pour la protéine Cas9 ainsi que la machinerie de recombinaison Lambda-Red (voir III.1.3 Electroporation). Les plasmides produisant l'ARN guide (gRNA) ont été construits sur la base de pTargetF, amplifié avec les amorces TM60 et TM34 pour *mhpE*, TM60 et TM186 pour *tyrB*, et TM60 et CA2976 pour le remplacement de *ygbI* dans la souche 1475. La vérification de l'amplification a été faite grâce au service de séquençage Sanger fourni par Eurofins Genomics, avec l'amorce TM35.

#### a. Obtention de l'ADN donneur

L'ADN donneur pour l'échange d'allèle de *ygbI* sur la souche 1475 a été amplifié sur la souche 1135 avec les amorces CA2977 et CA2978. Le fragment pour la délétion de *ygbK* dans la souche 1135 avec *ygbI* a été commandé chez Eurofins Genomics. Ceux pour les délétions de *mhpE* et de *tyrB* ont été obtenus à grâce du protocole suivant.

Les fragments de réparation pour la suppression de *mhpE* et *tyrB* ont été obtenus à partir du génome d'*E. coli* substr. K.12 MG1655. Les régions *mhpE* et *tyrB* ont été amplifiées à partir de la préparation d'ADN génomique de la souche d'*E. coli* substr. K.12 MG1655 avec les couples d'amorces TM32/TM33 et TM157/158 respectivement. Les fragments résultants ont été purifiés sur gel (EZ-Spin Column DNA Gel Extraction Kit de BioBasic) et phosphorylés en leurs extrémités 5' à l'aide d'une T4 Polynucléotide Kinase (BioLabs). Le vecteur utilisé était un pZE13 (Expressys) digéré avec EcoRV (BioLabs) et déphosphorylé avec une Antarctic phosphatase (BioLabs). Le vecteur et les inserts ont ensuite été ligaturés à l'aide d'une HiT4 DNA Ligase (BioLabs). L'exactitude de l'insert a été vérifiée par séquençage, en utilisant les amorces TM61 et TM62.

Les plasmides circulaires résultants ont été amplifiés avec les couples d'amorces TM36/37 et TM186/187, afin de linéariser les vecteurs et de supprimer les gènes cibles. Les fragments linéaires ont été purifiés sur gel et recircularisés pour obtenir les plasmides pTM4 et pTM19, portant respectivement les séquences d'ADN de réparation utilisés pour les délétions de *mhpE* et *tyrB* respectivement. Les ADN de réparation ont été amplifiés sur ces plasmides avec les couples d'amorces TM32/33 et TM157/158.

#### b. Remplacement des gènes cibles par CrispR-Cas9

Les souches portant le plasmide pCas ont été électroporées avec 100 ng de pTarget et 400 ng d'ADN donneur. Les cellules ont été cultivées en présence d'arabinose lors de leur préparation pour la transformation (10 mM). Les cellules transfectées ont ensuite été mises en suspension dans 2 mL de SOC et placées à 30°C pendant la nuit. L'ensemble de la réaction de transformation a étéensemencé sur LB Kanamycine/Spectinomycine. La bonne modification du génome a été vérifiée par amplification de la zone génomique ciblée et comparaison des tailles attendues, avant de se débarrasser des plasmides et de vérifier les autres mutations déjà présentes si nécessaire.

La suppression du gène *mhpE* a été vérifiée par amplification du génome sur colonie avec le couple d'amorces TM130/131. La vérification de la suppression de *tyrB* a été faite avec le couple d'amorces TM188/TM189, et le remplacement de *ygbI* dans la souche 1475 avec les amorces CA2979/2980.

#### 2.4 Délétion de gène par recombinaison homologue (Lambda Red)

L'opéron *ykg* a été supprimé du génome de la souche d'*E. coli* substr. K.12 MG1655 par recombinaison homologue, adapté d'un protocole décrit précédemment (Datsenko & Wanner, 2000). Le fragment pour la recombinaison homologue a été obtenu en amplifiant la cassette de résistance au chloramphénicol flanqué de séquences FRT du plasmide pKD3, avec les amorces TMA26/27. Les amorces arboraient des extrémités 5' flottantes, correspondant : à la séquence comprise entre +19 et +69 de *ykgE* d'une part, et à 18 nt en amont et 32 nt en aval du codon STOP. Ces positions permettent d'obtenir des extrémités similaires à celles obtenues pour *ykgE* et *ykgG* dans la collection KEIO. L'amplicon a été purifié sur gel.

La souche cible a été transformée avec pKD46. L'expression phénotypique de la  $\beta$ -lactamase a été réalisée pendant 1-2 h à 30°C, et les étalements sur boîtes gélosées + ampicilline incubées une nuit à 30°C. Un clone issu de cette transformation a été mis en culture à 30°C dans un milieu LB Ampicilline jusqu'à saturation. La culture a été diluée à  $DO_{600} = 0.1$  dans 5 mL de milieu SOB + Ampicilline. Une fois atteint une  $DO_{600}$  de 0.5, 10 mM final de L-arabinose ont été ajoutés, et les cellules ont été remises en culture jusqu'à l'obtention d'une  $DO_{600}$  de ~1.0-1.2. 500  $\mu$ L de cette culture ont été prélevés, centrifugés, et le surnageant a été débarrassé. Le culot cellulaire a été resuspendu dans 300  $\mu$ L de culot cellulaire, et la suspension a été incubée 10 minutes sur glace avant d'ajouter 400 ng de fragment. Après 30 minutes d'incubation sur glace, un choc thermique a été appliqué, à 42°C pendant 90 secondes, puis les cellules ont été replacées sur glace. 400  $\mu$ L de LB ont été ajoutés aux cellules et la suspension a été incubée à 30°C pendant une nuit. La totalité de la transformation a été étalée sur des boîtes gélosées LB + Chloramphénicol (12.5  $\mu$ g/mL), et incubée à 37°C pendant une nuit. La suppression de l'opéron *ykg* a été vérifiée par amplification du génome sur colonie avec le couple d'amorces TM48/49. La souche délétée a pu être utilisée pour produire un lysat de phage P1.

#### 2.5 Construction des biosenseurs

##### a. pBS2

Le promoteur pYag a été amplifié à partir du génome d'*E. coli* substr. K12 MG1655 avec les amorces TM7/TM8, ce qui a permis l'insertion d'un site de restriction XhoI en 5' et HindIII en 3' du fragment, qui a été purifié sur gel d'agarose 5 %. Le plasmide pREP22 (Frazão *et al*, 2018b) et le fragment généré ont été digérés avec les enzymes de restriction XhoI et HindIII, et ont été ligués ensemble (HiT4 DNA ligase), puis la réaction de ligation a été utilisée pour transformer des cellules NEB 5-alpha. La vérification de la bonne insertion du fragment pYag a été vérifiée par PCR sur colonie avec les amorces TM9/TM10 et le OneTaq® 2X Master Mix with Standard Buffer (Biolabs), avant d'être séquencée (Eurofins Genomics).

Le plasmide intermédiaire obtenu a été utilisé comme matrice pour l'amplification de la partie « vecteur » du pBS2, avec les amorces TM12 et TM13. Le terminateur T7 a été amplifié à partir du pET28 avec les amorces TM5/TM14, et le répresseur XynR avec son promoteur naturel ont été amplifiés sur le génome d'*E. coli* substr. K12 MG1655 avec les amorces TM4/TM11. Les fragments générés ont été purifiés sur gel d'agarose puis utilisés dans une réaction de NEBuilder HiFi DNA Assembly, ensuite utilisée pour la transformation de NEB 5-alpha. Les clones obtenus contenant pBS2 ont été vérifiés par PCR sur colonie en utilisant les amorces TM15/TM16, avant d'être envoyés pour séquençage.

#### b. pBS3

Le pBS2 a servi de matrice afin d'amplifier la partie spécifique au biosenseur, avec les amorces TM71 et TM146. La partie vecteur a été amplifiée à partir de pZA33 avec les amorces JFR64 et JFR65. Les fragments obtenus ont été purifiés sur gel d'agarose puis clonés par NEBuilder HiFi DNA Assembly (Biolabs). La bonne insertion du biosenseur a été vérifiée par PCR sur colonie avec les amorces JFR66/JFR67, avant d'être séquencée avec les amorces JFR66/JFR67/TM10/TM16.

#### c. pBS5

Le pBS2 a servi a été circularisé par amplification avec les amorces TM71/TM72, le gène *ltdD* a été amplifié à partir du génome d'*E. coli* substr. K12 MG1655 avec les amorces TM67/68, et les fragments générés ont été purifiés sur gel d'agarose. Le fragment contenant le promoteur constitutif pJ23106 a été commandé chez Eurofins Genomics. Le clonage du pBS5 a été effectué avec le NEBuilder HiFi DNA Assembly (Biolabs), ensuite utilisé pour la transformation de cellules NEB 5-alpha. La taille des fragments insérés dans le plasmide d'origine a d'abord été vérifiée par PCR sur colonie avec les amorces TM9, et TM15, avant d'être séquencée avec les amorces TM9/TM10/TM15/TM16.

### 2.6 Constructions des plasmides exprimant les PCT/PhaC

Le plasmide D1 a été synthétisé par Eurofins Genomics (voir séquence I.2). Le gène codant pour PhaC<sub>RE</sub> a été amplifié sur le génome de *Ralstonia eutropha* avec les amorces TMJ1/2 (fragment FRE). PhaC<sub>AR</sub> a été amplifié sur le plasmide pUC19\_pJ23111\_phaCARopt\_PCTEs avec les amorces TMJ5/6 (fragment FAR), et pour PCT<sub>TT</sub> sur une préparation d'ADN génomique de *Thermus thermophilus* avec les amorces TMJ3/4 (fragment FTT). Les fragments ont été purifiés sur gel d'agarose. Les plasmides

A1, A2, A3, A4, C1, C2, C4, D2, D3, D4 et 1 ont été obtenus par restriction ligation, selon le tableau suivant, qui indique l'origine de la PCT (vertical gauche), l'origine de la PhaC (horizontal), les enzymes de restriction employées et le plasmide obtenu :

	FRE	FAR	A1	D1	C1
D1	A1 (PacI/SpeI)	C1 (SpeI/PacI)			
pET28_PCT <sub>ME</sub>				D2 (AvrII/XhoI)	
pET28_PCT <sub>RE</sub>			A3 (AvrII/XhoI)	D3 (AvrII/XhoI)	
FTT				D4 (AvrII/EcoRI)	
D2			A2 (SpeI/PacI)		C2 (SpeI/PacI)
D4			A4 (SpeI/PacI)		C4 (SpeI/PacI)

### 3. Cultures microbiologiques

#### 3.1 Pour le suivi de la consommation de DHB

Plusieurs colonies des souches à tester ont été utilisées pour inoculer 10 mL de LB et ont été incubées toute une nuit à 37°C et à 200 RPM. La culture saturée a ensuite été utilisée pour inoculer une seconde préculture à  $DO_{600} = 0.2$ , dans un milieu M9 xylose 0.2%, également incubées une nuit à 37°C et à 200 RPM. Cette préculture a servi à inoculer à  $DO_{600} = 0.2$  un erlenmeyer bafflé de 250 mL contenant 25 mL de milieu M9 xylose 0.2 % et, sauf cas contraire, 50 mM de (L,D)-DHB forme ammonium. La culture a été suivie pendant 96 h, avec un échantillon prélevé toutes les 24h. Les échantillons ont été centrifugés à 10 000 g pendant 2min, et le surnageant a été filtré (filtre Sartorius 0.2 µm). Le filtrat a ensuite été conservé à -20°C jusqu'à son analyse en HPLC.

