



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE DE LORRAINE

Ecole Nationale Supérieure d’Agronomie et des Industries Alimentaires (ENSAIA)

Ecole doctorale Ressources Procédés Produits Environnement (RP2E)

Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP)

THESE

Présentée à l’UL par

Hoang-Bao-Truc KHUAT

en vue d’obtenir le grade de

DOCTEUR DE L’UNIVERSITE DE LORRAINE

Spécialité: Procédés Biotechnologiques et Alimentaires

**ETUDE DU MÉTABOLISME DE *CORYNEBACTERIUM*
GLUTAMICUM AU COURS DE PROCÉDÉS AÉRO-ANAÉROBIES
ET SES APPLICATIONS EN GÉNIE MÉTABOLIQUE**

A soutenir publiquement le 13 décembre 2013 devant la commission d’examen

Rapporteurs :

Mme N. Cochet, Professeur à l’Université de Technologie de Compiègne

Mr F. Duchiron, Professeur à l’Université de Reims Champagne-Ardenne

Examineurs :

Mme K. A. To, Professeur, IPH, Hanoï

Mr J. Boudrant, Directeur de recherche émérite au CNRS, ENSAIA - UL, Nancy
(Directeur de thèse)

Mr S. Delaunay, Professeur, ENSAIA - UL, Nancy (Co-directeur)

Mr E. Guédon, Chargé de Recherche au CNRS – HDR, ENSAIA - UL, Nancy
(Co-directeur)

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, (CNRS – ENSAIA). Je tiens tout d’abord à remercier le **Prof. Michel Sardin**, le **Dr. Gabriel Wild** et le **Dr. Laurent Falk** qui m’ont accueillie dans le laboratoire.

Je remercie particulièrement le **Prof. Jean-Louis Goergen**, mon premier Directeur de thèse, qui a accepté de diriger mes travaux de thèse, qui m’a accueillie et beaucoup aidée dès mes premiers pas au laboratoire.

Je remercie plus particulièrement le **Dr. Joseph Boudrant** qui a accepté d’être mon deuxième Directeur de thèse. Merci bien à lui pour son soutien, son encouragement sans cesse durant la thèse.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à mes co-directeurs le **Dr Emmanuel Guedon** et le **Prof. Stéphane Delaunay** pour m’avoir encadrée, transmis leurs connaissances, énormément soutenue sur le plan scientifique tout au long de cette thèse.

J’exprime également mes remerciements au **Prof. To Kim Anh** qui m’a aidé à obtenir une bourse de thèse et a favorisé mes travaux de thèse au Vietnam.

Je remercie sincèrement le **Prof. Nelly Cochet** et le **Prof. Francis Duchiron** d’avoir accepté d’évaluer ces travaux.

Un grand merci à **Fabrice Blanchard** et **Mickael** pour leurs supports techniques et scientifiques.

Je remercie chaleureusement mes amis du laboratoire: **Françoise, Loyal, Tatiana, Mathilde, Caroline, Budour, Amel, Kenza, Nasir, Frédérique, Florent**, ainsi que mes amis Vietnamiens à Nancy: **Anh, Linh, Tuan, Hien, Lam...** pour les moments difficiles, l’amitié, l’humanité et la bonne humeur que nous avons partagé ensemble. Je remercie également les autres membres de l’équipe Biopromo et du laboratoire pour leur contribution au déroulement de ce travail.

Je n’oublie pas de remercier mon mari pour tout ce que tu as fait pour moi: écouter,

supporter mes doutes, mes moments de stress, mettre la “pression” pour le travail, le support financier et surtout de m’avoir aidée à surpasser les moments difficiles dans ma vie personnelle lors de ces années de thèse. Sans toi, je ne serai pas où je suis ce jour.

Enfin, je dédie ce travail à toute ma famille, la famille de mon mari et à tous mes amis. Je remercie mes parents et mon frère, ma belle soeur, ma soeur... qui m’ont soutenue, encouragée tout au long de ce travail.

SOMMAIRE PLAN

FIGURES.....	vii
TABLEAUX.....	xii
ABRÉVIATIONS	xiv
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	5
I.1.Métabolisme en anaérobiose de <i>Corynebacterium glutamicum</i>	5
I.1.1 Caractéristiques microbiologiques et génomiques de <i>C. glutamicum</i>	5
I.1.2 Métabolisme en anaérobiose de <i>C. glutamicum</i>	6
I.1.2.1 Entrée des sucres.....	9
I.1.2.2 Glycolyse	11
I.1.2.3 Voie de synthèse du lactate	15
I.1.2.4 Voie de synthèse du succinate.....	19
I.1.2.5 Voie de synthèse de l'acétate	23
I.2 Ingénierie métabolique appliquée à <i>Corynebacterium glutamicum</i>	25
I.2.1 Introduction	25
I.2.2 Production des acides aminés.....	27
I.2.3 Production des acides organiques	33
I.2.4 Modification métabolique de <i>C. glutamicum</i> pour la production du bioéthanol	35
Pyruvate décarboxylase (PDC) et alcool déshydrogénase (ADH) de <i>Z. mobilis</i>	36
Production d'éthanol chez <i>C. glutamicum</i>	38
I.3 Production d'itaconate.....	41
I.3.1 Introduction	41
I.3.2 Voie de synthèse de l'itaconate	43
I.3.3 Importance de la CAD pour la biosynthèse de l'acide itaconique	43
I.3.4 Production industrielle de l'acide itaconique.....	44
CHAPITRE II: MATERIELS ET METHODES.....	46
II.1 Souches bactériennes, oligonucléotides et plasmides utilisés	46
II.1.1 Souches bactériennes.....	46
II.1.1.1 Caractéristiques de la souche <i>C. glutamicum</i> 2262	46
II.1.1.2 Autres souches de <i>C. glutamicum</i>	47
II.1.1.3 Caractéristiques de la souche <i>E. coli</i> DH5 α	48
II.1.3 Plasmides	48
II.1.2 Oligonucléotides	49
II.2 Milieux de culture et conditions de croissance	50
II.2.1 Milieux de culture et condition de croissance de <i>C. glutamicum</i>	50
II.2.1.1 Composition des milieux de culture.....	50

II.2.1.2 Préparation du milieu de culture MCGC.....	52
II.2.1.3 Mise en culture des souches.....	52
II.2.2 Condition de culture pour <i>E. coli</i> DH5 α	53
II.3 Culture en bioréacteur	53
II.3.1 Description du bioréacteur.....	53
II.3.2 Culture en mode discontinu.....	54
II.3.3 Culture en mode semi-continu.....	55
II.4 Méthodes analytiques	56
II.4.1 Coefficient de corrélation entre la densité optique (DO ₅₇₀) et le poids sec..	56
II.4.2 Dosage des concentrations en biomasse, glucose et des métabolites au cours des cultures.....	56
II.5 Dosages des activités enzymatiques.....	60
II.5.1 Traitement des échantillons	60
II.5.2 Mesure de l'activité pyruvate décarboxylase (PDC)	60
II.5.3 Mesure de l'activité alcool déshydrogénase (ADH).....	62
II.5.4 Mesure de l'activité de cis-aconitate décarboxylase (CAD)	63
II.5.5 Dosage de la concentration en protéines.....	63
II.6 Analyse en Western-blot des protéines	64
II.7 Techniques de génie génétique	67
II.7.1 Préparation des cellules compétentes	67
II.7.2 Préparation d'ADN plasmidique	67
II.7.3 Amplification de fragments nucléotiques par PCR.....	68
II.7.4 Electrophorèse sur gel d'agarose.....	69
II.7.5 Purification de l'ADN du gel d'agarose	69
II.7.6 Modification enzymatique d'ADN.....	69
II.7.7 Ligation	70
II.7.8 Transformation par électroporation	70
CHAPITRE III. EVALUATION DES CAPACITES DE PRODUCTION DE LACTATE A PARTIR DE GLUCOSE PAR <i>C. GLUTAMICUM</i> 2262 EN ANAEROBIOSE.....	72
III.1 Etude de la production de lactate par <i>C. glutamicum</i> 2262 en anaérobiose, en mode discontinu et semi-continu	73
III.1.1 Article 1.1	74
III.1.2 Résultats complémentaires à l'article	90
III.1.2.1 Production d'autres acides organiques en anaérobiose, en mode discontinu à des états physiologiques différents et en mode semi-continu par <i>C. glutamicum</i> 2262	90
III.1.2.2 Bilan carboné lors des cultures en mode discontinu et semi-continu avec <i>C. glutamicum</i> 2262	93
III.1.3 Conclusions.....	95

III.2 Etude de la production de lactate par *C. glutamicum* 2262 cultivé en anaérobiose et en mode discontinu à des concentrations initiales croissantes en glucose 96

III.2.1 Cinétiques de croissance, de consommation de glucose et de production de lactate.....96

III.2.2 Mesure des performances du procédé de production de lactate et bilans carbonés..... 100

III.3 Influence de l'augmentation de la température du milieu de culture sur la production anaérobie de lactate par *C. glutamicum* 2262.....103

III.3.1 Cinétiques de croissance, de consommation de glucose et de production de lactate, de succinate et d'acétate suite à une élévation de température de 33 à 39°C..... 103

III.3.2 Comparaison des performances et des bilans carbonés du procédé anaérobie de production de lactate par *C. glutamicum* 2262 avec et sans variation de la température du milieu de culture 106

III.4 Conclusion.....108

CHAPITRE IV. EFFET DE L'EXPRESSION DES GENES DE LA PYRUVATE DECARBOXYLASE ET DE L'ALCOOL DESHYDROGENASE CHEZ *C. GLUTAMICUM* 2262..... 109

IV.1 Caractérisation des souches *C. glutamicum* 2262 exprimant PDC-ADH sous le contrôle du promoteur de *ldhA* (*PldhA*) 109

IV.1.1 Construction de pMTL500E-*Pldh* et pMTL540E-*Pldh* 109

IV.1.2 Expression de *pdc* et *adh* chez *C. glutamicum* 2262..... 114

IV.2 Production d'éthanol chez *C. glutamicum* 500EOH et 540EOH en anaérobiose, en fiole chicanée 116

IV.2.1 Cinétiques de croissance, de consommation de glucose et de production d'éthanol, de lactate, de succinate et d'acétate de *C. glutamicum* 500EOH..... 116

IV.2.2 Cinétiques de croissance, de consommation de glucose et de production d'éthanol, de lactate, de succinate et d'acétate de *C. glutamicum* 540EOH..... 119

IV. 3 Amélioration de la production d'éthanol par délétion de *ldhA*.....122

IV.3.1 Caractérisation de *C. glutamicum* 2262 Δ *ldh* 122

IV.3.2 Conséquence de la transformation de *C. glutamicum* 2262 Δ *ldh* avec pMTL500EOH ou pMTL540EOH..... 124

IV.3.3 Production d'éthanol par *C. glutamicum* 2262 Δ *ldh*500EOH et 2262 Δ *ldh*540EOH, en anaérobiose..... 126

IV.4 Discussion 129

CHAPITRE V. PRODUCTION D'ITACONATE CHEZ <i>C. GLUTAMICUM</i> 2262 RECOMBINANT.....	134
V.1. Clonage du gène codant la cis-aconitate acide décarboxylase (CAD) chez <i>A. terreus</i>	135
V.1.1. Analyse structurale et synthèse du gène codant la CAD.....	136
V.1.2. Analyse fonctionnelle du gène modifié chez <i>E. coli</i>	138
V.2. Construction de la souche de <i>Corynebacterium glutamicum</i> capable de produire de l'acide itaconique	139
V.2.1. Stratégie et construction du plasmide nécessaire à l'expression du gène <i>cad</i>	139
V.2.2 Caractérisation de l'expression du gène codant la CAD chez <i>C. glutamicum</i>	140
V.3 Performances fermentaires initiales de <i>C. glutamicum</i> 2262 <i>cad Aldh.</i>..	141
V.3.1 En fiole chicanée.....	141
V.3.2 En culture en mode discontinue, en aérobiose.....	142
V.3.3. Influence d'une limitation en oxygène sur la production d'acide itaconique	145
V.3.4. Influence d'une variation de la température du milieu de culture	148
V.3.5. Influence d'une limitation en substrat azoté.....	152
V.3.6 Discussion	156
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	164

FIGURES

CHAPITRE I

Figure 1.1: Métabolisme du glucose en anaérobiose chez <i>C. glutamicum</i>	7
Figure 1.2: Systèmes de transport de sucres chez <i>C. glutamicum</i>	10
Figure 1.3: La glycolyse chez <i>C. glutamicum</i>	12
Figure 1.4: Voie de synthèse du lactate chez <i>C.glutamicum</i>	16
Figure 1.5: Voie de synthèse du succinate chez <i>C.glutamicum</i>	19
Figure 1.6: Voie de synthèse de l'acétate chez <i>C. glutamicum</i>	24
Figure 1.7: Voie de synthèse de glutamate chez <i>C. glutamicum</i>	28
Figure 1.8: Voie de synthèse de lysine chez <i>C. glutamicum</i>	31
Figure 1.9: Voie de synthèse de alanine chez <i>C. glutamicum</i>	32
Figure 1.10: Catabolisme du glucose par <i>C. glutamicum</i> recombinée productrice d'éthanol (Inui et al., 2004b).....	39
Figure 1.11: Acide itaconique	41
Figure 1.12: Voie de biosynthèse d'acide itaconique chez <i>Aspergillus terreus</i>	42

CHAPITRE II

Figure 2.1: Description des cultures en mode discontinu	55
Figure 2.2: Exemple de spectrogramme d'une analyse HPLC des acides itaconique, trans-aconitique et cis-aconitique	59
Figure 2 3: Suivi de la disparition du NADH au cours du dosage de l'activité PDC	61

CHAPITRE III

Figure 3.1: Kinetics of growth, glucose consumption and lactate production by <i>C. glutamicum</i> 2262 under aerobic condition during a batch process.....	81
Figure 3.2: Lactate production by <i>C. glutamicum</i> 2262 in batch culture under oxygen deprivation conditions.....	82
Figure 3.3: Lactate production by <i>C. glutamicum</i> 2262 in fed-batch culture under oxygen deprivation conditions.....	85
Figure 3.4: Production de succinate et d'acétate en mode discontinu après un arrêt de l'aération à: DO 3 (a); DO 10 (b); DO 30 (c); DO 60 (d) et en mode semi-continu à: DO 10 (e); DO 30 (f) avec <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262. Evolution des concentrations en succinate (■) et en acétate (×).....	92
Figure 3.5: Bilans carbonés lors des cultures de <i>C. glutamicum</i> 2262 en mode discontinu avec une interruption de l'aération à DO 3 (a); 10 (b); 30 (c); 60 (d) et en mode semi-continu avec arrêt de l'aération à DO 10 (e); 30 (f).	94
Figure 3.6: Production de lactate par <i>C. glutamicum</i> 2262 en culture en mode discontinu à une concentration initiale en glucose de 40 g/l (A) ou 50 g/l (B).97	
Figure 3.7: Evolution des concentrations en succinate (■) et en acétate (×) lors de la culture de <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262, en mode discontinu, avec arrêt de l'aération à DO ₅₇₀ 10 et avec des concentrations initiales en glucose de: 40 g/l (a); 50 g/l (b); 60 g/l (c) et de 70 g/l (d).....	99
Figure 3.8: Bilans carbonés lors des cultures de <i>C. glutamicum</i> 2262 en mode discontinu, avec une interruption de l'aération à DO ₅₇₀ 10, avec une concentration initiale en glucose de 40 (a), 50 g/ (b), 60 (c) ou 70 g/l (d). ...	102
Figure 3.9: Production de lactate par <i>C. glutamicum</i> 2262 en mode discontinu, suite à une élévation de la température du milieu de culture à 39 ⁰ C.....	104
Figure 3.10: Production de succinate et d'acétate par <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262, en mode discontinu, avec arrêt de l'aération à DO ₅₇₀ 10 et élévation de la température du milieu de culture à 39 ⁰ C.....	106

Figure 3.11: Bilans carbone des cultures de <i>C. glutamicum</i> 2262 en mode discontinu, avec arrêt de l'aération à DO ₅₇₀ 10 avec (a) et sans (b) passage de la température du milieu de 33 à 39°C.....	107
---	-----

CHAPITRE IV

Figure 4.1: Stratégie suivie pour la construction de pMTL500E- <i>Pldh</i> et pMTL540E- <i>Pldh</i>	110
Figure 4.2: Vérification du clonage de l'insert de 400 pb issu de <i>Pldh</i> dans pMTL540E et pMTL500E.....	111
Figure 4.3: Construction des vecteurs d'expression contenant les séquences <i>pdh</i> et <i>adh</i> . Construction de pMTL540EOH (A) et de pMTL 500EOH (B).	112
Figure 4.4: Vérification de l'insertion de l'opéron PET dans pMTL540-E <i>Pldh</i> et pMTL500-E <i>Pldh</i>	113
Figure 4.5: Production d'éthanol chez <i>C. glutamicum</i> 500E (A) et 500EOH (B) en anaérobiose, en fiole chicanée.	117
Figure 4.6: Production d'éthanol chez <i>C. glutamicum</i> 540E (A) et 540EOH (B) en anaérobiose, en fiole chicanée.	120
Figure 4.7: Culture de <i>C. glutamicum</i> 2262Δ <i>ldh</i> en culture anaérobie, en fiole chicanée.....	123
Figure 4.8: Conséquences physiologique et cinétique de l'introduction de pMTL500EOH (A) et pMTL540EOH (B) chez <i>C. glutamicum</i> 2262 Δ <i>ldh</i> cultivée en anaérobiose, en fiole chicanée.	127

CHAPITRE V

Figure 5.1: Structure chimique de l'acide itaconique	134
Figure 5.2: Caractéristique physique du gène codant l'activité CAD chez <i>Aspergillus terreus</i>	135
Figure 5.3: Stratégie générale pour l'amplification de la séquence codante de l'activité CAD. Les flèches vertes représentent les amorces utilisées au cours des différentes PCR successives.	136
Figure 5.4: Compilation de l'usage des codons chez <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032. Les codons d'usage fréquent ou rare sont indiqués par des cases noires ou surlignées en gras, respectivement.....	137
Figure 5.5: Carte physique et génétique de la construction plasmidique utilisée pUC <i>cad Aldh</i> pour l'obtention de la souche recombinante <i>Corynebacterium glutamicum cad Aldh</i> capable d'exprimer l'activité CAD, et incapable de produire de l'acide lactique.....	140
Figure 5.6: Analyse par Western Blot, des extraits protéiques cellulaires des souches recombinantes de <i>C. glutamicum</i> et d' <i>E. coli</i> exprimant l'activité CAD (<i>cad+</i> <i>ldh-</i> et <i>puc57 cad</i> respectivement) comparativement aux souches parentales (sauvage).....	141
Figure 5.7: Cinétique de croissance de <i>C. glutamicum</i> 2262 <i>cad Aldh</i> lors d'une culture en mode discontinu, en aérobie.....	143
Figure 5.8: Production d'itaconate par <i>C. glutamicum</i> 2262 <i>cad Aldh</i> lors d'une culture en mode discontinu, en aérobie.....	144
Figure 5.9: Cinétique de croissance de <i>C. glutamicum</i> 2262 <i>cad Aldh</i> lors d'une culture en mode discontinu avec arrêt de l'aération à DO ₅₇₀ 10.....	146
Figure 5.10: Production d'itaconate par <i>C. glutamicum</i> 2262 <i>cad Aldh</i> lors d'une culture en mode discontinu avec arrêt de l'aération lorsque la DO ₅₇₀ a atteint 10 (2,6 g/l).....	147

Figure 5.11: Cinétique de croissance de <i>C. glutamicum</i> 2262 <i>cad Aldh</i> lors d'une culture en mode discontinu avec, simultanément, arrêt de l'aération et élévation de la température du milieu de culture de 33 à 39°C lorsque la DO ₅₇₀ a atteint 10 (2,6 g/l).....	149
Figure 5.12: Production d'itaconate par <i>C. glutamicum</i> 2262 <i>cad Aldh</i> lors d'une culture en mode discontinu avec, simultanément, arrêt de l'aération et élévation de la température du milieu de culture de 33 à 39°C lorsque la DO ₅₇₀ de 10 a été atteinte (2,6 g/l).	151
Figure 5.13: Cinétique de croissance de <i>C. glutamicum</i> 2262 <i>cad Aldh</i> lors d'une culture en mode discontinu avec une limitation en substrat azoté et avec, simultanément, arrêt de l'aération et élévation de la température du milieu de culture de 33 à 39°C lorsque la DO ₅₇₀ a atteint 10 (2,6 g/l).....	153
Figure 5.14: Production d'itaconate par <i>C. glutamicum</i> 2262 <i>cad Aldh</i> lors d'une culture en mode discontinu avec une limitation en substrat azoté et avec, simultanément, arrêt de l'aération et élévation de la température du milieu de culture de 33 à 39°C lorsque la DO ₅₇₀ a atteint 10 (2,6 g/l).....	155

TABLEAUX

CHAPITRE II

Tableau 2.1: Caractéristiques générales de <i>C. glutamicum</i>	47
Tableau 2.2: Plasmides utilisés au cours de ce travail.....	48
Tableau 2.3: Oligonucléotides utilisés au cours de ce travail.....	49
Tableau 2.4: Composition du milieu MCGC.....	51
Tableau 2.5: Mélange réactionnel pour la mesure de l'activité PDC	61
Tableau 2.6: Mélange réactionnel pour la mesure de l'activité ADH	62
Tableau 2.7: Mélange réactionnel pour la mesure de l'activité CAD	63
Tableau 2.8: Mélange réactionnel pour PCR standard	68
Tableau 2.9: Mélange réactionnel d'une digestion par enzyme de restriction	69

CHAPITRE III

Table 3.1: Performances of lactate production process using <i>C. glutamicum</i> 2262 in the production phase of the one-step batch cultures.	83
Table 3.2: Performances of lactate production process using <i>C. glutamicum</i> 2262 in the production phase of one-step fed-batch cultures.....	86
Tableau 3.3: Performances de la production anaérobie de lactate par <i>C. glutamicum</i> 2262 en culture en mode discontinu avec différentes concentrations initiales en glucose	101
Tableau 3.4: Performances du procédé anaérobie de production de lactate par <i>C. glutamicum</i> 2262 en mode discontinu, avec et sans variation de la température du milieu de culture.	107

CHAPITRE IV

Tableau 4.1: Activité spécifique pyruvate décarboxylase (PDC) et alcool déshydrogénase (ADH) chez <i>E. coli</i> DH5 α transformé soit avec pMTL500EOH soit avec pMTL540EOH.....	114
Tableau 4.2: Activité spécifique pyruvate décarboxylase (PDC) et alcool déshydrogénase (ADH) chez <i>C. glutamicum</i> 500EOH, 540EOH, 500E et 540E	115
Tableau 4.3: Comparaison des performances des procédés de production d'éthanol avec <i>C. glutamicum</i> 500EOH et <i>C. glutamicum</i> 540EOH.....	121
Tableau 4.4: Activités spécifiques pyruvate décarboxylase (PDC) et alcool déshydrogénase (ADH) chez <i>C. glutamicum</i> 2262 Δ ldh500EOH et Δ ldh540EOH.....	124
Tableau 4.5: Performances des procédés de production d'éthanol mettant en oeuvre <i>C. glutamicum</i> 2262 Δ ldh500EOH et <i>C. glutamicum</i> 2262540EOH, en fiole chicanée, en anaérobiose.....	128

CHAPITRE V

Tableau 5.1: Mesure de l'activité spécifique de l'enzyme CAD recombinante exprimée chez <i>E. coli</i> DH5 α pUC 57 <i>cad</i> . La même activité a été mesurée chez <i>E. coli</i> DH5 α , et constitue le témoin négatif.....	138
Tableau 5.2: Concentrations maximales en biomasse ($X_{\max}$), en itaconate ($[\text{itaconate}]_{\max}$) et activités spécifiques de la CAD obtenues avec <i>C. glutamicum</i> 2262 <i>cad</i> Δ ldh lors de cultures en mode discontinu sans ($\emptyset$) ou avec application de différents stress.	156

ABRÉVIATIONS

- alaD***: gène codant l'alanine déshydrogénase
- ACK**: acétate kinase
- ACN**: aconitase
- ADH**: alcool déshydrogénase
- ADN**: adénine désoxyribonucléique
- AI**: acide itaconique
- ARN**: acide ribonucléique
- ATP**: adénosine triphosphate
- BSA**: albumine de sérum bovin
- CAD**: cis-aconitate décarboxylase
- CS**: citrate synthase
- CTF**: CoA transférase
- ENO**: énalase
- FBPA**: fructose biphosphate aldolase
- FBP**: fructose-1, 6-diphosphate
- F6P**: fructose-6-phosphate
- Fru**: fructose
- FUM**: fumarase
- G+C**: guanine + cytosine
- GDH**: glutamate déshydrogénase
- Glc**: glucose
- GPDH**: glycéraldéhyde-3-P déshydrogénase
- GPI**: glucose phosphate isomérase
- G6P**: glucose-6-phosphate
- HPLC**: chromatographie en phase liquide à haute performance
- ICD**: isocitrate dehydrogenase
- LDH**: lactate déshydrogénase
- lysC***: gène codant l'aspartokinase
- MDH**: malate déshydrogénase
- NADH**: nicotinamide adénine dinucléotide (forme réduite)
- PC**: pyruvate carboxylase

PCR: réaction en chaîne par polymérase
PDC: pyruvate décarboxylase
PDHC: pyruvate déshydrogénase complexe
PEPC: phosphoénolpyruvate carboxylase
PEPCK: phosphoénolpyruvate carboxykinase
PEPS: PEP synthétase
PEP: phosphoénolpyruvate
PFK: 6-phosphofructokinase
PGK: phosphoglycérate kinase
PGM: phosphoglycérate mutase
PQO: pyruvate:quinone oxydoréductase
PTA: phosphotransacétylase
PTS: système phosphotransférase
PTS^{Glc}: PTS glucose
PTS^{Fru}: PTS fructose
PTS^{Suc}: PTS saccharose
PYK: pyruvate kinase
TBE: tampon Tris, Borate, EDTA
TPI: triosephosphate isomérase
SDH: succinate déshydrogénase
Suc: saccharose
Suc6P: saccharose-6-phosphate

INTRODUCTION

L'épuisement des ressources pétrolières, la répartition inégale des combustibles fossiles dans le monde et les émissions alarmantes de gaz à effet de serre ont provoqué un renouveau dans la valorisation des biotransformations (microbiennes ou enzymatiques) à partir de ressources renouvelables, très majoritairement d'origine végétale. Un des exemples les plus connus et les plus documentés est la production de bioéthanol. Celui-ci peut être obtenu par voie microbienne à partir d'agro-ressources et constituer une alternative intéressante tant au niveau économique qu'au niveau environnemental. Du fait des contraintes liées à l'environnement et à l'approvisionnement en matière première, le prix de revient de l'éthanol tend à se rapprocher de celui des carburants issus des produits pétroliers. Ce prix pourrait d'ailleurs encore être abaissé à condition de pouvoir disposer de microorganismes performants, capables de produire de l'éthanol à partir de substrats carbonés de faible coût.

Actuellement, plusieurs microorganismes peuvent permettre la production d'éthanol. Il y a notamment *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia galeiformis*, les bactéries lactiques, *Zymomonas mobilis*, *Escherichia coli* recombinant, etc... *Saccharomyces cerevisiae* est le microorganisme le plus utilisé à l'échelle industrielle, essentiellement pour des raisons de robustesse. Pourtant, cette levure présente une relative lenteur à cataboliser les substrats carbonés ce qui a pour conséquence une augmentation de la durée de fermentation. De même, bien que *Z. mobilis* soit une bactérie emblématique produisant de l'éthanol avec un rendement élevé (Dien et al., 2003), sa faible robustesse et son incapacité à fermenter des sucres autres que le glucose, le fructose ou le saccharose limitent son intérêt pour une utilisation à plus grande échelle.

L'épuisement des sources de pétrole et l'augmentation inévitable du prix de ce dernier induisent de nouveaux challenges à l'industrie chimique en vue d'utilisation de sources de matière première à coût raisonnable et renouvelables. Ainsi donc, de plus en plus, l'industrie chimique se tourne vers la biotechnologie. Cette dernière, en effet, peut fournir un grand nombre de molécules susceptibles de remplacer les synthons d'origine pétrolière par exemples : les acides succinique, fumarique, aspartique, itaconique etc. Parmi ceux-ci, l'acide itaconique est l'un des plus prometteurs car pouvant être utilisé comme substituant de monomères issus de l'industrie chimique pour la synthèse de polymères, la synthèse de lubrifiants ou encore comme agent de surface pour les peintures et les résines. Actuellement, l'acide itaconique est principalement produit au cours de procédés fermentaires utilisant le champignon filamenteux *Aspergillus terreus*. Toutefois, les procédés correspondants demeurent longs, ce qui se traduit par des productivités faibles

et, par conséquent, par un coût du produit encore élevé le rendant moins compétitif par rapport à son équivalent issu de l'industrie pétrochimique. Afin d'accroître la productivité et l'efficacité de ces procédés, le développement de nouveaux catalyseurs microbiens peut et doit être envisagé.

Depuis sa découverte en 1957 et son exploitation dans les années qui ont suivi, *Corynebacterium glutamicum* est un microorganisme industriellement très important. En effet, *C. glutamicum* présente de nombreuses propriétés intrinsèques qui en font une usine cellulaire potentielle pour la production de métabolites primaires. Ce microorganisme présente des propriétés de résistance remarquables aux environnements agressifs (agitation, salinité, solvant, etc...), une excellente robustesse au cours des procédés industriels ainsi qu'une capacité à utiliser, soit seul, soit en co-métabolisme, des sources de carbone variées telles que le glucose, le fructose, le saccharose, l'acétate, le lactate, le pyruvate, le propionate, le glutamate, le gluconate et la sérine. Les capacités polyvalentes de cet organisme ont, depuis longtemps, été mises en œuvre à l'échelle industrielle pour la production d'acides aminés tels que le glutamate et la lysine avec des rendements et des taux de conversion élevés.

Grâce aux avancées du génie métabolique, ce micro-organisme est aujourd'hui potentiellement utilisable comme plate-forme d'ingénierie métabolique pour la synthèse de plusieurs précurseurs chimiques, matériaux et combustibles. Récemment, il a été montré que, dans des conditions de limitation d'oxygène, le métabolisme de *C. glutamicum* est principalement orienté vers la formation d'acides organiques, sa croissance devenant dans ces conditions très rapidement nulle. Cette propriété peut également être utilisée, grâce à des souches modifiées génétiquement, pour produire un panel important de métabolites d'intérêt. Dans cette optique, le séquençage complet du génome de *C. glutamicum* a été un outil important qui a contribué à faciliter les stratégies de modifications génétiques. A ce jour, il a ainsi été montré que *C. glutamicum* pouvait synthétiser diverses molécules telles que des acides organiques (lactate et succinate), du poly-3-hydroxybutyrate, de l'isobutanol, de l'éthanol et du 1, 2-propanediol.

Dans ce travail de thèse, nous avons cherché à exploiter le métabolisme de *C. glutamicum*, dans des conditions de limitation d'oxygène, pour la production d'éthanol et d'itaconate. L'objectif de cette thèse a été de développer un biocatalyseur microbien capable de convertir un substrat carboné, le glucose, en éthanol et en itaconate. Pour cela nous avons cherché à obtenir un biocatalyseur robuste permettant l'obtention:

- de rendements de conversion élevés,
- d'une concentration finale en produit la plus élevée possible,

- de productivités élevées.

La souche *C. glutamicum* 2262 a été modifiée génétiquement dans ce but. Cette souche est thermosensible. Elle a été initialement sélectionnée pour sa capacité à produire du glutamate suite à une variation de la température de son milieu de culture.

Pour la production d'éthanol, les modifications génétiques ont consisté à introduire directement au niveau du carrefour du pyruvate, une voie métabolique supplémentaire constituée par les enzymes très efficaces que sont les pyruvate décarboxylase et alcool déshydrogénase issues de *Z. mobilis*. La synthèse du lactate, produit principal en anaérobiose du métabolisme de *C. glutamicum*, étant en compétition avec la synthèse d'éthanol, une suppression de la voie de synthèse de cet acide organique a également été réalisée simultanément à l'introduction de la voie de synthèse de l'éthanol. Les différentes souches recombinées obtenues ont été testées au cours d'un procédé de production d'éthanol en focalisant principalement sur les rendements et le titre final en éthanol.

Pour la production d'itaconate, le gène *cad* de *A. terreus* a été modifié et inséré dans le génome de *C. glutamicum* au niveau du locus du gène *ldhA*, codant pour la lactate déshydrogénase. Cette stratégie a permis (i) de supprimer la production du lactate, (ii) d'exprimer conditionnellement le gène *cad* sous le contrôle du promoteur *ldh*, et (iii) également de profiter du flux de carbone initialement orienté vers la production d'acide lactique.

Ce document de thèse se divise en cinq chapitres. Une étude bibliographique, dans le premier chapitre, aborde les connaissances de base du métabolisme de *C. glutamicum* et sa régulation en anaérobiose. Cette partie se focalise essentiellement sur trois voies métaboliques principales, les synthèses du lactate, du succinate et de l'acétate, ainsi que sur l'ingénierie métabolique appliquée à *C. glutamicum*.

Le deuxième chapitre décrit les matériels et méthodes utilisés au cours de cette thèse: les méthodes de dosage des métabolites extracellulaires en anaérobiose, les méthodes de construction des souches recombinantes et l'analyse de fonctionnement des constructions.

Le troisième chapitre présente une étude physiologique et cinétique de *C. glutamicum* 2262 lors d'une culture en anaérobiose. Un des objectifs de cette partie du travail, réalisé sur la souche non modifiée génétiquement, a été d'établir un procédé de culture permettant d'obtenir le meilleur rendement de conversion du substrat en lactate et une productivité importante. Le procédé ainsi défini a été utilisé par la suite pour la production d'éthanol et d'itaconate avec des souches modifiées génétiquement.

Le quatrième chapitre est consacré à la construction et à la caractérisation des souches recombinantes pour la production d'éthanol. Deux vecteurs plasmidiques, portant les gènes codant la pyruvate décarboxylase et l'alcool déshydrogénase de *Z. mobilis*, ont été utilisés. Les performances des souches obtenues à la suite de la transformation de *C. glutamicum* 2262 avec chacune de ces constructions ont été comparées. Par la suite, le gène codant la lactate déshydrogénase endogène de *C. glutamicum* 2262 a été supprimé chez les souches modifiées génétiquement afin de tenter d'accroître la production d'éthanol.

Le dernier chapitre porte sur la construction d'une souche recombinante pour la production d'itaconate. Outre, la modification génétique utilisée, ce chapitre décrit les différents essais de modification du procédé qui ont été appliqués afin d'accroître la production d'itaconate par *C. glutamicum*.

Enfin, ce document se termine par un rappel des principaux résultats obtenus et les perspectives qui en découlent.

CHAPITRE I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1.Métabolisme en anaérobiose de *Corynebacterium glutamicum*

I.1.1 Caractéristiques microbiologiques et génomiques de *C. glutamicum*

Le genre *Corynebacterium* est un membre de la classe des Actinobactéries, de l'ordre des Actinomycétales, de la famille des *Corynebacteriaceae* (Stackebrandt et al., 1997). Les corynébactéries sont des bactéries à Gram-positif, non sporulantes, non mobiles (Abe et al., 1967). Elles sont aussi anaérobies ou aérobies facultatives, et catalase-positives. Elles apparaissent comme des bâtonnets avec une morphologie typique, un peu irrégulière: en paire adoptant souvent la forme d'un V ou s'arrangeant parallèlement (Liebl, 2005; Abe et al., 1967). Il peut aussi y avoir des différences morphologiques selon l'âge de culture et le milieu de culture utilisé. Les bactéries d'origine ont été généralement isolées du sol, des eaux usées, des fumures. Actuellement, il y a environ 50 espèces validées de *Corynebacterium*.

Corynebacterium glutamicum, est une bactérie du sol, auxotrophe pour la biotine, isolée initialement en 1957 par Kinoshita et ses collègues. Elle a montré la capacité d'excréter de grandes quantités d'acide L-glutamique dans son milieu de culture suite à une induction (Kinoshita et al, 1957). Cette bactérie est capable d'utiliser différentes sources de carbone, dont les sucres comme le glucose, le fructose, le saccharose; les acides organiques tels que l'acétate, le lactate, le pyruvate, le gluconate; l'éthanol (Arndt et Eikmanns, 2007; Coccagn-Bousquet et al., 1993; Dominguez et al., 1993a; Dominguez et Lindley, 1996). De plus, elle est capable de co-métaboliser le glucose avec d'autres sucres, des acides organiques ou des acides aminés tels que le fructose, le lactate, le pyruvate, l'acétate, le propionate, et la sérine. Elle possède une croissance monophasique sur des mélanges de ces substrat (Claes et al., 2002; Coccagn-Bousquet et al., 1993; Dominguez et al., 1993b; Merckens et al., 2005; Netzer et al., 2004; Wendisch et al., 2000). La croissance diauxique de *C. glutamicum* et l'utilisation séquentielle des sources de carbone ont été décrites pour un mélange de glucose et de glutamate, et expliquées par l'existence de la répression du système d'absorption de glutamate (cluster de gènes *gluABCD*) en présence de glucose (Kramer et Lambert, 1990; Kramer et al., 1990; Kronmeyer et al., 1995). Récemment, Arndt et al. (2006) ont rapporté que la croissance de *C. glutamicum* sur un mélange de

glucose et d'éthanol conduit à un comportement de croissance biphasique, en raison de l'utilisation séquentielle du glucose avant l'éthanol.

Le génome de *C. glutamicum* ATCC 13032 a été séquencé par plusieurs groupes de recherche indépendants (Ikeda et Nakagawa, 2003; Kalinowski et al, 2003). Récemment, le génome d'une autre souche industrielle, *C. glutamicum* R, a aussi été séquencé (Yukawa et al., 2007). En se basant sur ces analyses, on peut conclure que la taille du génome de *C. glutamicum* est de 3,3 kb et les annotations ont révélé environ 3000 ORFs (open reading frames). Le rapport (G+C) du génome de *C. glutamicum* est de 54%.

Corynebacterium glutamicum est principalement utilisé pour la production industrielle de L-glutamate et de L-lysine avec respectivement 1.800.000 et 850.000 tonnes produites par an (Leuchtenberger et al., 2005; Nakamura et al., 2007). La connaissance approfondie courante de *C. glutamicum* ainsi que son utilisation industrielle a suscité un intérêt pour l'exploitation de cet organisme pour la production de composés alternatifs.

I.1.2 Métabolisme en anaérobiose de *C. glutamicum*

En présence de nitrates en anaérobiose, *C. glutamicum* possède une croissance limitée par la respiration des nitrates en nitrites. Ces derniers ne peuvent pas être réduits davantage et s'accumulent (Nishimura et al, 2007; Takeno et al, 2007). Cette capacité métabolique de *C. glutamicum* a été attribuée à la présence des gènes de l'opéron *narKGHJI* codant un transporteur nitrate/nitrite et une nitrate réductase respiratoire. A haute densité cellulaire et en absence de nitrate, à partir de glucose, même en milieu synthétique, en conditions anaérobies, *C. glutamicum* a la capacité de maintenir une activité métabolique et d'excréter une quantité importante d'acides organiques tel que les acides lactique, succinique et acétique (**Figure 1.1**) mais cette conversion n'est pas couplée à la croissance (Inui et al., 2004b). Notons que l'arrêt de la croissance cellulaire permet de limiter sévèrement la synthèse de sous-produits qui sont formés, classiquement, lors de la croissance aérobie (Inui et al., 2004b). Ces caractéristiques sont à la base de productivités élevées lors des productions de lactate, de succinate, de L-alanine, de xylitol, d'éthanol et d'isobutanol (Blombach et al., 2011; Blombach et Seibold, 2010; Inui et al., 2004a; Jojima et al., 2010; Okino et al., 2005; Okino et al., 2008a; Sasaki et al., 2010). Cependant, le mécanisme du maintien de l'activité métabolique dans les cellules en arrêt

de croissance, en limitation d'oxygène, n'est pas encore bien compris.

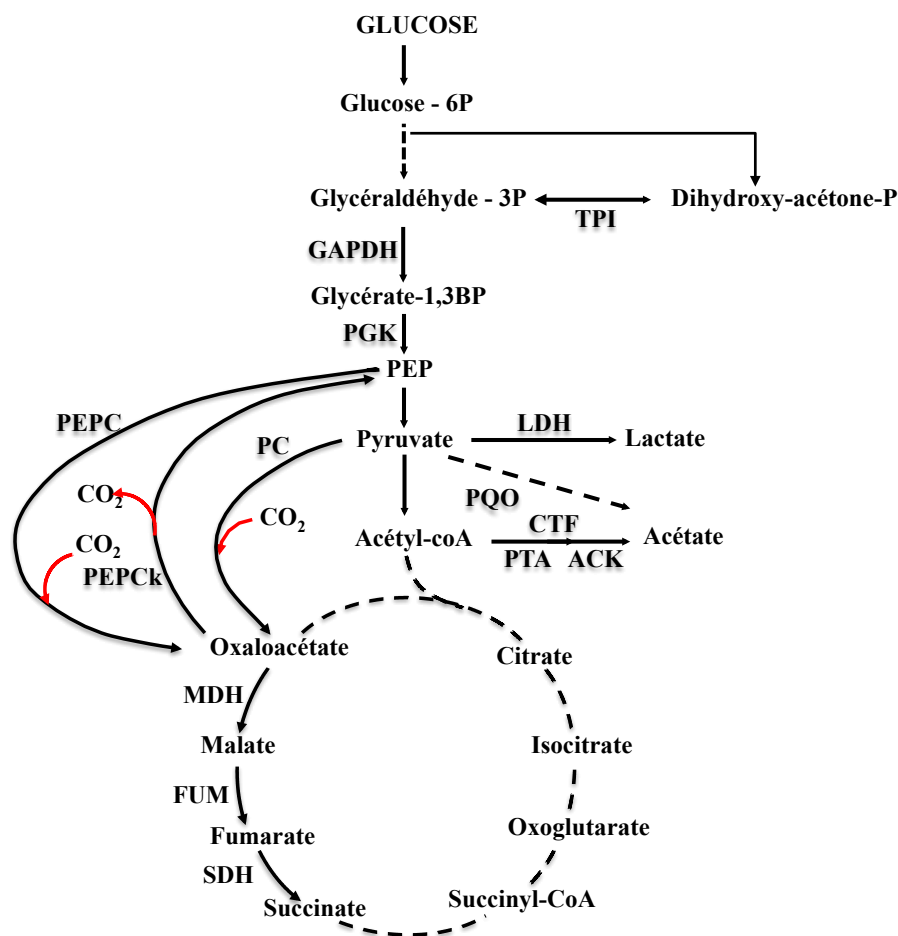


Figure 1.1: Métabolisme du glucose en anaérobiose chez *C. glutamicum*.

GAPDH, glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase; PGK, phosphoglycérate kinase; TPI, triosephosphate isomérase; PEPC, phosphoénolpyruvate carboxylase; PEPCk, phosphoénolpyruvate carboxykinase; PC, pyruvate carboxylase; MDH, malate déshydrogénase; FUM, fumarase; SDH, succinate déshydrogénase; LDH, lactate déshydrogénase; CTF, CoA transferase; PTA, phosphotransacétylase; ACK, acétate kinase; PQQ, pyruvate: quinone oxydoréductase

En utilisant la technique des puces à ADN, basée sur le génome de *C. glutamicum* R, les profils transcriptionnels, en limitation d'oxygène, dans un milieu minimal, ont été comparés à ceux obtenus dans des conditions d'aération normales, dans un milieu riche (Inui et al., 2007). Cette étude a révélé qu'en limitation en oxygène, un total de 161 gènes

est surexprimé plus de deux fois et que 221 gènes sont sous exprimés d'un facteur d'au moins deux par rapport à ce qui est observé en conditions aérobies (Inui et al., 2007). Ces gènes sont impliqués dans la transcription, la traduction, la réplication de l'ADN, le transport ou le métabolisme (Suda et al., 2008).