#### 3.2 Pour l'identification d'importeurs de DHB

Les cultures ont été effectuées dans un Spectrofluoromètre SAFAS FLX-Xenius®. Les précultures contenant 4 mL de milieu M9 glucose 0.4 g/L, 0.2 g/L DAP, 20 mM DHB et 10 % LB, et ont été incubée à 37°C et à 200 RPM pendant une nuit après avoir été inoculées avec plusieurs colonies de la souche à tester. Les cultures saturées ont ensuite été centrifugées à 4000 g pendant 5min, et lavées avec de l'eau MilliQ. Elles ont ensuite servi à inoculer 1.5 mL de M9 0.2 g/L DAP et glucose 0.4 g/L, sauf indication contraire, à une  $DO_{600}$  de 0.15. Les cultures ont été effectuées dans une plaque 24 puits avec le protocole suivant :

- Méthode de mesure : cinétique
- Type d'analyse : absorption ; longueur d'onde : 600 nm ; largeur de bande 2.0 nm



- Durée d'agitation : continue ; mouvement : orbital ; amplitude : 3 mm ; fréquence : 6 Hz

### 3.3 Pour les tests des biosenseurs

Les cellules transformées avec le biosenseur désiré ont été utilisées pour inoculer 5 mL de LB, contenant l'antibiotique approprié (Ab), et ont été incubées toute une nuit à 37°C et à 200 RPM. La préculture a ensuite servi à inoculer à  $DO_{600} = 0.2$ , 20 mL de M9 xylose 0.2 % (si destiné à l'analyse en cytométrie) ou 0.5 % (si destiné à l'analyse au spectrofluoromètre) + Ab, qui a également été mise en culture à 37°C et à 200 RPM. La seconde préculture a servi à inoculer un erlenmeyer bafflé de 250 mL contenant 25 mL de milieu M9 xylose 0.5 % à  $DO_{600} = 0.2$ . Les cellules ont été mises en culture à 37°C jusqu'à l'obtention d'une  $DO_{600} \sim 0.6-0.8$ .

#### a. Analysées en cytométrie

La culture de 25 mL a été séparée en cultures individuelles de 3 mL dans des tubes de culture en verre de 12 mL, induites avec l'inducteur désiré ou son contre-ion. Les échantillons prélevés ont été dilués à une  $DO_{600} 0.1$ .

Le criblage de la collection KEIO a été effectué dans les mêmes conditions, mais la culture a été séparée en diverses sous-cultures de 200  $\mu$ L, transvasées dans une microplaque 96 puits avant d'être induites et incubées à 37°C.

#### b. Analysées au spectrofluoromètre

Un échantillon de la culture a été prélevé, centrifugé (1500 g pendant 5min), puis le culot cellulaire a été resuspendu dans un tampon PBS à  $DO_{600} \approx 1$ . La culture a ensuite été préincubée 30min à température ambiante avec l'inducteur désiré ou son contre-ion, avant de commencer la cinétique avec le spectrofluoromètre.

### 3.4 Pour la polymérisation *in vivo*

Plusieurs clones des souches transformées avec les plasmides d'intérêt ont été mises en culture dans 3 mL de LB + ampicilline, dans un tube en verre de 12 mL, incubés à 37°C pendant une nuit. Cette préculture a servi à inoculer 3 mL de LB glucose 2 g/L + ampicilline, en présence de monomères ou contre-ions si approprié. Les cultures ont ensuite été incubées à 37°C pendant 48h avant d'être analysées. Le traitement des cellules est détaillé en III.2. Pour l'analyse en SEC et en RMN, effectuée par le LCPO, l'extraction à consister à incuber le culot cellulaire lyophilisé issu de la centrifugation des 3 mL de culture après 48h avec 2 mL de chloroforme, incubés à 60°C pendant 48h, puis séchés.

### 3.5 Pour la surproduction de protéines

Les souches d'*E. coli* BL21 DE3 transformées avec les plasmides portant les gènes codant pour les enzymes d'intérêt ont été mises en culture dans 10 mL de LB supplémenté avec l'antibiotique approprié, pendant une nuit. 2 mL de cette culture saturée ont ensuite servi à inoculer 100 mL de LB + Ab, afin d'obtenir une  $DO_{600} \approx 0.05$ . Les cellules ont été mises en culture jusqu'à l'obtention d'une  $DO_{600}$  de 0.5-0.7. Sauf mention contraire, 1 mM d'IPTG a servi à induire la production des protéines. Les cultures ont ensuite été remises

en incubation à 37°C pendant 4 h, sauf indication contraire. Au terme de ces 4 h, les cultures ont été transférées dans deux tubes de 50 mL (Falcon), et centrifugées à 4000 g pendant 15min. Le surnageant a été débarrassé et les culots cellulaires ont été conservés à -20°C ou utilisés immédiatement.

## 4. Biochimie des protéines

### 4.1 Purification des protéines

Les culots cellulaires obtenus précédemment ont été resuspendus dans un tampon de lyse 50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl et 5 mM imidazole pH 7.5. Les cellules ont ensuite été lysées par sonication avec Model 505 Sonic Dismembrator de Fisherbrand™, équipé d'une sonde 3 mm, tout en étant maintenue sur glace. Le programme de sonication utilisé était le suivant : 15s de sonication, 30s de repos répété huit fois. Un échantillon de lysat clair a été prélevé pour analyse en SDS-PAGE. Le lysat a ensuite été centrifugé à 20 000 g pendant 20min à 4°C. La fraction soluble a été récupérée et un échantillon conservé pour analyse en SDS-PAGE. Le culot obtenu dans le même temps a été conservé lors de certaines purifications pour une analyse ultérieure.

Les protéines ont ensuite été purifiées par chromatographie d'affinité grâce à une résine de cobalt (His SpinTrap de Cytiva). Toutes les centrifugations intervenant lors de la chromatographie d'affinité ont été effectuées à 700 g pendant 1 mn. 100 µL de résine ont été équilibrés avec 500 µL de lyse, puis la colonne a été centrifugée. Le lysat clair précédemment obtenu a été appliqué à la résine et la colonne disposée sur un agitateur rotatif (22 RPM), pendant 30 min à température ambiante. La colonne a ensuite été centrifugée, et deux fois 500 µL de tampon de lavage (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole pH 7.5) ont été appliqués. Après centrifugation, la résine a été mise en contact avec 400 µL de tampon d'éluion (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 200 mM imidazole pH 7.5), puis centrifugée. Des échantillons ont été prélevés après chaque étape pour analyser la fraction non fixée, les lavages et l'éluion.

L'éluion obtenue a ensuite été dessalée et débarrassée de l'imidazole qu'elle contenait par filtration (Amicon® Ultra 0.5 mL, seuil de 30 kDa, Millipore). Elle a pour cela été diluée deux fois afin de contenir une concentration de 100 mM d'imidazole maximum comme préconisé par le fabricant. Le filtre a été équilibré avec 500 µL de tampon HEPES 50 mM pH 7.5 et centrifugé à 20 000 g pendant 5 min. L'éluion diluée a ensuite été appliquée sur le filtre et concentrée par centrifugation. Les protéines ont ensuite été successivement diluées et concentrées jusqu'à ce que la concentration en imidazole soit inférieure à 1 mM. L'enzyme purifiée a été directement analysée sur gel et utilisée pour la caractérisation de ses constantes enzymatiques. La concentration de l'enzyme a été déterminée par la loi de Beer-Lambert grâce à la mesure de l'absorbance à 280 nm. Les caractéristiques (masse moléculaire et coefficient d'extinction molaire) sont récapitulées dans les tables ci-après.

### 4.2 Gel SDS-PAGE

Le culot correspondant à la fraction insoluble obtenu après la lyse des cellules a été resuspendu dans 5 mL de tampon de lyse auxquels a été ajouté 1 % (v/v) de TRITON X-

100. Les échantillons (10  $\mu$ L) récupérés lors de la purification ont été traités avec 2  $\mu$ L de tampon Laemmli 4X (BioRad) 200 mM dithiothreitol (DTT), et chauffé 10min à 95°C, avant d'être chargés sur un gel précoulé de polyacrylamide Mini-PROTEAN® TGX™ 4-20 % (BioRad). L'échelle de protéines précolorée PageRuler™ (10 à 180 kDa) (Thermo Scientific) a été utilisée comme référence. L'électrophorèse a été effectuée à courant constant (200 V) pendant 45min, dans un tampon Tris-Glycine-SDS 1X (BioBasic).

Le gel a ensuite été coloré dans 50 mL d'InstantBlue™ (CBS Scientific) pendant 2 h avant d'être rincé à l'eau distillée. Les photographies ont été prises avec le Chemidoc MP (BioRad), avec le protocole préenregistré dédié au bleu de coomassie.

### 4.3 Tests enzymatiques

Les poids moléculaires et coefficients d'extinction molaire des enzymes ont été calculés grâce au logiciel Protparam (Expasy).

#### a. Aldolases

Les réactions enzymatiques pour les mesures d'activité des aldolases ont été réalisées dans des microplaques 96 puits de la manière suivante. La réaction (250  $\mu$ L) contenait l'aldolase à tester (voir concentration ci-après), 20  $\mu$ g/mL de LdhA (*E. coli*) purifiée, 0.2 mM de NADH et différentes concentrations d'OHB (0 à 14 mM), dans un tampon HEPES 50 mM, KCl 50 mM et MgCl<sub>2</sub> 5 mM pH 7.5. L'oxydation du NADH ( $\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) a été suivie en temps réel à 340 nm avec un lecteur de microplaque Epoch2 (Biotek), pendant 10min à 37°C, avec une mesure toutes les 10s. L'activité a été calculée avec le poids moléculaire et le coefficient d'extinction molaire des enzymes décrits ci-après, par régression non linéaire sur le logiciel Graphpad. Les R<sup>2</sup> des régressions étaient tous supérieurs à 0.8.

**Tableau 14** : Caractéristiques moléculaires des aldolases étudiées

Aldolase	Concentration ( $\mu$ g/mL)	Poids moléculaire (Da)	Coefficient d'extinction molaire ( $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )	Composition
DgoA	79	21390	24000	Trimère
Eda	61	22284	17000	/
GarL	68	27384	22460	Hexamère
YagE	9.7	32530	21500	Tétramère
YfaU	4.5	28916	37000	Trimère
YjhH	18	32722	29000	Tétramère

#### b. Lactates oxydases

Les réactions enzymatiques pour les mesures d'activité des lactate oxydases ont été réalisées dans des microplaques 96 puits de la manière suivante. La réaction (250  $\mu$ L) contenait l'oxydase à tester (voir concentration ci-après), 50  $\mu$ M de DCPIP et différentes concentrations de lactate ou de DHB (0-100 mM), dans un tampon HEPES 50 mM, KCl 50 mM et MgCl<sub>2</sub> 5 mM pH 7.5. La réduction du DCPIP ( $\epsilon = 20\ 000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) a été suivie en temps réel à 600 nm avec un lecteur de microplaque Epoch2 (Biotek), pendant 10min à 37°C, avec une mesure toutes les 10s. L'activité a été calculée avec le poids moléculaire et le coefficient d'extinction molaire des enzymes décrits ci-après, par régression non linéaire sur le logiciel Graphpad. Les R<sup>2</sup> des régressions étaient tous supérieurs à 0.8.

**Tableau 15** : Caractéristiques moléculaires des lactate oxydases étudiées

Lactate oxydase	Concentration (µg/mL)	Poids moléculaire (Da)	Coefficient d'extinction molaire (M <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> )	Composition
Dld	1.18	64612	62000	Monomère
LldD	2	42728	55000	Monomère
YkgF	1	53052	58000	Monomère

### c. Racémases

Les réactions enzymatiques pour l'estimation de la capacité des racémases d'*E. coli* à convertir le L-DHB en D-DHB ont été réalisées dans des tubes en verre. La réaction (500 µL) contenait la racémase à tester (voir concentration ci-après), 10 mM de substrat naturel ou 20 mM de DHB, dans un tampon Tris-HCl pH8. La réaction a été incubée toute une nuit à 37°C. Les réactions ont été stoppées par incubation à 95°C pendant 10min avant d'être analysées en HPLC.

Racémase	Concentration (µg/mL)
Alr	279.6
DadX	36.6
MetC	352.8
Murl	91.2
RspA	51
YgeA	262.5

### d. Malate/2-hydroxyacide déshydrogénases

Les réactions enzymatiques pour les mesures d'activité de DmlA et des 2-hydroxyacide déshydrogénases ont été réalisées dans des microplaques 96 puits de la manière suivante. La réaction (250 µL) contenait l'enzyme à tester (voir concentration ci-après), 0.2 mM de NADH et différentes concentrations de D-malate (0-10 mM, pour DmlA) ou d'OHB (0-32 mM pour DmlA, 0-5 mM pour les HADH), dans un tampon HEPES 50 mM, KCl 50 mM et MgCl<sub>2</sub> 5 mM pH 7.5. L'oxydation du NADH ( $\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ) a été suivie en temps réel à 340 nm avec un lecteur de microplaque Epoch2 (Biotek), pendant 10min à 37°C, avec une mesure toutes les 10s. L'activité a été calculée avec le poids moléculaire et le coefficient d'extinction molaire des enzymes décrits ci-après, par régression non linéaire sur le logiciel Graphpad. Les R<sup>2</sup> des régressions étaient tous supérieurs à 0.8.

**Tableau 16** : Caractéristiques moléculaires des déshydrogénases étudiées

Enzyme	Concentration (µg/mL)	Poids moléculaire (Da)	Coefficient d'extinction molaire (M <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> )	Composition
DmlA	7	40315	59000	Monomère
HADH OO	1.2	37381	31400	
HADH WC	1.2	37427	35870	

Le test de leur capacité à produire du D-DHB a été réalisée dans un tube en verre. Pour les HADH, la même réaction que pour la mesure des constantes enzymatiques a été réalisée, dans un volume de 2 mL. Pour DmlA, la réaction (4.5 mL) contenait 0.5 mM de NADH, 0.75 mM d'OHB, 1 mg d'enzyme dans un tampon HEPES 50 mM, KCl 50 mM et MgCl<sub>2</sub> 5 mM pH 7.5. Les réactions ont été suivies en parallèle en temps réel par l'oxydation

du NADH à 340 nm, et lorsque la DO<sub>340</sub> devenait stable, 0.5 mM de NADH ont été rajoutés. Cette dernière étape a été répétée une fois. Les réactions ont ensuite été stoppées à 95°C pendant 10min avant d'être analysées en HPLC.

#### e. CoA-transférases

Pour les tests utilisant le réactif d'Ellman (Ellman, 1959), les réactions enzymatiques pour les mesures d'activité des acyl-CoA transférases ont été réalisées dans des microtubes 1.5 mL de la manière suivante. La réaction (1 mL) contenait l'enzyme à tester (15 µg), 0.2 mM d'acétyl-CoA et différentes concentrations de substrat (butyrate 0-5 mM, DHB 0-100 mM), dans un tampon HEPES 50 mM, KCl 50 mM et MgCl<sub>2</sub> 5 mM pH 7.5. Les réactions ont été incubées à 37°C pendant 15 min, et un échantillon (100 µL) a été prélevé toutes les trois minutes et immédiatement dénaturé pendant 10 min à 95°C. Les échantillons prélevés ont ensuite été mis en présence de 100 µL d'une solution contenant 1 mM d'oxaloacétate, 1 mM de DTNB, 1 mM d'EDTA et 0.04 U de citrate synthase commerciale, dans un tampon sodium phosphate pH 8 et incubée à 37°C. L'absorbance du TNB libre ( $\epsilon = 14\ 150\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) ainsi produit a été mesurée à 412 nm sur un spectrophotomètre UV-Vis Agilent Cary 3500 (Agilent).

Les tests mesurant l'oxydation du NADH ( $\epsilon = 6220\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) contenaient 15 µg de transférase, 0.3 mM d'ATP, 1 mM de PEP, 0.2 mM de NADH, 0.2 mM d'acétyl-CoA, 1 µL de mélange de pyruvate kinase (0.8 U) et lactate déshydrogénase (1 U) commercial et 7 µg d'acétate kinase d'*E. coli* purifiée dans un tampon HEPES 50 mM, KCl 50 mM et MgCl<sub>2</sub> 5 mM pH 7.5. La réaction a été incubée à 37°C et initiée par l'ajout de différentes concentrations de substrat (0 à 100 mM de DHB). L'oxydation du NADH a été suivie en temps réel à 340 nm avec un lecteur de microplaque Epoch2 (Biotek), pendant 10min à 37°C, avec une mesure toutes les 10s. L'activité a été calculée avec le poids moléculaire et le coefficient d'extinction molaire des enzymes décrits ci-après, par régression non linéaire sur le logiciel Graphpad. Les R<sup>2</sup> des régressions étaient tous supérieurs à 0.8.

**Tableau 17** : Caractéristiques moléculaires des PCT étudiées

PCT	Concentration (µg/mL)	Poids moléculaire (Da)	Coefficient d'extinction molaire (M <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> )	Composition
<i>R. eutropha</i>	61	57012	41500	Tétramère
<i>M. elsdenii</i>	73	55654	35027	Tétramère
<i>C. kluyveri</i>	60	47123	26500	Tétramère

#### f. Couplage de transaminase et déshydrogénase

Les tests pour l'estimation de la capacité de la Mdh5Q et de DmlA à produire du D-DHB ont aussi été réalisés à partir d'homosérine par le couplage d'une activité transaminase. Les réactions contenaient 20 µg d'AlaC A142P:Y275D purifiée, 250 µg de Mdh5Q ou 1 mg de DmlA, 0.1 mM NADH, 1 mM NAD, 0.1 mM pyridoxal-5-phosphate (PLP), 20 mM L-homosérine, 1 mM α-cétoglutarate et 2 U/mL de glutamate déshydrogénase commerciale, dans un tampon HEPES 50 mM, KCl 50 mM et MgCl<sub>2</sub> 5 mM pH 7.5. Les réactions ont été incubées toute la nuit à 37°C puis ont été stoppées par chauffage à 95°C pendant 10min, avant d'être analysées en HPLC.

## 5. Analyse de la fluorescence

## 5.1 Produite par le biosenseur

L'analyse de la fluorescence dans les expérimentations du biosenseur d'OHB a été réalisée en cytométrie de flux ou en spectrofluorométrie.

Le cytomètre employé était un BD Accuri™ C6 Plus, équipé d'un bras AutoSampler (BD Biosciences), et sur les quatre lasers utilisés, trois étaient bleus, et un rouge. Le cytomètre a été calibré à l'aide billes de calibration CS&T RUOS Beads. La fluorescence des échantillons obtenus (III.3.3.a) a été mesurée par l'excitation de la SYFP2 à 488 nm, et l'intermédiaire du filtre 1 (533/30 nm), conformément aux caractéristiques de la SYFP2 (excitation maximale 515 nm, émission maximale 527 nm). Le flux de cellule était réglé sur « bas », le seuil de détection fixé en SSC à 10 000 et la limite d'évènement fixée à 100 000. Les échantillons de cellule ont été dilués à une DO<sub>600</sub> de 0.1 avant d'être analysés. Le passage de chacun des échantillons était entrecoupé par le passage d'un échantillon de FACS Clean 1X (BD Biosciences), et d'un échantillon d'eau MilliQ, dont le flux était réglé sur rapide, pendant 30s. Les graphiques utilisés pour l'interprétation de la fluorescence faisaient intervenir le nombre de cellules en fonction de la fluorescence mesurée. Une fenêtre d'analyse délimitait le pic de fluorescence principal et a permis l'élimination du bruit de fond généré non spécifiquement, par les poussières présentes dans l'échantillon. La valeur de la fluorescence représente la fluorescence moyenne « mean » contenue dans cette fenêtre.

Le spectrofluoromètre employé pour l'analyse de la fluorescence était un Enspire 2300 (Perkin). Les analyses des échantillons obtenus (III.3.3.b) ont été effectuées dans une plaque 96 puits pendant 24 h à 37°C. L'excitation de la SYFP2 a été effectuée à 515 nm et la mesure de la fluorescence émise à 527 nm. La valeur obtenue a pu être directement utilisée pour l'interprétation des résultats.

## 5.2 Produite par le rouge du Nil

L'interaction entre le NR et les polymères produits (III.3.4) ont été analysés en microscopie à fluorescence et en cytométrie. L'émission maximale du NR est fixée à 559 nm et l'émission maximale à 635 nm.

Les cellules destinées à une observation en microscopie ont été prélevées de la culture (3 µL) et directement mélangées avec 1 µL de NR (0.5 mg/mL dans du DMSO). Le microscope à fluorescence employée était un Keyence BZ-X810, équipé d'objectifs x10 (BZ-PA10), x40 (BZ-PA40) et x100 (BZ-PA100), ainsi que d'un filtre à lumière blanche (OP-87767) et d'un filtre TexasRed (OP-87765) pour l'observation en fluorescence (excitation 560/40 nm, filtre d'analyse 630/75 nm).

Les cellules destinées à une analyse en cytométrie ont été préparées de la manière suivante, adaptée de Lagares Jr. & Valverde, 2017, sauf mention contraire : 0.4 unités de DO a été prélevée et centrifugée à 4000 g pendant 5 min. Le surnageant a été débarrassé et le culot repris dans 1 mL d'éthanol 50 % (v/v) dans du PBS 1X (BioBasic), et incubés pendant 10 min. Le TSE utilisé lors des tests de cytométrie contenait 10 mM de Tris-HCl (pH 7.5), 20 % (m/v) de sucrose et 2.5 mM d'EDTA (Tyo *et al*, 2006). Les cellules ont été centrifugées puis reprises dans du PBS contenant 3 µg/mL de NR. Après 30 minutes d'incubation, les cellules ont été analysées en cytométrie de flux. Le cytomètre de flux

employé était un SONY SH800, calibré avec les billes de calibration Automatic Setup Beads (SONY), et avec une puce de tri Sorting Chip-100  $\mu\text{m}$ . La longueur d'onde d'excitation du laser était réglée sur 488 nm, le seuil de détection fixé en FSC à 0.02 % pour une limite de 100 000 évènements. Le gain était réglé à 4 en FSC, 30.5 % en BSC et 50 % sur le filtre d'analyse FL2 (585/30 nm). La pression des échantillons était réglée à 2 (3000 évènements/s). Une fenêtre d'analyse a été fixée autour du pic de fluorescence afin d'éliminer la fluorescence non spécifique, due aux poussières présentes. La valeur obtenue est une valeur moyenne « mean » de la fluorescence dans cette fenêtre.