Il a été montré que le NADH est oxydé par la lactate déshydrogénase (codée par *ldhA*) et la malate déshydrogénase (codée par *mdh*) et que la vitesse de consommation du glucose est corrélée au rapport NADH/NAD⁺ intracellulaire chez *C. glutamicum* dans des conditions de limitation d'oxygène (Inui et al., 2004b). Par ailleurs, l'expression de l'opéron H⁺-ATPase est régulée négativement lors d'une limitation d'oxygène chez *C. glutamicum* probablement pour économiser l'ATP intracellulaire (Neuweger et al., 2009). Une souche de *C. glutamicum* sans activité H⁺-ATPase présente une augmentation de la vitesse de respiration, mais également de la vitesse de consommation de glucose, de la glycolyse et une diminution de la production d' α -cétoglutarate en condition d'aérobiose. Ceci suggère une diminution du flux à travers le bras oxydatif du TCA, une augmentation de la production et de l'accumulation intracellulaire de pyruvate et une augmentation de la production de lactate (Sekine et al., 2001).

La molécule centrale responsable de ce changement métabolique pourrait être le fait d'un facteur sigma de groupe 2 de l'ARN polymérase de *C. glutamicum*, nommé *sigB*. En effet, le niveau de transcription de *sigB* augmente, en effet, pendant la phase de transition entre la phase exponentielle de croissance et la phase stationnaire de croissance (Larisch et al., 2007). L'expression de *sigB* est également surrégulée en réponse à des stress acide, salin ou thermique (froid ou chaleur), suite à l'ajout d'éthanol (Barreiro et al., 2009), au cours de l'adaptation à l'accumulation d'acide lactique (Jakob et al., 2007) et sous privation d'oxygène (Ehira et al., 2008; Inui et al., 2007). Dans ce dernier cas, des analyses transcriptomiques ont montré que l'interruption de *sigB* conduit à réduire les niveaux de transcription de gènes impliqués dans le métabolisme du glucose en acides organiques. Ceci conduit à un retard de la consommation de glucose par les cellules dans des conditions de limitation d'oxygène (Ehira et al., 2008). Ces résultats indiquent que *sigB* est impliqué dans la régulation positive des gènes du métabolisme du glucose et qu'il peut, indirectement, provoquer l'augmentation de la consommation de glucose dans des conditions de limitation d'oxygène (Ehira et al., 2008).

Ainsi, lors d'un passage de conditions d'aérobiose à des conditions d'anaérobioses, les facteurs de transcription sont activés et le facteur sigma de l'ARN polymérase est surrégulé conduisant à une augmentation des activités des enzymes du métabolisme central des carbohydrates (Ehira et al., 2008; Engels et al., 2008; Inui et al., 2007). Une bonne compréhension des voies métaboliques de *C. glutamicum* sous des conditions de limitation d'oxygène est donc importante pour le développement et l'obtention de bioprocédés à productivité élevée. Cela justifie donc la description en détail, ci-après, de l'entrée des sucres, de la glycolyse et des voies de synthèse du lactate, du succinate et de l'acétate, chez *C. glutamicum*.

I.1.2.1 Entrée des sucres

Corynebacterium glutamicum est capable d'utiliser comme source de carbone une grande variété de sucres et d'acides organiques, soit en tant que substrat isolé, soit en co-métabolisme. Les sucres, surtout le glucose, le saccharose et le fructose sont les sources de carbone préférées dans les procédés biotechnologiques industriels. Ces sucres peuvent pénétrer dans la cellule par deux moyens: le système phosphotransférase (PTS) et le système perméase (**Figure 1.2**). Le système PTS joue un rôle majeur pour l'entrée des sucres dans les cellules de *C. glutamicum* et il catalyse la phosphorylation de ces sucres (soit le glucose-6-phosphate ou soit le fructose-6-phosphate) en utilisant du phosphoénolpyruvate (PEP) et générant du pyruvate (Dominguez et Lindley, 1996; Mori et Shii, 1987). Ajoutons que, le fructose intracellulaire, qui est formée au cours de la croissance à partir du saccharose, est d'abord éliminé par un système d'exportation inconnu, puis est repris et phosphorylé en fructose-1-phosphate par un PTS (*ptsF*) (Dominguez et Lindley, 1996).

Cependant, l'entrée effective du glucose par une souche de *C. glutamicum* n'ayant pas de PTS suggère l'existence d'un autre système d'entrée de ce sucre. Il s'agit en fait d'une perméase à faible affinité (IMglc) (Dominguez et Lindley, 1996). La présence de plusieurs types de systèmes perméasiques (SP) a été identifiée grâce à l'existence de glucose perméase, de maltose perméase et sachant que la fructose perméase n'y est pas présente (Mori et Shii, 1987; Sugimoto et Shii, 1989b). Notons que le SP peut représenter jusqu'à 15% du flux total d'entrée des sucres lors d'une croissance rapide (Cocaign-Bousquet et al., 1996). De plus, la présence d'une glucokinase (GLK) dans cette

bactérie permet de phosphoryler le glucose entrant par ce système (Gourdon et al., 2003; Park et al., 2000).

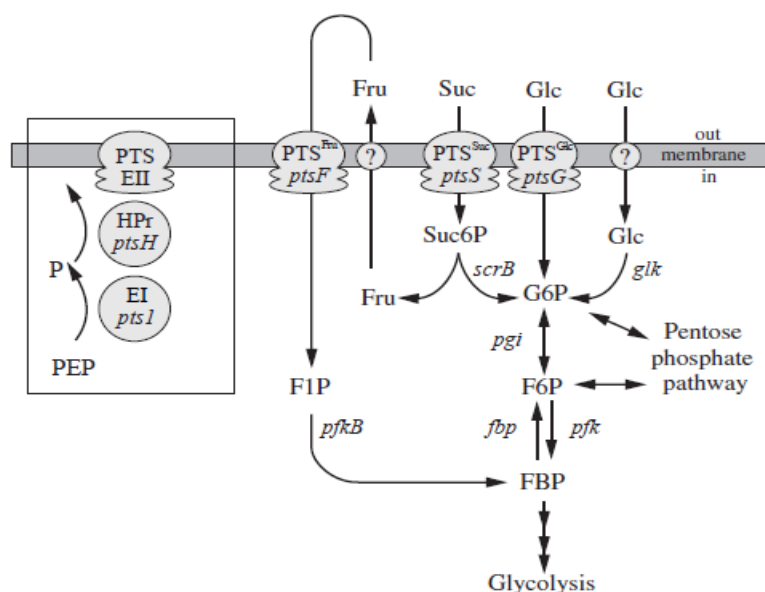


Figure 1.2: Systèmes de transport des sucres chez *C. glutamicum*.

PTS^{Glc}, PTS glucose; PTS^{Fru}, PTS fructose; PTS^{Suc}, PTS saccharose, système de transport non identifié. Fru, fructose; Suc, saccharose; Glc, glucose; G6P, glucose-6-phosphate; F6P, fructose-6-phosphate; FBP, fructose-1, 6-diphosphate; Suc6P, saccharose-6-phosphate. L'encart montre le transfert du phosphoryl dérivé de PEP via le PTS phosphotransférase I (EI) et des protéines HPr partagées par les trois composantes PTS spécifiques du substrat EII (Eggeling et Bott, 2005)

Généralement, un PTS se compose deux protéines cytoplasmiques communes [enzyme I (EI) et HPr] et d'un complexe protéique spécifique du sucre [Enzyme II (EII)]. Le groupe phosphorylé du phosphoénolpyruvate est séquentiellement transféré à EI, HPr, EII et enfin au substrat. Les composés communs du PTS, EI et HPr, sont respectivement codés par *ptsI* et *ptsH*. Les EII, spécifiques du glucose, du fructose ou du saccharose, sont respectivement codées par *ptsG*, *ptsF* et *ptsS* (Moon et al., 2005; Parche et al., 2001).

Les différents PTS de *C. glutamicum* sont exprimés de façon constitutive (Stulke et Hillen, 1999) et permettent de co-consommer simultanément les sucres d'un mélange. Les recherches récentes montrent que le glucose augmente l'expression des gènes *ptsG*, *ptsH* et *ptsI*, alors que le fructose et le saccharose induisent l'expression de *ptsF*, *ptsS*, *ptsG*,

ptsH et *ptsI* (Engels et Wendisch, 2007; Tanaka et al., 2008a). SugR a été identifié comme étant le répresseur des gènes du système d'entrée des sucres (Engels et Wendisch, 2007; Gaigalat et al., 2007; Tanaka et al., 2008b). Dans le génome de *C. glutamicum*, les gènes *sugR* et *fruR*, codant pour des régulateurs transcriptionnels de type DeoR, sont situés dans le cluster contenant *ptsF*, *ptsI* et *ptsH*. La fixation de SugR au promoteur de *ptsG* est inhibée par le fructose-6-phosphate (Engels et Wendisch, 2007). L'expression de *ptsG* est donc réprimée par SugR en l'absence de fructose dans le milieu de culture et l'inhibition de l'activité de SugR par le fructose-6-phosphate induit l'expression de *ptsG*. En revanche, la fixation de SugR à la région intergénique de *ptsI-fruR* est inhibée par les autres métabolites intermédiaires du fructose: le fructose-1-phosphate, le fructose 1,6-bisphosphate et le glucose-6-phosphate (Gaigalat et al., 2007). Cependant, l'influence respective de ces métabolites sur l'activité de SugR sur les gènes cibles reste à élucider.

I.1.2.2 Glycolyse

Une fois l'entrée des sucres et la phosphorylation réalisées, le métabolisme des sucres-phosphate se produit via deux voies métaboliques centrales: la glycolyse et la voie des pentoses-phosphate. Cependant, chez *C. glutamicum*, en anaérobiose, la glycolyse joue le principal rôle du métabolisme des sucres. La glycolyse se compose d'un ensemble de réactions enzymatiques permettant de synthétiser l'énergie (3 ATP et 2 NADH) et également d'acheminer le glucose consommé vers les voies de synthèse d'énergie et de précurseurs (**Figure 1.3**). Les enzymes de cette étape ont été mises en évidence chez *B. flavum* et *C. glutamicum* (Dominguez et al., 1998). Bien que la glycolyse soit une étape très importante, relativement peu d'enzymes de la glycolyse ont été biochimiquement caractérisées chez *C. glutamicum*. Les principales études biochimiques ont été concentrées sur les réactions irréversibles et à ce jour, cinq enzymes ont été purifiées ou partiellement purifiées et six enzymes ont été caractérisées biochimiquement. Cependant, l'analyse du génome de *C. glutamicum* a permis de conclure à la présence des gènes codant l'ensemble des enzymes de la glycolyse (Kalinowski et al., 2003).

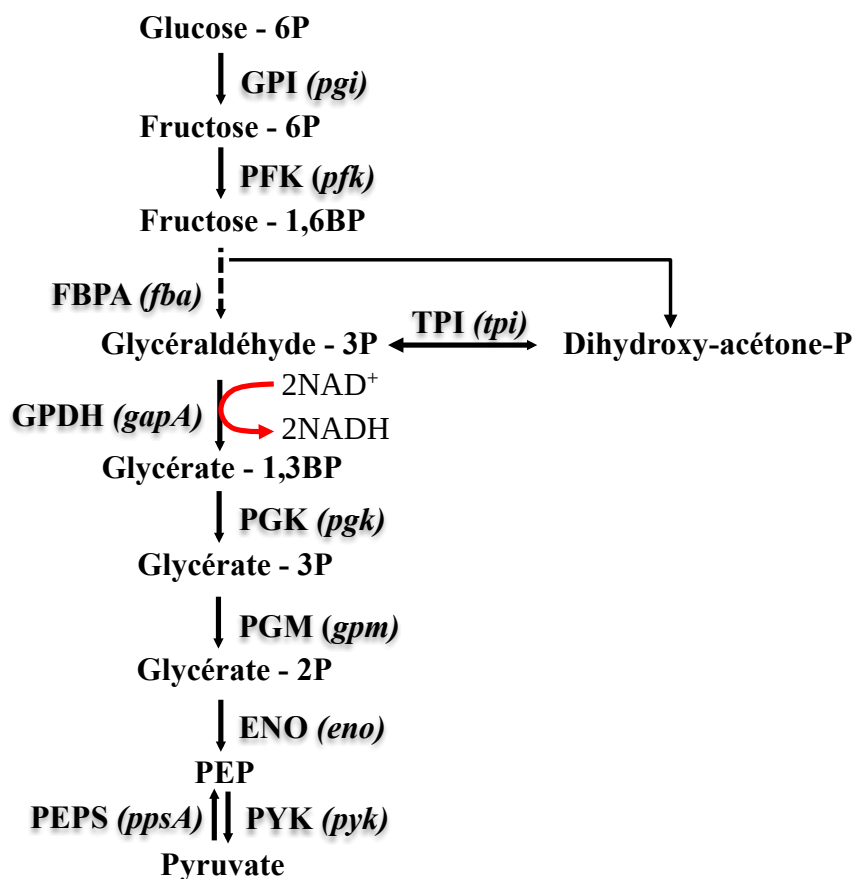


Figure 1.3: La glycolyse chez *C. glutamicum*.

GPI, glucose phosphate isomérase; PFK, 6-phosphofructokinase; FBPA, fructose biphosphate aldolase; TPI, triose phosphate isomérase; GPDH, glycéraldéhyde-3-P déshydrogénase; PGK, phosphoglycérate kinase; PGM, phosphoglycérate mutase; ENO, émolase; PEPS, PEP synthétase; PYK, pyruvate kinase

Glucose-6-Phosphate Isomérase

La glucose-6-phosphate isomérase (GPI) a été partiellement purifiée à partir de *C. glutamicum* ATCC14067. Elle est fortement inhibée par l'érythrose-4-phosphate (E4P) (Sugimoto et Shiio, 1989a). Il a été postulé que le flux métabolique en aval du fructose-6-phosphate (fructose-6P) ne serait pas perturbé par cette inhibition. Les constantes d'affinité de 1,4 mM et 0,54 mM pour le glucose-6-phosphate (glucose-6P) et le F6P, respectivement, sont similaires à celles rapportées pour des glucose-6P isomérases d'autres origines. La mesure des pools métaboliques intracellulaires lors de la croissance sur différents sucres indique que cette réaction n'est pas loin de son équilibre

thermodynamique et qu'il est donc improbable qu'elle soit responsable d'un contrôle significatif du flux glycolytique (Eggeling et Bott, 2005).

6-Phosphofructokinase

La 6-phosphofructokinase (PFK) de *C. glutamicum* ATCC14067, contrairement à celle décrite chez de nombreux autres organismes, n'est inhibée ni par l'ATP, ni par le citrate ou le phosphoénolpyruvate (PEP). Elle n'est activée ni par l'ADP, ni par l'AMP ou le fructose-1,6-bisphosphate (Sugimoto et Shiio, 1989b). Par contre, l'ADP est un inhibiteur de la PFK (Sugimoto et Shiio, 1989b). L'absence des mécanismes classiques de contrôle allostérique explique, non seulement, pourquoi cette enzyme a peu de contrôle sur la glycolyse, mais aussi, pourquoi un flux de carbone considérable peut être maintenu via la glycolyse pour la surproduction d'acide aminé.

Glycéraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase

La glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) est fortement régulée par le rapport NADH/NAD^+ (Dominguez et al., 1998) et peut dans des circonstances où la charge redox des cellules augmente (limitation de l'oxygène, fort flux glycolytique, surproduction de glutamate) être responsable d'un contrôle important sur le flux glycolytique, comme cela a été décrit pour *Lactococcus lactis* (Garrigues et al., 1997).

Pyruvate Kinase

À ce jour, le point de contrôle le plus important reconnu dans la glycolyse est la pyruvate kinase (PYK). Cette enzyme a été caractérisée à partir d'une préparation partiellement purifiée issue de *C. glutamicum* ATCC14067 (Ozaki et Shiio, 1969). C'est une enzyme allostérique ayant un coefficient de Hill égal à 3,0. Une activation, par un facteur d'environ 4, a été observée en présence de 2 mM d'AMP et de 0,1 mM de PEP. L'ATP et la GTP ont été identifiées comme des effecteurs négatifs. Une forte inhibition par l'ATP (87% en présence de 1 mM d'ATP et 0,5 mM de PEP) a été observée. L'inhibition par l'ATP est non compétitive par rapport à l'ADP. Le fait que cette enzyme soit régulée par

l'AMP et l'ATP, démontre clairement l'importance de cette enzyme dans le contrôle du métabolisme énergétique chez *C. glutamicum*.

La caractérisation de l'enzyme purifiée provenant de *C. glutamicum* ATCC13059 (Jetten et al., 1994a) a élucidé sa structure tétramérique. L'activation par l'AMP et l'inhibition par l'ATP ont également été confirmées chez cette enzyme purifiée. Le K_m apparent pour le PEP est de 1,2 mM en présence de 2 mM d'ADP, de 2,8 mM en présence de 2 mM d'ATP et de 0,4 mM en présence de 2 mM d'AMP.

PEP Synthétase

L'activité de la PEP synthétase a été détectée chez *C. glutamicum* ATCC13032, ATCC14067 et ATCC13869 mais avec des activités spécifiques relativement faibles (Jetten et al., 1994b). La synthèse d'ARNm a également été observée à des niveaux relativement faibles (Hayashi et al., 2002). Cette enzyme est inhibée par l'AMP ou le PEP et est activée par l'ATP. Les cellules cultivées avec du lactate comme source de carbone présentent une activité enzymatique deux à trois fois supérieure à celle observée avec le glucose comme source de carbone (Jetten et al., 1994b).

Régulation des gènes impliqués dans la glycolyse chez *Corynebacterium glutamicum* dans des conditions de privation d'oxygène

Récemment, les études du métabolisme de *C. glutamicum* R ont montré que la consommation de glucose dans des conditions de limitation en oxygène est 1,4 fois plus élevée que celle atteinte lors d'une culture aérobie (Inui et al., 2007). Ce phénomène, qui se produit dans de nombreux organismes soumis aux conditions anaérobies, est connu comme «l'effet Pasteur» (Emmerling et al., 2000). En condition de limitation d'oxygène, les gènes codant les enzymes principales de la glycolyse, y compris *gapA*, *pgk*, et *tpi*, sont plus de 2 fois surexprimés (Inui et al., 2007). Ces gènes sont organisés en cluster dans le génome de *C. glutamicum* R (Yukawa et al., 2007b). Par ailleurs, les activités des enzymes codées par ces gènes, y compris la GAPDH, la triosephosphate isomérase (TPI) et la phosphoglycérate kinase (PGK), sont également élevées dans ces conditions (Inui et al., 2007). L'augmentation de l'activité de ces enzymes conduit à augmenter le flux de

carbone via la voie glycolytique, ce qui se traduit par une augmentation de la vitesse de consommation du glucose. Cependant, la contribution respective de chacune de ces enzymes à l'augmentation du flux glycolytique chez *C. glutamicum* lors d'une limitation en oxygène reste floue.

Par ailleurs, le gène *gapA* codant la GAPDH est surexprimé dans des conditions de privation d'oxygène (Inui et al., 2007) et ce gène est réprimée par le NADH. Ceci suggère que la voie de la glycolyse de *C. glutamicum* dans cette condition est contrôlée au moins en partie par le rapport intracellulaire de NAD^+/NADH (Inui et al., 2004b; Omumasaba et al., 2004). En outre, le bicarbonate et le pyruvate jouent le rôle de déclencheurs stimulant la voie de la glycolyse lors de leur addition dans le milieu de culture. Ce phénomène est appelé l'effet « pump-priming » (Inui et al., 2004b).

La molécule centrale qui serait responsable de l'augmentation de la vitesse de consommation de glucose pourrait être le produit du gène *sigB*. En effet, le gène *sigB* qui code un facteur Sigma de groupe 2 de l'ARN polymérase de *C. glutamicum*, est surexprimé dans des conditions de limitation d'oxygène (Inui et al., 2007). L'interruption de *sigB* conduit à réduire le niveau de transcription des gènes *fba*, *tpi*, *gapA*, et *pgk*. Cela entraîne une baisse de la consommation de glucose par les cellules dans des conditions de limitation d'oxygène. Il est intéressant de noter que l'interruption de *sigB* n'affecte pas la croissance ou la consommation de glucose pendant une culture aérobie (Ehira et al., 2008). Ces résultats indiquent que *sigB* est un régulateur positif de l'expression des gènes codant des enzymes glucolytiques et qu'il serait à l'origine de l'augmentation de la consommation de glucose dans des conditions de limitation d'oxygène (Ehira et al., 2008).

I.1.2.3 Voie de synthèse du lactate

Actuellement, la production du lactate chez *C. glutamicum* a été observée dans les conditions de limitation de l'oxygène, et aussi dans des conditions aérobies: soit au début de la phase stationnaire de croissance, soit au cours de la phase exponentielle de croissance lors d'une limitation en biotine ou après un choc thermique lors d'une culture en mode continu (Dietrich et al., 2009; Dominguez et al., 1993b; Inui et al., 2004b; Okino et al., 2005; Uy et al., 2003).

Les études du métabolisme de *C. glutamicum* en anaérobiose ont montré qu'en limitation d'oxygène, *C. glutamicum* produit de l'acide L-lactique avec une productivité élevée mais également les acides succinique et acétique (Inui et al., 2004b; Okino et al., 2005). La voie de biosynthèse du lactate est donc considérée comme une des principales voies chez *C. glutamicum* dans cette condition (**Figure 1.4**).

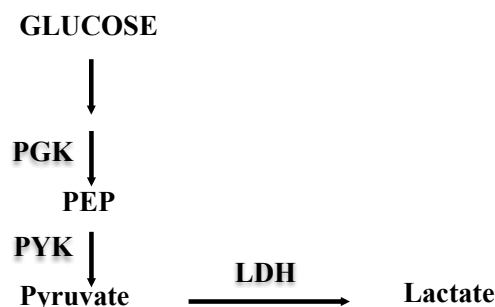


Figure 1.4: Voie de synthèse du lactate chez *C. glutamicum*.

PGK, phosphoglycérate kinase; LDH, lactate déshydrogénase ; PEP, phosphoénolpyruvate ; PYK, pyruvate kinase

Pour la production de L-lactate, le glucose est métabolisé en pyruvate via la voie de la glycolyse. Le pyruvate est ensuite transformé en L-lactate par l'action de la lactate déshydrogénase NAD-dépendante (LDH). Lors de la synthèse du lactate, cette enzyme réduit non seulement le pyruvate en lactate, mais réoxyde aussi le NADH en NAD^+ . Cela contribue à maintenir l'équilibre électronique de la cellule puisque du NADH est synthétisé par la GAPDH au cours de la glycolyse (Toyoda et al., 2009).

La LDH, codée par le gène *ldhA* (cg3219), est une protéine de 314 acides aminés. Elle est spécifique de la réduction de l'acide pyruvique en acide L-lactique, en présence de NADH comme cofacteur exclusif. Le pH optimal pour cette réaction est de 6,6. Aucune réaction n'a été détectée lors d'un test d'oxydation d'acide L-lactique par cette enzyme quel que soit le pH testé et le cofacteur utilisé (Dietrich et al., 2009). De plus, une souche mutante, déficiente en LDH, est incapable de produire le lactate (Inui et al., 2004b). Ces résultats indiquent que la LDH ne possède pas d'isoenzyme chez *C. glutamicum* et qu'elle fonctionne uniquement dans le sens de la réduction du pyruvate en lactate. Les valeurs de K_m et de V_{max} ont été calculées pour l'acide pyruvique. Elles sont égales à 7,3 mM et

120 mmol/min, respectivement. L'étude des effecteurs montre que le fructose 1,6-bisphosphate et un rapport élevé NADH/NAD^+ sont des activateurs de l'activité LDH (Garrigues et al., 1997; Garvie, 1980). Cette activation de la LDH par le fructose 1,6-bisphosphate a été décrite pour les enzymes d'un grand nombre de bactéries à Gram-positif (Garvie, 1980).

Au cours de la production de lactate dans des conditions de limitation d'oxygène, l'activité LDH augmente de cinq fois par rapport à celle observée en aérobiose. Cela suggère que l'induction de l'activité de l'enzyme LDH est liée à la production de lactate (Inui et al., 2004b). Le niveau d'expression de *ldhA* et l'activité de la LDH sont augmentés en réponse à la faible concentration en oxygène généralement mesurée en début de la phase stationnaire de croissance (Inui et al., 2007), lors d'une accumulation de fructose 1,6-bisphosphate, en présence d'un rapport NADH/NAD^+ élevé (Dietrich et al., 2009) ou encore, lors d'une limitation en oxygène (le niveau d'ARNm issu de *ldhA* augmente de 9 fois) (Inui et al., 2004b; Inui et al., 2007). L'induction notable de l'expression de *ldhA* au début de phase stationnaire n'existe qu'en présence de sucres. En leur absence, elle est complètement réprimée. Ces résultats indiquent que la présence de sucres est essentielle pour l'induction de l'expression de *ldhA* (Inui et al., 2007).

Par ailleurs, bien qu'une souche de *C. glutamicum* R déficiente en *ldhA* présente une similarité au niveau de production du succinate et de l'acétate par rapport à la souche sauvage, sa vitesse de consommation de glucose, et le rapport NAD^+/NADH sont considérablement réduits. Ces données suggèrent que le manque d'activité de la LDH induit une diminution de l'oxydation du NADH. L'accumulation intracellulaire de NADH qui en découle conduit à l'inhibition de la GAPDH et donc à la réduction ultérieure du flux glycolytique (Inui et al., 2004b).

En outre, lors de la production de lactate et de succinate sous une limitation d'oxygène, l'ajout d'une petite quantité de pyruvate conduit à une augmentation de la production de ces acides organiques et de la vitesse de consommation de glucose (Inui et al., 2004b). Ces observations ont conduit à l'hypothèse selon laquelle l'ajout de faibles concentrations de pyruvate permettrait une meilleure oxydation du NADH par l'action de la LDH, et par conséquent une augmentation du rapport NAD^+/NADH intracellulaire conduisant, au final, à une stimulation de la glycolyse.

Des études récentes ont montré que SugR, considéré comme un répresseur de l'expression des gènes de PTS et de gènes glycolytiques, est aussi un répresseur transcriptionnel du gène *ldhA*. La présence de sucres (glucose, fructose, saccharose ou ribose) diminue cette répression. Cette régulation permet aux cellules d'utiliser efficacement le sucre en réponse aux conditions environnementales (Dietrich et al., 2009; Engels et Wendisch, 2007; Gaigalat et al., 2007; Tanaka et al., 2008b; Toyoda et al., 2008). La répression par SugR de *ldhA* est importante pour la formation du L-lactate par *C. glutamicum* en anaérobiose et également en aérobiose. En effet, il a été montré que la suppression de SugR se traduit par une augmentation de l'activité *ldhA* en anaérobiose (8 fois) et en aérobiose. De plus, la surexpression de SugR réduit la production de L-lactate d'environ 25%, alors que la suppression de SugR permet d'augmenter trois fois la formation de L-lactate en anaérobiose (Engels et al., 2008). Cependant, le fructose-1-phosphate et le fructose-1,6-bisphosphate ont des effets négatifs sur la fixation de SugR aux promoteurs cibles, y compris le promoteur de *ldhA* (Engels et al., 2008; Engels et Wendisch, 2007). Le contrôle par SugR de *ldhA* assure que l'expression de *ldhA* n'est maximale que dans des conditions de limitation d'oxygène si l'apport en sucres, entrant dans la glycolyse, est suffisant (Engels et al., 2008).

Par ailleurs, LldR, une autre protéine qui se lie à la région promotrice de *ldhA*, régule aussi l'expression de *ldhA* (Toyoda et al., 2009). LldR a été caractérisée comme étant un répresseur des gènes d'utilisation du L-lactate. LldR agit comme un répresseur de *ldhA* en absence de L-lactate. Cette répression est toujours présente, et de même importance chez un mutant déficient en *ldhA* (Teramoto et al., 2010). Cependant, l'expression de *ldhA* est principalement contrôlée par SugR (Toyoda et al., 2009).

I.1.2.4 Voie de synthèse du succinate

En absence d'oxygène, si des accepteurs d'électrons exogènes ne sont pas disponibles, *C. glutamicum* produit également du succinate à partir des sucres via les voies anaplérotiques et le bras réducteur du cycle de Krebs (Dominguez et al., 1993b; Inui et al., 2004b; Okino et al., 2005).

Pour la production de succinate, le phosphoénolpyruvate métabolisé à partir du glucose, est converti en oxaloacétate (OAA) par l'enzyme anaplérotique phosphoénolpyruvate carboxylase (PEPC) (**Figure 1.5**). L'OAA peut également être synthétisé par l'intermédiaire d'une seconde enzyme anaplérotique, la pyruvate carboxylase (PC). L'OAA est ensuite métabolisé en succinate à l'aide du bras réducteur du TCA (**Figure 1.5**).

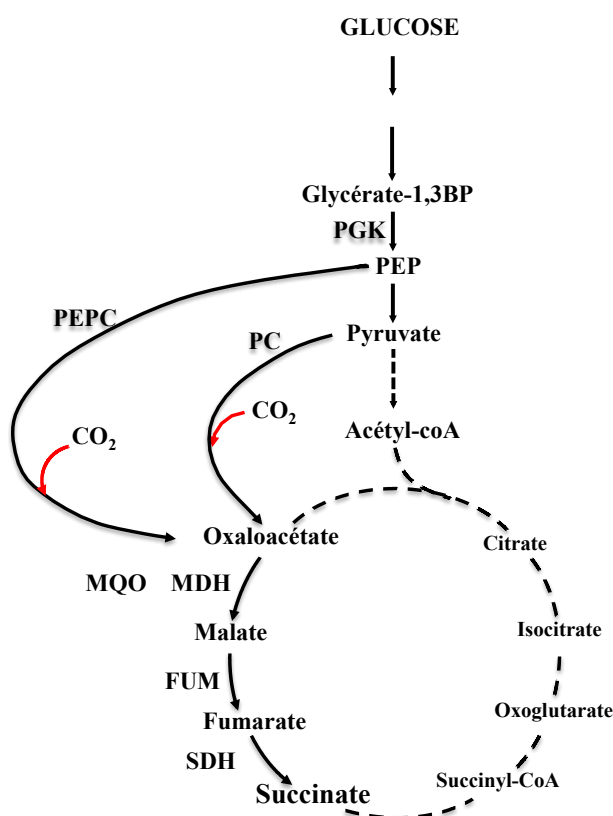


Figure 1.5: Voie de synthèse du succinate chez *C. glutamicum*.

PGK, phosphoglycérate kinase; PEPC, phosphoénolpyruvate carboxylase; PC, pyruvate carboxylase; MDH, malate déshydrogénase; FUM, fumarase; SDH, succinate déshydrogénase

Pyruvate Carboxylase

La pyruvate carboxylase (PC) catalyse la carboxylation irréversible du pyruvate en oxaloacétate en concomitance avec l'hydrolyse de l'ATP lors d'une réaction en deux étapes (Eggeling and Bott, 2005). La PC est efficacement inhibée par l'AMP, l'ADP, l'acétyl-CoA et l'aspartate (valeurs de K_i d'environ 0,75 mM, 2,6 mM, 110 μ M, et 10 mM, respectivement) (Koffas et al., 2002). La PC est une enzyme d'environ 125 kDa dont l'activité nécessite de la biotine. Sa synthèse chez *C. glutamicum* est environ trois fois sur-exprimée lors de l'utilisation du lactate comme substrat (Koffas et al., 2002; Peters-Wendisch et al., 1998). Le gène *pyc* code pour la PC, une protéine constituée de 1,140 acides aminés (Koffas et al., 2002; Peters-Wendisch et al., 1998).

PEP Carboxylase

La PEP carboxylase (PEPC) catalyse la fixation du bicarbonate sur le PEP pour former de l'oxaloacétate et du phosphate inorganique. L'enzyme de *C. glutamicum* ssp. *flavum* a été purifiée. Elle est activée par l'acétyl-CoA et le fructose-1,6-bisphosphate, et inhibée par l'aspartate et l' α -cétoglutarate (K_i de 44 μ M et 4,7 mM, respectivement) (Mori et Shiio, 1985a, b). Le même profil de régulation a été observé pour l'enzyme de *C. glutamicum* ATCC 13032 (Eikmanns et al., 1989). Le gène codant la PEPC (*ppc*) chez *C. glutamicum* a été étudié en détails (Eikmanns et al., 1989). Il est transcrit dans un opéron avec les gènes codant pour la 3-phosphoglycérate kinase et la triosephosphate isomérase (Eikmanns, 1992).

Malate Déshydrogénase

C. glutamicum possède deux types de L-malate déshydrogénase, comme c'est d'ailleurs le cas chez d'autres bactéries: une cytoplasmique, dépendant du NAD, la malate déshydrogénase (MDH) et une enzyme très active, associée à la membrane, la malate:quinone oxydoréductase (MQO). Les deux enzymes ont été purifiées et leur biochimie ainsi que leur fonction *in vivo* ont été soigneusement étudiées (Molenaar et al., 2000; Molenaar et al., 1998). Après identification et isolement des gènes *mgo* et *mdh* codant la MQO et la MDH, respectivement, il a été montré qu'un mutant déficient en

MQO est incapable de croître sur un milieu minimal alors qu'un mutant déficient en MDH n'a aucun phénotype apparent dans des conditions normales (Molenaar et al., 2000). Toutefois, récemment, il a été démontré que le produit de *mdh* est nécessaire pour la production de succinate dans des conditions de privation d'oxygène (Inui et al., 2007). Le gène *mdh* codant un polypeptide de 328 résidus, les analyses transcriptomiques n'ont révélé aucune indication quant à l'influence de la nature de la source de carbone sur l'expression de *mdh* (Gerstmeir et al., 2003). Cependant, il a été mesuré que l'activité spécifique de MDH est trois fois plus élevée lorsque les cellules sont cultivées sur de l'acétate plutôt que sur du glucose comme seule source de carbone (Molenaar et al., 2000).

Fumarase

La fumarase (FUM), encore appelée fumarate hydratase, catalyse l'interconversion du fumarate et du malate. L'activité FUM a été démontrée dans des extraits bruts de *C. glutamicum* ssp. *flavum*. Un gène putatif (*fum*) a été identifié dans le génome de *C. glutamicum* ATCC 13032 (Kalinowski et al., 2003). La protéine codée par *fum* se compose de 469 acides aminés (49,8 kDa) et est donc de taille similaire à la protéine correspondant retrouvée chez *B. subtilis* qui, elle, a 464 résidus (Miles et Guest, 1987) et à celle de *E. coli* qui, elle, possède 465 résidus (Woods et al., 1986).

Succinate déshydrogénase

La succinate déshydrogénase (SDH) de *C. glutamicum* n'a pas encore été caractérisée mais l'analyse de l'expression du génome a montré que la SDH de *C. glutamicum* se composerait de trois sous-unités, SdhA, SdhB, et SdhC, qui sont codées par l'opéron *sdhCAB* (Wendisch, 2003).

Importance respective des différentes enzymes de la voie de synthèse du succinate

Il a été rapporté que les souches mutantes de *C. glutamicum* avec interruption soit de *mdh*, soit de *sdhA* soit encore de *fum*, sont incapables de produire du succinate (Inui et al.,

2004b; Inui et al., 2007). Ceci indique que la MDH, la FUM et la SDH sont toutes les trois indispensables à la synthèse du succinate chez *C. glutamicum*. Cependant, les recherches du groupe d'Inui (Inui et al., 2007) ont montré que dans des conditions de limitation en oxygène, les gènes *fum*, *sdhA*, *sdhB* et *sdhC* sont tous sousrégulés, alors que le gène *mdh* est 2,7 fois surrégulé au niveau transcriptionnel. D'autre part, le gène *ppc*, est trois fois surexprimée chez *C. glutamicum* dans des conditions de limitation d'oxygène (Inui et al., 2007). Dans ces conditions, l'OAA est synthétisé plutôt via la conversion du PEP catalysée par PEPC que via la conversion du pyruvate par la PC (Inui et al., 2004b; Inui et al., 2007). Dans des conditions de limitation d'oxygène, la PEPC est ainsi l'enzyme anaplérotique prédominante pour la production de succinate (Inui et al., 2004b). Ceci est particulièrement remarquable car dans des conditions aérobies, la PC est connue comme étant l'enzyme anaplérotique prédominante permettant de reconstituer le pool OAA en vue de la production d'acides aminés comme le glutamate ou la lysine (Peters-Wendisch et al., 2001). La surexpression de PEPC dans des conditions de limitation d'oxygène permet d'accroître la production de succinate par *C. glutamicum* et engendre également l'augmentation de l'activité de MDH (Inui et al., 2007).

Récemment, l'interruption de *sigB* a conduit à la diminution du niveau de transcription de *ppc*, de *fum* et de *pqo*, ce qui a entraîné une diminution de la vitesse de production de succinate dans des conditions de limitation d'oxygène (Ehira et al., 2008). Cela indique que dans ces conditions *sigB* pourrait être un régulateur positif de la production du succinate chez *C. glutamicum*.

Plus récemment, un nouvel exporteur du succinate, *SucE1*, fonctionnel lors de la production de succinate, a été identifié. Le niveau d'expression de *sucE1* est plus élevé dans des conditions microaérobies et anaérobies que dans des conditions aérobies. La surexpression ou l'interruption de *sucE1* conduit, respectivement, à augmenter ou diminuer la production du succinate. Ces résultats suggèrent que *sucE1* code un exporteur du succinate induit dans des conditions pauvres en oxygène, et important pour la production de succinate dans ces conditions (Fukui et al., 2011).

I.1.2.5 Voie de synthèse de l'acétate

Contrairement à *E. coli* ou *B. subtilis*, l'acétate n'est pas un métabolite important et typique du catabolisme du glucose chez *C. glutamicum*. Mais dans des conditions de limitation en oxygène, *C. glutamicum* peut produire de l'acétate (Dominguez et al., 1993b; Inui et al., 2004b). La formation de l'acétate par *C. glutamicum* implique la décarboxylation du pyruvate par la pyruvate:quinone oxydoréductase, PQO (Schreiner et Eikmanns, 2005). L'accumulation d'acétate peut entraîner une diminution de la productivité des procédés de production de métabolites désirés en raison d'une perte de carbone et d'une augmentation du coût de purification des produits cibles. La plupart des travaux sur la synthèse d'acétate chez *C. glutamicum* ont donc eu pour objectif de réduire la production de cette molécule.

En se basant sur les données du séquençage génomique de *C. glutamicum* R (Yukawa et al., 2007b), des gènes potentiellement impliqués dans la formation d'acétate ont été identifiés. Il s'agit des gènes codant la pyruvate déshydrogénase (PDHC), la phosphoacetyltransférase (PTA) et l'acétate kinase (ACK).

La pyruvate:quinone oxydoréductase (PQO) codée par le gène *pqo* chez *C. glutamicum* a également été identifiée comme pouvant être impliquée dans la synthèse d'acétate (Schreiner et Eikmanns, 2005; Schreiner et al., 2006). Enfin, deux homologues de la CoA-transférase (CTF) qui catalyse l'hydrolyse de l'acétyl-CoA pour former l'acétate, ont été trouvés dans le génome de *C. glutamicum* R (Yasuda et al., 2007b).

Le complexe pyruvate déshydrogénase (PDHC) contient trois sous-unités appelées E1p (pyruvate déshydrogénase), E2p (dihydrolipoamide acetyltransferase) et LPD (lipoamide déshydrogénase) (Eggeling et Bott, 2005). L'activité de la PDHC a été détectée dans diverses souches de *C. glutamicum* (Cocaign-Bousquet et al., 1996; Schwinde et al., 2001; Shiio et Ujigawa, 1978). Cependant, en dépit de son rôle crucial, relativement peu d'efforts ont été consacrés à l'étude du complexe au niveau moléculaire et structural. L'activité de la PDHC dépend de la nature des substrats, des cofacteurs thiamine pyrophosphate et Mg^{2+} et l'addition de cystéine ou de dithiothréitol (DTT) augmente l'activité du complexe de *C. glutamicum* (Shiio et Ujigawa, 1978). Jusqu'à présent, les gènes codant pour E1p et E2p n'ont pas été étudiés. En revanche, un gène fonctionnel *lpd* codant pour la LPD de *C. glutamicum* a été caractérisé (Schwinde et al., 2001). La LPD

présente jusqu'à 58% d'identification avec les LPD provenant d'autres organismes et la protéine purifiée catalyse réversiblement la réoxydation de l'acide dihydrolipoïque et la NADH: NAD⁺ transhydrogénation. La surexpression du gène *lpd* isolé chez *C. glutamicum* aboutit à une activité LPD douze fois plus importante. Toutefois, l'activité PDH globale n'est pas affectée (Schwinde et al., 2001).

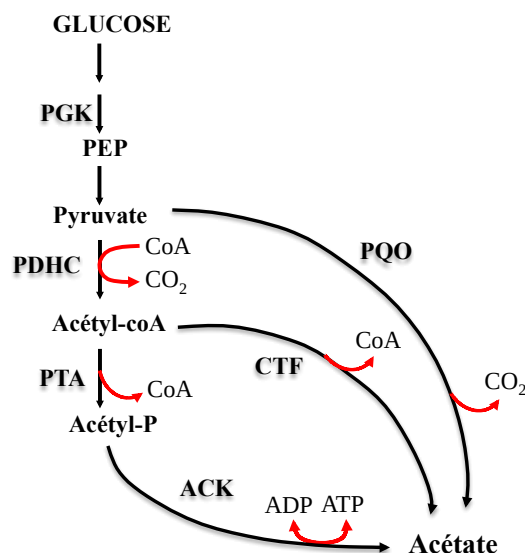


Figure 1.6: Voie de synthèse de l'acétate chez *C. glutamicum*

PGK, phosphoglycérate kinase; PDHC, pyruvate déshydrogénase complexe; PTA, phosphotransacétylase; ACK, acétate kinase; CTF, CoA transférase; PQA, pyruvate:quinone oxydoréductase

La **figure 1.6** montre les deux voies de synthèse de l'acétate à partir du pyruvate: la voie de conversion directe du pyruvate en acétate, qui est catalysée par la PQA, et l'autre voie, dont l'acétyl-CoA est un intermédiaire. En fait, dans des conditions de limitation d'oxygène presque tout l'acétate est produit via l'acétyl-CoA. Une souche de *C. glutamicum* déficiente en *aceE* produit très peu d'acétate dans ces conditions (Blombach et al., 2007). La voie principale de production d'acétate chez *C. glutamicum* utilise donc la PDHC avec formation d'acétyl-CoA. L'inactivation simultanée des voies PTA-ACK et CTF conduit à une réduction significative de la production d'acétate. Par contre, l'inactivation individuelle de chaque gène n'a aucune incidence mesurable sur la production d'acétate. La voie CTF semble compenser la déficience de la voie de PTA-ACK et inversement. Des souches $\Delta aceE \Delta pqa \Delta ldhA$ et $\Delta aceE \Delta ldhA$ produisent encore

de l'acétate mais à des niveaux très faibles. Ceci suggère que d'autres voies de formation de l'acétate à partir de l'acétyl-CoA sont probablement présentes chez *C. glutamicum* et restent à identifier.

Chez un mutant avec interruption de *sigB*, dans des conditions de limitation d'oxygène, le gène *pqo* est sousrégulé ce qui entraîne une baisse de 47% de la vitesse de production d'acétate (Ehira et al., 2008). Ceci indique que, comme pour la synthèse de succinate, SigB pourrait être un régulateur positif de la production d'acétate de *C. glutamicum* dans des conditions de limitation d'oxygène.

I.2 Ingénierie métabolique appliquée à *Corynebacterium glutamicum*

I.2.1 Introduction

Dans le contexte de croissance inévitable du prix des matières premières d'origine fossile, la tendance de l'utilisation des procédés biotechnologiques prend de plus en plus d'importance. Il y a une longue tradition de l'application de cultures microbiennes à la fabrication des produits alimentaires, et aussi pour la production d'acides organiques, d'alcools, d'acides aminés et de vitamines. Par ailleurs, un autre débouché important des produits d'origine microbienne est l'industrie pharmaceutique notamment les antibiotiques. L'amélioration des souches microbiennes d'intérêt occupe donc une place importante pour l'optimisation de ces procédés.