### III. Biochimie analytique

#### 1. **Quantification des acides organiques en HPLC**

La quantification des acides organiques et des sucres a été effectuée par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) sur une Vanquish (Thermo Fisher), connectée à un détecteur RI (RID 10A, Shimadzu) et un détecteur UV/VIS (SPD-20A, Shimadzu). La séparation des acides organiques a été effectuée avec une colonne chromatographique Rezex ROA Organics Acid H+ 8 % 300x7.8 mm (Phenomenex 1132-079), couplée à une colonne de garde Security Guard Cartridges carbo-H 4x3.0 mm Id (Phenomenex AJO-4490). La phase mobile était constituée de 0.5 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$  réglée à un flux de 0.5 mL/min, la température du four colonne était réglée à 80°C et la longueur d'onde du détecteur UV à 205 nm.

La résolution chirale a été effectuée sur la même machine avec une colonne chromatographique Chirex® 3126 (D)-penicillamine 150\*4,6 mm (Phenomenex OOB-3126-EO) couplée à une colonne de garde LC Gurad column Chirex® 3126 (D)-penicillamine 30\*4,6 mm (Phenomenex 03A-3126-EO). La phase mobile était composée de 2 mM  $\text{CuSO}_4$  et 15 % (v/v) méthanol, réglée à 0.8 mL/min, la température du four colonne était maintenue à 25°C, et le détecteur UV réglé à 254 nm.

#### 2. **Quantification des polymères intracellulaires en GC**

La quantité de monomères incorporés dans les polymères synthétisés dans les cellules a été déterminée en chromatographie gazeuse en utilisant des échantillons de cellules lyophilisées méthanolysées, comme décrit précédemment (Juengert *et al*, 2018). Approximativement 50 mg de cellules lyophilisées ont été méthanolysées dans 2 mL d'un mélange 15:85 % (v/v) d'acide sulfurique/méthanol et 2 mL de chloroforme à 100°C pendant 140min. Après refroidissement, 1 mL d'eau MilliQ a été ajouté et le mélange a été mis de côté jusqu'à séparation des phases. Une portion de la phase inorganique (chloroforme) a été analysée en GC (GC-2030, Shimadzu, Kyoto, Japon), équipée d'un détecteur à flamme d'ionisation (FID). La forme méthyl-ester du 3HB dérivé du P(3HB) a pu être détectée.

## Références bibliographiques

- Aceti DJ & Ferry JG (1988) Purification and characterization of acetate kinase from acetate-grown *Methanosarcina thermophila*. Evidence for regulation of synthesis. *Journal of Biological Chemistry* 263: 15444–15448
- Agus J, Kahar P, Abe H, Doi Y & Tsuge T (2006) Molecular weight characterization of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] synthesized by genetically engineered strains of *Escherichia coli*. *Polymer Degradation and Stability* 91: 1138–1146
- Al-Yassir N, Siddiqui MA, Saeed MR, Aitani AM, Al-Khattaf SS, Alzenaidi AS & Guggilla VS (2017) Methods for producing ethylene and propylene from naphtha.
- Arsenault P, Wobbe K & Weathers P (2008) Recent Advances in Artemisinin Production Through Heterologous Expression. *CMC* 15: 2886–2896
- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, *et al* (2000) Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nat Genet* 25: 25–29
- Azimi B, Nourpanah P, Rabiee M & Arbab S (2014) Poly ( $\epsilon$ -caprolactone) Fiber: An Overview. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics* 9: 155892501400900
- Baba T, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M, Datsenko KA, Tomita M, Wanner BL & Mori H (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* 2
- Baekeland LH (1909) Method of making insoluble products of phenol and formaldehyde. (Brevet)
- Bailey JE (1991) Toward a Science of Metabolic Engineering. *Science* 252: 1668–1675
- Bañares AB, Valdehuesa KNG, Ramos KRM, Nisola GM, Lee W-K & Chung W-J (2019) Discovering a novel d-xylonate-responsive promoter: the PyjH-driven genetic switch towards better 1,2,4-butanetriol production. *Appl Microbiol Biotechnol* 103: 8063–8074
- Beber ME, Gollub MG, Mozaffari D, Shebek KM, Flamholz AI, Milo R & Noor E (2022) eQuilibrator 3.0: a database solution for thermodynamic constant estimation. *Nucleic Acids Research* 50: D603–D609
- Bhattarai A, Ali AS, Kachur SP, Mårtensson A, Abbas AK, Khatib R, Al-mafazy A, Ramsan M, Rotllant G, Gerstenmaier JF, *et al* (2007) Impact of Artemisinin-Based Combination Therapy and Insecticide-Treated Nets on Malaria Burden in Zanzibar. *PLoS Med* 4: e309
- Bhubalan K, Rathi D-N, Abe H, Iwata T & Sudesh K (2010) Improved synthesis of P(3HB-co-3HV-co-3HHx) terpolymers by mutant *Cupriavidus necator* using the PHA synthase gene of *Chromobacterium* sp. USM2 with high affinity towards 3HV. *Polymer Degradation and Stability* 95: 1436–1442
- Biovyn (2022) Biovyn - Bio-sourcing. *INEOS Inovyn*
- Bomtempo J-V, Chaves Alves F & De Almeida Oroski F (2017) Developing new platform chemicals: what is required for a new bio-based molecule to become a platform chemical in the bioeconomy? *Faraday Discuss* 202: 213–225



- Boontip T, Waditee-Sirisattha R, Honda K & Napathorn SC (2021) Strategies for Poly(3-hydroxybutyrate) Production Using a Cold-Shock Promoter in *Escherichia coli*. *Front Bioeng Biotechnol* 9: 666036
- Bossu J, Angellier-Coussy H, Totee C, Matos M, Reis M & Guillard V (2020) Effect of the Molecular Structure of Poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate) (P(3HB-3HV)) Produced from Mixed Bacterial Cultures on Its Crystallization and Mechanical Properties. *Biomacromolecules* 21: 4709–4723
- Bouatra S, Aziat F, Mandal R, Guo AC, Wilson MR, Knox C, Bjorndahl TC, Krishnamurthy R, Saleem F, Liu P, *et al* (2013) The Human Urine Metabolome. *PLoS ONE* 8: e73076
- Bouzon M, Perret A, Loreau O, Delmas V, Perchat N, Weissenbach J, Taran F & Marlière P (2017) A Synthetic Alternative to Canonical One-Carbon Metabolism. *ACS Synth Biol* 6: 1520–1533
- Brandl H, Gross RA, Lenz RW & Fuller RC (1988) *Pseudomonas oleovorans* as a Source of Poly( $\beta$ -Hydroxyalkanoates) for Potential Applications as Biodegradable Polyesters. *Appl Environ Microbiol* 54: 1977–1982
- Braskem (2021) Braskem invests US\$61 million to increase biopolymer production. *Braskem*
- Brown GK, Cromby CH, Manning NJ & Pollitt RJ (1987) Urinary organic acids in succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency: Evidence of  $\alpha$ -oxidation of 4-hydroxybutyric acid, interaction of succinic semialdehyde with pyruvate dehydrogenase and possible secondary inhibition of mitochondrial  $\beta$ -oxidation. *J of Inher Metab Disea* 10: 367–375
- Bruni GO & Terrell E (2022) A Review on the Production of C4 Platform Chemicals from Biochemical Conversion of Sugar Crop Processing Products and By-Products. *Fermentation* 8: 216
- Budde CF, Mahan AE, Lu J, Rha C & Sinskey AJ (2010) Roles of Multiple Acetoacetyl Coenzyme A Reductases in Polyhydroxybutyrate Biosynthesis in *Ralstonia eutropha* H16. *J Bacteriol* 192: 5319–5328
- Castro-Aguirre E, Iñiguez-Franco F, Samsudin H, Fang X & Auras R (2016) Poly(lactic acid)—Mass production, processing, industrial applications, and end of life. *Advanced Drug Delivery Reviews* 107: 333–366
- Chassagnole C, Raïs B, Quentin E, Fell DA & Mazat J-P (2001) An integrated study of threonine-pathway enzyme kinetics in *Escherichia coli*. *Biochemical Journal* 356: 415–423
- Chek MF, Kim S-Y, Mori T, Arsad H, Samian MR, Sudesh K & Hakoshima T (2017) Structure of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase PhaC from *Chromobacterium* sp. USM2, producing biodegradable plastics. *Sci Rep* 7: 5312
- Chen G-Q, Hajnal I, Wu H, Lv L & Ye J (2015) Engineering Biosynthesis Mechanisms for Diversifying Polyhydroxyalkanoates. *Trends in Biotechnology* 33: 565–574
- Chen Y & Nielsen J (2016) Biobased organic acids production by metabolically engineered microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology* 37: 165–172

- Cherepanov PP & 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
- Chojnacka K, Moustakas K & Witek-Krowiak A (2020) Bio-based fertilizers: A practical approach towards circular economy. *Bioresource Technology* 295: 122223
- Chubukov V, Mukhopadhyay A, Petzold CJ, Keasling JD & Martín HG (2016) Synthetic and systems biology for microbial production of commodity chemicals. *npj Syst Biol Appl* 2: 16009
- Chung CT, Niemela SL & Miller RH (1989) One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2172–2175
- Clark J (2002) THE HABER PROCESS. *ChemGuide*
- Cleusix V, Lacroix C, Vollenweider S, Duboux M & Le Blay G (2007) Inhibitory activity spectrum of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* against intestinal bacteria. *BMC Microbiol* 7: 101
- Coates GW & Getzler YDYL (2020) Chemical recycling to monomer for an ideal, circular polymer economy. *Nat Rev Mater* 5: 501–516
- Copley SD, Newton MS & Widney KA (2023) How to Recruit a Promiscuous Enzyme to Serve a New Function. *Biochemistry* 62: 300–308
- Cox GB, Newton NA, Gibson F, Snoswell AM & Hamilton JA (1970) The function of ubiquinone in *Escherichia coli*. *Biochemical Journal* 117: 551–562
- Cox MM (1983) The FLP protein of the yeast 2- $\mu$ m plasmid: Expression of a eukaryotic genetic recombination system in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*: 5
- Cox N (2021) Suivi en temps réel d'extraits cellulaires par RMN pour comprendre et optimiser les systèmes métaboliques : étude du contrôle exercé par les cofacteurs sur le métabolisme central d'*Escherichia coli* (Thèse).
- Cronan JE, Littel KJ & Jackowski S (1982) Genetic and biochemical analyses of pantothenate biosynthesis in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 149: 916–922
- D'Ari R & Casadesús J (1998) Underground metabolism. *Bioessays* 20: 181–186
- Datsenko KA & Wanner BL (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 6640–6645
- Demeneix BA (2020) How fossil fuel-derived pesticides and plastics harm health, biodiversity, and the climate. *The Lancet Diabetes & Endocrinology* 8: 462–464
- Desguin B, Goffin P, Viaene E, Kleerebezem M, Martin-Diaconescu V, Maroney MJ, Declercq J-P, Soumillion P & Hols P (2014) Lactate racemase is a nickel-dependent enzyme activated by a widespread maturation system. *Nat Commun* 5: 3615
- Desguin B, Urdiain-Arraiza J, Da Costa M, Fellner M, Hu J, Hausinger RP, Desmet T, Hols P & Soumillion P (2020) Uncovering a superfamily of nickel-dependent hydroxyacid racemases and epimerases. *Sci Rep* 10: 18123