Historiquement, l'amélioration d'une souche microbienne passait par une mutagenèse aléatoire suivie par une variété de procédures de sélection. Depuis une trentaine d'années, l'application de la technologie de l'ADN recombinant a permis d'améliorer significativement les souches microbiennes d'intérêt. Parmi les avantages apportés par cette technologie, il y a la possibilité de développer de nouvelles voies métaboliques, la possibilité du contrôle de niveaux et du temps d'expression des gènes codant pour les enzymes impliqués dans une voie de biosynthèse. En outre, il est possible d'ajouter au répertoire génétique d'une espèce des gènes importants provenant de la même ou d'autres espèces. L'objectif général de cette approche est, en fait, de diriger efficacement le flux des précurseurs vers une voie métabolique définie pour maximiser le taux et la conversion en produit. Pour ce faire, il est essentiel de pouvoir comprendre les mécanismes de

l'expression génétique et de la régulation ainsi que la biochimie et la physiologie de la souche devant être modifiée (Jetten et al., 1994a).

Le génie métabolique est une méthodologie permettant une amélioration ciblée de la formation d'un métabolite ou des propriétés cellulaires grâce à la modification des réactions biochimiques spécifiques dans des réseaux métaboliques complexes (Bailey, 1991; Stephanopoulos et Vallino, 1991). Le génie métabolique est donc un outil largement utilisé en biotechnologie.

Durant ces dernières décennies, *C. glutamicum* est apparu comme un microorganisme robuste et polyvalent pour la production à grande échelle d'acides aminés. Les premiers outils du génie génétique pour *C. glutamicum* sont apparus en 1984 (Katsumata et al., 1984; Ozaki et al., 1984). Cela a été un instrument pour l'initialisation de programmes de recherche axés sur le développement d'un large spectre de méthodes génétiques et, ensuite, sur la conception métabolique de souches productrices (Kirchner et Tauch, 2003).

Récemment, le séquençage complet du génome de plusieurs souches de *C. glutamicum* a été réalisé (Ohnishi et al., 2002; Tauch et al., 2002). Ceci a ouvert un nouvel espace de recherche pour cet organisme. Le développement de nouvelles générations de souches productrices a été envisagé par des approches génomiques et par des analyses globales en utilisant la transcriptomique et la protéomique (Hodgson, 1998).

Dans la suite de cette synthèse bibliographique, nous nous sommes intéressés donc aux approches d'ingénierie métabolique initiées chez *C. glutamicum* pour la production d'acides aminés et d'acides organiques. En raison de l'intérêt porté au cours de ce travail les productions de deux molécules, l'éthanol et l'acide itaconique, seront plus particulièrement discutées.

I.2.2 Production des acides aminés

Les acides aminés sont largement utilisés dans l'industrie chimique et en pharmacie comme précurseurs, mais sont aussi utilisés dans l'industrie alimentaire comme additifs. *C. glutamicum* joue un rôle particulièrement important pour la production d'acides aminés, en particulier le L-glutamate et la L-lysine. Une connaissance approfondie de la physiologie, la biochimie et la génétique a permis de développer efficacement des souches productrices de ces acides aminés notamment par ingénierie métabolique.

Glutamate

Le plus grand marché parmi les acides aminés est celui du glutamate. Le glutamate est principalement utilisé comme exhausteur de goût. La production mondiale annuelle de glutamate a récemment atteint plus de 2,5 millions de tonnes (Becker et Wittmann, 2012).

Lors de la culture, la surproduction de glutamate par *C. glutamicum* qui n'est pas naturelle, doit être induite. Plusieurs moyens d'induction ont été décrits : l'épuisement du milieu en biotine, qui est un élément essentiel pour la croissance; l'ajout de tensioactifs tels que le Tween 40; l'ajout de pénicilline, qui inhibe la biosynthèse du peptidoglycane, l'ajout d'éthambutol, un médicament antimycobactérien qui inhibe la biosynthèse des acides mycoliques dans des mycobactéries (Kim et al., 2009); ou l'élévation de la température du milieu de culture de 33 à 39°C chez la souche 2262 (Delaunay et al., 2002).

La voie de synthèse de glutamate est présentée dans la **figure 1.7**. De nombreuses études sur les voies de biosynthèse de L-glutamate chez *C. glutamicum* ont été réalisées, par exemple sur le cycle TCA (Kawahara et al., 1997), les voies anaplérotiques (Peters-Wendisch et al., 2001; Riedel et al., 2001) ou la voie d'assimilation de l'ammonium (Beckers et al., 2001; Jakoby et al., 1999). Il y a aussi eu des efforts de compréhension du métabolisme global, dont l'objectif était de comprendre le métabolisme énergétique ou la répartition des flux métaboliques (Aoki et al., 2005).

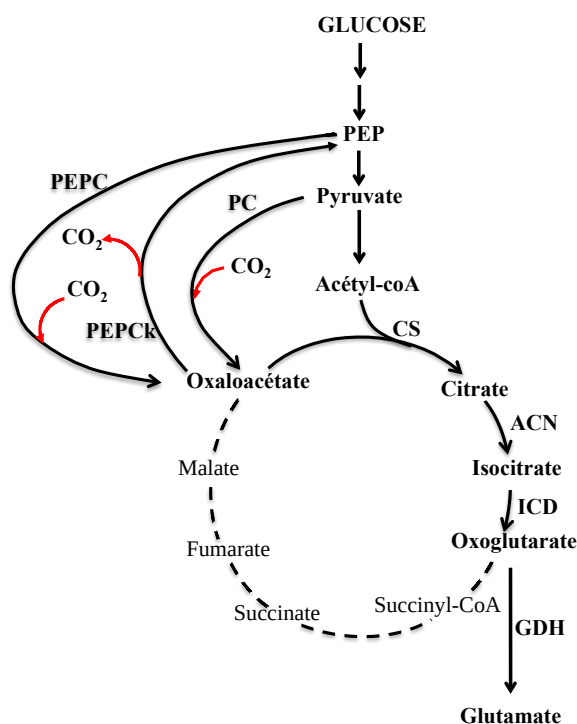


Figure 1.7: Voie de synthèse du glutamate chez *C. glutamicum*

PEPC, phosphoénolpyruvate carboxylase; PC, pyruvate carboxylase; PEPCK, phosphoénolpyruvate carboxykinase; CS, citrate synthase; ACN, aconitase; ICD, isocitrate déshydrogénase; GDH, glutamate déshydrogénase

De nombreux travaux ont porté sur la redirection du flux de carbone afin de favoriser la synthèse et la production de glutamate. Dans un premier temps, les voies anaplérotiques ont été une cible privilégiée de ces travaux (Sauer et Eikmanns, 2005). Ainsi une souche surexprimant le gène *pyc* a permis une production de glutamate sept fois plus élevée par rapport à la souche sauvage (Peters-Wendisch et al., 2001). Cependant, la production de glutamate par une souche, dans laquelle *pyc* avait été éliminé, a pu être accrue par la surexpression de *ppc* (Sato et al., 2008). La double interruption de *dtsR1* (codant une sous-unité du complexe de l'acétyl-CoA carboxylase) et de *pyc* a conduit à la surproduction efficace de L-glutamate chez *C. glutamicum* en raison de l'augmentation de l'activité PEPC (Yao et al., 2009b).

Les premières études biochimiques ont démontré que l'activité de l' α -cétoglutarate

déshydrogénase (ODH) est significativement diminuée lors qu'il y a de production de glutamate (Kawahara et al., 1997). En effet, ceci conduit à une augmentation du flux métabolique vers la synthèse du glutamate au détriment de la synthèse de succinyl-CoA (Shimizu et al., 2003). Ainsi, une surproduction de L-glutamate chez *C. glutamicum* peut être obtenue par l'élimination de l'activité ODHC, suite à une interruption du gène *odhA*, codant la sous-unité E1 de ODHC, en excès de biotine (Asakura et al., 2007). Par ailleurs, la surexpression du protéine OdhI, un inhibiteur de ODHC (Niebisch et al., 2006), conduit également à la production de glutamate sans nécessiter d'induction (Kim et al., 2010).

D'autres méthodes d'amélioration de la production de glutamate ont également été rapportées (Aoki et al., 2005). La manipulation du métabolisme énergétique par élimination de l' H^+ -ATPase a permis d'obtenir une augmentation de la production de L-glutamate par *C. glutamicum*. La diminution du niveau énergétique intracellulaire permettrait donc d'augmenter le métabolisme du sucre et d'améliorer la synthèse de glutamate. De même, en introduisant les gènes de synthèse du polyhydroxybutyrate (PHB) chez *C. glutamicum*, ce qui conduit à une réduction de la disponibilité en énergie, une augmentation de production du L-glutamate de 39 à 68% a pu être obtenue (Liu et al., 2007).

Par ailleurs, notons que des études d'ingénierie métabolique de *C. glutamicum* ont été réalisées en vue de la production de L-glutamate à partir de substrats non naturels pour la bactérie tels que le β -glucane (Tsuchidate et al., 2011) et l'amidon (Yao et al., 2009a).

Lysine

La L-lysine est l'un des acides aminés essentiels les plus importants qui est utilisé principalement comme complément dans l'alimentation animale. La production annuelle de lysine est d'environ 1,5 million de tonnes (Becker et Wittmann, 2012). Chez *C. glutamicum*, elle est synthétisée à partir du pyruvate, de l'oxaloacétate et nécessite deux molécules d'ammoniac et quatre NADPH supplémentaires (**Figure 1.8**). *C. glutamicum* ne produit pas naturellement la lysine. Une modification génétique est indispensable pour obtenir l'excrétion et l'accumulation de lysine dans le milieu de culture. Les souches de *C. glutamicum* obtenues par la mutagenèse aléatoire et le criblage sont souvent moins stables que les souches sauvages, ce qui justifie pleinement l'utilisation de l'ingénierie

métabolique (Wendisch et al., 2006). La surexpression de gènes essentiels à la production de lysine chez *C. glutamicum* a abouti à une souche capable de produire L-lysine avec un rendement élevé grâce à l'intensification du flux de la biosynthèse de la lysine, la réduction du flux de synthèse de la thréonine et à l'amélioration de l'approvisionnement en précurseurs (Ohnishi et al., 2002). Les gènes *lysC*, *hom* et *pyc* codant respectivement l'aspartokinase, l'homosérine déshydrogénase et la pyruvate carboxylase ont été identifiés dans la souche produisant traditionnellement la L-lysine. L'introduction supplémentaire d'un allèle mutant *gnd* codant la 6-phosphogluconate déshydrogénase, a permis d'induire l'augmentation de la production de lysine à partir du glucose (Ohnishi et al., 2005). De même, la surexpression de l'endogène *fbp* codant pour fructose-1,6-bisphosphatase a amélioré la production de la lysine à partir du saccharose (Georgi et al., 2005).

C. glutamicum sauvage n'est pas capable d'utiliser le lactose, le galactose ou l'amidon. L'application du génie métabolique sur cette souche en introduisant *lacYZ* de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* et *galMKTE* de *L. lactis* subsp. *cremoris* a permis la production de lysine à partir du lactosérum (Barrett et al., 2004). En introduisant le gène *amyE* de *Streptomyces griseus* chez *C. glutamicum* productrice de L-lysine, Seibold et al. (2006) ont obtenu une souche de *C. glutamicum* exprimant l' α -amylase extracellulaire. Ainsi cette souche peut utiliser l'amidon pour produire de la lysine. Des travaux supplémentaires sont néanmoins nécessaires pour une production efficace et durable de lysine à partir de l'amidon, du lactosérum ou d'autres sources de carbone non naturelles pour *C. glutamicum*.

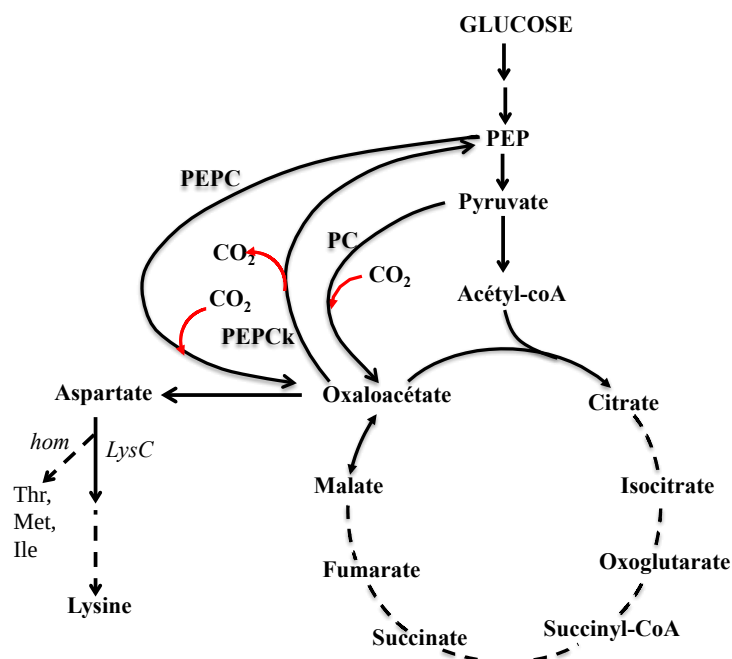


Figure 1.8: Voie de synthèse de lysine chez *C. glutamicum*

PEPC, phosphoenolpyruvate carboxylase; PC, pyruvate carboxylase; PEPCk, phosphoenolpyruvate carboxykinase; *lysC*, gène codant l'aspartokinase.

L-alanine

La L-alanine peut être utilisée avec d'autres L-acides aminés pour la thérapie nutritionnelle pré- et postopératoire dans des applications médicales et vétérinaires (Hols et al., 1999). Elle est également utilisée comme additif alimentaire en raison de son goût sucré. La production mondiale annuelle de L-alanine est d'environ 500 tonnes et ce marché est actuellement limité par les coûts de production.

Récemment, des souches de *C. glutamicum* ont été développées pour la production de L-alanine en anaérobie grâce à la surexpression du gène alanine déshydrogénase (*alaD*) de *Lysinibacillus sphaericus*, ceci pour diriger les flux de carbone des acides organiques vers l'alanine et aussi grâce à l'inactivation des gènes *ldhA* et *ppc* impliqués dans la synthèse des acides organiques (**Figure 1.9**). Cependant, en raison de l'inhibition de l'activité GAPDH par un rapport élevé NADH/NAD^+ , la productivité d'alanine d'une telle souche ($\Delta\text{ldhA } \Delta\text{ppc } \text{alaD}^+$) est limitée (Jojima et al., 2010). Pour améliorer la productivité en alanine, le gène *gapA* codant la GAPDH a été surexprimé afin d'améliorer la

consommation de glucose. De plus, le gène *alr* codant l'alanine racémase (Yukawa et al., 2007b) a été éliminé pour éviter la formation d'énantiomères d'alanine. La souche ($\Delta ldhA \Delta ppc \Delta alr alaD^+ gapA^+$) ainsi obtenue a produit 98 g/l de L-alanine après 32 h dans des conditions de limitation d'oxygène (Yukawa et al., 2007b).

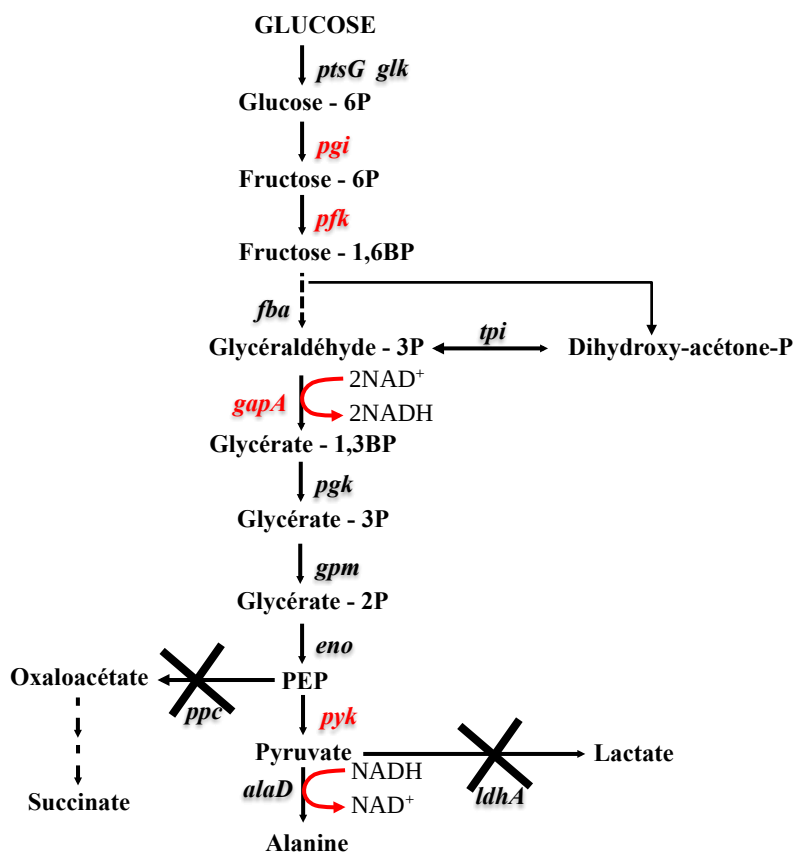


Figure 1.9: Voie de synthèse de l'alanine chez *C. glutamicum*

alaD : gène alanine déshydrogénase

Plus récemment, Yamamoto et ses collègues (Yamamoto et al., 2012) ont généré une souche ayant une très grande vitesse de production d'alanine, de 50,6 mM/h et un rendement de conversion du substrat très élevé, de 91,8%, en 48 h, dans une culture discontinue dans des conditions de privation en oxygène. Pour obtenir cette souche, les gènes *gapA*, *pyk*, *pfk* et *pgi* sous le contrôle du promoteur P_{tac} ont été intégrés dans l'ADN chromosomique de *C. glutamicum*. Dans le même temps, les gènes *ldhA* et *ppc* ont été éliminés. La production du procédé, la vitesse de consommation de glucose, la concentration finale en alanine, la productivité en alanine et le rendement [alanine]/[biomasse] ont été améliorés de 4,8, 6,4, 7,0, et 1,3 fois, respectivement, par

rapport à ceux obtenus avec la souche parentale, avec l'avantage supplémentaire d'une diminution de la production des sous-produits (Yamamoto et al., 2012).

I.2.3 Production des acides organiques

Production d'acide succinique

L'acide succinique et ses sels ont une grande variété d'applications notamment comme tensioactif, agent moussant, chélateur d'ions, additif alimentaire, dégivreur routier et aérien. Ils peuvent aussi être utilisés comme plateforme pour la synthèse d'une variété d'autres produits chimiques par exemple le tétrahydrofurane, le 1,4-butanediol, la γ -butyrolactone, la N-méthyl pyrrolidone, la pyrrolidone-2. Par ailleurs, le marché des polymères du lactate et du succinate, matières premières pour la fabrication de plastiques biodégradables, augmente de plus en plus (Flieger et al., 2003; Fukui et al., 2011; Zeikus et al., 1999). La culture microbienne est largement utilisée depuis longtemps pour la production d'acides organiques. Actuellement, des efforts de recherche se concentrent sur les souches bactériennes synthétisant le succinate comme produit final du catabolisme. L'objectif de ces travaux est d'établir des procédés biotechnologiques compétitifs de production du succinate (Wendisch, 2007).

Récemment, il a été montré qu'en absence d'oxygène, si des accepteurs d'électrons exogènes ne sont pas disponibles, *C. glutamicum* peut produire le succinate à partir de sucre via le bras réducteur du cycle TCA (Inui et al., 2004b; Okino et al., 2005; Okino et al., 2008a). L'ajout de bicarbonate permet d'augmenter la vitesse de consommation de glucose et de production de lactate (2,5 fois et 2,3 fois, respectivement) et d'augmenter la production de succinate de 3,6 fois. La consommation du bicarbonate et la production de succinate sont quasiment proportionnelles. L'effet stimulant du bicarbonate a été expliqué par l'augmentation du rapport NAD^+/NADH (2,9 vs 1,7 en l'absence de bicarbonate) qui pourrait réduire l'inhibition de la GAPDH par le NADH. D'un autre côté, l'ajout de 10 mM de pyruvate a montré un effet similaire à celui du bicarbonate. De plus, bien que le pyruvate ait été rapidement consommé, son effet stimulant est resté. Cette fonction du pyruvate n'est pas encore comprise clairement (Inui et al., 2004b). La délétion de *ldhA*, codant la L-lactate déshydrogénase, ou la surexpression du gène endogène *pyc*, codant la pyruvate carboxylase, a également conduit à augmenter de façon significative la

production de succinate (Inui et al., 2004b; Okino et al., 2008a). Le rendement du succinate a alors été de 1,4 mole par mole de glucose. Les productivités volumétriques et spécifiques de cette souche ont été beaucoup plus élevées que celles obtenues lors de la production de succinate en aérobiose par *E. coli*. Ainsi, *C. glutamicum* se positionne comme une souche alternative à *E. coli* pour la production biotechnologique de succinate. D'autant plus que lors du procédé de production, *C. glutamicum* ne nécessite pas de milieu complexe comme *E. coli* (Wendisch et al., 2006). Plus récemment, l'importance de *sucE*, transporteur du succinate, a été démontré lors de la production du succinate chez *C. glutamicum* (Fukui et al., 2011; Huhn et al., 2011). Toutefois, la suppression de *sucE1* n'est pas suffisante pour inhiber complètement la production de succinate sous conditions microaérobies ce qui suggère la présence d'autres exporteurs fonctionnels du succinate chez *C. glutamicum* (Fukui et al., 2011; Huhn et al., 2011). Par conséquent, SucE1, et probablement d'autres exporteurs du succinate non identifiés, pourraient être des cibles intéressantes de l'ingénierie métabolique de *C. glutamicum* pour la production du succinate.

Les études de la production de succinate de *C. glutamicum* ont jusqu'à présent dû faire face à deux problèmes: (i) Comment éliminer la formation de l'acétate comme sous-produit et (ii) Comment améliorer le rendement succinate par glucose qui est limitée par la disponibilité des équivalents réducteurs pour la conversion de l'oxaloacétate en succinate dans le cycle TCA? Ces deux problèmes ont été récemment résolus par la disruption des gènes *cat*, *pqo*, *pta-ack* et *ldhA* en parallèle avec l'intégration chromosomique des gènes de la pyruvate carboxylase, *pyc*^{P458S} de *C. glutamicum* DM1727 sous le contrôle du promoteur *tuf*, et *fdh* de *Mycobacterium vaccae* et la surexpression de *gapA* (Litsanov et al., 2012). La souche modifiée a permis d'accumuler, en anaérobiose, en culture semi-continue avec du glucose, du formiate et du dioxyde de carbone comme sources de carbone, de 1,13 M de succinate après 53 h de culture, avec un rendement de 1,67 mole de succinate produite par mole de glucose consommée et un niveau très bas de sous-produits.

Production de l'acide lactique

L'acide lactique est largement utilisé dans l'industrie alimentaire et également comme précurseur chimique pour la production de plastiques biodégradables (Datta et al., 1995; Hofvendahl et Hahn-Hagerdal, 2000). Historiquement, les *Lactobacillus* ont été principalement utilisées pour la production sélective de D-(-) ou L-(+) acide lactique (Benthin et Villadsen, 1995; Kyla-Nikkila et al., 2000). Cependant, les bactéries lactiques présentent des caractères indésirables comme leur besoin en acides aminés ou en nutriments complexes pour leur croissance et l'acide lactique synthétisé est parfois délicat à purifier. Par conséquent, d'autres biocatalyseurs ont été développés en vue d'une production significative de D- et L-acide lactiques.

Dans un milieu synthétique, lors de la suppression de l'apport en oxygène, *C. glutamicum* présente naturellement une haute productivité en L-acide lactique, avec la présence d'acide succinique et aussi d'acide acétique (Inui et al., 2004b). En profitant de cette productivité élevée, *C. glutamicum* a été modifié génétiquement pour accroître la production de D-acide lactique (Okino et al., 2008b). La modification génétique a été réalisée ici par l'introduction et la surexpression du gène codant la D-lactate déshydrogénase de *Lactobacillus delbrueckii* en parallèle avec la suppression de *ldhA* qui est responsable de la production L-lactate. En conséquence, cette souche a produit jusqu'à 120 g/l de D-acide lactique avec une pureté optique supérieure à 99,9%, après 30 h de fermentation dans un milieu synthétique.

Par ailleurs, l'interruption du gène *pyc* a également permis une augmentation de la production de L-lactate chez *C. glutamicum* en limitation en biotine (Sato et al., 2008).

I.2.4 Modification métabolique de *C. glutamicum* pour la production du bioéthanol

Traditionnellement, *S. cerevisiae* et *Z. mobilis* ont été utilisés pour la production d'éthanol. Cependant, dans la dernière décennie une variété de micro-organismes a été modifiée pour tenter d'améliorer les performances du procédé de production d'éthanol. L'utilisation des bactéries à Gram-négatif: *Z. mobilis*, *E. coli* et *Klebsiella oxytoca*, et des levures *S. cerevisiae* et *Pichia stipidis* a obtenu les plus grands succès (Dien et al., 2003; Jeffries et Jin, 2004). Des chercheurs se sont également intéressés à *C. glutamicum* pour la production d'éthanol car cette bactérie est largement utilisée pour la production industrielle

de nombreux métabolites dont des acides aminés et des acides organiques (Inui et al., 2004a). En outre, la croissance de *C. glutamicum* est quasiment interrompue lors d'une limitation d'oxygène. L'énergie consommée est donc principalement utilisée pour la production de composés d'intérêt. L'absence de croissance permet aussi l'utilisation de cultures à haute densité qui conduisent à une productivité volumétrique élevée (Inui et al., 2004b). Pour profiter de ces caractéristiques, le métabolisme central de *C. glutamicum* a dû être modifié car *C. glutamicum* ne possède pas naturellement les enzymes permettant la synthèse d'éthanol.

Pyruvate décarboxylase (PDC) et alcool déshydrogénase (ADH) de *Z. mobilis*

La pyruvate décarboxylase (PDC, CE 4.1.1.1) catalyse la décarboxylation non oxydative du pyruvate en acétaldéhyde en libérant du dioxyde de carbone. L'acétaldéhyde généré par cette réaction est réduit en éthanol par l'alcool déshydrogénase (ADH, CE 1.1.1.1). Ces deux enzymes (PDC et ADH) sont suffisantes pour convertir le pyruvate intracellulaire et le NADH en éthanol (Talarico et al., 2005). Au cours de la fermentation alcoolique, PDC et ADH II sont cruciales car non seulement l'utilisation du pyruvate, mais aussi le rendement en éthanol et l'efficacité de la fermentation, sont affectés directement par ces enzymes.

Bien que la PDC soit largement distribuée parmi les plantes, les levures et les champignons, elle est absente chez les animaux et rare chez les bactéries. L'enzyme PDC a des propriétés cinétiques, des stabilités thermiques et un usage des codons différents selon l'origine de l'organisme la synthétisant (Raj et al., 2002).

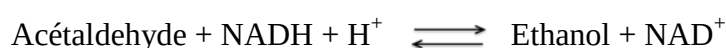
La PDC de *Z. mobilis* a été la première PDC bactérienne identifiée (Dawes et al., 1966), caractérisée (Bringer-Meyer et al., 1986; Hoppner et Doelle, 1983; Neale et al., 1987b), et clonée (Conway et al., 1987a; Neale et al., 1987a). Elle est donc devenue l'une des PDC les plus étudiées. La PDC de *Z. mobilis* codée par un gène ayant 1707 nucléotides de longueur (Neale et al., 1987a) est constituée de 568 acides aminés avec une masse de sous-unité égale à 60790 daltons. Elle a été découverte comme la première PDC n'étant pas activée par le substrat (Hoppner et Doelle, 1983). Elle a un K_m pour le pyruvate extrêmement faible, de 0,4 mM (Bringer-Meyer et al., 1986). Cette faible valeur K_m permet à la PDC de rivaliser pour l'utilisation du pyruvate avec les autres enzymes du

métabolisme central et aboutit à la formation d'une grande quantité d'acétaldéhyde, qui est ensuite converti en éthanol par l'alcool déshydrogénase (Ingram et al., 1987). Par ailleurs, la PDC de *Z. mobilis* est aussi la PDC la plus stable (Dobritzsch et al., 1998). Pour ces raisons, la PDC de *Z. mobilis* a été transférée et utilisée pour la production d'éthanol chez une grande variété d'organismes (Arfman et al., 1992; Bucher et al., 1994; Deng et Coleman, 1999; Gold et al., 1996; Ingram et al., 1999; Ingram et al., 1998; Wood et Ingram, 1992).

ADH

Les ADHs sont presque présentes chez tous les organismes. Elles sont capables de métaboliser une grande variété de substrats. Elles sont ainsi impliquées dans plusieurs processus métaboliques, par exemple dans le métabolisme des alcools, des alcanes, des sucres et des lipides, et dans la défense cellulaire contre les alcools et les aldéhydes exogènes (Burdette et al., 2002; Ma et al., 1995; Park et Plapp, 1991; Tani et al., 2000; Vangnai et al., 2002; Yoon et al., 2002).

Chez les organismes producteurs, l'ADH catalyse la dernière réaction de la voie de synthèse de l'éthanol, une réduction réversible de l'acétaldéhyde:



La valeur de K_{eq} d'oxydation de l'éthanol étant aussi faible que $6,92 \times 10^{-12}$ M, l'équilibre est davantage déplacé vers la synthèse d'éthanol (Burton, 1974). Bien que la plupart des bactéries anaérobies et certaines bactéries aérobies synthétisent de l'éthanol comme un produit final, la quantité d'alcool déshydrogénase présente dans ces cellules est habituellement inférieure de 1 à 2 ordres de grandeur à celle trouvée dans les cellules de *S. cerevisiae*. Cependant, les niveaux d'alcool déshydrogénase chez *Z. mobilis* approchent ceux mesurés chez la levure.

Z. mobilis est dotée deux isoenzymes de l'alcool déshydrogénase : une contenant du zinc (ADH I) et l'autre contenant du fer (ADH II). Généralement, les deux enzymes ont besoin du cofacteur NAD^+ (Conway et Ingram, 1989; Reid et Fewson, 1994). Alors qu'ADH I est essentielle en tout début de la phase de production d'éthanol, ADH II intervient

pendant la majeure partie de cette phase de production. C'est elle qui permet donc l'obtention d'une concentration élevée en éthanol (O'Mullan et al., 1995). La taille de la séquence d'ADN codant ADH II chez *Z. mobilis* est de 1.4kb. Elle contient un cadre de lecture ouvert codant pour un polypeptide de 383 acides aminés, avec une masse moléculaire de 40141 Daltons (Conway et al., 1987b).

Les cultures en anaérobiose de *Z. mobilis* permettent la production d'éthanol avec un rendement élevé à partir du glucose (Kalnenieks et al., 2002). Une production d'éthanol, mais avec des rendements beaucoup plus faibles a été rapportée pour les cultures aérobies (Kalnenieks et al., 2000; Viikari, 1988). Le rendement en éthanol faible, ainsi que l'accumulation de sous-produits comme l'acétaldéhyde, l'acétone et l'acétate indiquent qu'une importante, voire la majeure, partie du NADH est oxydée par la chaîne respiratoire dans ces conditions de culture (Kalnenieks et al., 2002).

La PDC et l'ADH II de *Z. mobilis* présentent donc des caractéristiques intéressantes qui en font des outils de choix pour introduire la capacité à produire de l'éthanol à partir de pyruvate chez de nombreux microorganismes dont *C. glutamicum*.

Production d'éthanol chez *C. glutamicum*

Une souche recombinée exprimant les gènes codant la pyruvate décarboxylase (*pdc*) et l'alcool déshydrogénase (*adhB*) de *Z. mobilis* a été construite chez *C. glutamicum*. Chaque gène a été placé sous le contrôle du promoteur de *ldhA* de *C. glutamicum* qui est induit sous une limitation en oxygène (Inui et al., 2004b). Le métabolisme central de la souche ainsi construite est présenté dans la **figure 1.10**.

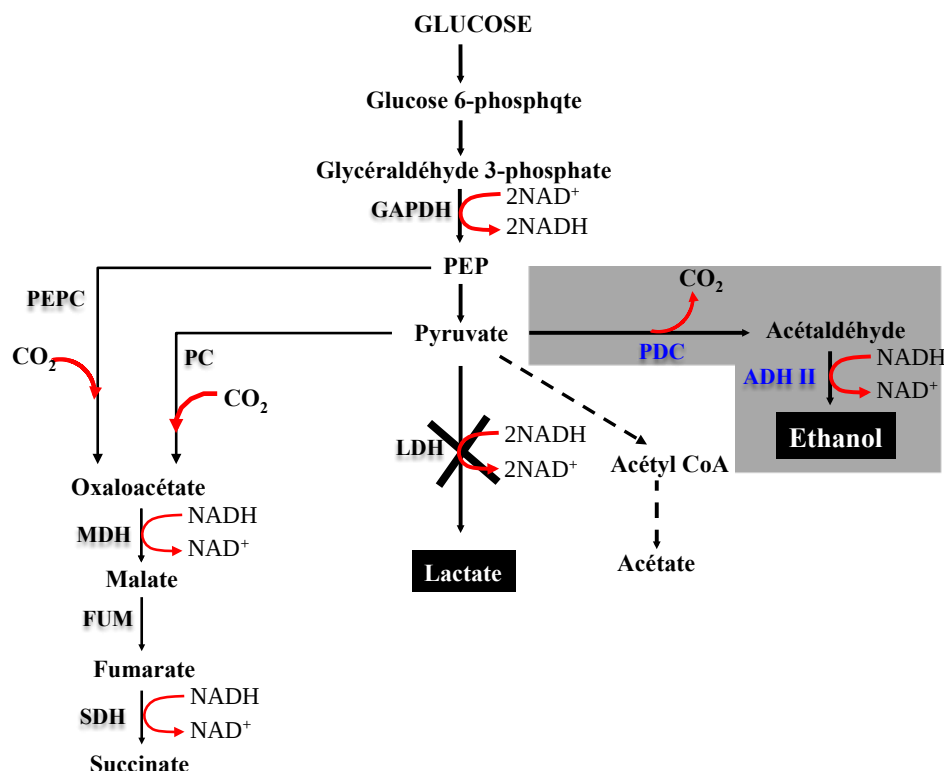


Figure 1.10: Catabolisme du glucose chez *C. glutamicum* recombinée productrice d'éthanol (Inui et al., 2004b).

GAPDH, glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase; LDH, lactate déshydrogénase; PEPC, phosphoénolpyruvate carboxylase; PC, pyruvate carboxylase; MDH, malate déshydrogénase; FUM, fumarase; SDH, succinate déshydrogénase; PDC, pyruvate décarboxylase; ADH II, alcool déshydrogénase. Les enzymes introduites à l'aide de gènes issus du génome de *Zymomonas mobilis* (PDC, pyruvate décarboxylase; ADH II, alcool déshydrogénase II) sont indiquées sur fond gris. La croix indique la voie supprimée (LDH, lactate déshydrogénase).

Dans des conditions de limitation d'oxygène, la souche *C. glutamicum* recombinée ne se développe pas, mais produit une quantité significative d'éthanol, de 2g/l, ainsi que de l'acétate, du lactate et du succinate comme co-produits. L'élimination du gène endogène *ldhA* conduit à une augmentation de 1,4 fois de la vitesse de production d'éthanol et à une suppression complète de la formation de L-lactate. L'utilisation de ce système dans des conditions anaérobies et à une haute densité cellulaire a permis d'obtenir une productivité

volumique en éthanol de 29,5 g/l/h (Inui et al., 2004a) ce qu'aucun autre système bactérien n'a pu atteindre jusqu'à présent. Cependant les auteurs donnent des informations limitées sur le rendement, la concentration maximale d'éthanol et de formation de sous-produits (l'acétate et le succinate) pour ces expériences. Par conséquent, une comparaison directe avec les systèmes utilisant *E. coli*, *K. oxytoca* ou *Z. mobilis* n'est pas encore possible (Wendisch et al., 2006).

La production d'éthanol à partir du glucose peut être encore améliorée, avec la souche recombinée de *C. glutamicum*, par l'addition d'une petite quantité de pyruvate (ou d'acétaldéhyde) au milieu de culture (augmentation par 2 de la vitesse de production). Un phénomène similaire a été observé, avec une souche sauvage, chez laquelle, lors de la production de lactate et de succinate sous la limitation d'oxygène, de petites quantités pyruvate produit conduit aussi à une augmentation de la vitesse de production des acides organiques et de la consommation de glucose (Inui et al., 2004a). Ces observations ont conduit à faire l'hypothèse que de faibles concentrations en pyruvate permettraient un recyclage du NADH par l'action de la lactate déshydrogénase (LDH). Par conséquent, l'augmentation du rapport NAD^+/NADH intracellulaire entraînerait une stimulation de la glycolyse par un mécanisme intermédiaire de levée de l'inhibition de la GAPDH exercée par le NADH.

Bien que conduisant à une augmentation de la production en éthanol, l'interruption de *ldhA* se traduit également par une diminution du rendement de conversion du glucose en éthanol. Cela suggère que le glucose n'est pas entièrement métabolisé en éthanol. Une des autres conséquences de l'interruption de *ldhA* est l'augmentation de la vitesse de production de succinate et d'acétate par rapport à la souche sauvage. Ces observations ont suggéré que les niveaux d'activité de la PDC et de l'ADH pourraient être insuffisants pour atteindre une production d'éthanol efficace. En conséquence, le rendement en éthanol pourrait peut-être être accru en augmentant l'expression des gènes *pdc* et *adhB*.

Par ailleurs, l'inactivation simultanée des gènes *ppc* (phosphoenolpyruvate carboxylase) et *ldhA* permet un accroissement de la production d'éthanol et une diminution significative de celle de succinate. Aucune production de lactate n'est observée suite à cette modification génétique mais seulement avec ajout de pyruvate ou d'acétaldéhyde. Cependant, cette souche mutée, $\Delta ppc\Delta ldhA$, présente une diminution de la vitesse de production d'éthanol et de consommation du glucose. L'absence d'activités LDH et PEPC

aboutit à une incapacité des cellules à régénérer le NADH, entraînant par conséquent l'arrêt de la glycolyse (Inui et al., 2004a). De façon surprenante, la régénération du NADH par ADH II s'avère donc insuffisante chez cette souche $\Delta ppc\Delta ldhA$.

En conclusion, bien que l'application du génie métabolique ait permis d'améliorer de façon importante la capacité de production d'éthanol chez une grande variété de microorganismes, actuellement, aucun microorganisme ne satisfait tous les critères souhaitables pour une application industrielle. Il existe donc encore un espace et intérêt important pour la recherche et la construction de microorganismes producteurs d'éthanol.

I.3 Production d'itaconate

I.3.1 Introduction

L'acide itaconique (AI) est un acide organique qui découvert en 1837 en tant que produit de décomposition thermique de l'acide citrique (Kuenz et al., 2012). Également connue comme l'acide méthylène succinique, il s'agit d'un acide dicarboxylique insaturé, dans lequel un groupe carboxyle est conjugué à un groupe méthylène et possédant un poids moléculaire de 130,1 g/mol (**Figure 1.11**).

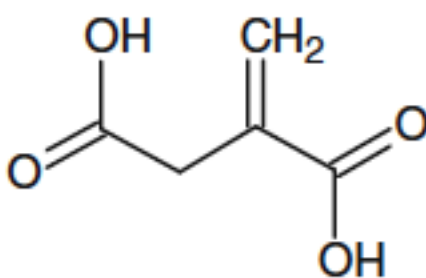


Figure 1.11: Acide itaconique

La diversité de ses groupes fonctionnels fait de l'acide itaconique un intermédiaire efficace dans la fabrication de composés organiques complexes. Il permet diverses réactions, telles que la formation de sels de métaux, l'estérification avec des alcools, la

production d'anhydride, des réactions d'addition et de polymérisation (Kuenz et al., 2012). L'acide itaconique est un produit “volume élevé/bas prix” et son prix est sensiblement le même que pour l'acide citrique, de l'ordre de 2\$ US/kg (Okabe et al., 2009). Plus de 80 000 tonnes de IA sont produites dans le monde entier chaque année. L'AI est utilisé dans le monde entier pour la synthèse industrielle de résines de polyesters, de plastiques et de verre artificiel (Kin et al., 1998) et dans la préparation de composés bioactifs dans les secteurs de l'agriculture, de la pharmacie et de la médecine. Il y a aujourd'hui un fort intérêt pour le développement de méthodes biologiques de production de composés possédant des doubles liaisons qui sont utilisables pour la fabrication de différents polymères. L'AI fournit également des possibilités pour des transformations enzymatiques sélectives en vue de synthétiser des précurseurs polyfonctionnels (Ferraboschi et al., 1994).

L'AI peut être produit à la fois chimiquement et biotechnologiquement (Baup, 1837; Willke et Vorlop, 2001). L'excrétion de AI chez *Aspergillus itaconicus* a été signalée depuis 1932, alors que l'excrétion de cet acide n'a été découverte que plus tard chez *Aspergillus terreus* (Tevz et al., 2010). Mais cette dernière espèce est aujourd'hui l'espèce microbienne majoritairement utilisée pour la production d'AI à l'échelle industrielle. Aucun processus chimique n'est aujourd'hui en mesure de concurrencer cette voie biotechnologique (Kuenz et al., 2012).

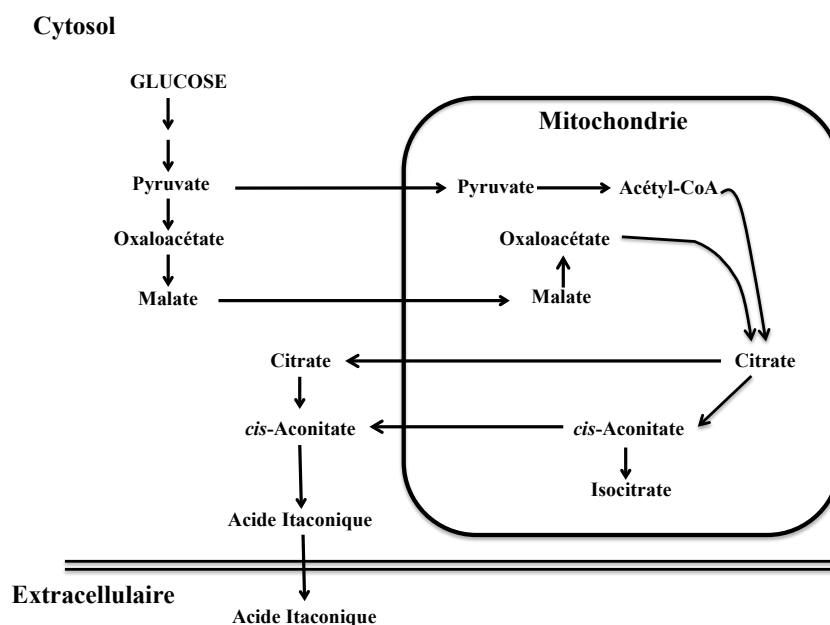


Figure 1.12: Voie de biosynthèse d'acide itaconique chez *Aspergillus terreus*.