- Doi Y (1995) Microbial synthesis, physical properties, and biodegradability of polyhydroxyalkanoates. *Macromol Symp* 98: 585–599
- Doi Y, Kitamura S & Abe H (1995) Microbial Synthesis and Characterization of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Macromolecules* 28: 4822–4828
- Domenech J & Ferrer J (2006) A new d-2-hydroxyacid dehydrogenase with dual coenzyme-specificity from *Haloferax mediterranei*, sequence analysis and heterologous overexpression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1760: 1667–1674
- Doublet P, Van Heijenoort J, Bohin JP & Mengin-Lecreulx D (1993) The murI gene of *Escherichia coli* is an essential gene that encodes a glutamate racemase activity. *J Bacteriol* 175: 2970–2979
- Dym O, Pratt EA, Ho C & Eisenberg D (2000) The crystal structure of D- lactate dehydrogenase, a peripheral membrane respiratory enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 9413–9418
- EcoCyc, consulté en Août 2023
- Ellman GL (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 82: 70–77
- Eroğlu MS, Hazer B, Ozturk T & Caykara T (2005) Hydroxylation of pendant vinyl groups of poly(3-hydroxy undec-10-enoate) in high yield. *J Appl Polym Sci* 97: 2132–2139
- Escoubas JM, Lane D & Chandler M (1994) Is the IS1 transposase, InsAB', the only IS1-encoded protein required for efficient transposition? *J Bacteriol* 176: 5864–5867
- Farmer TJ & Mascal M (2015) Platform Molecules. In *Introduction to Chemicals from Biomass*, Clark J & Deswarte F (eds) pp 89–155. Wiley
- Fernandez Pales A & Levi P (2018) The Future of Petrochemicals International Energy Agency (Brevet)
- Fiedler S, Steinbüchel A & Rehm BHA (2000) PhaG-Mediated Synthesis of Poly(3-Hydroxyalkanoates) Consisting of Medium-Chain-Length Constituents from Nonrelated Carbon Sources in Recombinant *Pseudomonas fragi*. *Appl Environ Microbiol* 66: 2117–2124
- Frazão C, Topham CM, Malbert Y, François JM & Walther T (2018a) Rational engineering of a malate dehydrogenase for microbial production of 2,4-dihydroxybutyric acid via homoserine pathway. *Biochemical Journal* 475: 3887–3901
- Frazão CJR, Wagner N, Rabe K & Walther T (2023) Construction of a synthetic metabolic pathway for biosynthesis of 2,4-dihydroxybutyric acid from ethylene glycol. *Nat Commun* 14: 1931
- Frazão CR, Maton V, François JM & Walther T (2018b) Development of a Metabolite Sensor for High-Throughput Detection of Aldehydes in *Escherichia Coli*. *Front Bioeng Biotechnol* 6: 118

- Frazão, Trichez D, Serrano-Bataille H, Dagkesamanskaia A, Topham CM, Walther T & François JM (2019) Construction of a synthetic pathway for the production of 1,3-propanediol from glucose. *Sci Rep* 9: 11576
- Fukui T & Doi Y (1997) Cloning and analysis of the poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) biosynthesis genes of *Aeromonas caviae*. *J Bacteriol* 179: 4821–4830
- Futai M (1973) Membrane D-lactate dehydrogenase from *Escherichia coli*. Purification and properties. *Biochemistry* 12: 2468–2474
- Futai M & Kimura H (1977) Inducible membrane-bound L-lactate dehydrogenase from *Escherichia coli*. Purification and properties. *Journal of Biological Chemistry* 252: 5820–5827
- Galeon W, Schoenthal & Lynn H. Slaugh (1986) Methanol synthesis catalyst. (Brevet)
- Gao Y, Lim HG, Verkler H, Szubin R, Quach D, Rodionova I, Chen K, Yurkovich JT, Cho B-K & Palsson BO (2021) Unraveling the functions of uncharacterized transcription factors in *Escherichia coli* using ChIP-exo. *Nucleic Acids Research* 49: 9696–9710
- Gerngross TU, Snell KD, Peoples OP, Sinskey AJ, Csuhai E, Masamune S & Stubbe J (1994) Overexpression and Purification of the Soluble Polyhydroxyalkanoate Synthase from *Alcaligenes eutrophus*: Evidence for a Required Posttranslational Modification for Catalytic Activity. *Biochemistry* 33: 9311–9320
- Glasner ME, Truong DP & Morse BC (2020) How enzyme promiscuity and horizontal gene transfer contribute to metabolic innovation. *The FEBS Journal* 287: 1323–1342
- Gold V ed. (2019) The IUPAC Compendium of Chemical Terminology: The Gold Book 4th ed. Research Triangle Park, NC: International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)
- Gonzalez CF, Proudfoot M, Brown G, Korniyenko Y, Mori H, Savchenko AV & Yakunin AF (2006) Molecular Basis of Formaldehyde Detoxification: CHARACTERIZATION OF TWO S-FORMYLGLUTATHIONE HYDROLASES FROM *ESCHERICHIA COLI*, FrmB AND YeiG. *J Biol Chem* 281: 14514–14522
- Greenspan P & Fowler SD (1985) Spectrofluorometric studies of the lipid probe, Nile red. *Journal of Lipid Research* 26: 781–789
- Guarnieri MT, Chou Y-C, Salvachúa D, Mohagheghi A, St. John PC, Peterson DJ, Bomble YJ & Beckham GT (2017) Metabolic Engineering of *Actinobacillus succinogenes* Provides Insights into Succinic Acid Biosynthesis. *Appl Environ Microbiol* 83: e00996-17
- Guo F, Zhang S, Jiang Y, Xu H, Xin F, Zhang W & Jiang M (2021) Bioconversion of Methanol by Synthetic Methylo-trophy. In *One-Carbon Feedstocks for Sustainable Bioproduction*, Zeng A-P & Claassens NJ (eds) pp 149–168. Cham: Springer International Publishing
- Gupta RD (2016) Recent advances in enzyme promiscuity. *Sustain Chem Process* 4: 2

- Gutheil WG, Holmquist B & Vallee BL (1992) Purification, characterization, and partial sequence of the glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase from *Escherichia coli*: a class III alcohol dehydrogenase. *Biochemistry* 31: 475–481
- Han X, Satoh Y, Satoh T, Matsumoto K, Kakuchi T, Taguchi S, Dairi T, Munekata M & Tajima K (2011) Chemo-enzymatic synthesis of polyhydroxyalkanoate (PHA) incorporating 2-hydroxybutyrate by wild-type class I PHA synthase from *Ralstonia eutropha*. *Appl Microbiol Biotechnol* 92: 509–517
- Han X, Satoh Y, Tajima K, Matsushima T & Munekata M (2009) Chemo-enzymatic synthesis of polyhydroxyalkanoate by an improved two-phase reaction system (TPRS). *Journal of Bioscience and Bioengineering* 108: 517–523
- Hanke T, Nißh K, Noack S, Polen T, Bringer S, Sahm H, Wiechert W & Bott M (2013) Combined Fluxomics and Transcriptomics Analysis of Glucose Catabolism via a Partially Cyclic Pentose Phosphate Pathway in *Gluconobacter oxydans* 621H. *Appl Environ Microbiol* 79: 2336–2348
- Hatti-Kaul R, Törnvall U, Gustafsson L & Börjesson P (2007) Industrial biotechnology for the production of bio-based chemicals – a cradle-to-grave perspective. *Trends in Biotechnology* 25: 119–124
- Hausinger RP, Desguin B, Fellner M, Rankin JA & Hu J (2018) Nickel–pincer nucleotide cofactor. *Current Opinion in Chemical Biology* 47: 18–23
- Haveren J van, Scott EL & Sanders J (2008) Bulk chemicals from biomass. *Biofuels, Bioprod Bioref* 2: 41–57
- Hayes G, Laurel M, MacKinnon D, Zhao T, Houck HA & Becer CR (2023) Polymers without Petrochemicals: Sustainable Routes to Conventional Monomers. *Chem Rev* 123: 2609–2734
- Haywood GW, Anderson AJ & Dawes EA (1989) The importance of PHB-synthase substrate specificity in polyhydroxyalkanoate synthesis by *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiology Letters* 57: 1–6
- Hazer B & Steinbüchel A (2007) Increased diversification of polyhydroxyalkanoates by modification reactions for industrial and medical applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 74: 1–12
- He H, Höper R, Dodenhöft M, Marlière P & Bar-Even A (2020) An optimized methanol assimilation pathway relying on promiscuous formaldehyde-condensing aldolases in *E. coli*. *Metabolic Engineering* 60: 1–13
- Hein S, Söhling B, Gottschalk G & Steinbüchel A (2006) Biosynthesis of poly(4-hydroxybutyric acid) by recombinant strains of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters* 153: 411–418
- Henryon V & Monbrun J (2012) Procédé de préparation de la 2-hydroxybutyrolactone. (Brevet)
- Hernandez K, Bujons J, Joglar J, Charnock SJ, Domínguez de María P, Fessner WD & Clapés P (2017) Combining Aldolases and Transaminases for the Synthesis of 2-Amino-4-hydroxybutanoic Acid. *ACS Catal* 7: 1707–1711
- Heux S, Bergès C, Millard P, Portais J-C & Létisse F (2017) Recent advances in high-throughput <sup>13</sup>C-fluxomics. *Current Opinion in Biotechnology* 43: 104–109

- Hift Helen & Mahler HR (1952) THE ENZYMATIC CONDENSATION OF PYRUVATE AND FORMALDEHYDE. *Journal of Biological Chemistry* 198: 901–914
- Hiroe A, Sakurai T, Mizuno S, Miyahara Y, Goto S, Yamada M, Tsuge T & Taguchi S (2021) Microbial oversecretion of (R)-3-hydroxybutyrate oligomer with diethylene glycol terminal as a macromonomer for polyurethane synthesis. *International Journal of Biological Macromolecules* 167: 1290–1296
- Hoffmann GF, Meier-Augenstein W, Stöckler S, Surtees R, Rating D & Nyhan WL (1993) Physiology and pathophysiology of organic acids in cerebrospinal fluid. *J of Inher Metab Disea* 16: 648–669
- Hong K-K, Kim JH, Yoon JH, Park H-M, Choi SJ, Song GH, Lee JC, Yang Y-L, Shin HK, Kim JN, *et al* (2014) *O*-Succinyl- L -homoserine-based C4-chemical production: succinic acid, homoserine lactone,  $\gamma$ -butyrolactone,  $\gamma$ -butyrolactone derivatives, and 1,4-butanediol. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 41: 1517–1524
- Huong K-H, Sevakumaran V & Amirul AA (2021) P(3HB-*co*-4HB) as high value polyhydroxyalkanoate: its development over recent decades and current advances. *Critical Reviews in Biotechnology* 41: 474–490
- iGem registry Promoters/Catalog/Anderson. *Registry of Standard Biological Parts*
- Insomphun C, Chuah J-A, Kobayashi S, Fujiki T & Numata K (2017) Influence of Hydroxyl Groups on the Cell Viability of Polyhydroxyalkanoate (PHA) Scaffolds for Tissue Engineering. *ACS Biomater Sci Eng* 3: 3064–3075
- Insomphun C, Kobayashi S, Fujiki T & Numata K (2016) Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates containing hydroxyl group from glycolate in *Escherichia coli*. *AMB Expr* 6: 29
- Izui K, Taguchi M, Morikawa M & Katsuki H (1981) Regulation of *Escherichia coli* Phosphoenolpyruvate Carboxylase by Multiple Effectors In Vivo. II. Kinetic Studies with a Reaction System Containing Physiological Concentrations of Ligands1. *The Journal of Biochemistry* 90: 1321–1331
- Jakobs C, Jaeken J & Gibson KM (1993) Inherited disorders of GABA metabolism. *J of Inher Metab Disea* 16: 704–715
- Jang Y-S, Kim B, Shin JH, Choi YJ, Choi S, Song CW, Lee J, Park HG & Lee SY (2012) Bio-based production of C2-C6 platform chemicals. *Biotechnol Bioeng* 109: 2437–2459
- Janßen H & Steinbüchel A (2014) Fatty acid synthesis in *Escherichia coli* and its applications towards the production of fatty acid based biofuels. *Biotechnol Biofuels* 7: 7
- Jeong Y-J, Seo P-W, Seo M-J, Ju S-B, Kim J-S & Yeom S-J (2023) One-Pot Biosynthesis of 2-Keto-4-hydroxybutyrate from Cheap C1 Compounds Using Rationally Designed Pyruvate Aldolase and Methanol Dehydrogenase. *J Agric Food Chem* 71: 4328–4336
- 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