I.3.2 Voie de synthèse de l'itaconate

Les sucres comme le glucose et le saccharose sont les principales sources de carbone utilisées pour la production industrielle d'itaconate. Il est généralement admis que, chez *Aspergillus*, le glucose est métabolisé en pyruvate principalement par la voie glycolytique (Flippin et al., 2009). Le mécanisme de conversion du pyruvate en itaconate n'a pas encore été entièrement établi bien que l'utilisation de substrats marqués radioactivement ait permis de montrer que les intermédiaires du cycle TCA sont impliqués dans la biosynthèse de l'AI (Bonnarme et al., 1995). La voie biologique de la production d'acide itaconique chez *A. terreus* est présente dans deux compartiments sub-cellulaires: dans le cytosol et les mitochondries (Bonnarme et al., 1995; Jaklitsch et al., 1991). La voie de biosynthèse de l'acide itaconique proposée commence par la glycolyse dans le cytosol. Le pyruvate est ensuite transporté dans la mitochondrie et déshydrogéné en acétyl-CoA ou carboxylé en oxaloacétate dans le cytosol. L'oxaloacétate est d'abord converti en malate et ensuite reconverti en oxaloacétate après passage dans des mitochondries. L'oxaloacétate cytosolique est d'abord réduit en malate. Ensuite, le malate est transporté dans la matrice mitochondriale où il est oxydé retour en oxaloacétate. Dans les mitochondries, la citrate synthase convertit l'acétyl-CoA et l'oxaloacétate en l'acide citrique. En outre, dans le cycle TCA, le citrate est déshydraté en cis-aconitate qui est transportée vers le cytosol puis décarboxylé en itaconate par la cis-aconitique acide décarboxylase (CAD). Alternativement, l'acide citrique peut être d'abord transporté vers le cytosol par un transporteur d'acides tri-carboxyliques et ensuite converti en l'acide itaconique en deux étapes. Enfin, l'acide itaconique est exporté hors de la cellule, probablement par un transporteur des acides di-carboxyliques (Li et al., 2013). Une représentation graphique de la voie présumée est donnée à la **figure 1.12** (Jaklitsch et al., 1991). Bien que les détails du transport de l'acide itaconique sont inconnus, la production efficace d'acide itaconique dépend d'un flux suffisant des métabolites entre les deux compartiments cellulaires (Li et al., 2013).

I.3.3 Importance de la CAD pour la biosynthèse de l'acide itaconique

L'AI peut être synthétisé à partir d'acide cis-aconitique, qui est produit dans le cycle TCA, à l'aide d'une préparation d'enzymes brutes d'*A. terreus* contenant l'acide cis-

aconitique décarboxylase (CAD; EC 4.1.1.6) (Bentley et Thiessen, 1957a, b, c). Bonnarne et al. (1995), à l'aide de métabolites marqué au ^{14}C , a montré que la CAD catalyse la décarboxylation de l'acide cis-aconitique en AI dans le cytoplasme. Cependant, à cette époque, l'enzyme n'avait pas pu encore être purifiée en raison de son instabilité (Bonnarme et al., 1995). Dwiarti et al. (2002) a recherché les conditions de purification pour cette enzyme et a purifié une protéine de 55 kDa possédant une activité CAD à partir d'une souche *A. terreus* TN484-M1 qui peut produire une concentration élevée d'AI. Cette protéine est stable dans un tampon contenant 30% glycérol et a été identifiée comme l'enzyme métabolique essentielle pour la production de l'AI dans *A. terreus*. Le gène codant cette enzyme a été ensuite cloné et nommé *cad1*. Ce gène code un polypeptide de 490 résidus d'acides aminés avec une masse moléculaire calculée de 52 721 Da (Kanamasa et al., 2008). Le gène *cad1* a été fonctionnellement exprimé chez la levure (Kanamasa et al., 2008). La protéine CAD contient un domaine conservé de la famille des protéines MmgE/PrpD, présentes chez les bactéries et les champignons, qui comprend notamment plusieurs 2-méthylcitrate déshydratases bactériennes jouant un rôle dans le catabolisme de propionate.

Pour clarifier le rôle de CAD1 dans la souche productrice *A. terreus* TN484-M1, *cad1* a été séquencé. Il n'y a aucune différence dans les séquences nucléotidiques des *cad1* issues d'une souche sauvage d'*A. terreus* et de la souche TN484-M1. Mais le niveau de transcription de *cad1* chez la souche TN484-M1 est cinq fois plus élevé que chez la souche sauvage (Kanamasa et al., 2008). Ceci suggère qu'une productivité élevée en AI ne résulte pas d'une mutation au niveau de *cad1* mais d'un niveau d'expression élevé de *cad1* dans la souche de production élevée par rapport à la souche sauvage.

I.3.4 Production industrielle de l'acide itaconique

Jusqu'à présent, *A. terreus* est l'espèce microbienne la plus fréquemment utilisée pour la production industrielle d'AI (Willke et Vorlop, 2001). Mais les performances peuvent varier beaucoup, par exemple à cause d'éléments à l'état de trace dans le milieu de culture ou de la géométrie des réacteurs. Dans le procédé industriel de production d'AI, le bouillon de culture filtré est évaporé et recristallisé pour donner l'AI cristallisé. Cependant, les détails sur les variations de volume attribuées à l'ajustement du pH et à

l'évaporation du milieu de culture ne sont décrits qu'en partie seulement. En outre, le rendement de la fermentation, avec les mêmes souches, fluctue entre les fioles, les réacteurs et les réacteurs air-lift (Okabe et al. 2009). Donc, concernant la production d'AI avec ce champignon filamenteux, la reproductibilité des résultats semble être un problème majeur (Kuenz et al., 2012).

Récemment, de nombreux chercheurs ont tenté de remplacer la source de carbone utilisée pour la production microbienne d'AI avec des substrats alternatifs moins chers (Dwiarti et al., 2007). Cependant, il y a toujours un besoin pour de nouvelles innovations biotechnologiques qui contribueraient à réduire les coûts de production. Le développement de procédés innovants et l'amélioration des souches restent donc encore des voies d'investigation qui pourraient permettre l'utilisation de sources de carbone moins onéreuses (Okabe et al., 2009).

CHAPITRE II: MATERIELS ET METHODES

II.1 Souches bactériennes, oligonucléotides et plasmides utilisés

II.1.1 Souches bactériennes

II.1.1.1 Caractéristiques de la souche *C. glutamicum* 2262

La principale souche bactérienne utilisée au cours de ce travail est la souche *Corynebacterium glutamicum* 2262 (Delaunay et al., 1999). Les caractéristiques principales de cette souche sont décrits dans le **tableau 2.1** (Abe et al., 1967; Pons et al., 1993). La composition élémentaire générale de *C. glutamicum* est $C_{4,5} H_8 O_{2,2} N$ avec 9% de cendre (Vallino et Stephanopoulos, 1993).

Tableau 2.1: Caractéristiques générales de *C. glutamicum*

Caractères principaux	Substrat utilisés
○ Bactérie à Gram positif ○ Bacille court, droit ou légèrement incurvé, souvent par paire ○ Dimensions : 0,7 à 1 µm x 1 à 3 µm ○ Aspect sur gélose: colonie jaune pâle à jaune, régulière et lisses ○ Non-sporulant, non-mobile ○ Aérobie facultative ○ Auxotrophe pour la biotine ○ Production d'acide glutamique ○ Température optimale de croissance 25 à 37°C ○ pH optimal de croissance: 7,3 -7,4 ○ Génomique: Pourcentage en G + C: 53 – 58 % ○ Paroi : présence d'acide méso diaminopimélique et d'arabinogalactane ○ Uréase (+) ○ Catalase (+) ○ Hydrolyse caséine (-) ○ Hydrolyse gélatine (-) ○ Réduction de nitrate en nitrite (+)	○ Glucose (+) ○ Fructose (+) ○ Saccharose (+) ○ Maltose (+) ○ Tréhalose (+) ○ Mannose (+) ○ Rhamnose (-) ○ Galactose (-) ○ Raffinose (-) ○ Arabinose (-) ○ Lactose (-) ○ Xylose (-) ○ Dextrine (-) ○ Salicine (-) ○ Amidon (-)

II.1.1.2 Autres souches de *C. glutamicum*

Cinq souches ont été construites au cours de ce travail:

- *C. glutamicum* 2262 Δldh : *C. glutamicum* 2262 chez laquelle le gène codant la lactate déshydrogénase a été supprimé,
- *C. glutamicum* 2262 540EOH: *C. glutamicum* 2262 chez laquelle le plasmide pMTL540E PDC/ADH a été introduit,
- *C. glutamicum* 2262 500EOH: *C. glutamicum* 2262 chez laquelle le plasmide pMTL500E PDC/ADH a été introduit,

- *C. glutamicum* 2262 Δldh 540EOH: *C. glutamicum* 2262 Δldh chez laquelle le plasmide pMTL540E PDC/ADH a été introduit,
- *C. glutamicum* 2262 Δldh 500EOH: *C. glutamicum* 2262 Δldh chez laquelle le plasmide pMTL500E PDC/ADH a été introduit.
- *C. glutamicum* 2262 *cad* Δldh : *C. glutamicum* 2262 Δldh chez laquelle le gène *cad* a été inséré dans le génome sous le contrôle du promoteur de *ldhA*

II.1.1.3 Caractéristiques de la souche *E. coli* DH5 α

Une seule souche d'*E. coli* a été utilisée au cours de ce travail. Il s'agit de la souche DH5 α . Ses caractéristiques sont les suivantes: supE44 _lacU169 (80dlacZ_M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1 (Hanahan, 1983).

II.1.3 Plasmides

Les différents plasmides qui ont été utilisés au cours de ce travail sont listés dans le tableau ci-dessous (**Tableau 2.2**).

Tableau 2.2: Plasmides utilisés au cours de ce travail

Plasmides	Caractéristiques	Références
pMTL540E	5235 bp, résistance à l'ampicilline et à l'érythromycine, vecteur navette pour les bactéries à Gram-négatif et Gram-positif, origine de répllication (Ori) de <i>C. butyricum</i> (plasmide pCB102), promoteur: <i>lac</i> (<i>E. coli</i>)	Oultram, 1993
pMTL500E	6434 bp, résistance à l'ampicilline et à l'érythromycine, vecteur navette pour les bactéries à Gram-négatif et Gram-positif, Ori de <i>Streptococcus faecalis</i> (plasmide pAM β 1), promoteur: <i>lac</i> (<i>E. coli</i>)	Oultram, 1988

p4	8200 bp, résistance à l'ampicilline et à la kanamycine, vecteur navette servant à la fois à supprimer la LDH et la substituer par les gènes de PDC et d'ADH	notre laboratoire
pMTL540EOH	8700 bp, résistance à l'ampicilline et à l'érythromycine, vecteur navette pour les bactéries à Gram-négatif et Gram-positif, Ori de <i>C. butyricum</i> (plasmide pCB102), promoteurs: <i>lac</i> (<i>E. coli</i>) et <i>ldh</i> (<i>C. glutamicum</i>)	ce travail
pMTL500EOH	9900 bp, résistance à l'ampicilline et à l'érythromycine, vecteur navette pour les bactéries à Gram-négatif et Gram-positif, Ori de <i>Streptococcus faecalis</i> (plasmide pAM β 1), promoteurs: <i>lac</i> (<i>E. coli</i>) et <i>ldh</i> (<i>C. glutamicum</i>)	ce travail
TOPO Blunt	Zero Gram-négatif, origine de répllication pUC, resistance à la kanamicine. Vecteur dédié au clonage de produits de PCR à l'aide la topoisomérase.	Invitrogen (France)
pUC57	Plasmide de clonage classique de la famille pUC. Origine de répllication pAM β 1, resistance à l'ampliciline	
pUC57cad	Plasmide de clonage classique de la famille pUC. Origine de répllication pAM β 1, resistance à l'ampliciline. Gène structural codant la CAD.	Ce travail

II.1.2 Oligonucléotides

Afin de construire les différents outils plasmidiques utilisés au cours de ce travail, plusieurs fragments nucléotidiques ont dû être amplifiés. Les amorces utilisées à cet effet sont détaillées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 2.3: Oligonucleotides utilisés au cours de ce travail

Oligonucleotide	Séquence	Ojectif
LDH1_amont	5'-GGAATTCATGAAAGAAACCGTCGGTAACAAGATTGT C-3'	Amplifier la séquence de 0,3 kb de <i>ldh</i> natif de <i>C. glutamicum</i>
LDH1_aval	5'-CGAGCTCTTAGTCCACCAGCTGGAGGCGGGT-3'	
LDH2_amont	5'-AACTGCAGGAAGACACCCGCGACGCTGCCTATC-3'	Amplifier la séquence de 0,3 kb de <i>ldh</i> natif de <i>C. glutamicum</i>
LDH2_aval	5'-ATCAAGCTTTTAGAAGAACTGCTTCTGAATTTTCGC GCA-3'	
PDC_amont	5' -CGAGCTCAAGTGGGATCGCATATGAGTTATACTGT CGGTACCTATTTAG - 3'	Amplifier la séquence PDC (1,7kb) de <i>Z. mobilis</i> à partir du pLOI295
PDC_aval	5' - TTTCCCGGGAAAACTAGAGGAGCTTGTTAACAGGC TTAC - 3'	
ADH_amont	5' - TTTCCCGGGAAGTGGGGATCGAAAATGGCTTCTTC AACTTTTTATATTCC - 3'	Amplifier la séquence ADH (1,4kb) de <i>Z. mobilis</i> à partir du pLOI295
ADH_aval	5' -TTGGATCCCGTTTTTCCTGTTTTGAAATTAGAAAG - 3'	
Pldh _amont	5' - TCGACATAAAAATAAGAAGCCTGCAAATGCAGGC TTCTTATTTTTATG - 3'	Amplifier la séquence de 0,35 kb du promoteur de <i>ldh</i> natif de <i>C. glutamicum</i>
Pldh_aval	5' - TCGACATAAAAATAAGAAGCCTGCATTTGCAGGCT TCTTATTTTTATG - 3'	

II.2 Milieux de culture et conditions de croissance

II.2.1 Milieux de culture et condition de croissance de *C. glutamicum*

II.2.1.1 Composition des milieux de culture

Le milieu synthétique MCGC (Von der Osten et al., 1989) a été utilisé pour les cultures en fiole chicanée et également en bioréacteur. Les composants du milieu MCGC sont les suivants :

Tableau 2.4: Composition du milieu MCGC

Composition	Volume utilisé (ml)	Culture en fiole chicanée	Volume utilisé (ml)	Culture en réacteur de 2 l
Sels de base	40	Pour 1000 ml -18,2 g Na ₂ HPO ₄ -3,6g KH ₂ PO ₄ -1,2 g NaCl -4,8g (NH ₄) ₂ SO ₄ -900 ml H ₂ O -pH =7,6 -H ₂ O qsq 1000 ml -Autoclavé à 121°C, 20 min	1240	Pour 1240 ml -4,5 g Na ₂ HPO ₄ -9 g KH ₂ PO ₄ -3 g NaCl -12 g (NH ₄) ₂ SO ₄ -900 ml H ₂ O -pH =7,6 -H ₂ O qsq 1240 ml -Autoclavé à 121°C, 20 min
Supplément	10	Pour 175,5 ml : -100 ml de glucose à 300 g l⁻¹ -10 ml de sels A: -40g MgSO ₄ 7H ₂ O -4 g FeSO ₄ 7H ₂ O -0,4g FeCl ₃ -H ₂ O qsq 1l - Autoclavé à 121°C, 20 min -1 ml de sels B: -1g ZnSO ₄ 7H ₂ O -0,4 g CuCl ₂ 2H ₂ O -4g MnSO ₄ H ₂ O -0,2 g (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ 4H ₂ O -0,4 g Na ₂ B ₄ O ₇ 10H ₂ O -H ₂ O qsq 1l - Autoclavé à 121°C, 20 min -Vitamines: -0,5 ml CaCl ₂ 1,5 M -2 ml Biotine 1.g.l ⁻¹ -2 ml Thiamine 10.g.l ⁻¹ -30 µl Déféroxamine 100 g.l ⁻¹ -1,7 g Bétaine -60 ml H ₂ O Stérilisation par filtration (0,22 µm)	236,5	Pour 236,5 : -200 ml de glucose à 300 g l⁻¹ -15 ml de sels A: -40g MgSO ₄ 7H ₂ O -4 g FeSO ₄ 7H ₂ O -0,4g FeCl ₃ -H ₂ O qsq 1l - Autoclavé à 121°C, 20 min -1 ml de sels B: -1g ZnSO ₄ 7H ₂ O -0,4 g CuCl ₂ 2H ₂ O -4g MnSO ₄ H ₂ O -0,2 g (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ 4H ₂ O -0,4 g Na ₂ B ₄ O ₇ 10H ₂ O -H ₂ O qsq 1l -Autoclavé à 121°C, 20 min -Vitamines: -0,75 ml CaCl ₂ 1,5 M -3 ml Biotine 1.g.l ⁻¹ -3 ml Thiamine 10.g.l ⁻¹ -45 µl Déféroxamine 100 g.l ⁻¹ -3 g Bétaine -13,2 ml H ₂ O Stérilisation par filtration (0,22 µm)
Urée	0,65	Solution à 300g.l ⁻¹		

Les milieux BHI et LB ont été utilisés pour les étapes de propagation des cellules des constructions génétiques. Ils ont été utilisés sous forme liquide ou solide. Leur composition est indiquée ci-dessous:

Milieu BHI (pour 1 litre de milieu de culture):

Infusion coeur-cerveille 17,5 g/l

Peptone 10g/l

Glucose 2g/l

Chlorure de sodium 5g/l

Phosphate disodique 2.5g/l

Pour réaliser le milieu BHI solide, 15% d'agar-agar sont ajoutés.

Milieu LB (Sambrook *et al.*, 1989):

Bactotryptone 10 g.l⁻¹

Extrait de levure 5 g.l⁻¹

NaCl 10 g.l⁻¹

Pour le milieu LB gélosé, l'agar a été ajouté dans milieu LB liquide à la concentration finale de 15%.

II.2.1.2 Préparation du milieu de culture MCGC

Les sels de base, les solutions A et B et le glucose, sont stérilisés séparément à 121°C pendant 20 minutes. En revanche, les vitamines, la bêtaïne et le chlorure de calcium sont stérilisés par filtration sur membrane de porosité.

II.2.1.3 Mise en culture des souches

a. Préparation du stock bactérien

Les bactéries sont mises en culture dans du milieu MCGC, en fiole d'Erlenmeyer, à partir d'une seule colonie issue d'une culture sur milieu (LB ou BHI) solide en boîte de Pétri. Lors de la phase exponentielle de croissance ($DO_{570} = 2$), la croissance est arrêtée par refroidissement rapide de la culture dans la glace. Puis un volume de glycérol est rajouté à la suspension cellulaire afin d'obtenir une concentration finale de 20%. Ce mélange bactérie-glycérol est réparti dans des micro-tubes de 1,5 ml puis congelé à -80°C jusqu'à son utilisation.

L'objectif de cette étape est de conserver les souches à long terme. Elle permet également d'utiliser des bactéries dans un même état physiologique initial tout au long de ce travail.

b. Préparation des pré-cultures

- Remise en culture des bactéries:

Les bactéries stockées à -80°C sont remises en culture dans une fiole chicanée contenant 50 ml de milieu MCGC. La culture est incubée une nuit (12 heures) à 33°C , à 200 rpm. Les bactéries activées sont utilisées pour la préparation de la pré-culture.

- Pré-culture:

Les pré-cultures sont réalisées en fiole chicanée à 33°C avec une agitation fixée à 200 rpm. Chaque fiole contient 50 ml de milieu MCGC et 5ml de suspension de bactéries activées. Lorsque les bactéries atteignent la phase exponentielle de croissance ($\text{DO}_{570}=20$), leur croissance est tout de suite stoppée par un refroidissement de la fiole dans de l'alcool à -20°C . La suspension est alors stockée à 4°C pendant 48 h maximum.

II.2.2 Condition de culture pour *E. coli* DH5 α

Milieu LB

Le milieu LB est couramment utilisé pour la culture des souches d'*E. coli*. Il est complémenté avec des antibiotiques lors de cultures de souches transformées par des plasmides portant le gène de résistance à ces antibiotiques. Dans ce travail, nous avons utilisé essentiellement l'ampicilline (100 $\mu\text{g/ml}$, concentration finale).

II.3 Culture en bioréacteur

II.3.1 Description du bioréacteur

Le bioréacteur utilisé lors de ce travail est un bioréacteur Applikon (Pays-Bas) d'un volume total de 2 litres. Le volume de travail du réacteur est de 1,5 l et le volume de

préculture ajouté est calculé pour débiter toutes les cultures à la valeur 1 de DO_{570} (soit environ 5% v/v).

Le bioréacteur est équipé d'un système de contrôle de la température, du pH et de l'oxygénation :

** Régulation de l'oxygénation*

La régulation de l'oxygénation est effectuée de façon à maintenir la pression partielle en oxygène (pO_2) au dessus de 30% pendant la phase de culture aérobie grâce à la variation d'agitation et du débit d'air. La vitesse d'agitation varie de 500 à 1200 tours/minutes et le débit d'air change de 60 à 100 l/h. L'agitation a été réalisée grâce à des turbines réglables en hauteur, montées sur un axe unique. Lors d'une suppression d'aération, l'agitation est maintenue à 200 tours/minutes.

** Régulation du pH*

Le pH du milieu de fermentation est régulé à 7,6 par ajout d'une solution d'ammoniaque 12N. La mesure du pH est effectuée à l'aide d'une sonde pH Mettler.

La calibration de la sonde pH est réalisée avant la stérilisation du bioréacteur.

** Régulation de la température*

La température de la culture est régulée à 33°C par une utilisation alternée d'un manteau chauffant électrique enveloppant la cuve et par une circulation d'eau froide dans une tubulure en doigt de gant en contact avec le milieu de culture.

II.3.2 Culture en mode discontinu

Les cultures en mode discontinu débutent à une même concentration en biomasse initiale, sont régulées à 33°C et à pH 7,6. La saturation d'oxygène est initialement de 100% et est automatiquement régulée à 30%.

Pour chaque culture, le prélèvement des échantillons pour les mesures de la biomasse et des dosages des composants du milieu de culture est effectué à intervalles réguliers d'une heure.

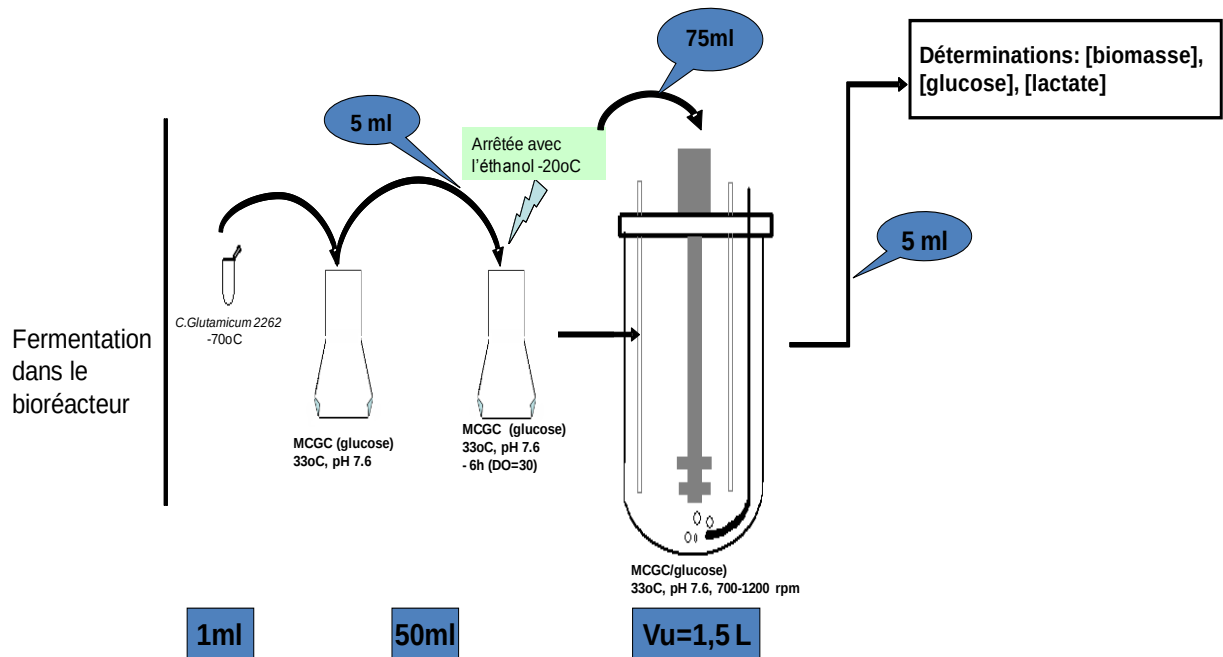


Figure 2.1: Description des cultures en mode discontinu

Vu: volume utile

II.3.3 Culture en mode semi-continu

Les cultures en mode semi-continu sont réalisées de la même manière que les cultures en mode discontinu: température régulée à 33°C, pH à 7,6. La concentration initiale du glucose est de 40 g/l. L'alimentation débute lors d'une chute de la concentration du glucose à 5 g/l. L'ajout du glucose par palier à partir de la solution mère de glucose de 350g/l, est réalisé rapidement à l'aide d'une pompe pour atteindre une concentration finale de glucose d'environ 30 g/l.

II.4 Méthodes analytiques

II.4.1 Coefficient de corrélation entre la densité optique (DO₅₇₀) et le poids sec

La relation entre la concentration en biomasse et la valeur de DO₅₇₀ est linéaire : Biomasse (ou poids sec) = k.DO. Pour trouver la valeur k dans les deux conditions de cultures (aérobiose et anaérobiose) dans lesquelles nous avons travaillé, des prélèvements de cellules ont été effectués lors des 2 phases des cultures. Les cellules de chaque échantillon sont récupérées par centrifugation (10000 rpm pendant 10 minutes) et filtration (avec des membranes d'une porosité de 0,22 µm), lavées 2 fois par l'eau physiologique, puis séchées à 105°C pendant 24h pour mesurer le poids sec avec une balance de précision. Un coefficient de corrélation k = 0.26 a été déterminé dans le cadre de cette étude, pour les 2 conditions de culture.

II.4.2 Dosage des concentrations en biomasse, glucose et des métabolites au cours des cultures

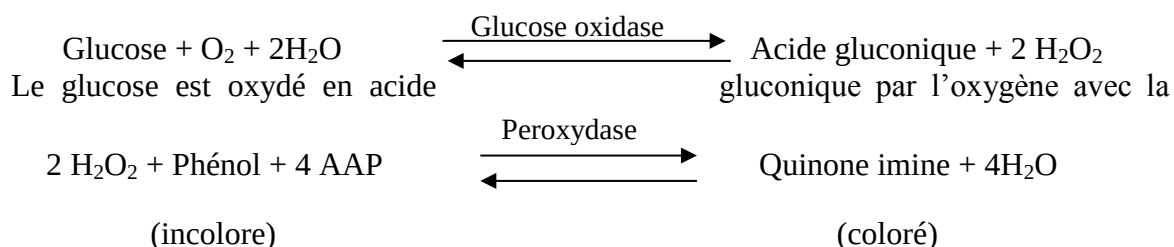
Les échantillons prélevés au cours des cultures sont rapidement utilisés pour mesurer la biomasse puis sont centrifugés pour éliminer les cellules en gardant le surnageant afin de déterminer la concentration des composants dans le milieu extracellulaire.

a. Biomasse

La concentration en biomasse est déterminée par la mesure de la densité optique (DO) à 570 nm avec un spectrophotomètre (Hitachi 2000, Japan). La valeur de DO obtenue est ensuite multipliée par le coefficient de corrélation pour estimer la concentration en biomasse, en g/l.

b. Glucose

Le glucose est dosé par un kit enzymatique (kit ELITech diagnostic, France) en se basant sur les réactions enzymatiques suivantes :

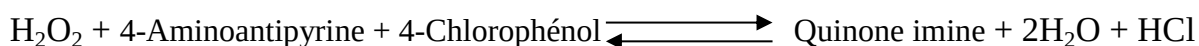
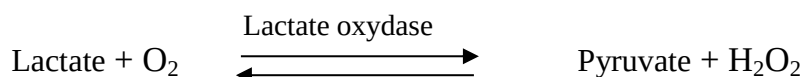


production de peroxyde hydrogène. La réaction est catalysée par une glucose-oxydase. Suite à l'activité de la peroxydase, le peroxyde d'hydrogène libéré est réduit par un chromogène incolore à état réduit, amino-4 antipyrine + phénol, en formant une quinone-imine colorée. L'intensité de la coloration mesurée à la longueur d'onde de 480 nm est proportionnelle à la concentration en glucose dans l'échantillon.

Une gamme étalon est faite à l'aide d'échantillons standards dont la concentration en glucose varie de 0 à 1 g/l.

c. Lactate

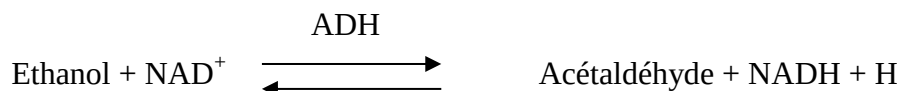
La concentration en lactate produit est mesurée à l'aide d'un kit enzymatique (Lactate PAP, Biomérieux, France) en se basant sur les réactions enzymatiques suivantes :



Comme dans le cas du glucose, l'intensité de la coloration due à la quinone-imine est mesurée par l'absorbance à 446 nm, elle est proportionnelle à la concentration en lactate dans l'échantillon. Des solutions standards de lactate de concentrations 3, 10 et 20 mM sont utilisées pour l'étalonnage.

d. Ethanol:

L'éthanol est dosé par kit enzymatique (R-Biopharm, France). Le principe est basé sur l'absorption du NADH à 340 nm. L'éthanol est converti en acétaldéhyde par l'alcool déshydrogénase en réduisant du NAD^+ .



Le NAD^+ n'absorbe pas à 340 nm, par contre le NADH présente une absorption maximum à cette longueur d'onde. La formation de NADH est proportionnelle à la concentration initiale d'éthanol dans l'échantillon.

La concentration d'éthanol est calculée par la formule suivante:

Formule 1: Calcul de la différence d'absorption

$$\Delta A = (A_2 - A_1)_{\text{sample}} - (A_2 - A_1)_{\text{blanc}}$$

Formule 2: Calcul de la concentration d'éthanol

$$C = \frac{V \times MG}{\epsilon \times d \times v \times 2 \times 1000} \times \Delta A$$

A_1 : Absorption des échantillons, sans alcool déshydrogénase, à 340 nm

A_2 : Absorption des échantillons, après ajout de l'alcool déshydrogénase, à 340 nm

C: Concentration [g/l]

V: Volume final [ml]

v: Volume d'échantillon [ml]

MG: Masse moléculaire de la substance dosée [g/mol]

d: distance parcourue par la lumière [cm]

ϵ : Coefficient d'extinction molaire du NADH à 340 nm = $6,3 \text{ [l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}]$

e. Itaconate

Le dosage de l'itaconate a été réalisé par HPLC à l'aide d'une colonne BioRad HPX- 87H (phase inverse), à 50°C et avec une phase mobile constituée par une solution aqueuse

d' H_2SO_4 (5 mM) avec un débit constant de 0,7 ml/min. La présence de l'acide itaconique est détectée à l'aide d'un détecteur UV (200 nm).

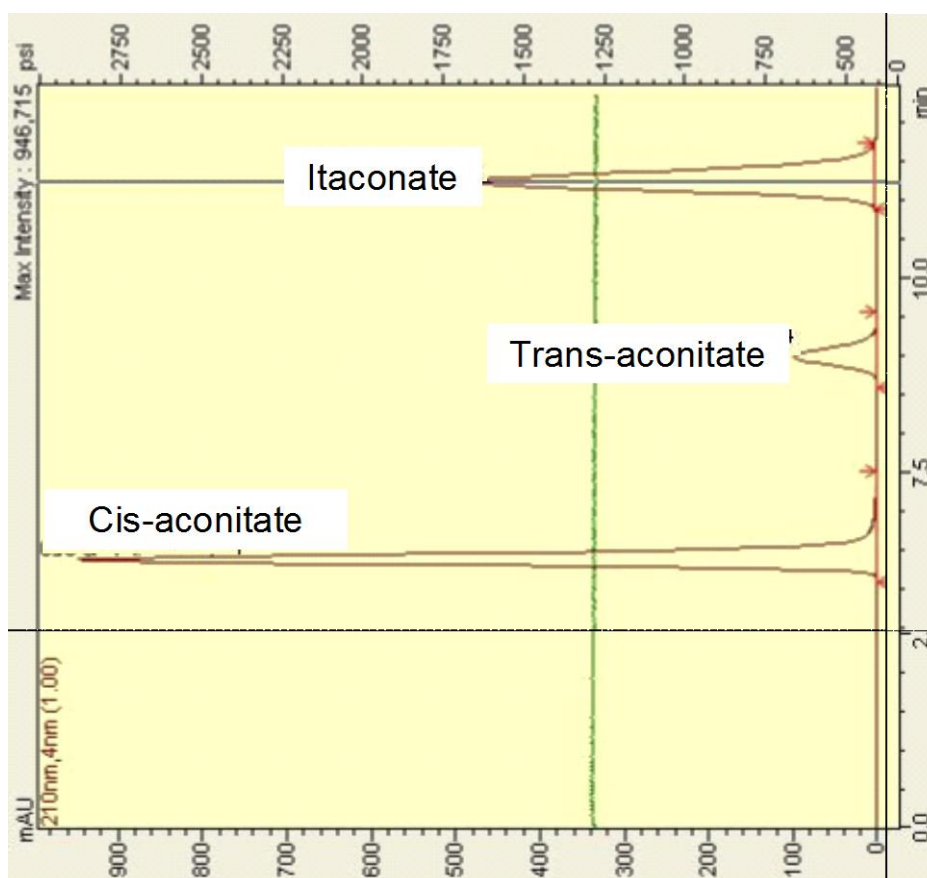


Figure 2.2: Exemple de spectrogramme d'une analyse HPLC des acides itaconique, trans-aconitique et cis-aconitique.

f. Autres composés

Les concentrations en acide succinique, acide lactique et également acide acétique sont mesurées par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC, Shimadzu, Japon). Une solution d' H_2SO_4 5mM est utilisée comme phase mobile avec la colonne Polypore H (Bio-Rad, France). Les acides organiques sont détectés par un détecteur UV.

II.5 Dosages des activités enzymatiques

Les activités de la pyruvate décarboxylase (PDC) et de l'alcool déshydrogénase (ADH) sont dosées avec un spectrophotomètre Beckman DU 7500 à partir d'extraits bruts. Ces dosages sont réalisés par la mesure de la disparition à 340 nm du NADH à 30 °C. Le coefficient d'absorption du NADH est $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

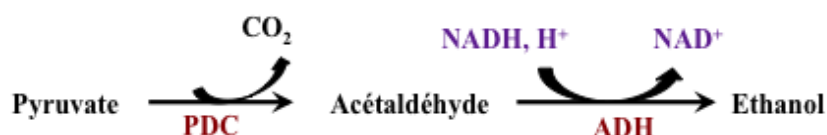
L'activité cis-aconitate décarboxylase (CAD) est dosée par HPLC à partir d'extraits bruts en mesurant la synthèse d'itaconate à partir de cis-aconitate au cours du temps.

II.5.1 Traitement des échantillons

Les échantillons prélevés au cours de la fermentation sont maintenus dans la glace puis rapidement centrifugés à 7000 rpm pendant 15 min à 4°C afin d'obtenir le culot bactérien. Le culot bactérien est lavé par le tampon d'extraction (Inui et al., 2004). Pour obtenir l'extrait brut, une sonication (20 KHz et 200 Watts) est effectuée dans la glace (8 cycles de 30 secondes de sonication avec un interval de 1 minute ce qui permet le refroidissement de l'extrait). Après sonication, l'échantillon est centrifugé à 20000 rpm (Avanti TM 30 Centrifuge, Beckman, France) pendant 30 min à 4°C. Enfin, le surnageant est rapidement récupéré puis utilisée immédiatement pour le dosage de la concentration en protéines et des activités enzymatiques.

Composition du tampon d'extraction: Tris-HCl (pH 7.5) 100mM, KCl 20mM, MgCl_2 20mM, MnSO_4 5mM, EDTA 0,1mM et DTT 2mM

II.5.2 Mesure de l'activité pyruvate décarboxylase (PDC)



Pour pouvoir être mesurée, l'activité PDC est couplée à une activité ADH. La PDC transforme le pyruvate en acétaldéhyde. Ensuite l'ADH transforme l'acétaldéhyde en éthanol et réduit également le NADH en NAD^+ . L'activité PDH est mesurée par la mesure

de la disparition du NADH dans le mélange réactionnel. La disparition du NADH est mesurée par spectrophotométrie (Beckman DU 7500) à la longueur d'onde de 340 nm à 30°C. Afin d'éliminer l'activité parasite, une réaction sans pyruvate est réalisée, puis soustraite de l'activité avec le pyruvate. Le mélange réactionnel pour la mesure de l'activité PDH est présenté dans le **Tableau 2.5**.

Tableau 2.5: Mélange réactionnel pour la mesure de l'activité PDC

Réactifs	Volume utilisé
Tampon Tris-malate 0,1M, pH=6	2,6ml
ADH de levure	1,8U
NADH, H ⁺ 6mM	0,2ml
Volume d'extrait	0,1 µl
Pyruvate 0,3M	0,1ml

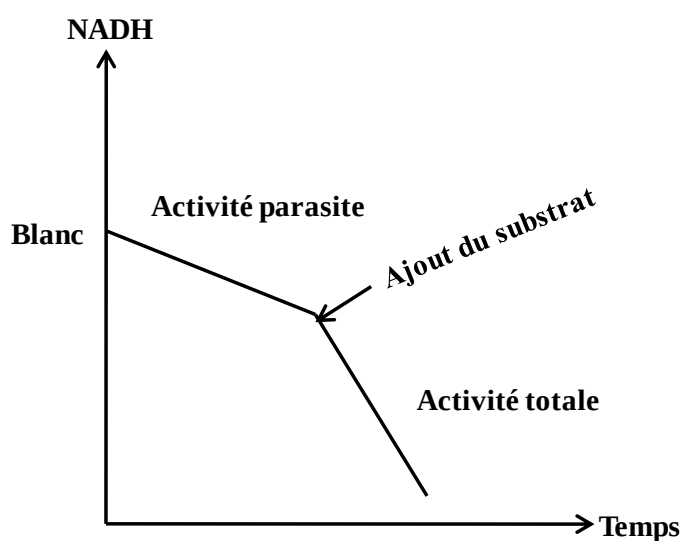
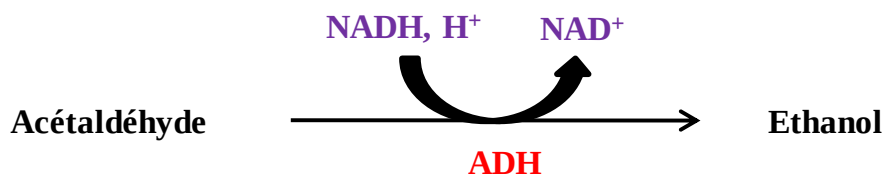


Figure 2.3: Suivi de la disparition du NADH au cours du dosage de l'activité PDC

II.5.3 Mesure de l'activité alcool déshydrogénase (ADH)



L'ADH transforme l'acétaldéhyde en l'éthanol en réduisant le NADH en NAD⁺. L'activité ADH est mesurée par la mesure indirecte de la disparition du NADH dans le mélange réactionnel. La disparition du NADH est mesurée par spectrophotométrie (Beckman DU 7500, France) à 340 nm. L'activité parasite, sans l'acétaldéhyde, est quantifiée puis soustraite de l'activité avec l'acétaldéhyde, le principe est le même que pour la mesure de l'activité PDH (**Figure 2.3**). Le mélange réactionnel pour la mesure de l'activité ADH est présenté dans le **Tableau 2.6**. La concentration en protéines est déterminée par la méthode de Bradford.

Tableau 2.6: Mélange réactionnel pour la mesure de l'activité ADH

Réactifs	Volume utilisé
Tampon Tris-malate 0,1M, pH 6,5	2ml
NADH, H ⁺ 6mM	0,2ml
Acétaldéhyde 500mM	0,2ml
Volume d'extrait	0,1ml
H ₂ O	0,2ml

Les différents substrats sont aliquotés à -20°C jusqu'à leur utilisation. La solubilisation de ces substrats, dans de l'eau bidistillée, se fait juste avant leur utilisation. La réaction enzymatique se fait à 30°C dans des cuves en quartz équipées d'un barreau aimanté afin de maintenir le mélange sous agitation.

II.5.4 Mesure de l'activité de cis-aconitate décarboxylase (CAD)



La cis-aconitate décarboxylase (CAD) transforme le cis-aconitate en l'itaconate en libérant le dioxyde de carbone. Son activité est déterminée en mesurant de la production de l'itaconate au cours du temps. Le principe de la mesure d'itaconate est décrit dans la partie II.4.2e. Le **Tableau 2.7** présente le mélange réactionnel pour mesurer l'activité du CAD.

Tableau 2.7: Mélange réactionnel pour la mesure de l'activité CAD

Réactifs	Volume utilisé
Tampon phosphate de sodium 0,2 M pH 6,2	2,5 ml
Acide cis-aconitique 8 mM	0,4 ml
Volume de l'extrait	0,1 ml

Le mélange est incubé pendant 10 min à 37 °C. La réaction enzymatique a été arrêtée par addition de 0,1 ml de HCl 12 N. L'acide itaconique libérée est ensuite mesuré par HPLC.

II.5.5 Dosage de la concentration en protéines

Le dosage des protéines a été réalisé sur les extraits bruts afin de calculer l'activité spécifique des enzymes. Nous avons utilisé la méthode de Bradford (1976). Le bleu de Coomassie présent dans le réactif de Bradford réagit avec les protéines en solution en formant un complexe protéique de couleur bleue qui absorbe la lumière visible à 595 nm. Une gamme étalon est réalisée à partir de concentrations croissantes (de 0 à 1 mg.ml⁻¹) d'albumine de sérum bovin (BSA) (Bradford, 1976).

II.6 Analyse en Western-blot des protéines

II.6.1 Préparation de l'échantillon

Les cellules sont mises en culture en fiole d'Erlenmeyer. 50 ml de cellules sont prélevés et sont maintenus dans la glace. Les échantillons sont centrifugés à 7000 rpm pendant 10 minutes à 4°C, puis les culots cellulaires sont suspendus dans 2 ml d'un tampon d'échantillon. Ces suspensions cellulaires sont soniquées dans la glace (20 KHz, 200 Watts, 4 cycles de 30 secondes de sonication avec un intervalle de 1 min de refroidissement de l'extrait), puis le surnageant et les débris cellulaires sont séparés par une centrifugation à 10000 rpm pendant 20 min à 4°C. Les protéines du surnageant sont dosées selon la méthode de Bradford afin d'estimer la quantité de protéines à déposer sur gel.

Composition du tampon d'échantillon (pour 10 ml)

NaH ₂ PO ₄ , pH 7	100mM
Anti-protéase (Roche)	1 tablette
PMSF (phénylméthylsulfonylfluoride)	1 mM

II.6.2 Préparation des gels SDS-PAGE

Les protéines sont séparées sur un gel de polyacrylamide contenant du SDS (SDS-PAGE). Nous avons procédé à la polymérisation du gel de séparation 15% acrylamide/bis acrylamide, puis du gel de concentration 4% acrylamide/bis acrylamide.

Composition du gel de séparation 15%

H ₂ O	4,7 ml
Tris HCl 1.5 M, pH 8.8	5 ml
SDS 10%	200 µl
Acryl/Bis 30: 0.8 %	10 ml
APS 10%	100 µl
TEMED	10 µl

Composition du gel de concentration 4%

H ₂ O	6,1 ml
Tris HCl 1.5 M, pH 8.8	2,5 ml
SDS 10%	100 µl
Acryl/Bis 30: 0.8 %	1,3 ml
APS 10%	50 µl
TEMED	10 µl

L'ammonium persulfate (APS) et le TEMED sont ajoutés juste avant de couler les gels.

Les extraits protéiques sont mélangés à la solution de dépôt 1x, puis sont incubés à 100°C, pendant 5 minutes avant le dépôt sur gel. 10 µl d'échantillons protéiques sont déposés par puits. La migration des gels est réalisée à 150 V, 20 - 30 mA.

Composition de la solution de dépôt des échantillons (5x):

Tampon Tris-HCl pH 6,8:	0,0625 M
Glycérol:	10 %
SDS:	10 %
β-mercaptoéthanol:	5 %
Bleu de bromophénol:	0,05 %

Tampon d'électrophorèse 10X (pour 1 L)

Trisma (Tris Base):	30 g
Glycine:	144 g
SDS:	10 g
Qsp eau distillée	

II.6.3 Analyse par Western blot

Après séparation sur gel de polyacrylamide, les protéines sont transférées à partir du gel sur une membrane de PVDF pendant 1 heure à 100V dans un tampon de transfert. Avant son utilisation, la membrane de PVDF doit être imbibée de méthanol.