- Jossek R & Steinbüchel A (1998) In vitro synthesis of poly(3-hydroxybutyric acid) by using an enzymatic coenzyme A recycling system. *FEMS Microbiology Letters* 168: 319–324
- Juengert J, Bresan S & Jendrossek D (2018) Determination of Polyhydroxybutyrate (PHB) Content in *Ralstonia eutropha* Using Gas Chromatography and Nile Red Staining. *BIO-PROTOCOL* 8
- Kang L, Shaw AC, Xu D, Xia W, Zhang J, Deng J, Wo ldike HF, Liu Y & Su J (2011) Upregulation of MetC Is Essential for D-Alanine-Independent Growth of an *alr/dadX*-Deficient *Escherichia coli* Strain. *Journal of Bacteriology* 193: 1098–1106
- Karan H, Funk C, Grabert M, Oey M & Hankamer B (2019) Green Bioplastics as Part of a Circular Bioeconomy. *Trends in Plant Science* 24: 237–249
- Kataoka N, Vangnai AS, Pongtharangkul T, Yakushi T & Matsushita K (2017) Production of 1,3-diols in *Escherichia coli*. *Bioresource Technology* 245: 1538–1541
- Kawaguchi A, YOSHIMURA T & Okuda S (1981) A New Method for the Preparation of Acyl-CoA Thioesters1. *The Journal of Biochemistry* 89: 337–339
- Kawaguchi H, Hasunuma T, Ogino C & Kondo A (2016) Bioprocessing of bio-based chemicals produced from lignocellulosic feedstocks. *Current Opinion in Biotechnology* 42: 30–39
- Kazlauskas RJ (2005) Enhancing catalytic promiscuity for biocatalysis. *Current Opinion in Chemical Biology* 9: 195–201
- Keseler IM, Mackie A, Santos-Zavaleta A, Billington R, Bonavides-Martínez C, Caspi R, Fulcher C, Gama-Castro S, Kothari A, Krummenacker M, *et al* (2017) The EcoCyc database: reflecting new knowledge about *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res* 45: D543–D550
- Kim Y, Choi SY, Kim J, Jin KS, Lee SY & Kim K (2017) Structure and function of the N-terminal domain of *Ralstonia eutropha* polyhydroxyalkanoate synthase, and the proposed structure and mechanisms of the whole enzyme. *Biotechnology Journal* 12: 1600649
- Kitagawa M, Ara T, Arifuzzaman M, Ioka-Nakamichi T, Inamoto E, Toyonaga H & Mori H (2006) Complete set of ORF clones of *Escherichia coli* ASKA library (A Complete Set of *E. coli* K-12 ORF Archive): Unique Resources for Biological Research. *DNA Research* 12: 291–299
- Kizer L, Pitera DJ, Pfleger BF & Keasling JD (2008) Application of Functional Genomics to Pathway Optimization for Increased Isoprenoid Production. *Appl Environ Microbiol* 74: 3229–3241
- Kohlberger M & Gadermaier G (2022) SELEX: Critical factors and optimization strategies for successful aptamer selection. *Biotech and App Biochem* 69: 1771–1792
- Kohn LD & Jakoby WB (1968) Tartaric Acid Metabolism. *Journal of Biological Chemistry* 243: 2465–2471

- Kohn LD & Kaback HR (1973) Mechanisms of Active Transport in Isolated Bacterial Membrane Vesicles. *Journal of Biological Chemistry* 248: 7012–7017
- Koller M & Rodríguez-Contreras A (2015) Techniques for tracing PHA-producing organisms and for qualitative and quantitative analysis of intra- and extracellular PHA. *Engineering in Life Sciences* 15: 558–581
- Kremers G-J, Goedhart J, Van Munster EB & Gadella TWJ (2006) Cyan and Yellow Super Fluorescent Proteins with Improved Brightness, Protein Folding, and FRET Förster Radius . *Biochemistry* 45: 6570–6580
- Krivoruchko A, Zhang Y, Siewers V, Chen Y & Nielsen J (2015) Microbial acetyl-CoA metabolism and metabolic engineering. *Metabolic Engineering* 28: 28–42
- Kucera, Novackova, Pernicova, Sedlacek, & Obruca (2019) Biotechnological Production of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-4-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) Terpolymer by *Cupriavidus* sp. DSM 19379. *Bioengineering* 6: 74
- Kusaka S, Iwata T & Doi Y (1999) Properties and biodegradability of ultra-high-molecular-weight poly[(R)-3-hydroxybutyrate] produced by a recombinant *Escherichia coli*. *International Journal of Biological Macromolecules* 25: 87–94
- Lagares Jr. A & Valverde C (2017) Quantification of Bacterial Polyhydroxybutyrate Content by Flow Cytometry. *BIO-PROTOCOL* 7
- Laird K (2023) Braskem evaluating production of bio-based polypropylene. *Sustainable Plastics*
- Lamberti FM, Román-Ramírez LA & Wood J (2020) Recycling of Bioplastics: Routes and Benefits. *J Polym Environ* 28: 2551–2571
- Lazcano A, Díaz-Villagómez E, Mills T & Oró J (1995) On the levels of enzymatic substrate specificity: Implications for the early evolution of metabolic pathways. *Advances in Space Research* 15: 345–356
- Lee H-S, Park J, Yoo YJ & Yeon YJ (2019) A novel d-2-hydroxy acid dehydrogenase with high substrate preference for phenylpyruvate originating from lactic acid bacteria: Structural analysis on the substrate specificity. *Enzyme and Microbial Technology* 125: 37–44
- Lee JW, Kim TY, Jang Y-S, Choi S & Lee SY (2011) Systems metabolic engineering for chemicals and materials. *Trends in Biotechnology* 29: 370–378
- Lee MY, Lee TS & Park WH (2001) Effect of Side Chains on the Thermal Degradation of Poly(3-hydroxyalkanoates). *Macromol Chem Phys* 202: 1257–1261
- Lee S-J, Ko J, Kang H-Y & Lee Y (2006) Coupled expression of MhpE aldolase and MhpF dehydrogenase in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 346: 1009–1015
- Lemoigne M (1926) Produit de deshydratation et de polymerisation de l'acide  $\beta$ -oxybutyrique. *Bull Soc Chim Biol* 8: 770–782
- Lepinet O & Labedan B (2005) Orphan Enzymes? *Science* 307: 42–42
- Levi PG & Cullen JM (2018) Mapping Global Flows of Chemicals: From Fossil Fuel Feedstocks to Chemical Products. *Environ Sci Technol* 52: 1725–1734



- Li A, Wang T, Tian Q, Yang X, Yin D, Qin Y & Zhang L (2021) Single-Point Mutant Inverts the Stereoselectivity of a Carbonyl Reductase toward  $\beta$ -Ketoesters with Enhanced Activity. *Chemistry A European J* 27: 6283–6294
- Li C, Zhang R, Wang J, Wilson LM & Yan Y (2020) Protein Engineering for Improving and Diversifying Natural Product Biosynthesis. *Trends in Biotechnology* 38: 729–744
- Li X, Cai Z, Li Y & Zhang Y (2015) Design and Construction of a Non-Natural Malate to 1,2,4-Butanetriol Pathway Creates Possibility to Produce 1,2,4-Butanetriol from Glucose. *Sci Rep* 4: 5541
- Li Z-J, Qiao K, Shi W, Pereira B, Zhang H, Olsen BD & Stephanopoulos G (2016) Biosynthesis of poly(glycolate-co-lactate-co-3-hydroxybutyrate) from glucose by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering* 35: 1–8
- Lindenkamp N, Schürmann M & Steinbüchel A (2013) A propionate CoA-transferase of *Ralstonia eutropha* H16 with broad substrate specificity catalyzing the CoA thioester formation of various carboxylic acids. *Appl Microbiol Biotechnol* 97: 7699–7709
- Ludwig K (1951) Production of ethylene. (Brevet)
- Luo K, Liu J, Abbay K, Mei Y, Guo X, Song Y, Guan Q & You Z (2023) The Relationships between the Structure and Properties of PA56 and PA66 and Their Fibers. *Polymers* 15: 2877
- Madison LL & Huisman GW (1999) Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 21–53
- Malfoy T, Barthe M, Auriol C & François JM Method for improving 2, 4 dihydroxybutyric acid production and yield. (Brevet)
- Mannan AA, Liu D, Zhang F & Oyarzún DA (2017) Fundamental Design Principles for Transcription-Factor-Based Metabolite Biosensors. *ACS Synth Biol* 6: 1851–1859
- Martinez S & Déziel E (2020) Changes in polyhydroxyalkanoate granule accumulation make optical density measurement an unreliable method for estimating bacterial growth in *Burkholderia thailandensis*. *Can J Microbiol* 66: 256–262
- Matsumoto K, Ishiyama A, Sakai K, Shiba T & Taguchi S (2011) Biosynthesis of glycolate-based polyesters containing medium-chain-length 3-hydroxyalkanoates in recombinant *Escherichia coli* expressing engineered polyhydroxyalkanoate synthase. *Journal of Biotechnology* 156: 214–217
- Matsumoto K, Takase K, Yamamoto Y, Doi Y & Taguchi S (2009) Chimeric Enzyme Composed of Polyhydroxyalkanoate (PHA) Synthases from *Ralstonia eutropha* and *Aeromonas caviae* Enhances Production of PHAs in Recombinant *Escherichia coli*. *Biomacromolecules* 10: 682–685
- Matsumoto K, Terai S, Ishiyama A, Sun J, Kabe T, Song Y, Nduko JM, Iwata T & Taguchi S (2013) One-Pot Microbial Production, Mechanical Properties, and Enzymatic Degradation of Isotactic P[(*R*)-2-hydroxybutyrate] and Its Copolymer with (*R*)-Lactate. *Biomacromolecules* 14: 1913–1918
- McKenna R & Nielsen DR (2011) Styrene biosynthesis from glucose by engineered *E. coli*. *Metabolic Engineering* 13: 544–554