Tampon de transfert (25 mM Tris Base, 192 mM Glycine, 20 % methanol)

Tris Base	3 g
Glycine	14,4 g
éthanol	200 ml
H ₂ O	1L

Après l'électrotransfert, la membrane est bloquée avec 20 ml d'une solution de lait à 5 % (dans un tampon TBS additionné de 0,1 % de Tween 20) pendant toute une nuit à 4°C sous faible agitation. La membrane est ensuite incubée avec les anticorps polyclonaux anti-CAD dilué au 1/1000 pendant 1 heure sous faible agitation. Des anticorps polyclonaux anti-CAD ont été produits chez le cochon d'Inde par le prestataire de service Eurogentec (Belgique) sur la base des peptides les plus immunogènes constatés dans la structure primaire de la protéine.

Après blocage, la membrane est ensuite lavée 3 fois pendant 10 minutes dans 20 ml du même tampon TBS Tween sous agitation, puis incubée pendant 1 h à température ambiante sous faible agitation avec un anticorps secondaire anti-cochon d'Inde couplé à la phosphatase alcaline et dilué au 1/2000. Pour finir, la membrane est lavée comme décrit précédemment, puis révélée par l'ajout de substrat BCIP/NBT (5-Bromo-4-chloro-3-Indolyl Phosphate/Nitro Blue Tetrazolium). La révélation est arrêtée après quelques minutes en ajoutant 10 ml de tampon phosphate (KH₂PO₄, pH 7, 0,5M).

Tampon TBST 0,1% (20 mM tris base, 137 mM sodium chloride, 0,1% Tween 20)

Tris base	2,42 g
Sodium chloride	8 g
Tween 20	1 ml
H ₂ O	1 L

II.7 Techniques de génie génétique

II.7.1 Préparation des cellules compétentes

E. coli DH5 α

Quelques microlitres du stock glycérolé d'*E. coli* DH5 α sont étalés sur du milieu LB Agar en boîte de Pétri. Celle-ci est incubée toute une nuit à 37°C. Une colonie sur boîte est remise en culture dans du milieu LB liquide à 37°C et sous agitation pendant une nuit. Puis, une seconde culture en milieu LB est ensemencée à partir de la culture de nuit. Lorsque les cellules sont en phase exponentielle de croissance ($DO_{600} = 0,7$), celles-ci sont bloquées immédiatement dans un mélange glace, H₂O et NaCl. Les cellules sont par la suite centrifugées pendant 7 minutes à 9000 tours par minute à 0°C puis lavées deux fois par de l'eau milliQ glycérolée (10%) stérile à 4°C. Après la dernière centrifugation, le surnageant est éliminé en partie, seules quelques dizaines de microlitres du surnageant sont gardées afin de resuspendre les cellules. Enfin, les cellules rendues ainsi compétentes à la transformation sont conservées pendant 1 mois à -80°C en aliquots de 50 μ l.

C. glutamicum 2262 et 2262 Δ ldh

Les bactéries sont cultivées dans du milieu MCGC + 3% de glucose jusqu'au début de la phase exponentielle de croissance ($[Biomasse] = 1,5 \text{ g.l}^{-1}$). La culture est stoppée dans un mélange eau-glace-NaCl. Les cellules sont rapidement centrifugées à 7000 rpm pendant 10 minutes et à 4°C. Le culot est lavé deux fois par de l'eau milliQ glycérolée (10%) stérile à 4°C, afin d'éliminer les sels et de fragiliser les enveloppes cellulaires. Après la dernière centrifugation, le surnageant est éliminé en partie, quelques dizaines de microlitres du surnageant sont conservés afin de resuspendre les cellules. Enfin, les cellules rendues ainsi compétentes à la transformation sont conservées pendant 1 mois à -80°C en aliquots de 50 μ l.

II.7.2 Préparation d'ADN plasmidique

La préparation d'ADN plasmidique est réalisée sur 1 à 2 ml d'une culture sur la nuit en milieu LB additionné d'antibiotiques à l'aide de mini-colonnes du kit NucleoSpin (Macherey-Nagel). Les mini-colonnes sont utilisées pour obtenir une préparation d'ADN

très propre, destinée à être manipulée (digestion, ligation, etc) ou introduite dans *E. coli*. Les midi-préparations d'ADN plasmidique sont réalisées à l'aide de midi-colonnes QIAGEN à partir de 50 ml de culture. Elles sont utilisées pour obtenir une plus grande quantité de matériel plasmidique destiné à être stocké ou employé pour la transformation ultérieure de *C. glutamicum*.

II.7.3 Amplification de fragments nucléotiques par PCR

a. PCR standard

Tableau 2.8: Mélange réactionnel pour PCR standard

Composants	Volume	Concentration finale
Amorce 1	0,5 µl	100 pmoles/µl
Amorce 2	0,5 µl	100 pmoles/µl
Tampon 10x	5 µl	1x
dNTP (2.5mM)	5 µl	250 µM
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 µl	1,5 mM
ADN à amplifier	0,3 µl	
Enzyme	0,2 µl	1 - 2,5 U
dH ₂ O	37 µl	
Volume total	50 µl	

Protocole pour la réaction PCR

Initialisation:	94°C; 5 min	
Dénaturation:	94°C; 30 s	} 30 cycles
Hybridation:	55°C; 30 sec	
Elongation:	72°C; 1 min/ 1000 bp	
Elongation final:	72°C; 10 min	

II.7.4 Electrophorèse sur gel d'agarose

La séparation et l'analyse des tailles de fragment d'ADN sont effectuées par électrophorèse à une tension comprise entre 80 et 100V, sur gel d'agarose de 0,7 à 2% (selon la taille des fragments), dans un tampon TBE 0,5%. Les fragments d'ADN sont visualisés à la lumière bleue à l'aide d'une solution Syber Safe solubilisée au cours de la préparation du gel. Les marqueurs de tailles de 100 pb et de 1kb (Invitrogen) sont utilisés pour identifier la taille des bandes d'ADN.

II.7.5 Purification de l'ADN du gel d'agarose

Afin de purifier l'ADN amplifié, une étape d'extraction de l'ADN du gel d'agarose est donc nécessaire. L'extraction d'ADN est effectuée avec le kit NucleoSpin Extract II (PCR clean-up gel extraction) suivant les instructions du fournisseur Macherey-Nagel. Le produit PCR extrait du gel est déposé sur gel d'agarose 1% + Syber Safe afin de vérifier sa pureté.

II.7.6 Modification enzymatique d'ADN

Le protocole classique de digestion d'ADN plasmidique avec une enzyme de restriction est présenté dans le tableau suivant :

Tableau 2.9: Mélange réactionnel d'une digestion par enzyme de restriction

Composants	Volume
ADN	1-5 µl
Tampon (10x)	2 µl
Enzyme	1.5 µl
dH ₂ O	15,5-11,5 µl
Volume total	20 µl

II.7.7 Ligation

Les produits de PCR sont clonés dans les plasmides pMTL540E (5,3kb) ou pMTL500E (6kb). Lors de la réaction de ligation, le rapport vecteur/insert est de l'ordre de 1/3.

Le mélange réactionnel de ligation (10 μ l) contient:

Composants	Volume
Plasmide digéré (50ng/ μ l)	1 μ l
Tampon de ligation (5X)	2 μ l
Produit PCR purifié	7 μ l
dH ₂ O	9.7 μ l
T4 ligase (100U/ μ l)	0.3 μ l
Volume total	20 μ l

Le mélange est bien homogénéisé et la réaction est laissée à température ambiante pendant environ 12 heures.

II.7.8 Transformation par électroporation

E. coli

Le choc électrique est effectué à l'aide d'un électroporateur Gene Pulser (Biorad) réglé à 2500 V, 25 μ F et 200 Ω sur une suspension préalablement incubée 5 minutes dans la glace, contenant 50 μ l de cellules compétentes de *E. coli* et 2 μ l de produit de ligation dans une cuvette de 2 mm. Après le choc électrique, le mélange cellule/ADN est alors repris rapidement dans 500 μ l de milieu LB et mis en culture pendant 45 min à 37°C. Ensuite, les cellules sont déposées sur une boîte de LB agar dans lequel 50 μ g.ml⁻¹ d'ampicilline ont été ajoutés. les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant 24 heures.

C. glutamicum 2262

Pour *C. glutamicum* 2262, le choc électrique est effectué à 1800 V, 25 μ F et 400 Ω . Après la transformation, les cellules sont reprises dans du milieu BHI et placées pendant une

heure à 33°C. Elles sont finalement concentrées par centrifugation. Les cellules concentrées sont étalées sur boîte contenant soit du milieu BHI et 50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ d'érythromycine pour *C. glutamicum* 2262, soit 50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ kanamycine et 200 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ d'érythromycine pour *C. glutamicum* 2262 Δldh . Les boîtes sont ensuite incubées à 33 °C pendant 72 heures pour *C. glutamicum* 2262 et *C. glutamicum* 2262 Δldh .

CHAPITRE III. EVALUATION DES CAPACITES DE PRODUCTION DE LACTATE A PARTIR DE GLUCOSE PAR *C. GLUTAMICUM* 2262 EN ANAEROBIOSE

Corynebacterium glutamicum a été largement utilisé depuis longtemps pour la production industrielle du glutamate en aérobiose (Liebl et al., 2005). En condition de limitation d'oxygène, dans un milieu minimum, ce microorganisme peut également produire, principalement, des acides lactique, succinique et acétique en utilisant le glucose comme source de carbone (Inui et al., 2004, Dominguez et al., 1993).

Afin d'obtenir une souche de *C. glutamicum* capable de produire de l'éthanol à partir de glucose, il faut insérer les séquences des gènes de la PDC et de l'ADH dans son génome. Ces enzymes vont être en concurrence avec la voie de synthèse du lactate, en raison de l'utilisation de pyruvate comme précurseur. D'autre part, pour profiter de la forte activité lactate déshydrogénase en condition anaérobie, il est prévu de mettre les gènes codant la PDC et l'ADH sous le contrôle du promoteur du gène codant la lactate déshydrogénase.

Pour cette raison, l'évaluation de la capacité de la synthèse du lactate par *C. glutamicum* en anaérobiose à partir de glucose apparaît comme une étape indispensable. Un procédé en deux étapes a donc été développé. Au cours de la première étape, en aérobiose, la croissance de *C. glutamicum* est favorisée. Dans une seconde phase, après arrêt de l'aération, la production d'acide lactique est déclenchée. Lors du déroulement de ce procédé, plusieurs questions se sont posées :

- Quel doit être l'état physiologique de *C. glutamicum* lors du passage de la phase aérobie à la phase anaérobie pour favoriser la production de lactate? Pour répondre à cette question, l'arrêt de l'aération a été réalisé à plusieurs niveaux de concentration en biomasse.
- Quel est le comportement cinétique de *C. glutamicum* 2262 suite à l'arrêt de l'aération ? Ce comportement est-il différent en fonction du temps de culture auquel l'arrêt de l'aération est réalisé? Nous nous sommes alors en particulier intéressés au rendement de conversion du substrat en produit et à la productivité du procédé.

- Le procédé de production de lactate peut il être amélioré suite à une augmentation de la concentration initiale en substrat ? En changeant le mode de culture (utilisation du mode semi-continu à la place du mode discontinu) ? Suite à une élévation de la température du milieu de culture de 33 à 39°C ?

III.1 Etude de la production de lactate par *C. glutamicum* 2262 en anaérobiose, en mode discontinu et semi-continu

La production d'acides lactique, succinique et acétique, en anaérobiose, a déjà été étudiée chez *C. glutamicum* R (Okino et al., 2005; Inui et al., 2004). Cependant, dans ces études, la croissance et les productions d'acides organiques ont été découplées. L'étape de croissance a été réalisée en fiole d'Erlenmeyer alors que les productions d'acides ont été menées, après lavage et concentration des cellules, avec des concentrations initiales en biomasse élevées: 10 g/l en mode discontinu et 30 g/l en mode semi-continu. Cette méthode présente des inconvénients tels que, le changement éventuel de l'état physiologique des cellules lors du passage d'une étape à l'autre, des risques de contamination lors du lavage et de la centrifugation des cellules et l'augmentation du coût de production. D'un autre côté, en vue d'améliorer la production du lactate, des méthodes différentes telles que l'ajout de pyruvate (Inui et al., 2004), la suppression des voies métaboliques concurrentes, y compris les voies de synthèse du succinate et de l'acétate (Inui et al., 2004) ont également été réalisées. Aucune de ces méthodes n'a permis une amélioration réellement importante de la production de lactate.

En plus d'une évaluation de la capacité de production du lactate par la souche *C. glutamicum* 2262, nous avons pour objectif de proposer un nouveau procédé de culture en une étape permettant une manipulation simplifiée, une production importante de lactate et, si possible, transposable à l'échelle industrielle.

Dans un premier temps, une évaluation de la production de lactate par *C. glutamicum* 2262 a été réalisée suite à un arrêt de l'aération à différentes valeurs de concentrations en biomasse. Celles-ci ont été choisies afin de correspondre à différentes phase de croissance et donc, à des états physiologiques différents. Une comparaison des performances de production a ensuite été effectuée entre une culture en mode discontinu et une culture en mode continu. Ces travaux sont présentés dans la publication ci-dessous, sous presse dans le journal « Bioscience, Biotechnology and Biochemistry ».

III.1.1 Article 1.1

Lactate production as a representative of fermentation potential of *Corynebacterium glutamicum* 2262 in a one-step process

Hoang Bao Truc KHUAT, Abdoul Karim KABORE, Eric OLMOS, Michel FICK, Joseph BOUDRANT, Jean-Louis GOERGEN, Stéphane DELAUNAY and Emmanuel GUEDON †

Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, UMR CNRS 7274,
ENSAIA - Université de Lorraine, 2 avenue de la Forêt de Haye – TSA 40602
54518 Vandoeuvre CEDEX, France

Abbreviation: LDH, lactate dehydrogenase

Abstract

The fermentative properties of the thermo sensitive strain *Corynebacterium glutamicum* 2262 were investigated in processes coupling an aerobic cell growth and an anaerobic fermentation phase. In particular, the influence of two different modes of fermentation on the production of lactate, the fermentation product model, was studied. In both processes, lactate was significantly produced, 27 g/L in batch culture and up to 55.8 g/L in fed-batch culture. However, the specific production rate in the fed-batch culture was four times lower than that in the batch culture. Compared with other investigated fermentation processes, our strategy resulted in the highest yield of lactic acid from biomass. Therefore, lactate production by *C. glutamicum* 2262 could reveal the capability of such strain to produce various fermentation products from pyruvate.

Key words: Lactate, *Corynebacterium glutamicum*, fermentation, batch, fed-batch.

Introduction

Carboxylic acids, among them mono (i.e. acetate, butyrate, lactate...) and diacids (succinate, malate...) are key molecules, generally regarded as building block chemicals. Due to their carboxylic functional groups, these molecules are valuable for synthesis of higher molecular weight compounds such as polymers. Nowadays, numerous organic acids are largely produced if not exclusively through microbiological processes,¹⁻³⁾ and such productions are regarded as an important economic alternative to chemical synthesis.⁴⁾ For example, citric acid, which yearly production is about 1.4 million tons,⁵⁾ is only produced by fermentation using mainly the filamentous fungus *Aspergillus niger*. It is noteworthy that the economic viability of microbial processes is mainly due to the ability of industrial microorganisms to use a large variety of substrates, among them cheap raw materials such as molasses, whey, starch waste, beet.

With an annual production of 2.5 million tons L-glutamate and 1.5 million tons L-lysine, *C. glutamicum* is the major amino acid producer. Such processes occur under aerobic condition, at high rates and productivities, enabling *C. glutamicum* to hold the leading position in this field.⁶⁾ Alternatively and as many aerobic and facultative anaerobic bacteria, *C. glutamicum* is also capable of producing organic acids under anaerobic conditions. Using either wild type or recombinant strains, organic acids such as succinate and lactate were reported to be produced in significant amounts,⁷⁻¹⁰⁾ but also alcohols such as ethanol,¹¹⁾ or isobutanol,¹²⁾ under oxygen depletion conditions. In *C. glutamicum*, the metabolic switch that takes place during the transition from aerobic to anaerobic conditions has been documented. Under oxygen transfer limiting conditions or under strict oxygen deprivation, an increase in glucose consumption rates occurs resulting in an increase in gene expression coding for enzymes of glycolytic and organic acid synthesis pathways such as *gapA*, *pgk*, *ppc*, *mdh* and *ldhA*.¹³⁾ Up regulation of such genes is controlled by SigB, a group 2 sigma factor, that was shown to be expressed either during the transition from exponential phase to stationary phase, under various stresses or under oxygen deprivation in *C. glutamicum*.¹⁴⁾ As a consequence, a metabolic shift is driven from the glycolytic pathway toward the reductive arm of the TCA cycle, enabling an increase in organic acid production.¹⁵⁾ From a biotechnology point of view, the modifications of the physiological state of cells during the transition from aerobic to anaerobic conditions are probably critical points. Recent works

have reported that the enzymatic machinery adjusted by the application of a microaerobic phase at the end of aerobic growth phase of *E. coli* will greatly influence the performance of the cells in the anaerobic production phase.^{16,17)}

Pyruvate, produced at the last step of glycolysis, is located at the crossroad of most fermentation pathways, and can directly be reduced into lactate by lactate dehydrogenase in order to regenerate the NAD⁺ pool under oxygen limitation conditions. Therefore, lactate production capabilities can be regarded as a good indicator of fermentative potential of microbial strains when oxygen is limiting. Recently, *C. glutamicum* was reported to produce anaerobically lactate at a high volumetric productivity of 42.9 g/L/h, but such results were obtained with high cell density cultures made with washed cells previously cultivated in an aerobic manner. Besides the fact it can be hardly extrapolated at industrial scales, this washing procedure may also strongly affect the physiological state of cells due to various stresses such as acceleration during the centrifugation step, or cold shocks.^{18, 19)}

The aim of the study is to determine the fermentative potential of the thermo sensitive strain *Corynebacterium glutamicum* 2262 through a one-step lactate fermentation process, associating both the aerobic cell growth phase and the anaerobic fermentation phase. In particular, the influence of the duration of the aerobic phase on the second phase, *ie* the production of lactate by *C. glutamicum* 2262 under oxygen-deprivation conditions, was investigated in batch and fed-batch cultures.

Materials and methods

Bacteria and culture medium. The strain used throughout this study was *Corynebacterium glutamicum* 2262.²⁰⁾ The culture medium used was based on the MCGC medium.²¹⁾ This modified-MCGC consisted of (per liter): 40 g glucose, 3g Na₂HPO₄, 6g KH₂PO₄, 2g NaCl, 8g (NH₄)₂SO₄, 400 mg MgSO₄·7H₂O, 40 mg FeSO₄·7H₂O, 4 mg FeCl₃, 1 mg ZnSO₄·7H₂O, 0.4 mg CuCl₂·2H₂O, 4 mg MnSO₄·H₂O, 0.2 mg (NH₄)₆Mo₇O₂·4H₂O, 0.4 mg Na₂B₄O₇·10H₂O, 84 mg CaCl₂, 2 mg biotin, 20 mg thiamine, 3 mg deferoxamine, 2 g betaine. Polypropylene glycol (1.3 g/L) was used as an antifoaming agent.

Fermentation conditions. Pre-culture of *C. glutamicum* 2262 was performed in a 500 mL flask containing 50 mL of the modified-MCGC medium. Cultures were incubated at 33°C at 200 rpm. This pre-culture was used to inoculate a 2 L fully instrumented bioreactor (Applikon) containing initially 1.5 l of modified-MCGC at 33°C. The pH set point was regulated at 7.6 by NH₃ 12 N addition. In a first phase, the culture medium was oxygenated by air addition. During culture, the dissolved oxygen concentration was measured online using an oxygen electrode (Mettler Toledo) and controlled when needed by varying the stirring speed and airflow rate. The airflow rate varies from 1 to 5 L/min and the agitation from 500 to 1200 rpm. The dissolved oxygen was initially set at 100% and maintained at 30% of saturation until the biomass concentration reached the desired OD₅₇₀. At this point, the aeration was stopped and the stirring speed was reduced to 200 rpm resulting in a drop in oxygen partial pressure. In fed-batch experiment, glucose was fed using a solution of 350 g/L glucose to maintain a residual concentration close to 5 g/L. All over the culture, 5 mL samples were collected to quantify biomass (*C. glutamicum* 2262), substrate (glucose), and products (acetate, lactate and succinate) concentration.

Analytical methods. Biomass concentration was determined in each sample by absorbance measurement at 570 nm (Spectrophotometer Beckman DU 7500). The correlation coefficient between the OD and dry weight of *C. glutamicum* 2262 is 0.26 g/L per one OD₅₇₀ unit.

After sample centrifugation (5 min, 10.000 rpm, microfuge[®] lite, Beckman), glucose and lactic acid concentrations were enzymatically measured on the supernatants (Elitech). The succinic and acetic acid concentrations were determined on the supernatants by High Pressure Liquid Chromatography (SPD-M10A VP, Shimadzu) using a Polypore H (Bio-Rad)

column maintained at 50°C. The separation was performed using acidic water (5 mM H₂SO₄). The signal is measured using an UV detector (Shimadzu).

Kinetic parameters calculation for fermentation processes

Specific rates of cell growth (μ) and lactate ($\square$) as well as glucose consumption ($\square$) were calculated using the following equations:

$$\mu = \left(\frac{1}{X} \right) \left(\frac{dX}{dt} \right)$$

$$\nu = \left(\frac{1}{X} \right) \left(\frac{dS}{dt} \right) \square$$

$$\pi = \left(\frac{1}{X} \right) \left(\frac{dP}{dt} \right)$$

Where X , S and P are the biomass concentration (g/L), and the concentration of substrates and products (g/L), respectively, measured during the cultures.

Other parameters are calculated as follows:

$$Y_{X/S} = (X - X_0)/(S_0 - S)$$

$Y_{X/S}$: Yield of biomass from glucose in growth phase (g/g):

X : biomass concentration at the end of growth phase (g/L)

X_0 : biomass concentration at the beginning of growth phase (g/L)

S_0 : glucose concentration at the beginning of growth phase (g/L)

S : glucose concentration at the end of growth phase (g/L)

$$Y_{P/S} = (P_f - P_0)/(S_f - S_0)$$

$Y_{P/S}$: Yield of lactate from glucose in production phase (g/g):

P_f : lactate concentration at the end of production phase (g/L)

P_0 : lactate concentration at the beginning of production phase (g/L)

S_0 : glucose concentration at the beginning of production phase (g/L)

S_f : glucose concentration at the end of production phase (g/L)

$$Y_{P/X} = P_f/X_f$$

$Y_{P/X}$: Yield of lactate produced by biomass in production phase (g/g):

P_f : lactate concentration at the end of production phase (g/L)

X_f : glucose concentration at the end of production phase (g/L)

$$P = P_f/t$$

P : Productivity (g/L/h):

P_f : lactate concentration at the end of production phase (g/L)

t : fermentation time (h)

Results

Influence of the transition point from aerobic to anaerobic conditions in a batch culture

As previously indicated, the facultative anaerobic *C. glutamicum* is able to produce fermentation products under anaerobic conditions. However, in this condition, growth of *C. glutamicum* is poor if not completely abolished (see below). Therefore, an aerobic phase, necessary for the cell growth and preceding the anaerobic one, has to be implemented in the process.

In order to determine the suitable point of transition from aerobic to anaerobic condition in a batch culture, the growth characteristic of *C. glutamicum* 2262 under aerobic condition was first investigated. With an initial glucose concentration of 40 g/L, the highest biomass concentration, 18.7 g/L, was reached after 8 hours of culture with a maximum specific growth rate of 0.64 h^{-1} . In this condition, the glucose was exhausted after 8 h of culture and a low but significant production of lactate, up to 0.9 g/L, was detected. This was due to the oxygen limitation (data not shown) as a consequence of the massive production of biomass and the difficulty to maintain an efficient oxygenation at the highest agitation and aeration rates (**Figure 3.1**). Then, lactate is consumed by the microorganism. Therefore, an absence of aeration in combination with a decrease in the stirring rate to establish the production phase of *C. glutamicum* at the most favorable physiological state are important for developing a one-step fermentation process. In these conditions, lactate production was induced in the batch cultures after a first aerobic phase for biomass accumulation. The suppression of the aeration was applied at different OD_{570} values of 3, 10, 30, and 60, respectively (**Figure 3.2**).

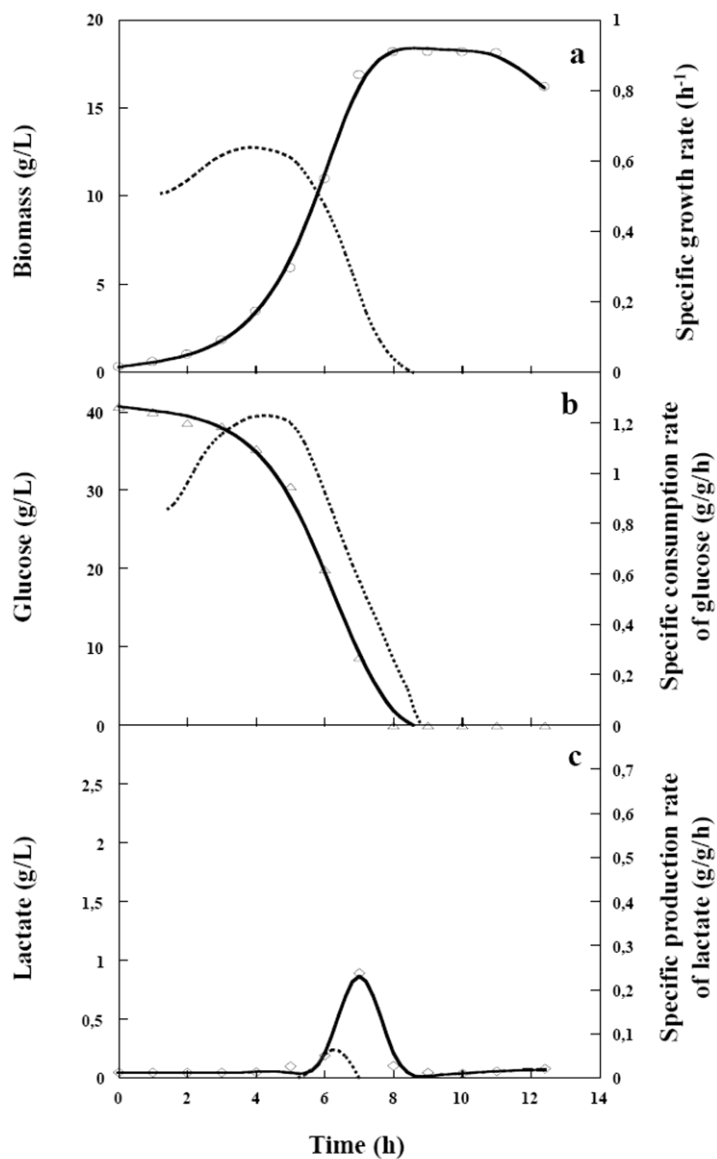


Figure 3.1: Kinetics of growth, glucose consumption and lactate production by *C. glutamicum* 2262 under aerobic condition during a batch process.

Time-course of growth (a), glucose consumption (b) and lactate production (c). The dotted lines represent the corresponding specific rate (g/g/h).

These four OD₅₇₀ values are representative of different cell growth phase. At an OD₅₇₀ of 3 (biomass concentration of 0.78 g l⁻¹), cells are in the accelerating growth phase. The second OD₅₇₀ value of 10 (biomass concentration of 2.6 g/L) corresponds to cells growing in

exponential phase, with maximal specific growth rate and specific glucose consumption rate of 0.64 h^{-1} and 0.71 g/g/h , respectively. The third and fourth OD_{570} values, 30 and 60 (biomass concentration of 7.8 g/L and 15.6 g/L) are representative of cells growing in early and late decelerating phase respectively.

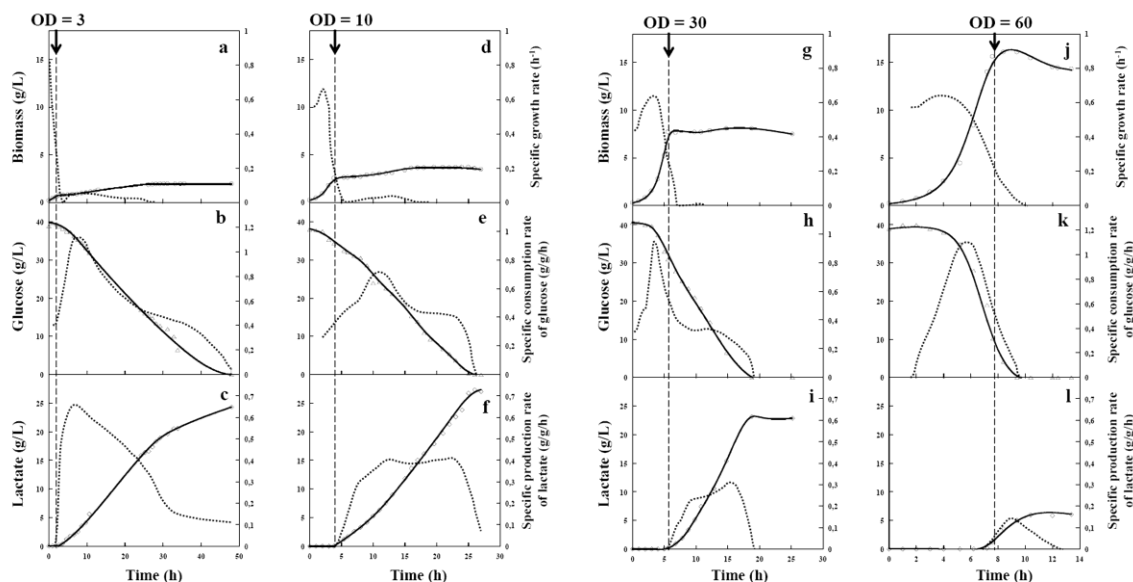


Figure 3.2: Lactate production by *C. glutamicum* 2262 in batch culture under oxygen deprivation conditions.

Time-course profiles of growth (a, d, g, j), glucose consumption (b, e, h, k), and lactate production (c, f, i, l). The dotted lines represent the corresponding specific rate (g/g/h). The black arrow and the vertical dashed line indicate the time when oxygen deprivation was applied.

The kinetics of growth, glucose consumption and lactic acid formation by *C. glutamicum* 2262 in these cultures are reported in **figure 3.2**. As expected,²²⁾ the highest growth rate, 0.64 h^{-1} , was reached during the aerobic phase and was similar in all cultures (**Figure 3.2d, 3.2g, 3.2j**) excepted for the first condition (**Figure 3.2a**). During this period, glucose was used mostly to support the cellular growth, as indicated by the absence of fermentation products (**Figure 3.2**).

As indicated in **figure 3.2**, the suppression of aeration at different OD_{570} values has a dramatic effect on the cell growth and provoked a rapid lactic acid excretion. The suppression

of aeration during the accelerating phase (OD_{570} of 3) led to the production of 24.5 g/L lactic acid with 2 g/L biomass, and resulted in a productivity of 0.54 g/L/h after 47 h of culture (Table 1). Without aeration, *C. glutamicum* 2262 continue to grow until 25 hours of culture. Therefore, glucose was used not only for lactate production but also to support the growth of cells (**Figure 3.2a**).

Table 3.1: Performances of lactate production process using *C. glutamicum* 2262 in the production phase of the one-step batch cultures.

OD_{570}	$Y_{P/S}$ (g g ⁻¹)	$Y_{P/X}$ (g g ⁻¹)	P (g l ⁻¹ h ⁻¹)	Lactate (g l ⁻¹)
3	0.63	12.3	0.54	24.5
10	0.79	7.3	1.3	27
30	0.8	2.83	1.65	23
60	0.54	0.38	1	6

$Y_{P/S}$: Yield of lactate from glucose, $Y_{P/X}$: Yield of lactate from biomass, P : Productivity

When the switch from the aerobic to the anaerobic phase was performed at an OD_{570} of 10, the specific growth rate decreased and led to an accumulation of biomass of 3.7 g/L after 26 h of culture (**Figure 3.2d**). As expected, cells produced lactate immediately upon oxygen deprivation, and accumulated up to 27 g l⁻¹ until glucose was completely consumed after 26 hours of culture (**Figure 3.2e, 3.2f**). In these conditions, the specific rate of glucose consumption reached a maximal value of 0.71 g/g/h, 7 h after the suppression of the aeration (**Figure 3.2e**). During the anaerobic phase, lactate was continuously produced and reached a maximal specific production rate of 0.4 g/g/h 14 hours after the oxygen deprivation (**Figure 3.2f**). Lactate was continuously produced until the carbon source was exhausted, suggesting that most of glucose was used for lactate production during the anaerobic phase.

When initiated at an OD_{570} value of 30, the anaerobic phase resulted in kinetics of cell growth, glucose consumption and lactate production similar to those obtained when the

oxygen deprivation was performed at an OD₅₇₀ of 10. As shown in **figure 3.2**, the cell growth was completely abolished under anaerobic conditions, and most of glucose was used for the production of lactate (**Figures 3.2g, 3.2h, 3.2i**). In these conditions, final lactate and biomass concentrations were 23 g/L and 8.1 g/L, respectively, after 19 h of culture.

When the aeration was suppressed at an OD₅₇₀ value of 60, a complete growth arrest was observed as well as a slight production of lactate up to 6 g/L after 12 h of culture. This was clearly due to the rapid exhaustion of residual glucose (**Figure 3.2j**).

From these results, it appeared that the cell concentration obtained when a switch from the aerobic to the anaerobic phase occurred, has a strong influence on the lactate production. As shown in Table 1, the suppression of the aeration at different OD₅₇₀ values dramatically affected yields of lactate from glucose ($Y_{P/S}$), lactate produced by biomass ($Y_{P/X}$), and productivities. Although the $Y_{P/S}$ value are average when the suppression of the aeration was performed at an OD₅₇₀ value of 3, the lactate productivity was the lowest compared to other conditions whereas the yield of lactate produced by biomass ($Y_{P/X}$) was the highest (**Table 3.1**). The highest yields of lactate from glucose (0.79 and 0.8) were obtained when the suppression of the aeration was performed at OD₅₇₀ values of 10 and 30, respectively. In this last condition, the highest lactic acid productivity of 1.65 g/L/h was obtained.

Production of lactate during fed-batch process

Using fed batch mode, the production of lactate by *C. glutamicum* 2262 under oxygen deprivation conditions can be extended during the anaerobic phase, ie when glucose is metabolized into fermentation products. Therefore, *C. glutamicum* cultures were fed with glucose when the aeration was suppressed at OD₅₇₀ values of 10 and 30, and using the same initial operating conditions as indicated for batch cultures experiments. In fed-batch mode, glucose was added in the culture medium by pulse to maintain the residual concentration over 5 g/L without exceeding 30 g/L.

When oxygen was depleted at OD₅₇₀ of 10, the specific rate of glucose consumption reached a maximal value of 0.5 g/g/h within 12 hours of fermentation (**Figure 3.3b**) then progressively decreased down to 0.05 g/g/h after 50 hours. However, the specific rates of glucose consumption and lactic acid production were maintained constant and relatively low,

even though lactic acid was steadily produced (**Figures 3.3b, 3.3c**). The specific rate of lactate production reached a maximum of 0.42 g/g/h before the first glucose feeding then decreased rapidly during a period of 30-50 hours to reach a minimum value of 0.02 g/g/h until the end of the fermentation. This fed batch fermentation resulted in a lactate production of 83 g, corresponding to a final concentration of 55.8 g/L (**Table 3.2**). In addition to lactate, 15.3 g/L succinate were produced after 220 h of culture (data not shown).

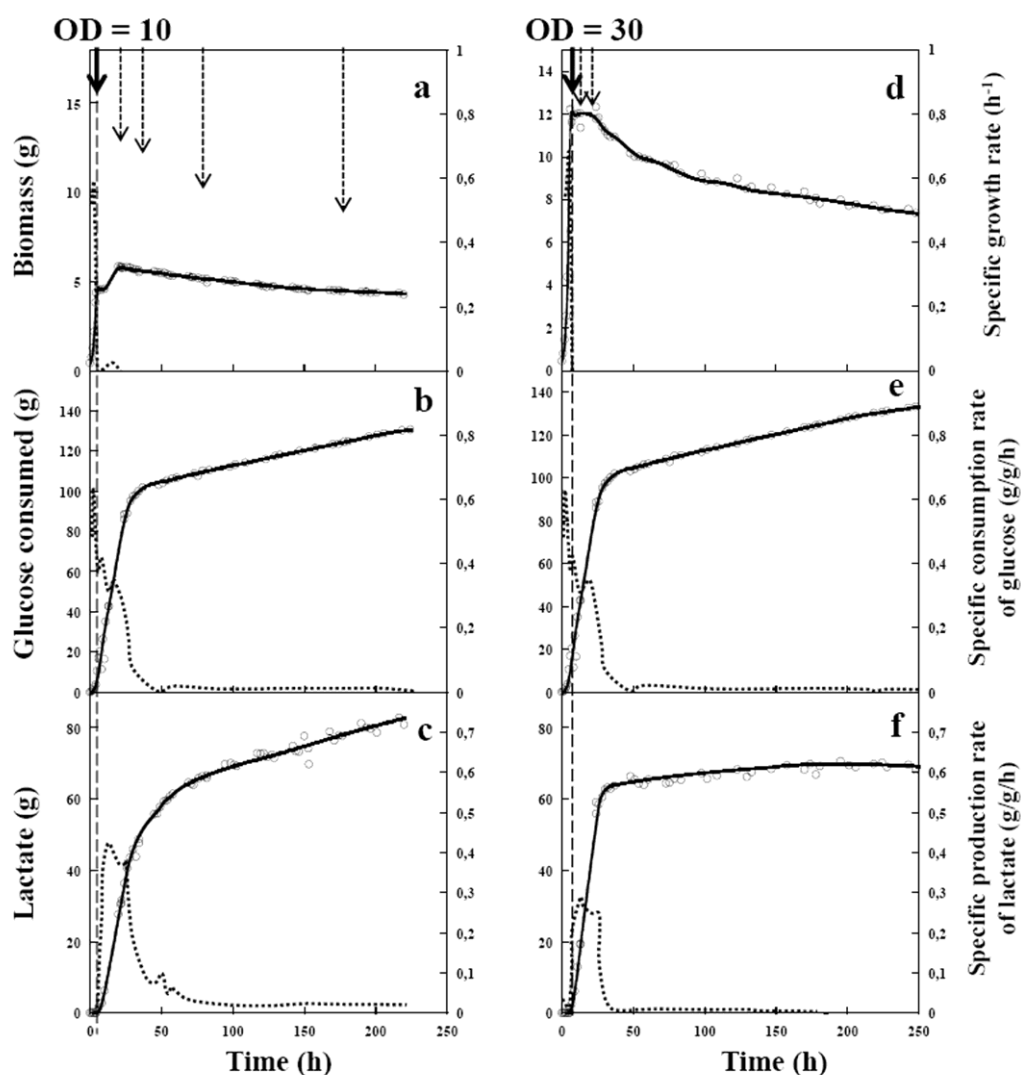


Figure 3: Lactate production by *C. glutamicum* 2262 in fed-batch culture under oxygen deprivation conditions.

Time-course profiles of growth (a, d), glucose consumption (b, e) and lactate production (c, f). As a consequence of the dilution due to the fed batch process, glucose consumption and

lactate production are expressed in gram (g) instead of gram per liter (g/L). The dotted lines represent the corresponding specific rate (g/g/h). The black arrow and the vertical dashed line indicate the time when oxygen deprivation was applied. The dashed arrows indicate the glucose additions into the bioreactor.

The depletion of oxygen at OD₅₇₀ value of 30 has a strong effect on the performance of the culture. Although the concentration profiles in the first 26 hours were similar to those of the previous fed-batch process (oxygen depletion at an OD₅₇₀ value of 10), the specific rates of glucose consumption and lactate production dropped close to zero, resulting in the complete abolition of lactate production even in the presence of a high concentration of glucose available remaining in the medium (**Figures 3.3d, 3.3e, 3.3f**). As a consequence, the yield of lactate produced by biomass ($Y_{P/X}$) was three times lower than yield obtained when aeration was suppressed at an OD₅₇₀ value of 10 (**Table 3.2**). In this fed-batch culture, succinate was also produced up to of 21 g/L after 220 h of culture (data not shown). In contrast, less than 1 g/L acetate was produced in both batch and fed-batch cultures (data not shown).

Table 3.2: Performances of lactate production process using *C. glutamicum* 2262 in the production phase of one-step fed-batch cultures.

OD ₅₇₀	$Y_{P/S}$ (g g ⁻¹)	$Y_{P/X}$ (g g ⁻¹)	P (g l ⁻¹ h ⁻¹)	lactate (g l ⁻¹)
10	0.63	14.3	0.25	55.8
30	0.6	5.57	0.21	49

$Y_{P/S}$: Yield of lactate from glucose, $Y_{P/X}$: Yield of lactate from biomass, P: Productivity

Comparing both batch and fed-batch processes carried out with an oxygen depletion established at an OD₅₇₀ value of 30, it can be noted that the glucose-to-lactic acid conversion yield ($Y_{P/S}$) and the lactic acid productivities (P) in batch mode exceeded by more than 1.3 - and 7.8 fold, respectively, those obtained in fed-batch cultures (**Table 3.1, Table 3.2**). This difference can be explained by a difference in glucose utilization in the two culture modes:

38% of the carbon was recovered in succinate and other products at the end of the fed-batch culture while this value is only 17% in batch mode (data not shown). However, the yield of lactate produced by biomass ($Y_{P/X}$) is 2-fold higher in fed-batch than in batch culture. In fact, the fed-batch mode increased the metabolically active period of the cells, resulting in an extended lactate production phase. However, as shown in **figure 3.3C**, the specific rate of lactate production was maintained at a very low value, less than 0.05 g/g/h after 61 g of lactate were produced (corresponding to a concentration of 49 g/L), and although more than 17g/L of glucose remained in the culture medium. This decline in lactate production rate could be the consequence of end product inhibition,²³⁾ but also a decrease in metabolic potential due to prolonged anaerobic period of the microbial biocatalyst. Therefore, further study to characterize the metabolic behavior of *C. glutamicum* cultivated anaerobically over a prolonged period of time could be useful to improve the process performance.

Discussion

The physiological states of *C. glutamicum* is crucial for the production of organic acid under oxygen deprivation conditions and are obviously influenced during the aerobic growth phase preceding the anaerobic-production phase. Improvement of fermentation productions can be achieved either by genetic engineering, by process optimization or by combining both approaches. In *C. glutamicum*, genetic engineering strategies consisting in the addition or the deletion of competing pathways are not always successful since the metabolic fluxes are precisely controlled by cellular regulation mechanisms.^{7,24)} For example, the inactivation of *ppc*, *pyc*, *ppc-pyc*, *pckA*, *fum*, and *aceA* genes, which impaired the succinic acid and acetic acid synthetic pathways respectively in *C. glutamicum*, has shown no benefit on the lactate production.²⁴⁾

In this study, process conditions for optimal production of lactate as a representative of most of fermentation products deriving directly or indirectly from pyruvate, were established. Under oxygen deprivation, *C. glutamicum* strain 2262 was able to produce up to 27 g/L and 55.8 g/L lactate in batch and fed-batch culture, respectively. However, the physiological changes of *C. glutamicum* during the transition from aerobic to oxygen deprivation conditions remain largely unknown whereas they appeared as key parameters to improve fermentation performances. Indeed, Martinez *et al.*,¹⁶⁾ and Vemuri *et al.*,¹⁷⁾ have shown that the physiological state of the cell during the transition from aerobic to anaerobic condition

significantly influenced the overall fermentation product formation by the succinate producing *E. coli* strains.