- Mendhulkar VD & Shetye LA (2017) Synthesis of Biodegradable Polymer Polyhydroxyalkanoate (PHA) in Cyanobacteria *Synechococcus elongates* Under Mixotrophic Nitrogen- and Phosphate-Mediated Stress Conditions. *Industrial Biotechnology* 13: 85–93
- Mitra R, Xiang H & Han J (2021) Current Advances towards 4-Hydroxybutyrate Containing Polyhydroxyalkanoates Production for Biomedical Applications. *Molecules* 26: 7244
- Miyahara Y, Hiroe A, Tsuge T & Taguchi S (2019) Microbial Secretion Platform for 3-Hydroxybutyrate Oligomer and Its End-Capped Forms Using Chain Transfer Reaction-Mediated Polyhydroxyalkanoate Synthases. *Biotechnol J* 14: 1900201
- Miyamoto T, Katane M, Saitoh Y, Sekine M & Homma H (2017) Identification and characterization of novel broad-spectrum amino acid racemases from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Amino Acids* 49: 1885–1894
- Mohan N, Montazer Z, Sharma PK & Levin DB (2020) Microbial and Enzymatic Degradation of Synthetic Plastics. *Front Microbiol* 11: 580709
- Moore T, Adhikari R & Gunatillake P (2005) Chemosynthesis of bioresorbable poly( $\gamma$ -butyrolactone) by ring-opening polymerisation: a review. *Biomaterials* 26: 3771–3782
- Moreno CJ, Hernández K, Gittings S, Bolte M, Joglar J, Bujons J, Parella T & Clapés P (2023) Biocatalytic Synthesis of Homochiral 2-Hydroxy-4-butyrolactone Derivatives by Tandem Aldol Addition and Carbonyl Reduction. *ACS Catal* 13: 5348–5357
- Moreno J, Iglesias J, Blanco J, Montero M, Morales G & Melero JA (2020) Life-cycle sustainability of biomass-derived sorbitol: Proposing technological alternatives for improving the environmental profile of a bio-refinery platform molecule. *Journal of Cleaner Production* 250: 119568
- Morschbacker A (2009) Bio-Ethanol Based Ethylene. *Polymer Reviews* 49: 79–84
- Morse M-C, Liao Q, Criddle CS & Frank CW (2011) Anaerobic biodegradation of the microbial copolymer poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate): Effects of comonomer content, processing history, and semi-crystalline morphology. *Polymer* 52: 547–556
- Mukhopadhyay A (2015) Tolerance engineering in bacteria for the production of advanced biofuels and chemicals. *Trends in Microbiology* 23: 498–508
- Mutzel R & Marlière P (2004) Method and device for selecting accelerated proliferation of living cells in suspension. (Brevet)
- Nakamura CE & Whited GM (2003) Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol. *Current Opinion in Biotechnology* 14: 454–459
- Nam H, Lewis NE, Lerman JA, Lee D-H, Chang RL, Kim D & Palsson BO (2012) Network Context and Selection in the Evolution to Enzyme Specificity. *Science* 337: 1101–1104
- Nanchen A, Schicker A, Revelles O & Sauer U (2008) Cyclic AMP-Dependent Catabolite Repression Is the Dominant Control Mechanism of Metabolic Fluxes under Glucose Limitation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 190: 2323–2330

- Narmandakh A & Bearne SL (2010) Purification of recombinant mandelate racemase: Improved catalytic activity. *Protein Expression and Purification* 69: 39–46
- Newton MS, Arcus VL, Gerth ML & Patrick WM (2018) Enzyme evolution: innovation is easy, optimization is complicated. *Current Opinion in Structural Biology* 48: 110–116
- OCDE (2022) Plastic pollution is growing relentlessly as waste management and recycling fall short, says OECD. *OECD Better Policies for Better Lives*
- Ojeda T (2013) Polymers and the Environment. In *Polymer Science*, Ylmaz F (ed) InTech
- Orešič M, Hyötyläinen T, Herukka S-K, Sysi-Aho M, Mattila I, Seppänen-Laakso T, Julkunen V, Gopalacharyulu PV, Hallikainen M, Koikkalainen J, *et al* (2011) Metabolome in progression to Alzheimer's disease. *Transl Psychiatry* 1: e57–e57
- Pascouau C, Wirotius A-L, Carlotti S, Cramail H & Peruch F (2023) Functional polyesters via ring-opening copolymerization of  $\alpha$ -hydroxy- $\gamma$ -butyrolactone and  $\epsilon$ -caprolactone: La[N(SiMe<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sub>3</sub> as an efficient coordination-insertion catalyst. *European Polymer Journal* 185: 111793
- Peekhaus N, Tong S, Reizer J, Saier MH, Murray E & Conway T (2006) Characterization of a novel transporter family that includes multiple Escherichia coli gluconate transporters and their homologues. *FEMS Microbiology Letters* 147: 233–238
- Peter D, Vögeli B, Cortina N & Erb T (2016) A Chemo-Enzymatic Road Map to the Synthesis of CoA Esters. *Molecules* 21: 517
- Pinchuk GE, Rodionov DA, Yang C, Li X, Osterman AL, Dervyn E, Geydebekht OV, Reed SB, Romine MF, Collart FR, *et al* (2009) Genomic reconstruction of Shewanella oneidensis MR-1 metabolism reveals a previously uncharacterized machinery for lactate utilization. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 2874–2879
- Plastics Europe (2022) Plastics - the Facts 2022
- Rafieenia R (2014) Metabolic capabilities of Actinobacillus succinogenes for succinic acid production. *Braz J Chem Eng* 31: 859–865
- Reddy VUN, Ramanaiah SV, Reddy MV & Chang Y-C (2022) Review of the Developments of Bacterial Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoates (mcl-PHAs). *Bioengineering* 9: 225
- Rehm BHA (2003) Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *Biochemical Journal* 376: 15–33
- Rehm BHA, Krüger N & Steinbüchel A (1998) A New Metabolic Link between Fatty Acid de Novo Synthesis and Polyhydroxyalkanoic Acid Synthesis. *Journal of Biological Chemistry* 273: 24044–24051
- Reinecke F & Steinbüchel A (2009) *Ralstonia eutropha* Strain H16 as Model Organism for PHA Metabolism and for Biotechnological Production of Technically Interesting Biopolymers. *Microb Physiol* 16: 91–108
- Renard E, Poux A, Timbart L, Langlois V & Guérin P (2005) Preparation of a Novel Artificial Bacterial Polyester Modified with Pendant Hydroxyl Groups. *Biomacromolecules* 6: 891–896

- Rivera LG & Bartlett MG (2018) Chromatographic methods for the determination of acyl-CoAs. *Anal Methods* 10: 5252–5264
- Rosenboom J-G, Langer R & Traverso G (2022) Bioplastics for a circular economy. *Nat Rev Mater* 7: 117–137
- Rössle M, Kreuzsch J & Decker K (1981) Acetyl coenzyme A and coenzyme A contents of growing *Clostridium kluyveri* as determined by isotope assays. *Arch Microbiol* 130: 288–293
- Rumin J, Bonnefond H, Saint-Jean B, Rouxel C, Sciandra A, Bernard O, Cadoret J-P & Bougaran G (2015) The use of fluorescent Nile red and BODIPY for lipid measurement in microalgae. *Biotechnol Biofuels* 8: 42
- Sadhukhan S, Zhang G-F & Tochtrop GP (2014) Modular Isotopomer Synthesis of  $\gamma$ -Hydroxybutyric Acid for a Quantitative Analysis of Metabolic Fates. *ACS Chem Biol* 9: 1706–1711
- Sakowicz R, Gold M & Jones JB (1995) Partial reversal of the substrate stereospecificity of an L-lactate dehydrogenase by site-directed mutagenesis. *J Am Chem Soc* 117: 2387–2394
- Satoh K, Kawakami T, Isobe N, Pasquier L, Tomita H, Zinn M & Matsumoto K (2022) Versatile aliphatic polyester biosynthesis system for producing random and block copolymers composed of 2-, 3-, 4-, 5-, and 6-hydroxyalkanoates using the sequence-regulating polyhydroxyalkanoate synthase PhaCAR. *Microb Cell Fact* 21: 84
- Sauer M, Porro D, Mattanovich D & Branduardi P (2008) Microbial production of organic acids: expanding the markets. *Trends in Biotechnology* 26: 100–108
- Schlegel HG, Lafferty R & Krauss I (1970) The isolation of mutants not accumulating poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid. *Archiv Mikrobiol* 71: 283–294
- Schmack G, Gorenflo V & Steinbüchel A (1998) Biotechnological Production and Characterization of Polyesters Containing 4-Hydroxyvaleric Acid and Medium-Chain-length Hydroxyalkanoic Acids. *Macromolecules* 31: 644–649
- Schubert P, Steinbüchel A & Schlegel HG (1988) Cloning of the *Alcaligenes eutrophus* genes for synthesis of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid (PHB) and synthesis of PHB in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 170: 5837–5847
- Schweiger G & Buckel W (1984) On the dehydration of (*R*)-lactate in the fermentation of alanine to propionate by *Clostridium propionicum*. *FEBS Letters* 171: 79–84
- Seebeck FP & Hilvert D (2003) Conversion of a PLP-Dependent Racemase into an Aldolase by a Single Active Site Mutation. *J Am Chem Soc* 125: 10158–10159
- Sellés Vidal L, Isalan M, Heap JT & Ledesma-Amaro R (2023) A primer to directed evolution: current methodologies and future directions. *RSC Chem Biol* 4: 271–291
- Selmer T, Willanzheimer A & Hetzel M (2002) Propionate CoA-transferase from *Clostridium propionicum*: Cloning of the gene and identification of glutamate 324 at the active site. *European Journal of Biochemistry* 269: 372–380

- Sheel A & Pant D (2018) Microbial Depolymerization. In *Waste Bioremediation*, Varjani SJ Gnansounou E Gurunathan B Pant D & Zakaria ZA (eds) pp 61–103. Singapore: Springer Singapore
- Sheldon RA (2014) Green and sustainable manufacture of chemicals from biomass: state of the art. *Green Chem* 16: 950–963
- Shimada T, Momiyama E, Yamanaka Y, Watanabe H, Yamamoto K & Ishihama A (2017) Regulatory role of XynR (YagI) in catabolism of xylonate in *Escherichia coli* K-12. *FEMS Microbiology Letters* 364
- Siracusa V & Blanco I (2020) Bio-Polyethylene (Bio-PE), Bio-Polypropylene (Bio-PP) and Bio-Poly(ethylene terephthalate) (Bio-PET): Recent Developments in Bio-Based Polymers Analogous to Petroleum-Derived Ones for Packaging and Engineering Applications. *Polymers* 12: 1641
- Slater SC, Voige WH & Dennis DE (1988) Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Alcaligenes eutrophus* H16 poly-beta-hydroxybutyrate biosynthetic pathway. *J Bacteriol* 170: 4431–4436
- Spiekermann P, Rehm BHA, Kalscheuer R, Baumeister D & Steinbüchel A (1999) A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. *Archives of Microbiology* 171: 73–80
- Srere PA, Brazil H, Gonen L & Takahashi M (1963) The Citrate Condensing Enzyme of Pigeon Breast Muscle and Moth Flight Muscle. *Acta Chem Scand* 17 suppl.: 129–134
- Stadtman ER (1953) THE COENZYME A TRANSFERASE SYSTEM IN *CLOSTRIDIUM KLUYVERI*. *Journal of Biological Chemistry* 203: 501–512
- Stagner J (2016) Methane generation from anaerobic digestion of biodegradable plastics – a review. *International Journal of Environmental Studies* 73: 462–468
- Stegmann P, Londo M & Junginger M (2020) The circular bioeconomy: Its elements and role in European bioeconomy clusters. *Resources, Conservation & Recycling: X* 6: 100029
- Steinmann B, Christmann A, Heiseler T, Fritz J & Kolmar H (2010) *In Vivo* Enzyme Immobilization by Inclusion Body Display. *Appl Environ Microbiol* 76: 5563–5569
- Stuani L, Lechaplais C, Salminen AV, Ségurens B, Durot M, Castelli V, Pinet A, Labadie K, Cruveiller S, Weissenbach J, *et al* (2014) Novel metabolic features in *Acinetobacter baylyi* ADP1 revealed by a multiomics approach. *Metabolomics* 10: 1223–1238
- Sutter M, Oliveira S, Sanders NN, Lucas B, van Hoek A, Hink MA, Visser AJWG, De Smedt SC, Hennink WE & Jiskoot W (2007) Sensitive Spectroscopic Detection of Large and Denatured Protein Aggregates in Solution by Use of the Fluorescent Dye Nile Red. *J Fluoresc* 17: 181–192
- Sweeney J, Murphy CD & McDonnell K (2015) Towards an effective biosensor for monitoring AD leachate: a knockout *E. coli* mutant that cannot catabolise lactate. *Appl Microbiol Biotechnol* 99: 10209–10214