In addition to lactate, significant amount of acetate (~1 g/L) and succinate (6 and 21 g/L) were produced in both batch and fed batch processes. These observations are in agreement with studies reporting the ability of *C. glutamicum* to produce significant amounts of organic acids from glucose despite cessation of growth under oxygen deprivation conditions.^{7, 13, 24)} Our study also demonstrates that *C. glutamicum* 2262 can utilize lactate formed during the aerobic phase when glucose is exhausted. This was in agreement with previously reported studies, indicating that *C. glutamicum* is able to grow using lactate as the sole carbon source in aerobic conditions,^{25, 26)} probably through the respiratory quinone-dependent LDH.^{27, 28)}

In contrast, under oxygen deprivation, lactate was consumed only when glucose is exhausted in the culture medium.

The lactate production by *C. glutamicum* has been also studied by Okino et al.⁷⁾ In their study, a single anaerobic production phase with high cell density cultures made with washed cells was carried out. As a result, a final lactic acid concentration of 10 g/L, with a yield of lactate from glucose of 0.89 g/g, was achieved at a cell concentration of 10 g/L after 2 h of batch culture whereas 52 g/L lactate were produced after 8 h of a fed batch culture using an initial concentration of 30 g/L of washed cells. In our Study, the yields of lactate produced by biomass ($Y_{P/X}$) were 7- 8 fold higher compared to the yield values obtained by Okino et al. 7), especially when the suppression of the aeration was performed at an OD₅₇₀ of 10 (1 g/g vs 7.3 g/g and 1.7 g/g vs 14.3 g/g in batch and fed batch processes respectively).

Importantly, these results were obtained from a simple one-step fermentation process operated at low initial biomass concentration of 2.6 g/L. As a consequence, the yields of lactate produced by biomass ($Y_{P/X}$) obtained in our study are much higher than those reported in the literature. In addition, compared to other fermentation procedures previously described that result in higher final product concentration, additional handling steps are generally required such as a washing step as well as a very high biomass concentration of 30 g/L.^{7, 24)}

Further studies are now needed to improve the production yields of fermentation product by *C. glutamicum*. Indeed, with an average yield of lactate production ($Y_{P/S}$) of 1.6 mol/mol,

an increase of 20% could be gained on the basis of the theoretical maximum yield (2 mol/mol).

Acknowledgments

The authors acknowledge the French Embassy in Vietnam through the Evarist Galois program and the Institut Carnot Énergie et Environnement en Lorraine (ICEEL) for their support.

References

- 1) Tsao GT, Cao NJ, Du J, and Gong CS, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 65, 243-280 (1999).
- 2) Chotani G, Dodge T, Hsu A, Kumar M, LaDuca R, Trimbur D, Weyler W, and Sanford K, *Biochim. Biophys. Acta.* 21543, 434-455 (2000).
- 3) Ohara H, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62, 474-477 (2003).
- 4) Sauer M, Porro D, Mattanovich D, and Branduardi P, *Trends Biotechnol.* 26,100-108 (2008).
- 5) Soccol CR, Vandenberghe, LPS, Rodrigues C and Pandey A, *Food Technol. Biotechnol.* 44, 141-149 (2006).
- 6) Becker J, and Wittmann C, *Curr. Opin. Biotech.* 23,718-726 (2012).
- 7) Okino S, Inui M, and Yukawa H, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68; 475-480 (2005).
- 8) Okino S, Noburyu R, Suda M, Jojima T, Inui M, and Yukawa H, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81, 459-464 (2008).
- 9) Okino S, Suda M, Fujikura K, Inui M, and Yukawa H, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78, 449-454 (2008).
- 10) Litsanov B, Brocker M, and Bott M, *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 3325-3337 (2012).
- 11) Inui M, Kawaguchi H, Murakami S, Vertes AA, and Yukawa H, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 8, 243-254 (2004).
- 12) Blombach B, Riester T, Wieschalka S, Ziert C, Youn JW, Wendisch VF, and Eikmanns BJ, *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 3300-3310 (2011).
- 13) Inui M, Suda M, Okino S, Nonaka H, Puskas LG, Vertes AA, and Yukawa H, *Microbiology.* 153, 2491-2504 (2007).
- 14) Ehira S, Shirai T, Teramoto H, Inui M, and Yukawa H, *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 5146-5152 (2008).

- 15) Yamamoto S, Sakai M, Inui M, and Yukawa H, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90, 1051-1061 (2011).
- 16) Martinez I, Bennett GN, and San KY, *Metab. Eng.* 12, 499-509 (2010).
- 17) Vemuri GN, Eiteman MA, and Altman E, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 28; 325-332 (2002).
- 18) Champagne CP and Gardner NJ, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 28, 291-296 (2002).
- 19) Horn G, Hofweber R, Kremer W, and Kalbitzer HR, *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 1457-1470 (2007).
- 20) Delaunay S, Gourdon P, Lapujade P, Mailly E, Oriol E, Engasser JM, Lindley ND, and Goergen J-L, *Enzyme Microb. Technol.* 25, 762-768 (1999).
- 21) Von der Osten CH, Gioannetti C, and Sinskey AJ, *Biotechnol. Lett.* 11, 11-16 (1989).
- 22) Bokas D, Uy D, Grattepanche F, Duportail G, Guedon E, Delaunay S, and Goergen JL, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76, 773-781 (2007).
- 23) Seletzky JM, Noack U, Fricke J, Hahn S, and Buchs J, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72, 1297-1307 (2006).
- 24) Inui M, Murakami S, Okino S, Kawaguchi H, Vertes AA, and Yukawa H, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 7, 182-196 (2004).
- 25) Coccagn-Bousquet M, and Lindley ND, *Enzyme Microb. Technol.* 17, 260-267(1995).
- 26) Wendisch PG, Kreutzer C, Kalinowski J, Patek M, Sahm H, and Eikmanns BJ, *Microbiology.* 144, 915-927 (1998).
- 27) Uy D, Delaunay S, Germain P, Engasser JM, and Goergen JL, *J. Biotechnol.* 104, 173-184 (2003).
- 28) Stansen C, Uy D, Delaunay S, Eggeling L, Goergen JL, and Wendisch VF, *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 5920-5928 (2005).

III.1.2 Résultats complémentaires à l'article

III.1.2.1 Production d'autres acides organiques en anaérobiose, en mode discontinu à des états physiologiques différents et en mode semi-continu par *C. glutamicum* 2262

Des études antérieures (Okino et al, 2005; Inui et al, 2004) ont montré que, dans des conditions anaérobies, *C. glutamicum* est capable de produire non seulement de l'acide lactique, mais aussi de l'acide succinique et de l'acide acétique. Or, l'utilisation de *C. glutamicum* comme « plateforme » pour la production en anaérobiose de molécules telles que le bioéthanol, dépend aussi de la capacité à réduire la production des co-produits que sont le succinate et l'acétate. De ce fait, l'étude de la production des co-produits de la production du lactate a été entreprise.

Comme le montre la **figure 3.4**, la production du succinate et d'acétate par *C. glutamicum* 2262 est généralement amorcée dès que la phase en anaérobiose est établie. Ceci se voit pour toutes les cultures discontinues (**Figures 3.5a, b, c, d**) et semi-continues (**Figures 3.4 e, f**) quelle que soit la concentration en biomasse à laquelle l'aération a été stoppée. Pour la culture en mode discontinu, les concentrations maximales en succinate obtenues selon le moment où l'aération a été stoppée sont de 5,6 g/l, 4,8g/l, 4,4 g/l et 3 g/l après, respectivement, 47, 23, 20 et 10 heures de culture (**Figures 3.4a, b, c, d**). La production du succinate est maintenue au cours du temps lors des cultures en mode en semi-continu. En conséquence, les concentrations finales en succinate obtenues sont de 15 g/l et 21 g/l, après un arrêt de l'aération à DO₅₇₀ 10 (2,6 g/l en biomasse) et à DO₅₇₀ 30 (7,8 g/l en biomasse), respectivement, et après 220 heures de culture. Dans des cultures réalisées, l'acétate est produit en très faible quantité à moins de 1g/l en concentration finale (**Figures 3.4a, b, c, d, e, f**)

La production de succinate la plus importante en mode discontinu est obtenue lorsque l'aération est stoppée à DO₅₇₀ 10 et à DO₅₇₀ 30. En mode semi-continu, la concentration finale en succinate la plus élevée obtenue lorsque le passage vers l'anaérobiose se fait à partir d'une DO₅₇₀ égale à 30. Ces résultats sont opposés à ceux concernant la production du lactate (**Figure 3**). La production de succinate semble donc se faire au détriment de la production de lactate. Cela a aussi été observé chez *C. glutamicum* R (Okino et al, 2005).

Ainsi la production d'acétate est significativement plus faible dans les cultures réalisées avec *C. glutamicum* 2262 que ce qui avait été précédemment mesuré chez *C. glutamicum* R (Okino et al, 2005). Cette caractéristique de *C. glutamicum* 2262 constitue un bon avantage en vue d'une exploitation de cette souche comme plateforme d'ingénierie métabolique.

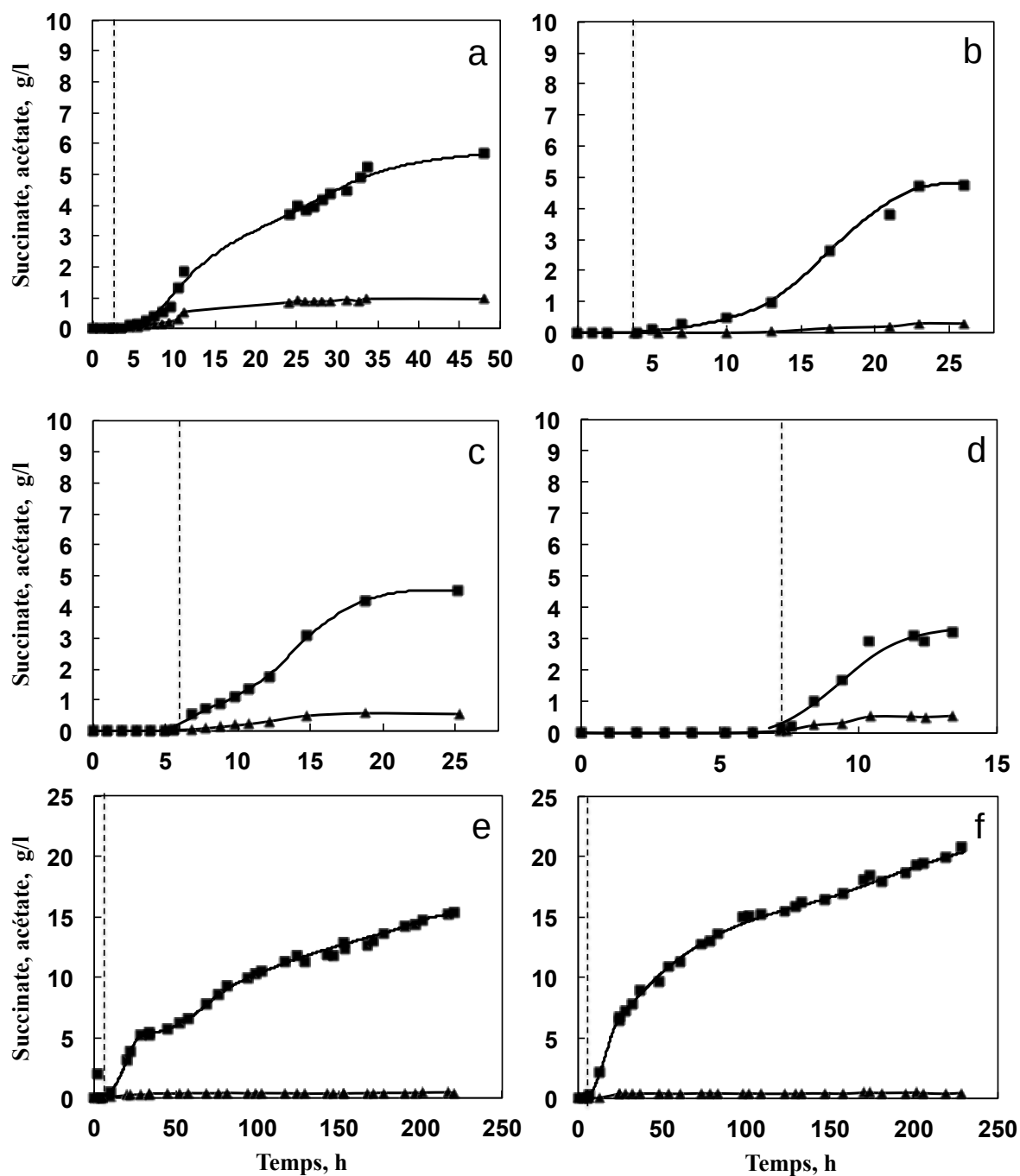


Figure 3.4: Production de succinate et d'acétate en mode discontinu après un arrêt de l'aération à: DO₅₇₀ 3 (a); DO₅₇₀ 10 (b); DO₅₇₀ 30 (c); DO₅₇₀ 60 (d) et en mode semi-continous à: DO₅₇₀ 10 (e); DO₅₇₀ 30 (f) avec *Corynebacterium glutamicum* 2262.

Evolution des concentrations en succinate (■) et en acétate (▲). Les lignes verticales en pointillés indiquent le temps de culture où l'apport en oxygène a été arrêté.

III.1.2.2 Bilan carboné lors des cultures en mode discontinu et semi-continu avec *C. glutamicum* 2262

Pour mieux appréhender la distribution du carbone au sein du métabolisme de *C. glutamicum* 2262, un bilan carboné a été réalisé pour toutes les cultures effectuées (**Figure 3.5**).

En mode discontinu, lors des deux cultures pour lesquelles une faible concentration finale en biomasse a été obtenue, le glucose est essentiellement converti en lactate : 61% lors de la culture avec arrêt de l'aération à DO₅₇₀ 3 et 70 % pour la culture avec arrêt à DO₅₇₀10 (**Figures 3.5, a, b**). Un arrêt plus tardif de l'arrêt de l'aération se traduit par un accroissement de la part de carbone retrouvé dans la biomasse au détriment du pourcentage de carbone utilisé pour la synthèse de lactate. Ainsi, dans le cas de la culture avec une interruption de l'aération à DO₅₇₀ 60, seuls 15% du carbone sont retrouvés dans le lactate. Ceci s'explique par l'utilisation du carbone principalement pour la synthèse de biomasse, à hauteur de 49% (**Figure 3.5d**). La même évolution de l'utilisation du carbone est retrouvée lors des cultures en mode semi-continu : l'utilisation du carbone pour la synthèse de lactate passe de 59 à 51% alors que, dans le même temps, la proportion du carbone consommé pour la synthèse de biomasse passe de 3 à 7% (**Figures 3.5e & f**).

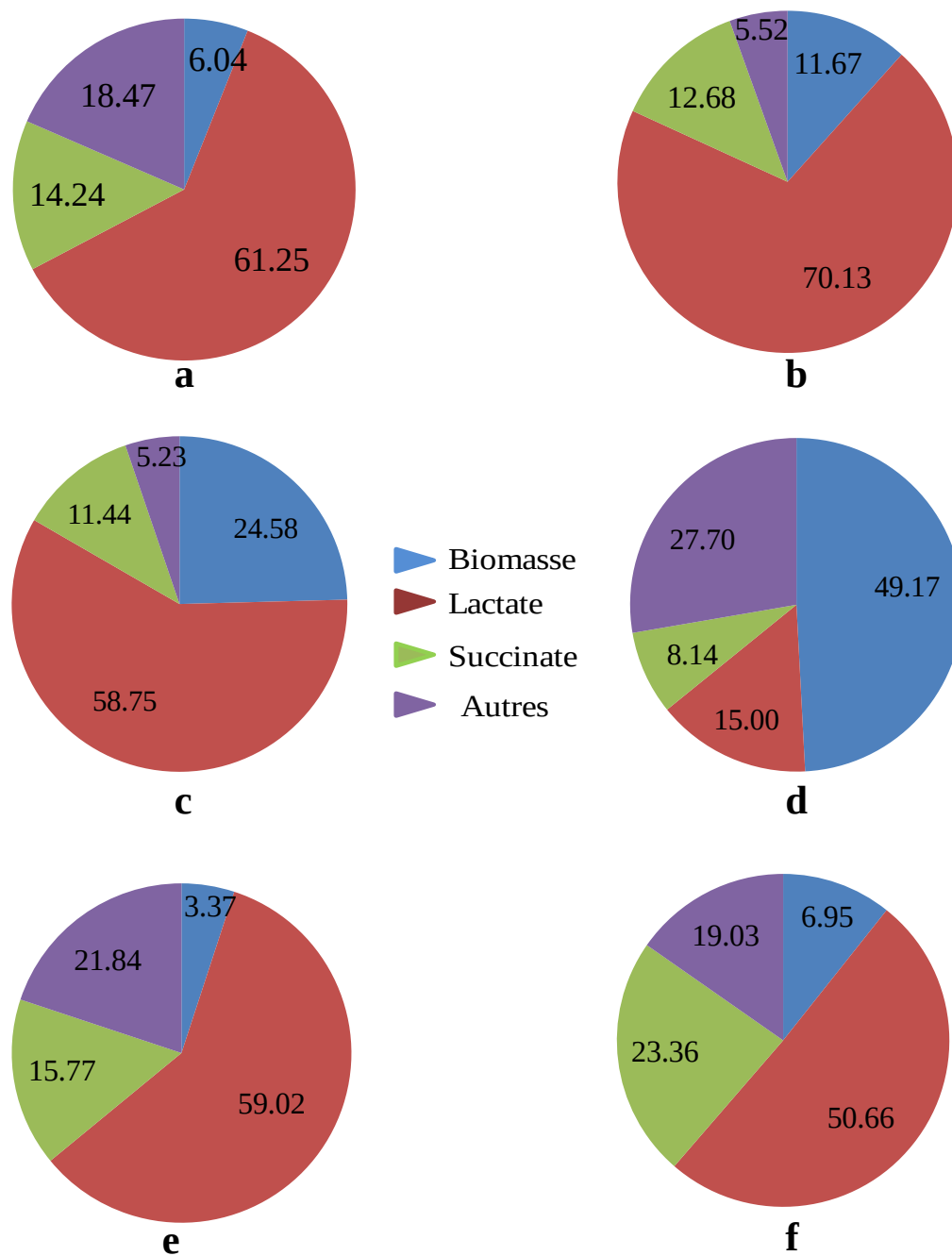


Figure 3.5: Bilans carbonés lors des cultures de *C. glutamicum* 2262 en mode discontinu avec une interruption de l'aération à DO₅₇₀ 3 (a); 10 (b); 30 (c); 60 (d) et en mode semi-continu avec arrêt de l'aération à DO₅₇₀ 10 (e); 30 (f).

En ce qui concerne la production de succinate, c'est lors des cultures en mode semi-continu que la part la plus importante du carbone est utilisée pour la synthèse de cet acide organique. En effet, 16 et 23% du carbone consommé sont retrouvés dans le succinate lors des cultures avec un arrêt de l'aération à DO₅₇₀ 10 et 30, respectivement (**Figures 3.5e, f**)

III.1.3 Conclusions

Les cultures en modes discontinu et semi-continu avec un arrêt de l'aération à différentes valeurs de concentration en biomasse nous ont permis de caractériser le comportement cinétique de *C. glutamicum* 2262 suite à un passage d'aérobiose à anaérobiose. Après un arrêt de l'apport en oxygène, ce microorganisme parvient à maintenir une croissance faible si cette interruption intervient précocément lors de la phase de croissance. Ce comportement est, bien entendu, complètement différent de celui observé lors du procédé de production de lactate par *C. glutamicum* R. En effet, pour ce dernier, la croissance est découplée de la production de lactate. Aucune croissance n'est donc mesurée lors de la phase d'accumulation de lactate (Okino et al., 2005, Inui et al., 2004b). Lors des cultures avec *C. glutamicum* 2262, la production des acides organiques, notamment du lactate débute dès l'arrêt de l'apport en oxygène. Les performances de cette production sont cependant dépendantes de l'état physiologique de *C. glutamicum* 2262 au moment de l'arrêt de l'aération. Il apparaît donc que lorsque celui-ci intervient alors que la bactérie est en phase active de croissance (DO₅₇₀ 10), le rendement de conversion du glucose en lactate (70% en mode discontinu et 60% en mode semi-continu), et la concentration finale en lactate (27 et 55,5 g/l en modes discontinu et semi-continu, respectivement) sont les plus élevés. De plus, en initiant la phase de production à une concentration de biomasse relativement faible, une valeur de DO₅₇₀ de 10 correspond à moins de 3 g/l, le procédé établi permet d'obtenir un rendement de conversion lactate sur biomasse beaucoup plus élevé que celle décrite dans la littérature que ce soit en mode discontinu ou en mode semi-continu (7,3 et 14,3 g/g vs. 1,7 g/g) (Okino et al., 2005). Dans la suite de ce travail, c'est donc à une DO₅₇₀ de 10 que l'interruption de l'apport en oxygène sera appliquée.

III.2 Etude de la production de lactate par *C. glutamicum* 2262 cultivé en anaérobiose et en mode discontinu à des concentrations initiales croissantes en glucose

III.2.1 Cinétiques de croissance, de consommation de glucose et de production de lactate

En vue d'améliorer la production du lactate par *C. glutamicum* 2262 en termes de concentrations finales en lactate, rendements et productivité, des expériences ont été réalisées en augmentant la concentration initiale du substrat. Quatre cultures avec une concentration initiale en glucose de 40, 50, 60 ou 70 g/l ont été réalisées en appliquant le procédé précédemment sélectionné (mode discontinu et arrêt de l'aération à une DO_{570} de 10). La **figure 3.6** présente les évolutions en fonction du temps des concentrations en biomasse, glucose résiduel et lactate ainsi que les vitesses spécifiques de croissance, de consommation du glucose et de production du lactate.

L'évolution de la concentration en biomasse et de la vitesse spécifique de croissance de *C. glutamicum* 2262 est similaire lors des quatre cultures. Après l'arrêt de l'apport en oxygène, les cellules continuent de se multiplier, mais à une vitesse spécifique réduite pour atteindre une concentration en biomasse maximale de 3,6 g/l (**Figure 3.6a, d, g, k**).

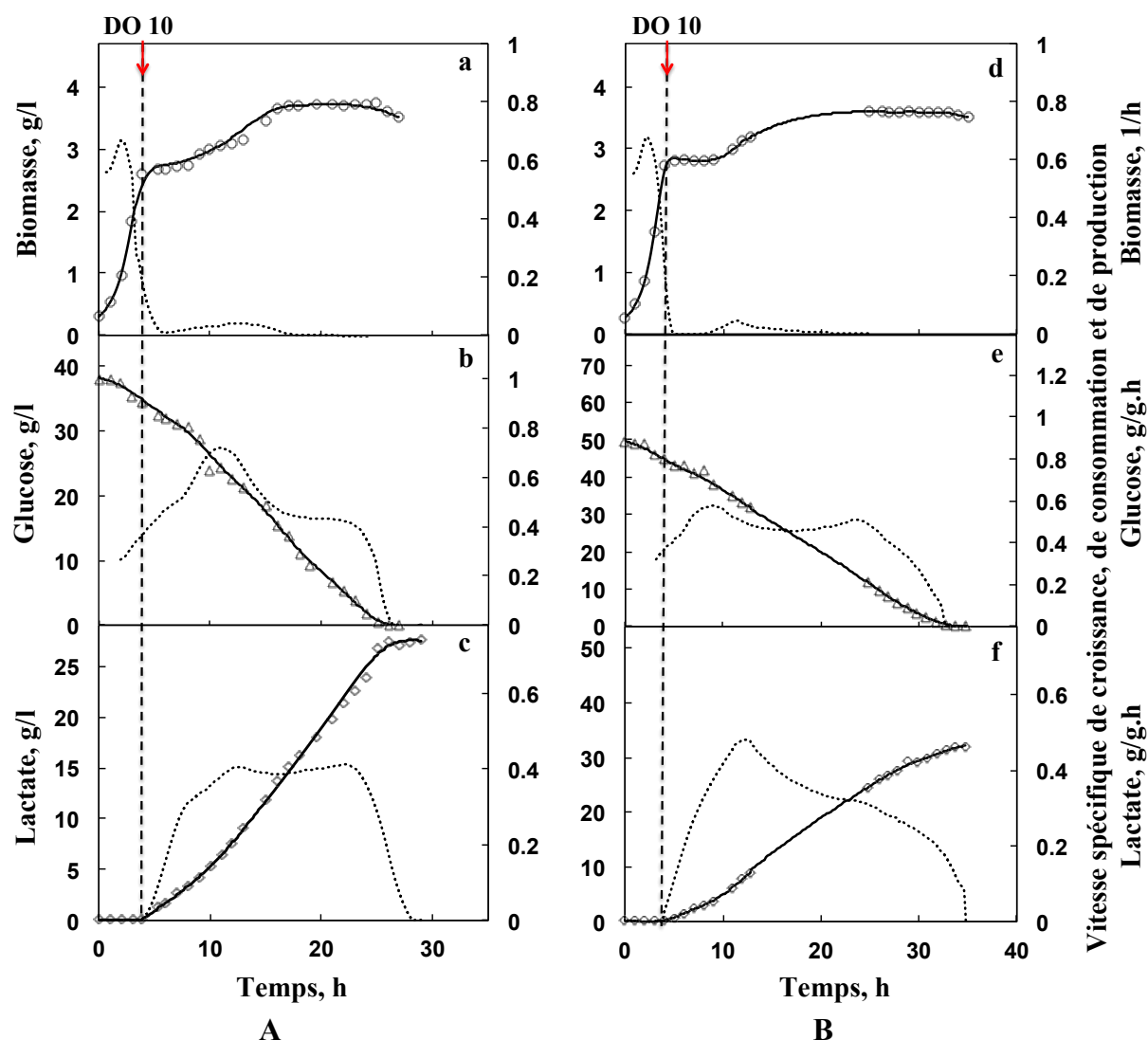


Figure 3.6: Production de lactate par *C. glutamicum* 2262 en culture en mode discontinu à une concentration initiale en glucose de 40 g/l (A) ou 50 g/l (B).

Evolution de la concentration en biomasse (a, d), de la concentration résiduelle en glucose (b, e), de la concentration en lactate (c, f). Les courbes en pointillés représentent la vitesse spécifique correspondante. Les lignes verticales en pointillés indiquent le moment de culture où l'apport en oxygène a été arrêté.

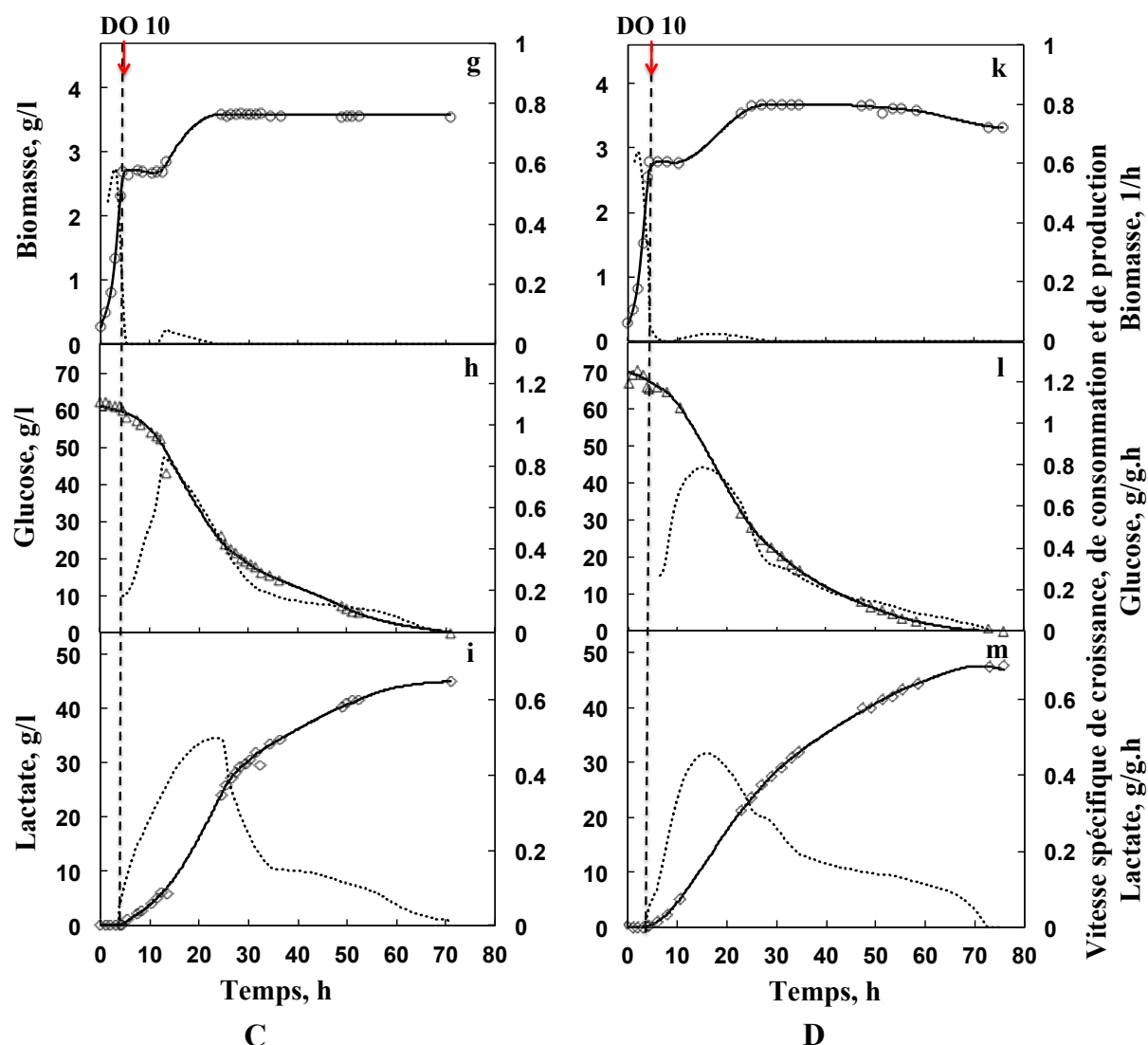


Figure 3.6 (suite) : Production de lactate par *C. glutamicum* 2262 en culture en mode discontinu à une concentration initiale en glucose de 60 g/l (C) ou 70 g/l (D).

Evolution de la concentration en biomasse (g, k), de la concentration résiduelle en glucose (h, l), de la concentration en lactate (i, m). Les courbes en pointillés représentent la vitesse spécifique correspondante. Les lignes verticales en pointillés indiquent le moment de culture où l'apport en oxygène a été arrêté.

Le glucose est entièrement consommé après 26 h de culture lors de la culture démarrée avec 40 g/l de glucose et après 34, 70 et 75 h pour les cultures dans lesquelles la concentration initiale en glucose est de 50, 60 et 70 g/l de glucose, respectivement (**Figure 6b, e, h, l**). Alors que la consommation en glucose est maintenue dans le temps, la vitesse spécifique de

consommation maximum de glucose reste similaire dans toutes les cultures, de l'ordre de 0,7 g/g.h (**Figure 3.6b, e, h, l**).

L'augmentation de la concentration initiale en substrat, de 40 g/l à 70 g/l, permet une amélioration significative de la concentration finale en lactate puisque celle-ci est de 27, 32, 44 ou 47,5 g/l pour les cultures avec des concentrations initiales en glucose de 40, 50, 60 et 70 g/l, respectivement (**Figure 3.6b, e, h, l**). La vitesse spécifique maximale de production de lactate est quasiment identique dans toutes les cultures (0,45 g/g.h).

Les principaux co-métabolites présents dans le milieu de culture sont le succinate et l'acétate (**Figure 3.7**).

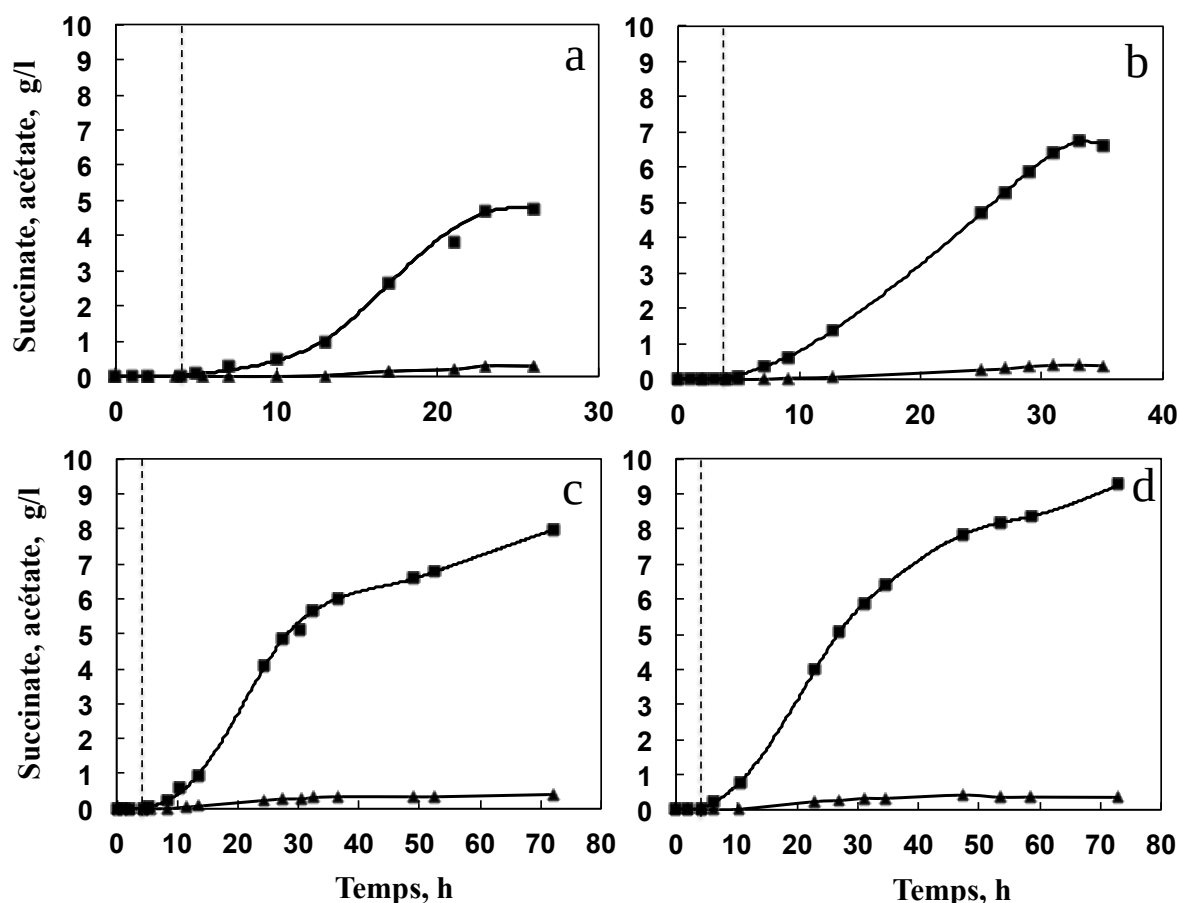


Figure 3.7: Production de succinate et d'acétate par *C. glutamicum* 2262 en culture en mode discontinu à une concentration initiale en glucose de 40 g/l (a), 50 g/l (b), 60 g/l (c) ou 70 g/l (d).

Evolution des concentrations en succinate (■) et en acétate (▲) lors de la culture de *Corynebacterium glutamicum* 2262, en mode discontinu, avec arrêt de l'aération à DO_{570} 10 et avec des concentrations initiales en glucose de: 40 g/l (a); 50 g/l (b); 60 g/l (c) et de 70 g/l (d). Les lignes verticales en pointillés indiquent le temps de culture où l'apport en oxygène a été arrêté.

Dans ces conditions, quelles que soient les conditions initiales en termes de concentration en glucose, *C. glutamicum* 2262 produit une concentration notable de succinate et une très faible concentration d'acétate (moins de 1g/l). La concentration finale en succinate augmente proportionnellement à la concentration initiale en glucose. En conséquence les concentrations finales en succinate sont de 4,8, 6,7, 8 et 9,3 g/l pour les cultures initiées avec 40, 50, 60 et 70 g/l de glucose, respectivement.

Ces résultats confirment que les deux produits principaux du métabolisme de *C. glutamicum* 2262 en condition anaérobie sont l'acide lactique et l'acide succinique. L'augmentation de la concentration initiale du substrat a permis une amélioration significative du titre final du lactate. Cependant, pour évaluer l'efficacité de ce procédé, il serait nécessaire d'évaluer les autres paramètres dont le rendement de conversion du substrat en produit et en biomasse, le rendement de conversion du produit par la biomasse et la productivité du procédé.

III.2.2 Mesure des performances du procédé de production de lactate et bilans carbonés

Le **tableau 3.3** montre les valeurs des principaux paramètres de la production anaérobie de lactate par *C. glutamicum* 2262 : la concentration initiale en glucose, la concentration finale en lactate, le rendement de conversion du glucose en lactate ($Y_{P/S}$), le rendement de conversion du glucose en biomasse ($Y_{X/S}$), le rendement de conversion en lactate par la biomasse ($Y_{P/X}$) et la productivité moyenne globale calculée en fin de culture lorsque glucose est entièrement consommé. Une augmentation de la concentration finale en lactate de l'ordre de 75% (de 27 à 47,5 g/l) est obtenue lorsque la concentration initiale en substrat augmente de 75% (de 40 à 70 g/l). Cependant l'obtention de cette augmentation nécessite un allongement du temps de culture ce qui se traduit par une diminution de 40% (de 1,05 à 0,63 g/h.h) de la productivité volumique (**Tableau 3.3**). Le rendement de conversion du glucose

en lactate varie assez peu entre les quatre conditions de culture. Il est de l'ordre de $0,7 \text{ g}_{\text{lactate}}/\text{g}_{\text{glucose}}$.

Tableau 3.3: Performances de la production anaérobie de lactate par *C. glutamicum* 2262 en culture en mode discontinu avec différentes concentrations initiales en glucose

Glucose ¹ (g/l)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	$Y_{P/X}$ (g/g)	Productivité (g/l.h)	Lactate ² (g/l)
40	0,09	0,7	7,3	1,05	27
50	0,07	0,64	8,9	0,94	32
60	0,06	0,71	12,2	0,63	44
70	0,05	0,68	12,9	0,63	47,5

¹ : concentration initiale

² : concentration finale

La concentration maximum en biomasse étant très similaire dans les quatre cultures (3,6 g/l), dès que la concentration initiale en glucose augmente dans le fermenteur, le rendement de conversion de glucose en biomasse diminue. Il passe ainsi de 0,09 à 0,05 $\text{g}_{\text{biomasse}}/\text{g}_{\text{glucose}}$ lorsque la concentration initiale en glucose est augmentée de 40 à 70 g/l. Dans le même temps, la production de lactate par gramme de biomasse est augmentée de 7,3 g/g à 12,9 g/g soit un accroissement de 76%. Cela traduit l'orientation du métabolisme de la bactérie en faveur de la synthèse de lactate.

La répartition du carbone consommé à partir du glucose varie assez peu au cours des différentes cultures réalisées. La majeure partie du carbone est retrouvée dans le lactate (entre 65 et 70% environ). Le carbone du succinate représente environ 13% du carbone consommé. La part du carbone retrouvée dans la biomasse diminue de 10 à 6% lorsque la concentration initiale en glucose augmente de 40 à 70 g/l. La part de carbone non spécifiée dans ce bilan est retrouvée dans les coproduits mineurs dont l'acétate mais également le CO_2 dont la production n'a pas été suivie (**Figure 3.8**).

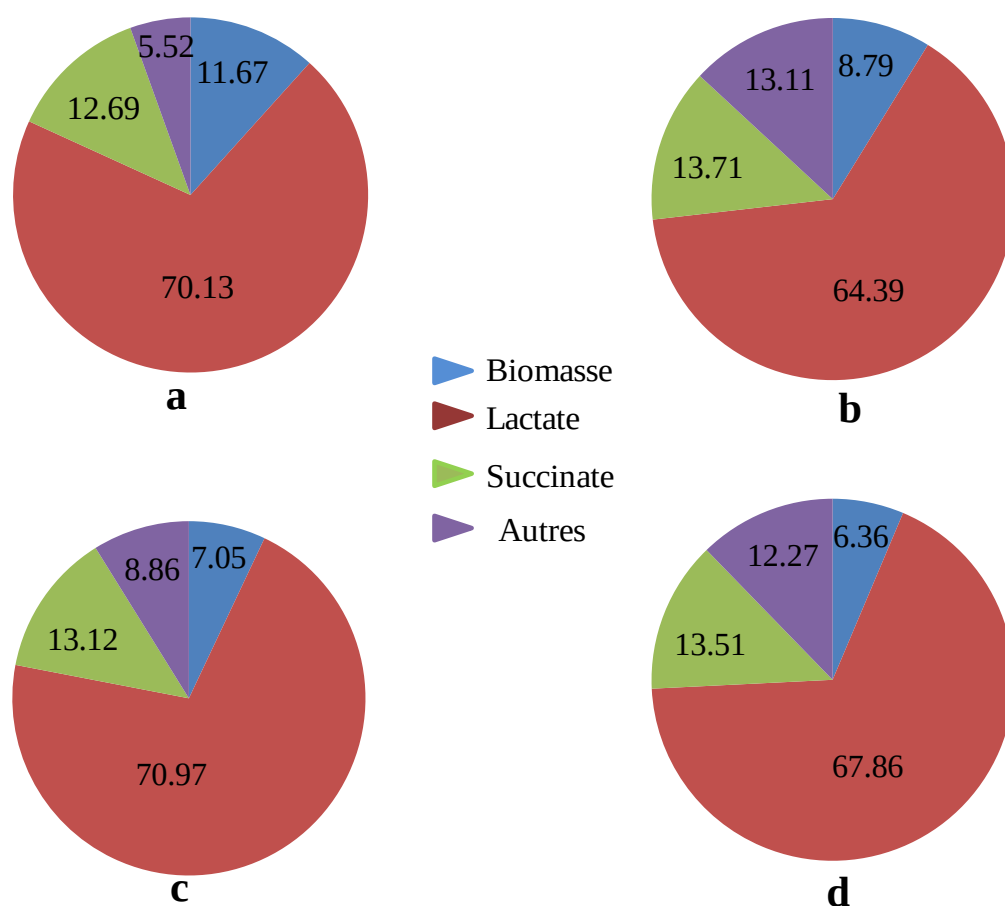


Figure 3.8: Bilans carbonés lors des cultures de *C. glutamicum* 2262 en mode discontinu, avec une interruption de l'aération à DO_{570} 10, avec une concentration initiale en glucose de 40 (a), 50 (b), 60 (c) ou 70 g/l (d).

Il s'avère donc que l'augmentation de la concentration initiale en glucose permet de maintenir dans le temps la production de lactate par *C. glutamicum* 2262. Ceci a un impact positif sur la concentration finale en lactate mais aussi sur l'orientation du flux de carbone vers la synthèse de lactate et de succinate au détriment de la synthèse de biomasse. Par contre, l'accroissement de la durée de la culture n'est pas compensé par cette augmentation de la production en lactate ce qui se traduit par une baisse importante de la productivité du procédé.

III.3 Influence de l'augmentation de la température du milieu de culture sur la production anaérobie de lactate par *C. glutamicum* 2262

Lors de son utilisation pour la production de glutamate, *C. glutamicum* 2262 est soumis à une élévation de la température du milieu de culture de 33 à 39°C. Cette élévation de température induit un ralentissement de la croissance et une redirection du flux de carbone vers la synthèse de glutamate (Delaunay et al., 1999). En outre, il a été démontré que, lorsque les corynébactéries sont soumises à un choc thermique, le flux de carbone dans la voie Embden Meyerhof (EMP) est plus important (Sonntag et al., 1995) ce qui pourrait être favorable à la production de lactate. De même, une accumulation extracellulaire d'acide lactique lors du procédé de production de glutamate en mode semi-continu, en aérobiose a déjà été mise en évidence chez *C. glutamicum* 2262. Suite à un passage de 33 à 39°C, celle-ci produit jusqu'à 11 g/l, 21 g/l et 1,5 g/l de lactate en mode discontinu, semi-continu et continu, respectivement (Delaunay et al, 1999; Delaunay et al., 2002; Uy et al., 2003). La réduction de l'activité de la pyruvate déshydrogénase (PDH) pourrait être la cause d'une l'accumulation de NADH et d'intermédiaires glycolytiques qui sont connus pour favoriser la synthèse de lactate (Garrigues et al.,1997). Ces différentes observations laissent penser qu'une augmentation de la température du milieu de culture de 33 à 39°C pourrait être favorable à la production de lactate dans le cadre du procédé anaérobie développé avec *C. glutamicum* 2262. Cette variation de température a donc été appliquée simultanément à l'arrêt de l'aération.

III.3.1 Cinétiques de croissance, de consommation de glucose et de production de lactate, de succinate et d'acétate suite à une élévation de température de 33 à 39°C

Les cinétiques de croissance, de consommation du glucose et de production de lactate par *C. glutamicum* 2262, en culture en mode discontinu, avec élévation de la température à 39°C appliquée au moment de la transition entre la phase de croissance et la phase de production sont présentées sur la **figure 3.9**.

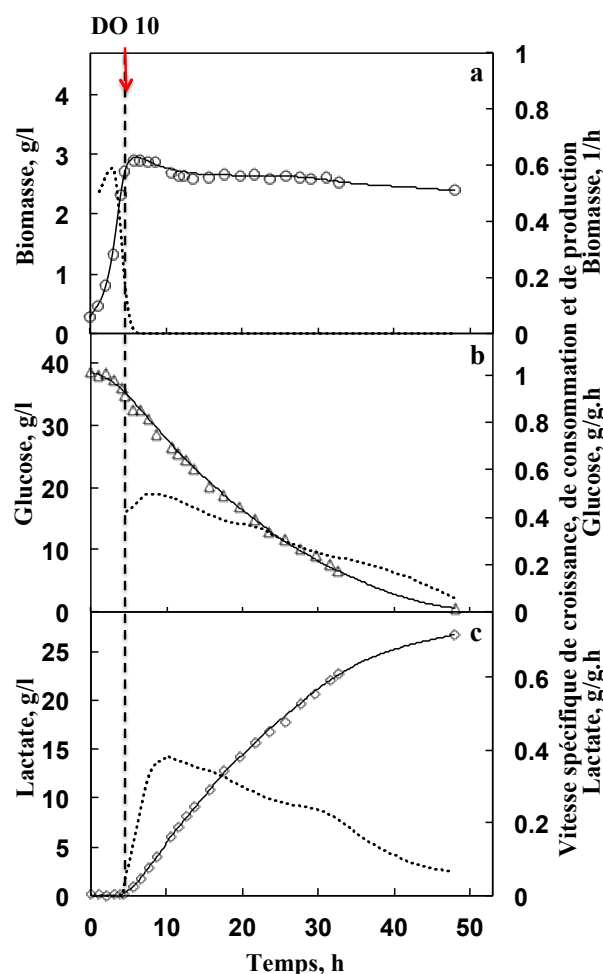


Figure 3.9: Production de lactate par *C. glutamicum* 2262 en mode discontinu, suite à une élévation de la température du milieu de culture à 39°C.

Evolution de la concentration en biomasse (a), de la concentration résiduelle en glucose (b), de la concentration en lactate (c). Les courbes en pointillés représentent la vitesse spécifique correspondante. La ligne verticale en pointillés indique le temps de culture où l'apport en oxygène a été arrêté et où la température a été élevée de 33 à 39°C.

Dès l'arrêt de l'apport en oxygène et l'élévation de la température, la croissance de *C. glutamicum* 2262 est stoppée ce qui se traduit par une stagnation de la concentration en biomasse (**Figure 3.9a**). En conséquence, la concentration maximale en biomasse n'est que de 2,7 g/l, soit 27% de moins par rapport à la concentration en biomasse de la culture réalisée dans les mêmes conditions sans modification de la température (**Figure 3.6a**). L'arrêt de la croissance induit très probablement la prolongation de la consommation du glucose jusqu'à

48 heures de culture (**Figure 3.9b**) par rapport aux 26 heures lors de la même culture sans variation de température (**Figure 3.6b**). Toujours comparativement à cette culture, la vitesse spécifique maximale de consommation du glucose est plus faible suite à l'élévation de la température (0,5 g/g.h contre 0,7 g/g.h) (**Figure 3.9b**). Il a été montré que suite à l'application d'un choc thermique à 39°C en culture en mode discontinu, en aérobiose, la vitesse spécifique de consommation de glucose de *C. glutamicum* 2262 pouvait être notablement augmentée après une augmentation de la température de 33 à 39°C (de 0,7 à 1,4 g/g.h) (Uy et al., 2005). Dans des conditions anérobies, cela ne semble pas être le cas.

Concernant la production du lactate, malgré la prolongation de la phase de production, la concentration finale en lactate atteint la même valeur que celle obtenue sans variation thermique soit 26,6 g/l (**Figure 3.9a**). La vitesse spécifique maximale de production du lactate est également plus faible puisqu'elle est de 0,38 g/g.h (**Figure 3.9c**) contre 0,45 g/g.h (**Figure 3.6c**). L'élévation de température s'avère donc sans influence positive sur l'accumulation de lactate lors du procédé anaérobie de production de lactate par *C. glutamicum* 2262.

Alors que la production d'acétate reste faible (concentration finale inférieure à 1 g/l), une concentration importante de succinate est obtenue (**Figure 3.10**). En effet, 9 g/l de succinate s'accumulent dans le milieu de culture alors que sans variation de la température, seuls 4,5 g/l avaient été mesurés. L'élévation de la température du milieu de culture, en anaérobiose semble donc favoriser la synthèse de succinate et donc le fonctionnement du bras réducteur du cycle de Krebs.

Il est intéressant de noter que les niveaux de production de succinate obtenus ici avec *C. glutamicum* 2262 sont supérieurs à ceux obtenus avec la souche *C. glutamicum* R chez laquelle la production de succinate a précédemment été étudiée (Okino et al., 2005). Au cours de ce travail, les auteurs avaient ajouté au milieu de culture 400 mM de bicarbonate afin d'accroître le fonctionnement des voies anapérotiques et de favoriser la production de succinate. Dans ces conditions, 4,2 g/l de succinate avaient été produits par *C. glutamicum* R. *C. glutamicum* 2262 pourrait donc être une souche potentiellement attractive au développement d'un procédé de production de succinate en anaérobiose.

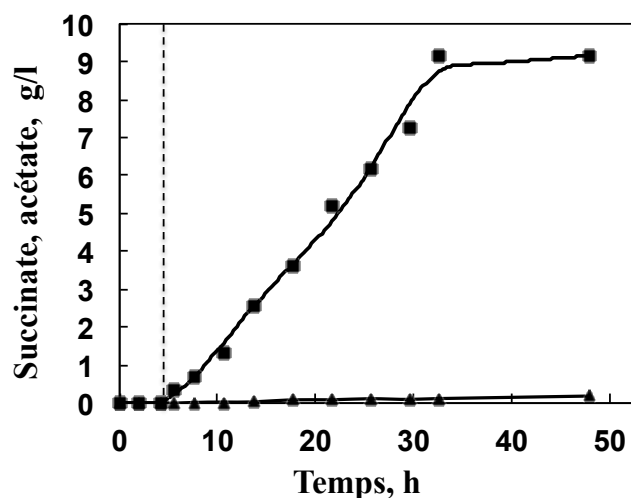


Figure 3.10: Production de succinate et d'acétate par *Corynebacterium glutamicum* 2262, en mode discontinu, avec arrêt de l'aération à DO_{570} 10 et élévation de la température du milieu de culture à 39°C.

Evolution des concentrations en succinate (■) et en acétate (▲). La ligne verticale en pointillé indique le temps de culture où l'apport en oxygène a été arrêté et l'élévation thermique à 39°C réalisée.

III.3.2 Comparaison des performances et des bilans carbonés du procédé anaérobie de production de lactate par *C. glutamicum* 2262 avec et sans variation de la température du milieu de culture

La **Tableau 3.4** présente le bilan de rendement de conversion du glucose en biomasse ($Y_{X/S}$), en lactate ($Y_{P/S}$), le rendement lactate produit sur biomasse produite ($Y_{P/X}$) et la productivité (P) des cultures en mode discontinu avec et sans modification de la température.

Le choc thermique a un effet négatif sur le rendement de conversion du glucose en biomasse puisque celui-ci diminue de 22% (de 0,09 à 0,07 g/g). La biomasse formée est cependant métaboliquement active puisque le rendement lactate/biomasse est plus élevé que celui obtenu lors de la culture sans variation thermique (9,5 g/g vs. 7,3 g/g, soit une augmentation de 30 %).

Tableau 3.4. Performances du procédé anaérobie de production de lactate par *C. glutamicum* 2262 en mode discontinu, avec et sans variation de la température du milieu de culture.

Conditions de culture	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	$Y_{P/X}$ (g/g)	P (g/l.h)
DO ₅₇₀ =10 ¹ , sans variation thermique	0,09	0,7	7,3	1,05
DO ₅₇₀ =10 ¹ , avec passage de 33 à 39°C	0,07	0,7	9,5	0,56

¹ : arrêt de l'aération pour une valeur de DO₅₇₀ de 10

Le rendement de conversion du glucose en lactate est, par contre, identique dans les deux cultures (0,7 g/g). Cependant, le maintien dans le temps de la production de lactate sans augmentation de la concentration finale de celui-ci provoque une diminution de 50% la productivité volumique du procédé (de 1,05 g/l.h à 0,56 g/l.h). Ces résultats sont différents de ceux précédemment obtenus avec *E. coli*. En effet, un choc thermique à 42°C avait été appliqué pour améliorer la production du lactate en anaérobiose chez *E. coli* (Zhou et al., 2010). Celui-ci avait alors permis une augmentation de 8% et 4% de la productivité spécifique et de la productivité volumétrique du procédé, respectivement.

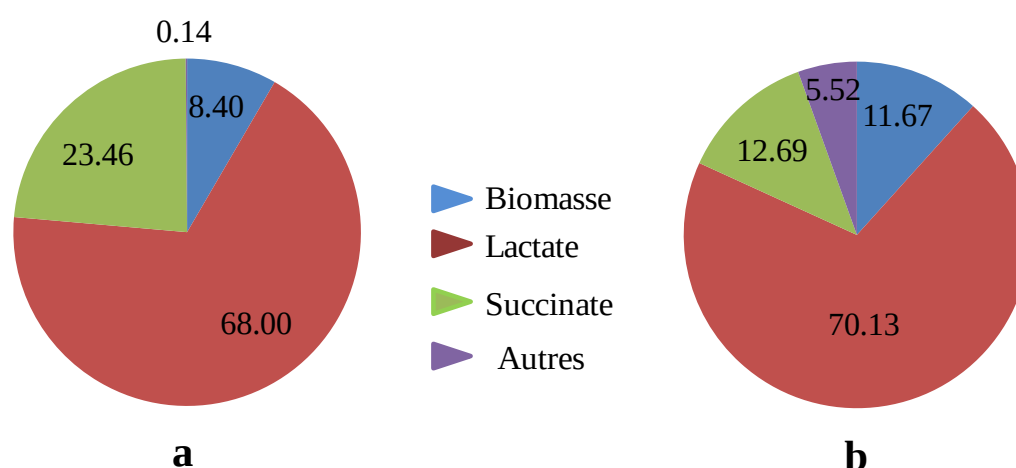


Figure 3.11: Bilans carbone des cultures de *C. glutamicum* 2262 en mode discontinu, avec arrêt de l'aération à DO₅₇₀ 10 avec (a) et sans (b) passage de la température du milieu de 33 à 39°C.

Avec une variation de température réalisée après 48 heures de culture, 68% du carbone consommé est transformé en lactate, 23,5 % en succinate et 8,4 % en biomasse (**Figure 3.11b**). En comparant avec le bilan carboné dans le cas de la culture sans modification de température, il semble que la variation thermique favorise la conversion du substrat en succinate. En effet, le taux d'utilisation du carbone issu du glucose pour la synthèse de lactate lors des deux cultures est très proche (70%), alors que 23,5% du carbone consommé sont retrouvés dans le succinate lors de la culture avec passage de 33 à 39°C contre seulement 12,7% lors de la culture sans cette variation.

III.4 Conclusion

L'état physiologique cellulaire lors du passage de la phase aérobie à la phase anaérobie le plus favorable à la production de lactate par *C. glutamicum* 2262 a pu être déterminé. L'arrêt de l'aération alors que la bactérie est en phase de croissance (DO_{570} de 10) permet d'obtenir le meilleur rendement de conversion du glucose en lactate (70% en mode discontinu et 60% en mode semi-continu) avec les concentrations finales en lactate les plus élevées (27 g/l en mode discontinu et 56 g/l en mode semi-continu). Suite à cet arrêt de l'aération, *C. glutamicum* 2262 produit très majoritairement du lactate. Les principaux co-produits sont le succinate et l'acétate. Le procédé établi dans cette partie du travail permet ainsi d'envisager l'exploitation de l'anaérobiose chez *C. glutamicum* 2262 pour la production de molécules d'intérêt. Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes en particulier intéressés à la production d'éthanol et d'itaconate. La production de ces 2 molécules, non naturellement synthétisées par *C. glutamicum*, nécessite, au préalable, à la fois l'introduction de leur voie de synthèse respective et la suppression de la synthèse de lactate afin de favoriser la redirection du flux de carbone vers la synthèse de la molécule d'intérêt.

CHAPITRE IV. EFFET DE L'EXPRESSION DES GENES DE LA PYRUVATE DECARBOXYLASE ET DE L'ALCOOL DESHYDROGENASE CHEZ *C. GLUTAMICUM* 2262

IV.1 Caractérisation des souches *C. glutamicum* 2262 exprimant PDC-ADH sous le contrôle du promoteur de *ldhA* (*PldhA*)

Afin de modifier le métabolisme de la souche *C. glutamicum* 2262 pour que celle-ci puisse synthétiser de l'éthanol, les gènes *pdc* et *adhB* de *Z. mobilis* ont été mis sous le contrôle du promoteur endogène de *ldhA*. Cette approche est similaire à celle suivie précédemment par l'équipe de recherche japonaise d'Inui et al. (2004) (cf. Chap. I. Synthèse bibliographique). La première étape a consisté à construire les outils plasmidiques nécessaires à la modification du métabolisme de *C. glutamicum* 2262, pMTL500E-*Pldh* et pMTL540E-*Pldh*.

IV.1.1 Construction de pMTL500E-*Pldh* et pMTL540E-*Pldh*

pMTL500E est un vecteur navette utilisable chez les bactéries à Gram-négatif et à Gram-positif. A notre connaissance, il n'a encore jamais été utilisé chez *C. glutamicum*. C'est la raison pour laquelle, nous avons également testé le plasmide pMTL540E. Ce dernier, dérivé de pMTL500E porte la région de réplication du plasmide de *Clostridium butyricum* pCB102 plutôt que le réplicon de pAM β 1, sa taille est également plus petite. Ajoutons que pMTL540E est également beaucoup plus stable que pMTL500E pour l'expression génétique (Oultram et al., 1988).

La séquence nucléotidique exacte du promoteur de *ldhA* de *C. glutamicum* 2262 n'est pas encore caractérisée. Cependant, la comparaison des transcriptomes de *C. glutamicum* ATCC13032 et de *C. glutamicum* 2262 a révélé une grande similarité entre ces deux souches (Stansen et al., 2005). Par conséquent, deux amorces (*Pldh* amont et *Pldh* aval, **Tableau 2.2**) ont été conçues en se basant sur la séquence du génome de *C. glutamicum* ATCC13032 (Ikeda et Nakagawa, 2003) pour amplifier une partie du promoteur de *ldhA* de *C. glutamicum* 2262.

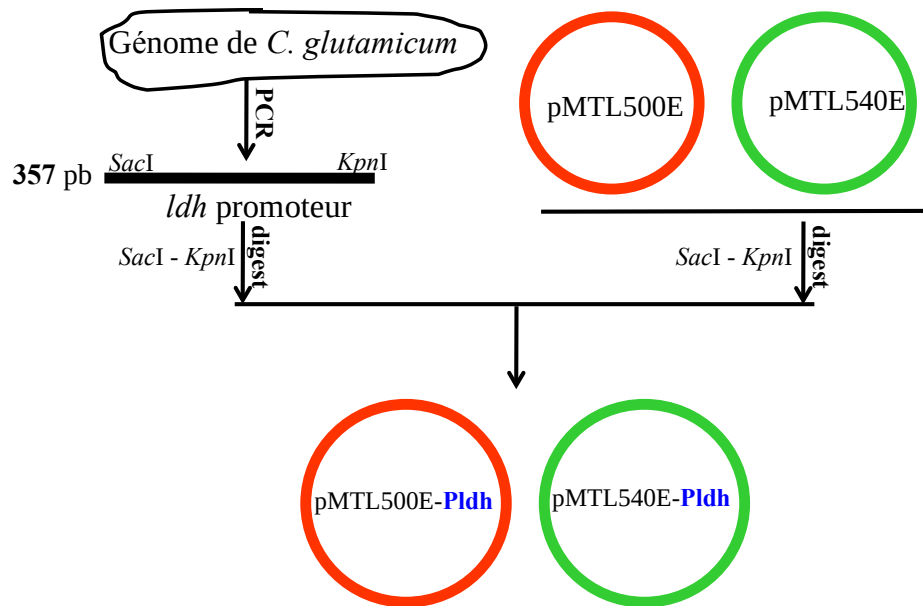


Figure 4.1: Stratégie suivie pour la construction de pMTL500E-Pldh et pMTL540E-Pldh.

Le produit de PCR de 0,4 kb comportant une portion du promoteur de *ldhA* a été digéré par *SacI* et *KpnI* et a été cloné dans les vecteurs navettes pMTL500E et pMTL540E (Oultram et al., 1993). Après transformation d'*E. coli* DH5 α avec les vecteurs obtenus, une vérification de la taille de ces derniers a été effectuée (**Figure 4.2**).

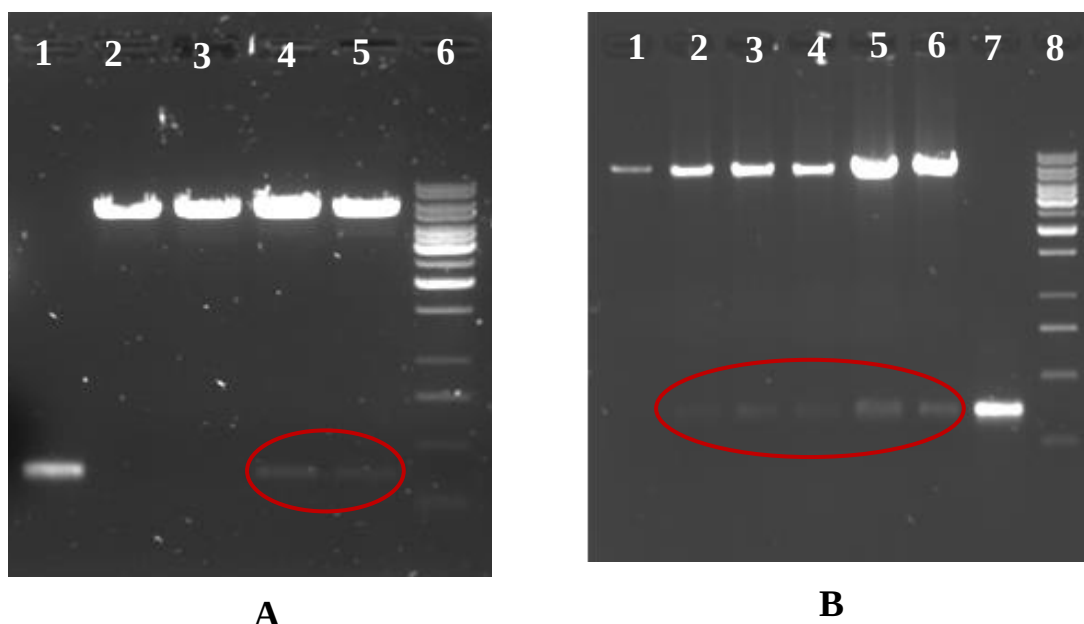


Figure 4.2: Vérification du clonage de l'insert de 400 pb issu de *Pldh* dans pMTL540E et pMTL500E.

Clones contenant pMTL540E+*Pldh* digéré avec *Sac* I, *Kpn* I (A). Puit 1: insert de 400 pb issu de *Pldh* (contrôle positif); puit 2: pMTL540E linéaire (contrôle négatif); puit 3: clone 1; puit 4: clone 2; puit 5: clone 3; puit 6: marqueur de taille (1kb Ladder, Invitrogen). Clones contenant pMTL500E+*Pldh* digéré avec *Sac* I, *Kpn* I (B). Puit 1: pMTL500E linéaire (contrôle négatif); puit 2: clone 1; puit 3: clone 2; puit 4: clone 3; puit 5: clone 4; puit 6: clone 5; puit 7: insert de 400 pb issu de *Pldh* (contrôle positif); puit 8: marqueur de taille (1kb Ladder, Invitrogen).

La digestion de pMTL540E*Pldh* par *Sac* I et *Kpn* I devrait donner deux bandes de 400 pb (promoteur *Pldh*) et de 5kb (plasmide vide). C'est ce qui est observé dans les pistes 4 et 5 (**Figure 4.2A**). De même, le plasmide pMTL500E, s'il contient *Pldh*, devrait donner deux bandes d'ADN suite à sa digestion par *Sac*I et *Kpn*I: l'un de 400 pb (promoteur *Pldh*) et l'autre de 6,1 kb (plasmide vide). C'est ce qui est visualisé dans les pistes 2, 3, 4, 5, 6 (**Figure 4.2B**). Les plasmides attendus ont donc effectivement été obtenus.

Clonage de l'opéron PET

L'opéron PET (Ingram et al. 1987) nécessaire à l'expression des gènes PDC et ADH de *Z. mobilis* a déjà été cloné dans un vecteur plasmidique pUC19, ceci pour générer le vecteur p4. Le fragment d'ADN contenant *pdh* et *adhB* de p4 a ensuite été cloné dans pMTL540E-*Pldh* aux sites de restriction *Bam*HI et *Sal*I afin de construire le plasmide pMTL540EOH (**Figure 4.3A**). Après transformation de *E. coli* DH5 α avec le plasmide ainsi construit, huit colonies ont été choisies aléatoirement afin de vérifier la construction réalisée. Le plasmide extrait de ces 8 clones a été digéré par *Bam*HI et *Sal*I (**Figure 4.4A**).

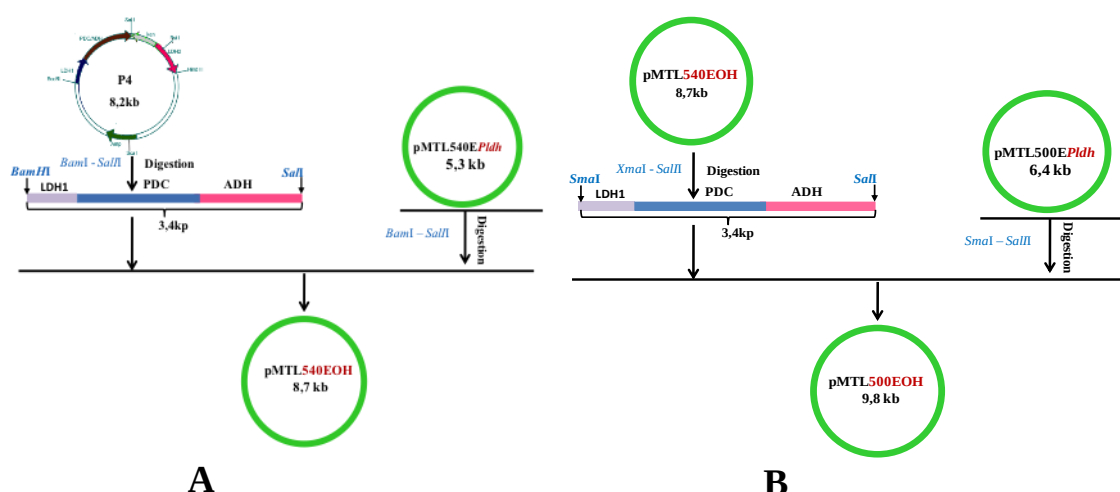


Figure 4.3: Construction des vecteurs d'expression contenant les séquences *pdh* et *adh*. Construction de pMTL540EOH (A) et de pMTL 500EOH (B).

Comme expliqué dans la **Figure 4.3A**, la digestion de pMTL540EOH par *Bam*HI et *Sal*I devrait donner deux bandes de 3,4 kb (*pdh* et *adh*) et 5,3 kb (vecteur vide). Alors que sa linéarisation par *Bam*HI ou *Sal*I devrait aboutir à un fragment de 8,7 kb. L'ensemble de ces bandes a pu être obtenu (**Figure 4.4A**) confirmant la construction attendue de pMTL540E.

Pour construire pMTL500EOH, une digestion de pMTL540EOH par *Sma*I et *Sal*I a été réalisé afin de récupérer un fragment de 3.4 kb contenant *pdh* et *adh* (**Figure 4.3B**). Ce fragment a ensuite été inséré aux sites *Sma*I et *Sal*I de pMTL500-*Pldh*.

Comme précédemment, une vérification de la construction a été réalisée (**Figure 4.4B**). Les fragments obtenus sont tous de la taille attendue.

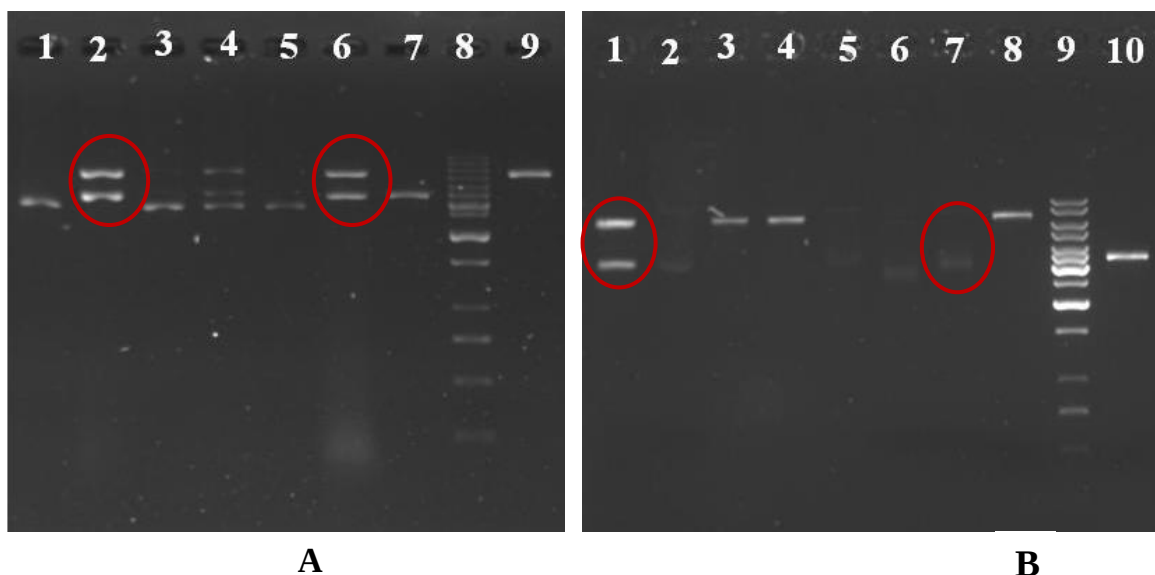


Figure 4.4: Vérification de l'insertion de l'opéron PET dans pMTL540-EPldh et pMTL500-EPldh.

Digestion de pMTL540EOH par *Bam*H I et *Sal* I (A). Puit 1 : clone 1 ; puit 2 : clone 2 ; puit 3 : clone 3 ; puit 4 : clone 4 ; puit 5 : clone 5 ; puit 6 : clone 6 ; puit 7 : Séquence PDC/ADH (contrôle positif) ; puit 8 : marqueur de taille (1kb Ladder, Invitrogen) ; puit 9 : pMTL540EPldh linaire (contrôle négatif). Digestion de pMTL500EOH par *Sma* I et *Sal* I (B). Puit 1 : clone 1 ; puit 2 : clone 2 ; puit 3 : clone 3 ; puit 4 : clone 4 ; puit 5 : clone 5 ; puit 6 : clone 6 ; puit 7 : clone 7 ; puit 8 : pMTL500EPldh linaire (contrôle négatif) ; puit 9 : marqueur de taille (1kb Ladder, Invitrogen) ; puit 10 : Séquence *pdc-adh* (contrôle positif).

Expression de l'opéron PET chez *E.coli* DH5 α

Les activités PDC et ADH ont été mesurées chez les deux souches de *E. coli* DH5 α transformées respectivement avec pMTL500EOH et pMTL540EOH. Chez ces deux souches, les activités ADH et PDC ont pu être détectées indiquant que les deux enzymes sont fonctionnelles chez *E. coli* (**Tableau 4.1**). Alors que l'activité ADH est similaire dans les souches *E. coli* DH5 α 500EOH et 540EOH, 0,51 et 0,64 U/mg

respectivement l'activité PDC chez *E. coli* DH5 α 540EOH (0,62 U/mg) est 2,6 fois plus élevée que celle chez *E. coli* DH5 α 500EOH (0,24 U/mg). Cela suggère que pMTL540EOH permettrait une expression plus efficace de l'opéron PET que pMTL500EOH chez *E. coli*.

Tableau 4.1: Activité spécifique pyruvate décarboxylase (PDC) et alcool déshydrogénase (ADH) chez *E. coli* DH5 α transformé soit avec pMTL 500EOH soit avec pMTL540EOH

Souches	Activité (U/mg)	
	PDC	ADH
<i>DH5α</i> 540EOH	0,62	0,64
<i>DH5α</i> 500EOH	0,24	0,51

DH5 α 540EOH; *DH5 α* 500EOH : *E. coli* DH5 α contenant pMTL540EOH ou pMTL500EOH, respectivement.

IV.1.2 Expression de *pdc* et *adh* chez *C. glutamicum* 2262

Les deux plasmides, pMTL540EOH et pMTL500EOH, ont ensuite été transférés chez *C. glutamicum* 2262. En parallèle, *C. glutamicum* 2262 a également été transformé avec les plasmides pMTL540 et pMTL500, utilisés comme contrôle. Les souches obtenues seront nommées par la suite *C. glutamicum* 540EOH, *C. glutamicum* 500EOH, *C. glutamicum* 540E, et *C. glutamicum* 500E.

C. glutamicum 540EOH, 540E, 500E et 500EOH ont été cultivées dans des conditions de privation d'oxygène, avec du glucose comme seule source de carbone et d'énergie (milieu MCGC). Les activités PDC et ADH ont ensuite été recherchées chez ces quatre souches.

Les activités PDC (0,028 U/mg) et ADH (0,114 U/mg) sont détectées chez *C.*

glutamicum 540EOH (**Tableau 4.2**). Celles-ci sont cependant significativement plus faibles par rapport à celles mesurées chez *E. coli* (**Tableau 4.1**). Comme attendu, aucune activité n'est détectée chez *C. glutamicum* 540E.

De même, les activités PDC et ADH sont présentes chez *C. glutamicum* 500EOH avec des niveaux de 0,04 U/mg et 0,11 U/mg, respectivement (**Tableau 4.2**). Comme chez *C. glutamicum* 540EOH, ces niveaux sont faibles par rapport à la souche correspondante de *E. coli*. Bien que les activités enzymatiques PDC et ADH puissent être considérées comme faibles chez les deux souches de *C. glutamicum* construites, celles-ci ont été utilisées afin d'évaluer leur capacité de production d'éthanol, en conditions proches de l'anaérobiose.

Tableau 4.2: Activités spécifiques pyruvate décarboxylase (PDC) et alcool déshydrogénase (ADH) chez *C. glutamicum* 500EOH, 540EOH, 500E et 540E.

Souches	Activité (U/mg)	
	PDC	ADH
<i>C. glutamicum</i> 540EOH	0,03	0,11
<i>C. glutamicum</i> 540E (témoin -)	ND	ND
<i>C. glutamicum</i> 500EOH	0,04	0,11
<i>C. glutamicum</i> 500E (témoin -)	ND	ND

C. glutamicum 540EOH; *C. glutamicum* 500EOH: *C. glutamicum* 2262 contenant pMTL540EOH et pMTL500EOH, respectivement. *C. glutamicum* 540E, *C. glutamicum* 500E: *C. glutamicum* 2262 contenant pMTL540E et pMTL500E respectivement. ND: Non détecté

IV.2 Production d'éthanol chez *C. glutamicum* 500EOH et 540EOH en anaérobiose, en fiole chicanée

Les cultures de *C. glutamicum* 500EOH et 540EOH ont été réalisées en fiole chicanée de 500 ml contenant 50 ml de milieu MCGC. Les cultures ont été suivies pendant 400 h. La concentration initiale en biomasse a été fixée à 0,3 g/l pour toutes les cultures. Pour obtenir une concentration en biomasse suffisante, le milieu de culture a été initialement agité à 200 tours par minute jusqu'à atteindre une concentration de biomasse de l'ordre de 3 g/l. Ensuite, afin de mimer les conditions de culture précédemment déterminées (cf. Chapitre 3), la fiole a été fermée hermétiquement à l'aide de parafilm. La croissance cellulaire, la consommation du glucose, la production de lactate, d'acétate, de succinate et d'éthanol, ainsi que le pH du milieu ont été suivis dans chaque fiole. En parallèle des cultures avec *C. glutamicum* 500EOH et 540EOH, des cultures avec *C. glutamicum* 500E et 540E ont été réalisées.

IV.2.1 Cinétiques de croissance, de consommation de glucose et de production d'éthanol, de lactate, de succinate et d'acétate de *C. glutamicum* 500EOH

Comme attendu, la croissance des deux souches modifiées est similaire dans la phase aérobie à l'issue de laquelle la concentration cellulaire désirée (3 g/l) est atteinte (**Figure 4.5a et 4.5c**). C'est au cours de cette phase que la vitesse spécifique de croissance devient maximum en atteignant $0,3 \text{ h}^{-1}$ en moins de 2 h de culture. Cependant, après la suppression de l'apport en oxygène, la croissance de *C. glutamicum* 500E est complètement arrêtée tandis que la souche *C. glutamicum* 500EOH continue de croître jusqu'à une concentration en biomasse de 4,5 g/l après 32h de fermentation (**Figure 4.5a et 4.5c**). Par la suite plus aucune croissance n'est observée et une légère décroissance de la concentration en biomasse est mesurée jusqu'à l'arrêt de la culture.

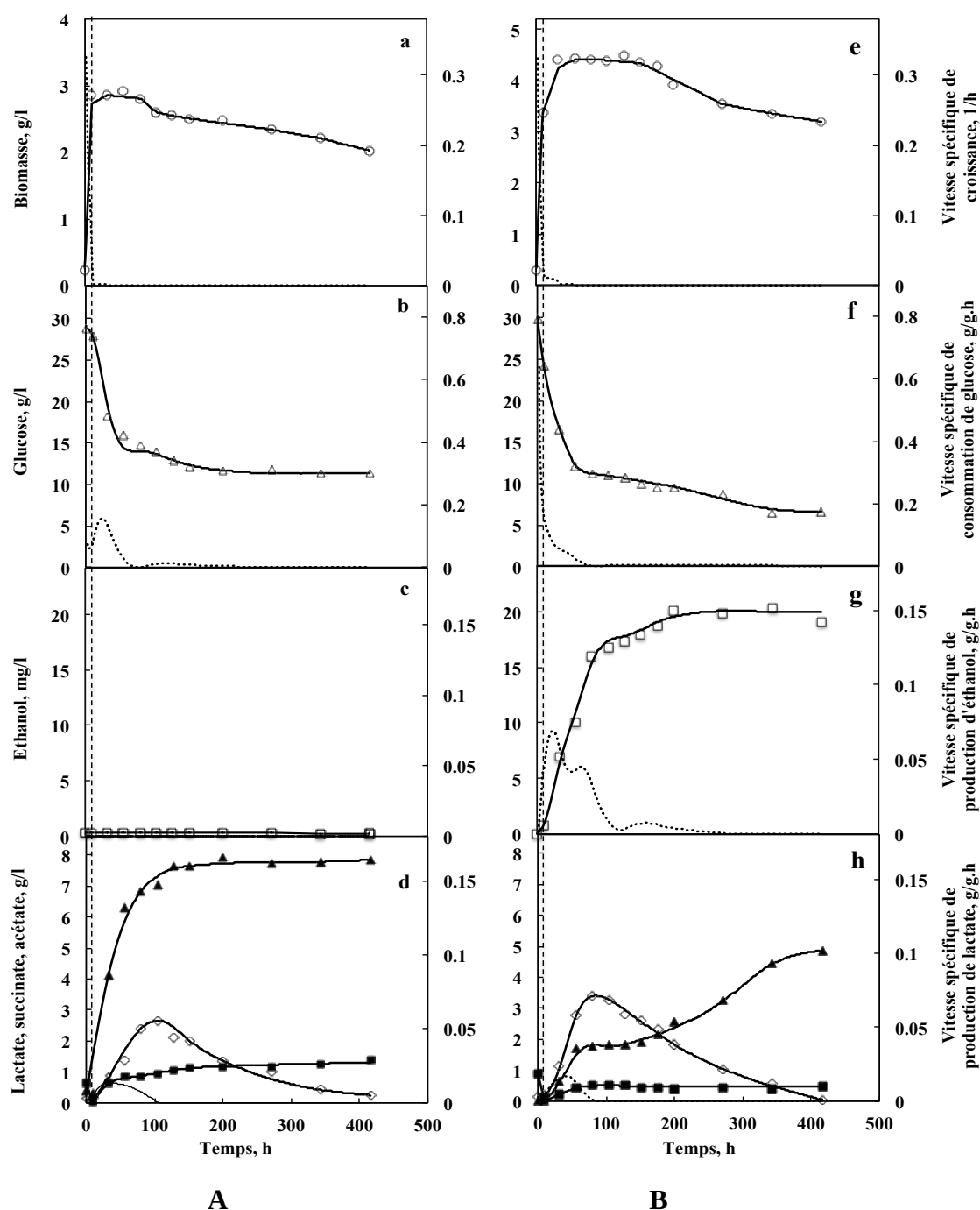


Figure 4.5: Production d'éthanol chez *C. glutamicum* 500E (A) et 500EOH (B) en anaérobiose, en fiole chicanée.

Evolution de la concentration en biomasse (a, e); de la concentration résiduelle en glucose (b, f); de la concentration en éthanol (c, g), en lactate (d, h; $\diamond$), en succinate (d, h; $\blacksquare$), en acétate (d, h; $\blacktriangle$). Les courbes en pointillés représentent la vitesse spécifique correspondant (g/g/h). Les lignes verticales en pointillés indiquent le temps où l'apport en oxygène a été arrêté.

Alors qu'aucune accumulation d'éthanol n'est mesurée dans le milieu de culture de *C. glutamicum* 500E, 20 mg/l sont produits par *C. glutamicum* 500EOH (**Figure 4.5g**). Cette production débute dès l'arrêt de l'apport en oxygène et dure jusqu'à 180 h de culture. Au cours de cette phase de production, la vitesse spécifique de production d'éthanol atteint rapidement une valeur maximum de 0,07 mg/g.h après 12 h de culture. Elle diminue ensuite simultanément à la vitesse de consommation de glucose (**Figures 4.5 f, g**).

À l'issue de 400 h de culture, la totalité du glucose initial n'est pas consommée. Il reste encore 6,5 g/l et 10 g/l de glucose dans le milieu de culture de *C. glutamicum* 500EOH et *C. glutamicum* 500E, respectivement (**Figures 4.5a et 4.5c**).

Comme nous l'avons vu précédemment, sans apport d'oxygène, *C. glutamicum* 2262 produit essentiellement des acides lactique et succinique. Mais de l'acide acétique peut également être produit (chapitre 3). Nous avons donc mesuré la production de ces acides par *C. glutamicum* 500EOH et *C. glutamicum* 500E (**Figure 4.5**). Pour ces deux souches l'acide organique principalement produit est l'acide acétique. Après 400h de culture, 5 g/l et 8 g/l d'acétate sont accumulés dans le milieu de culture de *C. glutamicum* 500EOH et de *C. glutamicum* 500E, respectivement (**Figure 4.5b et 4.5d**). La production de lactate est plus faible que celle de l'acétate. La concentration de lactate accumulée dans le milieu de culture de *C. glutamicum* 500EOH et *C. glutamicum* 500E atteint un maximum de 3,4 g/l et 2,6 g/l, respectivement, après 100 h de fermentation (**Figure 4.5d et 4.5h**). Étonnamment, au-delà, le lactate est reconsumé par les deux souches alors que du glucose est toujours présent dans le milieu de culture. La production de succinate reste faible chez les deux souches, de l'ordre de 1 g/l.

Le profil de production d'acides organiques par *C. glutamicum* 500EOH s'avère être significativement différent de celui de *C. glutamicum* 500E, ce qui suggère une influence de la présence des activités PDC et ADH sur le catabolisme général du glucose (**Figure 4.5**). En effet, chez *C. glutamicum* 500EOH, la concentration finale en acétate est plus faible et sa production se maintient davantage dans le temps.

Dans les conditions d'absence d'oxygénation, *C. glutamicum* 500E et 500EOH produisent une quantité importante d'acide organique qui peut conduire à une diminution du pH du milieu de culture puisque, en fiole, ce paramètre n'est pas régulé. En conséquence, un suivi du pH du milieu de culture a été réalisé (données non montrées). Le pH du milieu de culture est fortement réduit (de pH 7 à pH 5) après 104h de culture et stable par la suite. Cette diminution du pH semble affecter le métabolisme des deux souches puisque chez *C. glutamicum* 500E, 104 h de culture correspond aux concentrations maximum en acides organiques. Au-delà de 104h, la reconsommation du lactate est la seule modification métabolique significative observée. Avec *C. glutamicum* 500EOH, même si le métabolisme est fortement ralenti, au-delà de 104h, en plus de la reconsommation du lactate, une production notable d'acétate, liée à une faible consommation en glucose, est mesurée. De même, une faible production en éthanol arrive à se maintenir jusque 180h de culture.

IV.2.2 Cinétiques de croissance, de consommation de glucose et de production d'éthanol, de lactate, de succinate et d'acétate de *C. glutamicum* 540EOH

C. glutamicum 540EOH a été cultivé dans les mêmes conditions que *C. glutamicum* 500EOH précédemment. Les profils de pH, de croissance cellulaire, de consommation du glucose et de production d lactate, acétate et succinate de la souche *C. glutamicum* 540EOH sont très similaires à ceux de *C. glutamicum* 500EOH (**Figures 4.5 et 4.6**). Après suppression de l'apport en oxygène, la croissance de *C. glutamicum* 540E a été complètement stoppée tandis que *C. glutamicum* 540EOH a continué de croître jusqu'à un maximum de 4,4 g/l après 32h de culture (**Figure 4.6a et 4.6c**).