- Szilágyi A, Kun Á & Szathmáry E (2012) Early evolution of efficient enzymes and genome organization. *Biol Direct* 7: 38
- Taguchi S & Doi Y (2004) Evolution of Polyhydroxyalkanoate(PHA) Production System by“Enzyme Evolution”: Successful Case Studies of Directed Evolution. *Macromol Biosci* 4: 145–156
- Taguchi S, Maehara A, Takase K, Nakahara M, Nakamura H & Doi Y (2001) Analysis of mutational effects of a polyhydroxybutyrate (PHB) polymerase on bacterial PHB accumulation using an in vivo assay system. *FEMS Microbiology Letters* 198: 65–71
- Taguchi S, Nakamura H, Hiraishi T, Yamato I & Doi Y (2002) In Vitro Evolution of a Polyhydroxybutyrate Synthase by Intragenic Suppression-Type Mutagenesis. *Journal of Biochemistry* 131: 801–806
- Taguchi S, Yamada M, Matsumoto K, Tajima K, Satoh Y, Munekata M, Ohno K, Kohda K, Shimamura T, Kambe H, *et al* (2008a) A microbial factory for lactate-based polyesters using a lactate-polymerizing enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 17323–17327
- Taguchi S, Yamada M, Matsumoto K, Tajima K, Satoh Y, Munekata M, Ohno K, Kohda K, Shimamura T, Kambe H, *et al* (2008b) A microbial factory for lactate-based polyesters using a lactate-polymerizing enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 17323–17327
- Tajima K, Han X, Hashimoto Y, Satoh Y, Satoh T & Taguchi S (2016) In vitro synthesis of polyhydroxyalkanoates using thermostable acetyl-CoA synthetase, CoA transferase, and PHA synthase from thermotolerant bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 122: 660–665
- Tajima K, Satoh Y, Satoh T, Itoh R, Han X, Taguchi S, Kakuchi T & Munekata M (2009) Chemo-Enzymatic Synthesis of Poly(lactate- *co* -(3-hydroxybutyrate)) by a Lactate-Polymerizing Enzyme. *Macromolecules* 42: 1985–1989
- Takahashi-Íñiguez T, Aburto-Rodríguez N, Vilchis-González AL & Flores ME (2016) Function, kinetic properties, crystallization, and regulation of microbial malate dehydrogenase. *J Zhejiang Univ Sci B* 17: 247–261
- Takkellapati S, Li T & Gonzalez MA (2018) An overview of biorefinery-derived platform chemicals from a cellulose and hemicellulose biorefinery. *Clean Techn Environ Policy* 20: 1615–1630
- Thomason LC, Costantino N & Court DL (2007) *E. coli* Genome Manipulation by P1 Transduction. *CP Molecular Biology* 79
- Thompson JA, Markey SP & Fennessey PV (1975) Gas-Chromatographic/Mass-Spectrometric Identification and Quantitation of Tetrone and Deoxytetrone Acids in Urine from Normal Adults and Neonates. *Clinical Chemistry* 21: 1892–1898
- Timken HKC & Angevine PJ (1997) Production of benzene, toluene, and xylene (BTX) from FCC naphtha. (Brevet)
- Togna AP, Shuler ML & Wilson DB (1993) Effects of plasmid copy number and runaway plasmid replication on overproduction and excretion of  $\beta$ -lactamase from *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog* 9: 31–39

- Trachsel J, Bayles DO, Looft T, Levine UY & Allen HK (2016) Function and Phylogeny of Bacterial Butyryl Coenzyme A:Acetate Transferases and Their Diversity in the Proximal Colon of Swine. *Appl Environ Microbiol* 82: 6788–6798
- Tsuge T, Saito Y, Narike M, Muneta K, Normi YM, Kikkawa Y, Hiraishi T & Doi Y (2004) Mutation Effects of a Conserved Alanine (Ala510) in Type I Polyhydroxyalkanoate Synthase from *Ralstonia eutropha* on Polyester Biosynthesis. *Macromol Biosci* 4: 963–970
- Tsuge T, Taguchi K, Seiichi, Taguchi & Doi Y (2003) Molecular characterization and properties of (R)-specific enoyl-CoA hydratases from *Pseudomonas aeruginosa*: metabolic tools for synthesis of polyhydroxyalkanoates via fatty acid  $\beta$ -oxidation. *International Journal of Biological Macromolecules* 31: 195–205
- Tyo KE, Zhou H & Stephanopoulos GN (2006) High-Throughput Screen for Poly-3-Hydroxybutyrate in *Escherichia coli* and *Synechocystis* sp. Strain PCC6803. *Appl Environ Microbiol* 72: 3412–3417
- United Nations (2015) The Paris Agreement.
- Valentin HE, Mitsky TA, Mahadeo DA, Tran M & Gruys KJ (2000) Application of a Propionyl Coenzyme A Synthetase for Poly(3-Hydroxypropionate-co-3-Hydroxybutyrate) Accumulation in Recombinant *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 66: 5253–5258
- Valle A & Bolívar J (2021) *Escherichia coli*, the workhorse cell factory for the production of chemicals. In *Microbial Cell Factories Engineering for Production of Biomolecules* pp 115–137. Elsevier
- Vollenweider S & Lacroix C (2004) 3-Hydroxypropionaldehyde: applications and perspectives of biotechnological production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64: 16–27
- Volodina E, Schürmann M, Lindenkamp N & Steinbüchel A (2014) Characterization of propionate CoA-transferase from *Ralstonia eutropha* H16. *Appl Microbiol Biotechnol* 98: 3579–3589
- Vorobieva AA, Khan MS & Soumillion P (2014) *Escherichia coli* d-Malate Dehydrogenase, a Generalist Enzyme Active in the Leucine Biosynthesis Pathway. *J Biol Chem* 289: 29086–29096
- Wagner S, Baars L, Ytterberg AJ, Klussmeier A, Wagner CS, Nord O, Nygren P-Å, Van Wijk KJ & De Gier J-W (2007) Consequences of Membrane Protein Overexpression in *Escherichia coli*. *Molecular & Cellular Proteomics* 6: 1527–1550
- Walther T, Calvayrac F, Malbert Y, Alkim C, Dressaire C, Cordier H & François JM (2018) Construction of a synthetic metabolic pathway for the production of 2,4-dihydroxybutyric acid from homoserine. *Metabolic Engineering* 45: 237–245
- Walther T, Cordier H, Dressaire C, Francois JM & Huet R (2020) Method for the preparation of 2,4-dihydroxybutyrate. (Brevet)
- Walther T, Dressaire C, Cordier H & François JM (2013) Procédé de production d'acide 2,4-dihydroxybutyrique. (Brevet)

- Walther T, DRESSAIRE C, CORDIER H & Francois J-M (2015) A method of production of 2,4-dihydroxybutyric acid. (Brevet)
- Walther T, Topham CM, Irague R, Auriol C, Baylac A, Cordier H, Dressaire C, Lozano-Huguet L, Tarrat N, Martineau N, *et al* (2017) Construction of a synthetic metabolic pathway for biosynthesis of the non-natural methionine precursor 2,4-dihydroxybutyric acid. *Nature Communications* 8: 15828
- Warnecke T & Gill RT (2005) Organic acid toxicity, tolerance, and production in *Escherichia coli* biorefining applications. *Microb Cell Fact* 4: 25
- Wellner D & Lichtenberg LA (1971) [218a] Assay of amino acid oxidase. In *Methods in Enzymology* pp 593–596. Elsevier
- Werpy T & Peterson G (2005) Top Value Added Chemicals From Biomass
- Wheals A (1999) Fuel ethanol after 25 years. *Trends in Biotechnology* 17: 482–487
- Wild J, Hennig J, Lobočka M, Walczak W & Kłopotowski T (1985) Identification of the *dadX* gene coding for the predominant isozyme of alanine racemase in *Escherichia coli* K12. *MGG Molecular & General Genetics* 198: 315–322
- Williamson MP (2013) Using chemical shift perturbation to characterise ligand binding. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 73: 1–16
- Wojnowska-Baryła I, Bernat K & Zaborowska M (2022) Plastic Waste Degradation in Landfill Conditions: The Problem with Microplastics, and Their Direct and Indirect Environmental Effects. *IJERPH* 19: 13223
- Xicluna P (2019) La bioéconomie, nouvelle vision du vivant. *Ministère de l'Agriculture et de la Souveraineté Alimentaire*
- Xu B, Du Z, Dai J, Yang R, Yang D, Gu X, Li N & Li F (2022) Progress in Catalytic Conversion of Renewable Chitin Biomass to Furan-Derived Platform Compounds. *Catalysts* 12: 653
- Yamada T, Waller AS, Raes J, Zeleznik A, Perchat N, Perret A, Salanoubat M, Patil KR, Weissenbach J & Bork P (2012) Prediction and identification of sequences coding for orphan enzymes using genomic and metagenomic neighbours. *Molecular Systems Biology* 8: 581
- Yamamoto N, Nakahigashi K, Nakamichi T, Yoshino M, Takai Y, Touda Y, Furubayashi A, Kinjyo S, Dose H, Hasegawa M, *et al* (2009) Update on the Keio collection of *Escherichia coli* single-gene deletion mutants. *Molecular Systems Biology* 5: 335
- Zhang LB & Guo YM (2008) Effects of Liquid dl-2-Hydroxy-4-Methylthio Butanoic Acid on Growth Performance and Immune Responses in Broiler Chickens. *Poultry Science* 87: 1370–1376
- Zhang X, Carter MS, Vetting MW, San Francisco B, Zhao S, Al-Obaidi NF, Solbiati JO, Thiaville JJ, De Crécy-Lagard V, Jacobson MP, *et al* (2016) Assignment of function to a domain of unknown function: DUF1537 is a new kinase family in catabolic pathways for acid sugars. *Proc Natl Acad Sci USA* 113
- Zhang X, Mao Y, Wang B, Cui Z, Zhang Z, Wang Z & Chen T (2019) Screening, expression, purification and characterization of CoA-transferases for lactoyl-CoA generation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 46: 899–909



- Zher Neoh S, Fey Chek M, Tiang Tan H, Linares-Pastén JA, Nandakumar A, Hakoshima T & Sudesh K (2022) Polyhydroxyalkanoate synthase (PhaC): The key enzyme for biopolyester synthesis. *Current Research in Biotechnology* 4: 87–101
- Zhou GJ & Zhang F (2023) Applications and Tuning Strategies for Transcription Factor-Based Metabolite Biosensors. *Biosensors* 13: 428
- Zhuang Q, Wang Q, Liang Q & Qi Q (2014) Synthesis of polyhydroxyalkanoates from glucose that contain medium-chain-length monomers via the reversed fatty acid  $\beta$ -oxidation cycle in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering* 24: 78–86