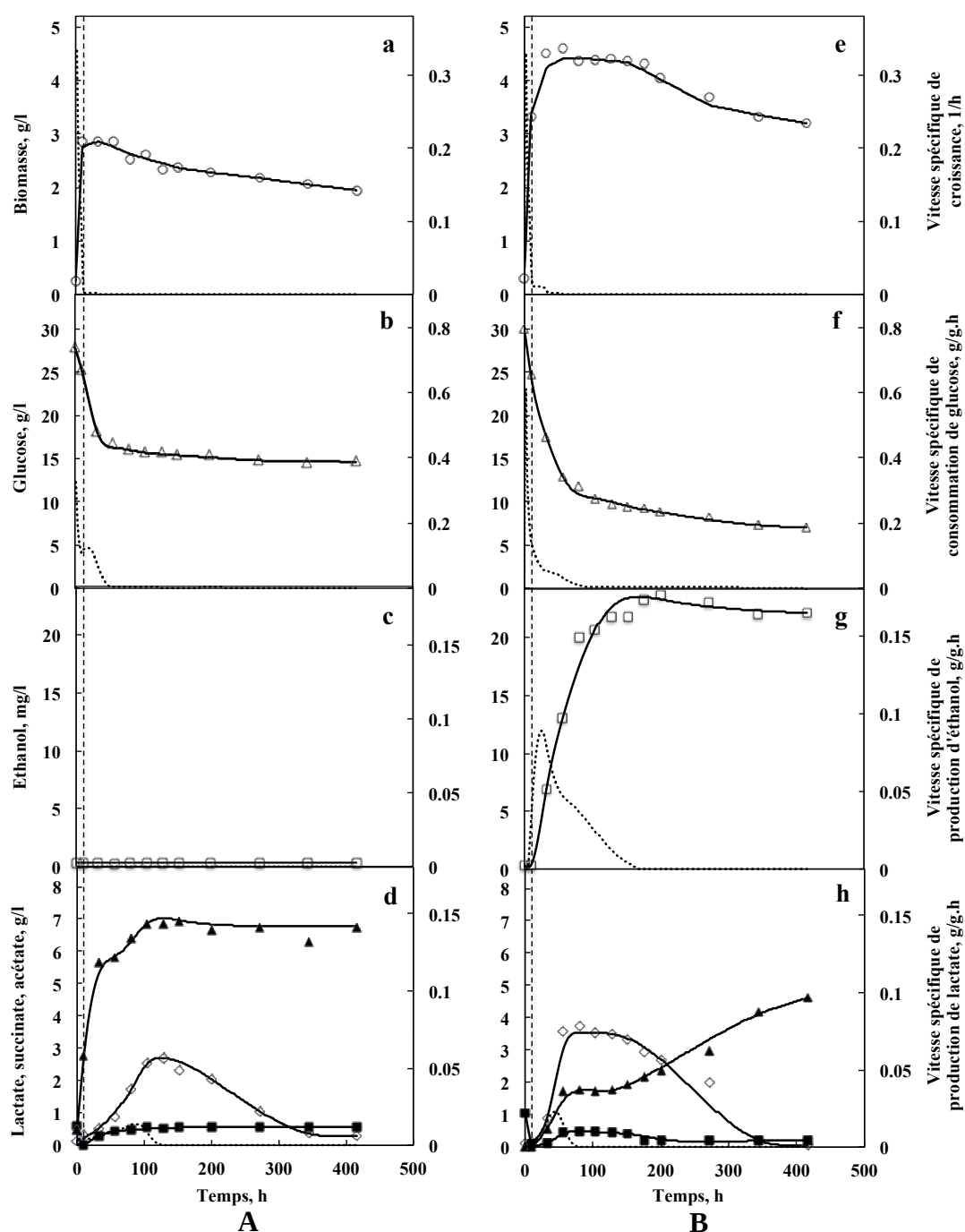


Figure 4.6: Production d'éthanol chez *C. glutamicum* 540E (A) et 540EOH (B) en anaérobiose, en fiole chicanée.

Evolution de la concentration en biomasse (a, e); de la concentration résiduelle en glucose (b, f); de la concentration en éthanol (c, g), en lactate (d, h; $\diamond$), en succinate (d, h; $\blacksquare$), en acétate (d, h; $\blacktriangle$). Les courbes en pointillés représentent la vitesse spécifique correspondante. La ligne verticale en pointillés indique le temps où l'apport en oxygène a été arrêté.

Comme on le voit sur la **Figure 4.6g**, le changement de vecteur n'a pas amélioré la production d'éthanol. Semblable à ce qui a été obtenu avec *C. glutamicum* 500EOH, la vitesse spécifique de production d'éthanol de *C. glutamicum* 540EOH a atteint un maximum de 0,09 g/g.h à 26 h de culture puis a considérablement chuté pour être nulle aux alentours de 150 h de culture. En conséquence, 24 mg/l d'éthanol ont été produits par *C. glutamicum* 540EOH. Comme précédemment, le principal acide organique accumulé dans le milieu de culture est l'acétate avec une concentration 5 g/l pour *C. glutamicum* 540EOH et 7 g/l et *C. glutamicum* 540E.

Comparaison de la production d'éthanol par *C. glutamicum* 500EOH et 540EOH

Comme nous venons de le voir, le changement de vecteur n'a pas apporté d'augmentation significative de la concentration finale en éthanol. De plus, les profils de croissance cellulaire, de consommation en glucose et de production d'acides organiques sont également très similaires entre *C. glutamicum* 500EOH et *C. glutamicum* 540EOH. Les rendements de conversion du glucose en biomasse ($Y_{X/S}$), du glucose en éthanol ($Y_{P/S}$), et de l'éthanol sur biomasse ($Y_{P/X}$), et la productivité de la production d'éthanol ont été comparés pour chaque souche (**Tableau 4.3**).

Tableau 4.3: Comparaison des performances des procédés de production d'éthanol avec *C. glutamicum* 500EOH et *C. glutamicum* 540EOH

	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (mg/g)	$Y_{P/X}$ (mg/g)	P (mg/l.h)	Éthanol (mg/l)
500EOH	0,19	0,85	4,4	0,1	20
540EOH	0,19	1,04	4,5	0,12	24

Les différents paramètres calculés sont très proches les uns des autres pour les deux souches comparées. L'utilisation d'un vecteur plasmidique plutôt qu'un autre n'apporte donc aucune amélioration significative à la production d'éthanol par *C. glutamicum* 2262.

IV. 3 Amélioration de la production d'éthanol par délétion de *ldhA*

IV.3.1 Caractérisation de *C. glutamicum* 2262 Δ *ldh*

Le précurseur de la voie de synthèse de l'éthanol est le pyruvate. Il peut sembler judicieux d'éliminer des voies concurrentes de la voie incorporée dans le métabolisme de *C. glutamicum* afin d'orienter le flux de carbone vers la synthèse d'éthanol. Néanmoins, en anaérobiose, toute modification des voies de biosynthèse peut également affecter le métabolisme énergétique de la bactérie ce qui peut se révéler, au final, néfaste. Pour tenter d'améliorer la production de l'éthanol par *C. glutamicum* nous avons choisi d'éliminer le gène *ldhA* codant la LDH. Cette élimination a dans un premier temps été effectuée chez la souche sauvage, *C. glutamicum* 2262. Cette modification génétique avait, en fait, été effectuée antérieurement à notre étude. Cependant, le mutant obtenu, *C. glutamicum* 2262 Δ *ldh*, n'avait alors pas été caractérisé d'un point de vue cinétique et métabolique. Nous nous sommes donc attachés à cette caractérisation avant de transférer à cette souche la capacité de production d'éthanol.

Cinétiques de croissance, de consommation de glucose, de production d'acides organiques de *C. glutamicum* 2262 Δ *ldh*, en anaérobiose, en fiole chicanée

C. glutamicum 2262 Δ *ldh* a été cultivé pendant 450h sur milieu MCGC en fiole chicanée. Après une phase sous agitation à 200 rpm/min jusqu'à une concentration en biomasse de 4,1 g/l, l'apport en oxygène est interrompu en recouvrant le carton cardé fermant la fiole par un film de paraffine.

Comme dans le cas de la souche sauvage, la privation en oxygène conduit à un arrêt très rapide de la croissance de *C. glutamicum* 2262 Δ *ldh* (**Figure 4.7a**). La consommation de glucose se poursuit lors du passage en anaérobiose mais avec une vitesse spécifique beaucoup plus faible (**Figure 4.7b**). Toute consommation de glucose est arrêtée après 160 h de culture. En conséquence, seuls 63 % du glucose initial sont consommés. Ce résultat est en accord avec des études précédentes suggérant que l'absence d'activité LDH provoque une réduction du flux glycolytique chez *C. glutamicum* dans des conditions de privation d'oxygène (Inui et al., 2004b).

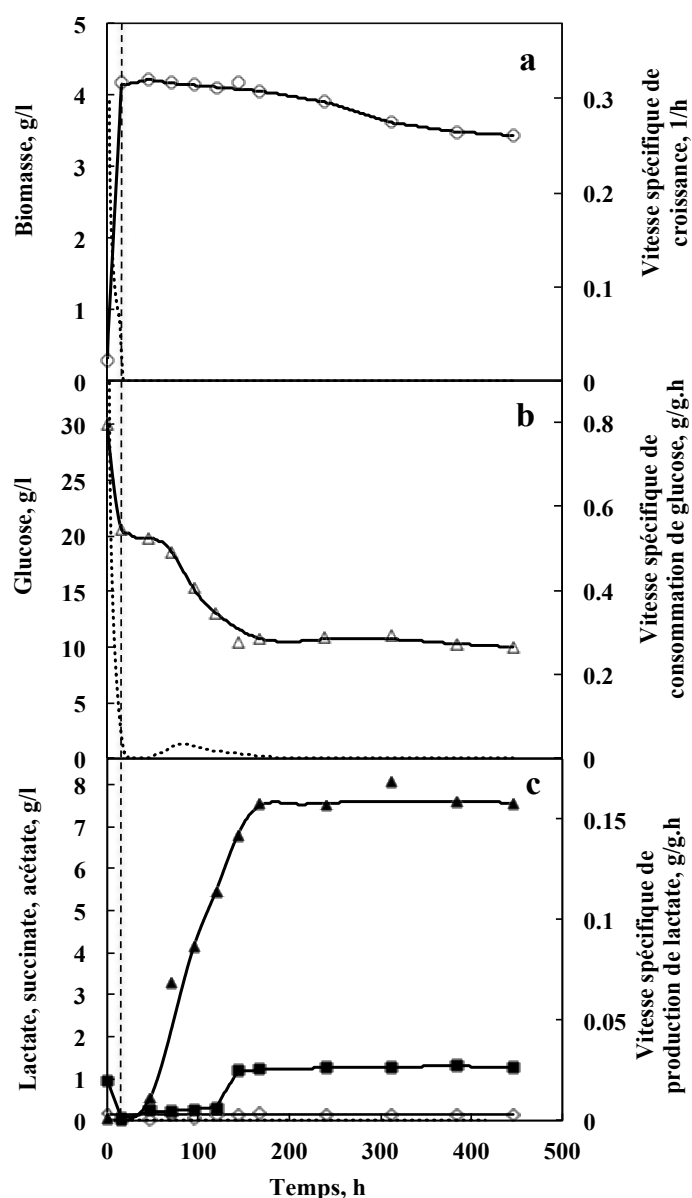


Figure 4.7: Culture de *C. glutamicum* 2262 Δ ldh en culture anaérobie, en fiole chicanée.

Evolution de la concentration en biomasse (a); de la concentration résiduelle en glucose (b); de la concentration en lactate (c; $\diamond$), en succinate (c; $\blacksquare$), en acétate (c; $\blacktriangle$). Les courbes en pointillés représentent la vitesse spécifique correspondante. La ligne verticale en pointillés indique le moment où l'apport en oxygène a été arrêté.

Comme attendu, aucune production de lactate n'est mesurée avec *C. glutamicum* 2262 Δ ldh (**Figure 4.7a**). De plus, aucune activité LDH n'a pu être détectée chez le

mutant construit (**Tableau 4.4**). Ces deux mesures confirment le remplacement allélique de *ldhA* par *aph3*, le gène codant la résistance à la kanamycine.

Contrairement à la souche sauvage, la souche mutante présente une production élevée d'acétate (7,5 g/l) alors que la production de succinate reste similaire (1,2 g/l) (**Figure 4.7b**). Il a précédemment été décrit que la suppression de *ldhA* affectait les productions de succinate et d'acétate chez *C. glutamicum* R (Inui et al., 2004b). Dans le cas de la souche *C. glutamicum* 2262, cela semble donc être différent. Il est cependant à noter que l'élimination de *ldhA* peut conduire à un déséquilibre électronique en réduisant la possibilité de réoxydation du NADH, H⁺. Une synthèse accrue d'acétate peut être une possibilité pour la cellule de convertir un excédent de pyruvate synthétisé sans avoir à utiliser de cofacteurs réduits (voie de l'acétate kinase).

IV.3.2 Conséquence de la transformation de *C. glutamicum* 2262Δ*ldh* avec pMTL500EOH ou pMTL540EOH

Après que l'inactivation de la production de lactate ait été confirmée chez *C. glutamicum* 2262Δ*ldh*, pMTL500EOH et pMTL540EOH ont été introduits dans cette souche pour obtenir les souches *C. glutamicum* 2262Δ*ldh* 540EOH et *C. glutamicum* 2262Δ*ldh* 500EOH. Celles-ci ont ensuite fait l'objet d'une étude cinétique.

Tableau 4.4: Activités spécifiques pyruvate décarboxylase (PDC) et alcool déshydrogénase (ADH) chez *C. glutamicum* 2262 $\Delta ldh500EOH$ et $\Delta ldh540EOH$

Souches	Activité (U/mg)		
	PDC	ADH	LDH
2262 $\Delta ldh540EOH$	0,03	0,12	ND
2262 Δldh	ND	ND	ND
2262 $\Delta ldh500EOH$	0,04	0,11	ND

ND: Non détectée

Mesure des activités PDC et ADH chez *C. glutamicum* 2262 $\Delta ldh540EOH$ et 2262 $\Delta ldh500EOH$

C. glutamicum 2262 $\Delta ldh540EOH$ et *C. glutamicum* 2262 $\Delta ldh500EOH$ ont été cultivées dans des conditions de privation en oxygène sur glucose comme seule source de carbone et d'énergie. Dans ces conditions, chez *C. glutamicum* 2262 $\Delta ldh540EOH$, des activités relativement faibles de PDC (0,03 U/mg) et d'ADH (0,122 U/mg) ont été mesurées (**Tableau 4.4**). Dans les mêmes conditions, les activités PDC et ADH de *C. glutamicum* 2262 $\Delta ldh500EOH$ sont de 0,04 U/mg et 0,11 U/mg, respectivement (**Tableau 4.4**). Les activités PDC et ADH dans les souches sans activité LDH sont donc similaires à celles mesurées chez *C. glutamicum* 540EOH et d *C. glutamicum* 500EOH, ce qui suggère que la suppression de la LDH n'affecte pas l'expression de la PDC et de l'ADH chez *C. glutamicum* dans des conditions de privation d'oxygène. Des résultats semblables ont été précédemment observés (Inui et al, 2004a).

IV.3.3 Production d'éthanol par *C. glutamicum* 2262 Δ ldh500EOH et 2262 Δ ldh540EOH, en anaérobiose

Pour étudier l'influence de la suppression de l'activité LDH sur la capacité de production d'éthanol des souches modifiées de *C. glutamicum*, *C. glutamicum* 2262 Δ ldh500EOH et *C. glutamicum* 2262 Δ ldh540EOH ont été mises en culture dans les mêmes conditions que celles décrites dans le chapitre III. Comme avec les souches étudiées précédemment, les profils de croissance de *C. glutamicum* 2262 Δ ldh540EOH et *C. glutamicum* 2262 Δ ldh500EOH montrent deux phases dépendant de la disponibilité en oxygène (**Figure 4.8**). Malgré la différence de vecteur plasmidique utilisé, les deux souches montrent des cinétiques tout à fait similaires (**Figure 4.8**). Comme prévu, le lactate n'a pas été produit pendant les 500 h de culture en raison de la suppression du gène *ldhA* (**Figure 4.8**). Après épuisement de l'oxygène, la croissance de *C. glutamicum* 2262 Δ ldh540EOH et de *C. glutamicum* 2262 Δ ldh500EOH est complètement stoppée. Étonnamment, alors que l'acétate et le succinate s'accumulent immédiatement dans le milieu de culture suite à la suppression d'oxygène, les deux souches montrent clairement trois phases différentes de production d'éthanol. Pendant 160 heures suivant l'arrêt de l'oxygénation, l'éthanol est produit en quantité limitée (**Figure 4.8**). Après cette phase, la production d'éthanol est fortement renforcée et les concentrations en éthanol atteignent leurs pics de 320 mg/l et 280 mg/l respectivement pour *C. glutamicum* 2262 Δ ldh540EOH et *C. glutamicum* 2262 Δ ldh500EOH, en 20 heures. Pendant cette phase, les vitesses spécifiques de production d'éthanol augmentent considérablement pour atteindre leurs valeurs maximales de 3,8 et 3,2 mg/gh respectivement pour *C. glutamicum* 2262 Δ ldh540EOH et *C. glutamicum* 2262 Δ ldh500EOH. Suite à cette phase, la concentration en éthanol atteint un plateau et la vitesse spécifique de production de l'éthanol tombe à zéro, (**Figure 4.8**) même si glucose n'est pas entièrement consommé. Il s'avère néanmoins que la délétion du gène *ldhA* conduit à augmenter quinze fois la concentration finale en éthanol.

Juste après l'arrêt de l'oxygénation, la vitesse spécifique de production d'acétate augmente rapidement pour atteindre sa valeur maximale de 0,01 g/g.h après 66 h et 0,014 g/g.h après 64 h, respectivement pour *C. glutamicum* 2262 Δ ldh500EOH et *C.*

glutamicum 2262 Δ ldh540EOH. Comme pour *C. glutamicum* 500EOH et *C. glutamicum* 540EOH, l'acétate est l'acide organique majoritaire dans le milieu de culture avec plus de 5 g/l, tandis que seules de faibles quantités de succinate sont produites (**Figure 4.8**).

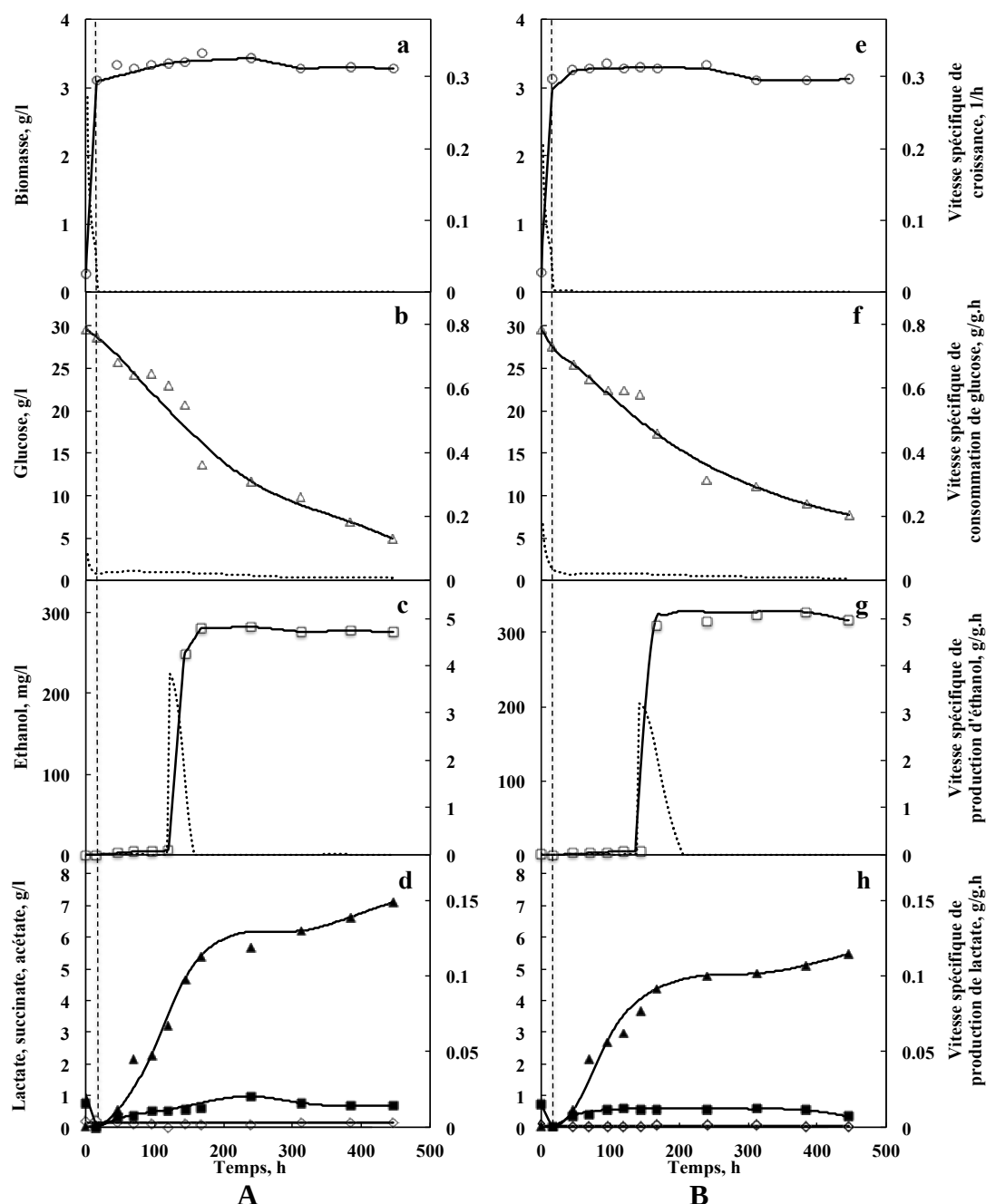


Figure 4.8: Conséquences physiologique et cinétique de l'introduction de pMTL500EOH (A) et pMTL540EOH (B) chez *C. glutamicum* 2262 Δ ldh cultivée en anaérobiose, en fiole chicanée.

Evolution de la concentration en biomasse (a, e); de la concentration résiduelle en glucose (b, f); de la concentration en éthanol (c, g), en lactate (d, h; ◇), en succinate (d, h; ■), en acétate (d, h; ▲). Les courbes en pointillés représentent la vitesse spécifique correspondante. Les lignes verticales en pointillés indiquent le moment où l'apport en oxygène a été arrêté.

Tableau 4.5: Performances des procédés de production d'éthanol mettant en oeuvre *C. glutamicum* 2262 Δ ldh500EOH et *C. glutamicum* 2262540EOH, en fiole chicanée, en anaérobiose

	$Y_{P/S}$ (g g ⁻¹)	$Y_{P/X}$ (g g ⁻¹)	P (mg l ⁻¹ h ⁻¹)	Ethanol (mg l ⁻¹)
<i>C. glutamicum</i> 2262 Δ ldh500EOH	0,01	0,08	1,7	280
<i>C. glutamicum</i> 2262 Δ ldh540EOH	0,014	0,09	1,9	320

$Y_{P/S}$: Rendement éthanol/glucose, $Y_{P/X}$: Rendement éthanol/biomasse, P: Productivité

Le rendement de conversion du glucose en éthanol ($Y_{P/S}$) est similaire chez *C. glutamicum* 2262 Δ ldh500EOH et *C. glutamicum* 2262 Δ ldh540EOH (**Tableau 4.5**). Toutefois, la productivité en éthanol et le rendement éthanol sur biomasse avec *C. glutamicum* 2262 Δ ldh540EOH sont supérieurs à ceux obtenus avec *C. glutamicum* 2262 Δ ldh500EOH. Avec cette dernière souche, la concentration finale en éthanol est supérieure de 14 % à celle obtenue avec *C. glutamicum* 2262 Δ ldh540EOH.

IV.4 Discussion

Les micro-organismes traditionnels utilisés pour la fermentation de l'éthanol, telles que *S. cerevisiae* et *Z. mobilis*, ne peuvent métaboliser les pentoses. Ils sont donc d'une utilité limitée pour les substrats lignocellulosiques qui contiennent une grande quantité de ces sucres, à moins d'être modifiés génétiquement. Afin de remédier à ces inconvénients, Ingram et al. (1987) ont montré chez *Escherichia coli*, qui est capable d'utiliser une large gamme de sucres, la faisabilité de rediriger le métabolisme central pour la production d'éthanol dans des conditions aérobies ou anaérobies par l'expression des gènes de *Z. mobilis* codant pour PDC et ADH. Cela a conduit à rediriger au niveau du noeud pyruvate le flux de carbone, de la production d'acides organiques vers la production d'éthanol comme produit principal des souches recombinantes (Alterthum et Ingram, 1989; Ingram, 1990). Néanmoins, les souches construites montrent soit une instabilité génétique élevée lorsque les gènes sont portés par des plasmides multicopies, soit une activité plus faible lorsque les gènes sont présents en une seule copie intégrée dans le génome (Hespell et al., 1996; Lawford et Rousseau, 1995).

C. glutamicum est largement utilisé pour la production industrielle de nombreux métabolites dont des acides aminés et des acides organiques (Kelle et al., 2005; Liebl et al., 1991; Marquet et al., 1986). Dans des conditions de limitation en oxygène, la croissance de *C. glutamicum* 2262, comme celle d'autres souches est stoppée (Inui et al., 2004b; Okino et al., 2005). Néanmoins, cette bactérie reste capable d'excréter une quantité importante d'acides organiques tels que les acides lactique et succinique. Par conséquent, nous avons utilisé la voie de synthèse de l'acide lactique de cette souche pour la production d'éthanol. Dans ce but, nous avons construit un vecteur d'expression contenant les gènes *pdc* et *adhB* de *Z. mobilis* (Conway et al., 1987a; Conway et al., 1987b; Neale et al., 1987a, b) sous le contrôle du promoteur *ldhA* endogène. Le promoteur natif du gène *ldhA* (*PldhA*) est un promoteur fortement induit dans des conditions de limitation en oxygène chez *C. glutamicum* (Inui et al., 2004b; Inui et al., 2007; Okino et al., 2005).

Dans notre étude, deux vecteurs appartenant à la famille des vecteurs d'expression pMTL ont été utilisés pour optimiser l'expression de l'opéron PET. Ces deux vecteurs,

pMTL500E et pMTL54E, diffèrent par leur origine de répllication. Toutes les souches construites ont permis d'obtenir une expression de PDC et d'ADH sous le contrôle du promoteur *ldhA*. Cependant, bien que les PDC et ADH soient fonctionnelles, la production d'éthanol des souches transformées par ces vecteurs est restée faible.

Dans une étude précédente, les gènes *pdc* et *adh* de *Z. mobilis* avaient été mis individuellement sous le contrôle du promoteur de *ldhA* et avaient été exprimés chez *C. glutamicum* R (Inui et al., 2004a). Cette souche recombinante a permis la production d'une quantité notable d'éthanol (16,5 mmol/l/h). Le lactate et le succinate étaient les principaux sous-produits avec une trace d'acétate. A l'inverse, dans notre étude, les souches productrices d'éthanol ont principalement accumulé de l'acétate comme sous-produit et seulement une petite quantité de succinate a été excrétée.

En outre, nous avons étonnamment observé que les souches recombinantes ont consommé le lactate excrété dans le milieu de culture dans des conditions de privation en oxygène (**Figure 4.5** et **4.6**). Par l'analyse de la croissance et de la consommation de carbone, il a été montré que *C. glutamicum* co-métabolise le glucose avec les autres sucres et les acides organiques tels que le lactate, le pyruvate, l'acétate et le propionate. De plus, *C. glutamicum* présente une croissance monophasique sur ces mélanges de substrats (Claes et al., 2002; Coccagn-Bousquet et al., 1993; Dominguez et al., 1993a; Wendisch et al., 2000). Les L-lactate et D-lactate sont également connus comme sources de carbone seules ou combinées de *C. glutamicum* (Stansen et al., 2005). L'utilisation du L-lactate par *C. glutamicum* nécessite la L-lactate déshydrogénase dépendante quinone (LldD) qui est codée par l'opéron *cg3226-lldD* (Stansen et al. 2005). L'expression de l'opéron *cg3226-lldD* est maximale lorsque le L-lactate est présent dans le milieu. En l'absence de son effecteur L-lactate, cet opéron est réprimé par LldR, le régulateur de transcription de type FadR (Georgi et al. 2008). En outre, LldR pourrait se lier à la région promoteur *ldhA* et agirait comme un répresseur transcriptionnel de l'*ldhA*. Au cours de la croissance en présence de sucre, le L-lactate produit par *ldhA* atténue la répression de *ldhA* par LldR (Toyoda et al. 2009). Comme le promoteur *ldhA* a été utilisé pour contrôler l'expression de PDC et ADH dans nos études, le régulateur LldR peut aussi réprimer cet opéron éthanologique. Comme on le voit sur les **figures 4.5** et **4.6**, la production d'éthanol a

été considérablement réduite quand le lactate a commencé à être utilisé et la concentration de lactate dans le milieu diminue. Peut-être qu'une augmentation de l'activité LldR en réponse à la diminution de la concentration de lactate contribuerait-elle également à la faible activité de PDC et d'ADH et par conséquent serait responsable de la faible production d'éthanol observée ici. Par conséquent, le rendement en éthanol de nos souches recombinantes pourrait être encore optimisé par la suppression de LldR.

Des améliorations de la production d'éthanol par les souches recombinantes *C. glutamicum* sont en principe réalisables par i) soit l'ajout de suppléments, ii) soit l'optimisation des procédés de fermentation, iii) soit la suppression des enzymes dans les voies concurrentes ceci grâce à des manipulations génétiques. De nos jours, pour améliorer le rendement en produit final, l'approche la plus courante utilise le génie métabolique, ceci pour supprimer les gènes codant pour les enzymes impliqués dans les voies concurrentes. Un certain nombre d'études utilisant les manipulations génétiques pour inactiver les gènes codant pour des enzymes nécessaires à la production de sous-produits au cours de la fermentation anaérobie de *C. glutamicum* comme *ldhA*, *mdh*, ou *pqo* ont déjà été réalisées (Blombach et al., 2011; Hasegawa et al., 2012; Inui et al., 2004a; Litsanov et al., 2012; Okino et al., 2008b; Sasaki et al., 2010). Lors du métabolisme du glucose en anaérobie chez *C. glutamicum*, le pyruvate est métabolisé en deux produits principaux: le lactate par la LDH et le succinate par la phosphoénolpyruvate carboxylase (PEPC) et le bras réducteur du cycle de l'acide tricarboxylique (oxaloacétate → malate → fumarate → succinate) (Inui et al. 2004b). Récemment, il a été montré que l'inactivation de la LDH conduit à une augmentation de 3,2 fois de la production d'éthanol par *C. glutamicum* lorsqu'il contient les gènes de PDC et de ADH sous le contrôle du promoteur *ldhA* (Inui et al. 2004a). Cette stratégie a été également appliquée dans nos études en vue d'améliorer la production d'éthanol par *C. glutamicum* 2262 dans des conditions de privation en oxygène.

Pour améliorer la production d'éthanol, une souche *C. glutamicum* 2262 Δ *ldh* a donc été générée par recombinaison homologue du gène *ldhA*. Les études de fermentation réalisées dans des conditions de privation d'oxygène ont montré que la production de

lactate a alors été éliminée, ce qui confirme que la voie de la formation de lactate a été inactivée (**Figure 4.8**). Lors des travaux réalisés, l'élimination du lactate n'a pas changé l'expression de PDC et de ADH. Les activités PDC et ADH dans les souches sans *ldhA* et les souches avec *ldhA* étaient, en effet, semblables. Cependant, l'élimination de la production de lactate a entraîné une productivité d'éthanol de 15 à 14 fois plus élevée chez *C. glutamicum* 2262 Δ *ldh* 500EOH et *C. glutamicum* 2262 Δ *ldh* 540EOH, par rapport celles retrouvées chez *C. glutamicum* 2262 500EOH et *C. glutamicum* 2262 540EOH, respectivement (**Tableaux 4.2 et 4.4**). Plus particulièrement, après une période de temps, la production d'éthanol s'est retrouvée soudainement augmentée dans les souches sans *ldhA*. D'autres études sur ce phénomène peuvent aider à améliorer la productivité de ces souches. Même si *C. glutamicum* 2262 Δ *ldh* 500EOH et *C. glutamicum* 2262 Δ *ldh* 540EOH ont montré une augmentation très importante de la production d'éthanol par rapport à *C. glutamicum* 2262 500EOH et *C. glutamicum* 2262540EOH, les productivités de l'éthanol chez ces souches sans *ldhA* sont très faibles par rapport ce qui est indiqué pour *C. glutamicum* R qui exprime l'opéron PET (Inui, 2004). Récemment, de nombreuses bactéries ont été modifiées pour produire sélectivement de l'éthanol. Il a été ainsi signalé que plusieurs bactéries modifiées pouvait avoir une productivité volumétrique en éthanol d'environ 1 g/l/h (Bothast et al., 1999; Dien et al., 2003; Zaldivar et al., 2001). Comme le procédé de fermentation en condition de privation d'oxygène utilisé dans notre étude a favorisé le flux métabolique via la LDH, la cause de la productivité volumétrique en éthanol faible observée pourrait être due au vecteur d'expression ou à *C. glutamicum* 2262 lui-même.

Dans le travail présent nous avons utilisé une souche, *C. glutamicum* 2262, qui, a été sélectionnée pour sa capacité à surproduire de l'acide glutamique. Cette souche pourrait donc présenter des caractéristiques génomiques et physiologiques qui pourraient expliquer, en partie, la production d'éthanol plus faible observée.

Les faibles activités enzymatiques PDC et ADH et les productions peu élevées en éthanol observées dans nos résultats pourraient également être dues à une faible transcription des gènes de l'opéron PET, ou à une traduction non optimale en raison d'un usage des codons différent entre *C. glutamicum* et *Z. mobilis*. L'opéron PET

utilisé ici ayant pu être exprimé avec succès chez *C. glutamicum* R (Inui et al., 2004), il est dépendant probable qu'un autre vecteur serait plus adapté pour une bonne expression chez *C. glutamicum* 2262.

Bien que la construction de souches de *C. glutamicum* 2262 modifiées génétiquement afin de produire de l'éthanol n'a pas permis d'aboutir à des performances quantitativement importantes, l'obtention d'une production d'éthanol démontre néanmoins l'intérêt de l'utilisation de cette bactérie comme une plateforme métabolique qui, après modification génétique et en anaérobiose, pourrait permettre la production de molécules d'intérêt. C'est dans cet objectif que, par la suite, du travail, nous nous sommes intéressés à la production d'un diacide, l'itaconate, par *C. glutamicum* 2262.

CHAPITRE V. PRODUCTION D'ITACONATE CHEZ *C. GLUTAMICUM* 2262 RECOMBINANT

Parmi les molécules susceptibles de remplacer les synthons d'origine pétrolière, l'acide itaconique est l'un des plus prometteurs car il peut être utilisé comme substituant de monomères issus de l'industrie chimique pour la polymérisation de matières plastiques, la synthèse de lubrifiants ou encore comme agent de surface pour les peintures et résines. A ce titre, l'acide itaconique (**Figure 5.1**) fait partie du « top 10 » des building blocks mentionnés dans une étude du Département Américain de l'Energie datant de 2004 ("*Top Value Added Chemicals From Biomass - Volume I: Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas*") et reprise par la plupart des agences nationales dont, pour la France, l'ADEME.

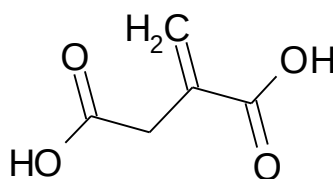


Figure 5.1: Structure chimique de l'acide itaconique

L'acide itaconique est principalement produit au cours de procédés fermentaires mettant en oeuvre le champignon filamenteux *Aspergillus terreus*. Toutefois, ces procédés de fermentation, à cause de productivités faibles, demeurent longs et, en conséquence, engendrent un coût de production élevé rendant les procédés moins compétitifs par rapport à leurs équivalents issus de l'industrie pétrochimique. Afin d'accroître la productivité et l'efficacité des procédés biotechnologiques, le développement de nouveaux catalyseurs cellulaires peut être envisagé en utilisant notamment *C. glutamicum* comme plateforme d'ingénierie métabolique.

V.1. Clonage du gène codant la cis-aconitate acide décarboxylase (CAD) chez *A. terreus*

Afin de développer une souche de *C. glutamicum* productrice d'acide itaconique (AI), la voie de biosynthèse de l'itaconate doit d'abord y être introduite, ceci par recombinaison génétique. Pour cela, il est nécessaire de pouvoir disposer du gène structural codant l'activité cis-aconitate décarboxylase (CAD). Le gène codant pour la CAD, enzyme responsable de production de l'AI chez *A. terreus*, a été cloné dès 2008 (Kanamasa et al., 2008).

Chez *A. terreus* DSMZ 826, le gène structural codant la CAD a une taille de 1528 paires de base et est constitué de deux exons séparés par un intron de 58 nucléotides (Figure 5.2).

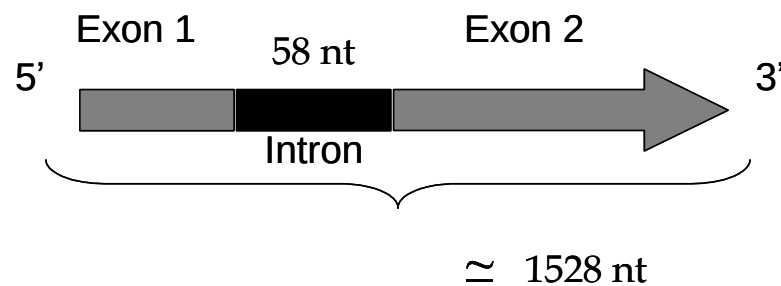


Figure 5.2: Caractéristique physique du gène codant l'activité CAD chez *Aspergillus terreus*

Parce que *C. glutamicum* n'est pas capable d'effectuer un épissage de l'intron du gène *cad*, une stratégie par PCR « splicing » consistant à n'amplifier que les parties codantes du gène (exons) a été entreprise. L'amplification de l'un des deux exons a été réalisée au moyen d'un couple d'amorces dont l'une possède une partie complémentaire au deuxième exon. Une fois chaque exon amplifié, ceux-ci sont associés au cours d'une seconde PCR utilisant les amorces complémentaires aux extrémités du gène. La procédure suivie est résumée dans la **figure 5.3**.

Après avoir été amplifié, le produit du gène codant la CAD a été cloné dans le vecteur TOPO Zéro Blunt (Invitrogen) avant d'être séquencé.

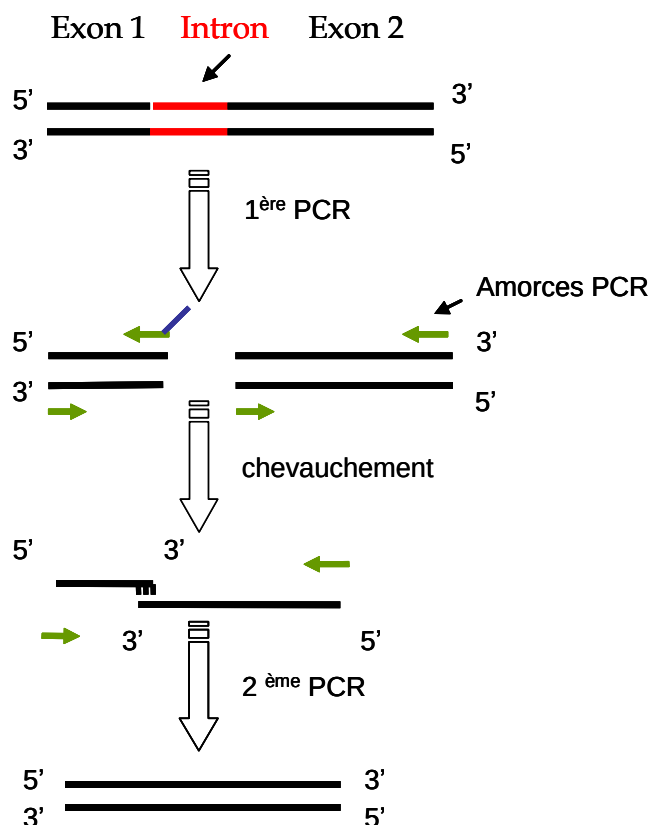


Figure 5.3: Stratégie générale pour l'amplification de la séquence codante de l'activité CAD. Les flèches vertes représentent les amorces utilisées au cours des différentes PCR successives.

V.1.1. Analyse structurale et synthèse du gène codant la CAD

Après soumission du gène structural codant la CAD dans les banques de données génomiques (banque non redondante), l'analyse par identité/similarité indique que ce gène n'a été trouvé que chez *A. terreus* alors qu'il semble totalement absent du monde bactérien. En revanche, l'analyse statistique indique que son pourcentage en GC est de 54,7% ce qui apparaît compatible pour une expression du gène chez *C. glutamicum* (57%). Toutefois, l'analyse statistique concernant l'usage des codons chez *C. glutamicum*, indique que plusieurs codons présents dans le gène *cad* sont des codons de fréquence d'usage rare (**Figure 5.4**). Il s'agit notamment des codons de l'arginine

AGG, AGA et CGA utilisés à des fréquences de 3, 5 et 7% respectivement, mais aussi des codons de la leucine (CTA) et de l'isoleucine (ATA) utilisés à des fréquences de 4 et 9 % respectivement. En conséquence, leur présence dans le gène peut constituer un frein à une expression hétérologue chez *C. glutamicum*.

Afin de remplacer ces codons rares par leur équivalent plus fréquent chez *C. glutamicum*, une synthèse chimique du gène modifié a été réalisée par un prestataire de service externe (Genecust, Luxembourg). Cette synthèse chimique a également été l'occasion d'ajouter des signaux de traduction du gène, adaptés à *C. glutamicum*, tels qu'un « Ribosome Binding Site » (RBS) ainsi qu'un nouveau codon d'initiation (ATG). L'ensemble (gène modifié et signaux de traduction) a été sous cloné dans un plasmide pUC57, adapté à *Escherichia coli*, ceci sous le contrôle d'un promoteur pLac UV5 afin de vérifier sa fonctionnalité au cours d'une étude préliminaire.

AA	Codon	Nombre	%	AA	Codon	Nombre	%	AA	Codon	Nombre	%
Gly	GGG	50527	0.15	Met	ATG	123604	1.00	Arg	CGG	25751	0.10
Gly	GGA	39036	0.12	Ile	ATA	24233	0.09	Arg	CGA	16607	0.07
Gly	GGT	114185	0.34	Ile	ATT	135873	0.50	Arg	CGT	93997	0.37
Gly	GGC	130043	0.39	Ile	ATC	111878	0.41	Arg	CGC	96053	0.38
Glu	GAG	83804	0.32	Thr	ACG	63696	0.26	Gln	CAG	130898	0.66
Glu	GAA	179460	0.68	Thr	ACA	35995	0.15	Gln	CAA	67129	0.34
Asp	GAT	146794	0.63	Thr	ACT	43256	0.18	His	CAT	57585	0.57
Asp	GAC	87759	0.37	Thr	ACC	103121	0.42	His	CAC	43743	0.43
Val	GTG	115687	0.36	Trp	TGG	65630	1.00	Leu	CTG	231373	0.49
Val	GTA	51020	0.16	End	TGA	4428	0.30	Leu	CTA	18067	0.04
Val	GTT	86572	0.27	Cys	TGT	23461	0.45	Leu	CTT	51442	0.11
Val	GTC	67356	0.21	Cys	TGC	28747	0.55	Leu	CTC	48147	0.10
Ala	GCG	146264	0.34	End	TAG	1172	0.08	Pro	CCG	101467	0.51
Ala	GCA	93390	0.22	End	TAA	9006	0.62	Pro	CCA	38663	0.20
Ala	GCT	73677	0.17	Tyr	TAT	75774	0.58	Pro	CCT	32678	0.17
Ala	GCC	113412	0.27	Tyr	TAC	55847	0.42	Pro	CCC	24383	0.12
Arg	AGG	7423	0.03	Leu	TTG	60322	0.13	Codon fréquemment utilisé Codon faiblement utilisé			
Arg	AGA	12345	0.05	Leu	TTA	62823	0.13				
Ser	AGT	41544	0.15	Phe	TTT	100128	0.57				
Ser	AGC	70867	0.26	Phe	TTC	74885	0.43				
Lys	AAG	51685	0.25	Ser	TCG	39546	0.15				
Lys	AAA	156169	0.75	Ser	TCA	35837	0.13				
Asn	AAT	84846	0.46	Ser	TCT	42367	0.16				
Asn	AAC	98018	0.54	Ser	TCC	40365	0.15				

Figure 5.4: Compilation de l'usage des codons chez *C. glutamicum* ATCC 13032. Les codons d'usage fréquent ou rare sont indiqués par des cases noires ou surlignées en gras, respectivement.

V.1.2. Analyse fonctionnelle du gène modifié chez *E. coli*

Le gène modifié codant la CAD a été exprimé dans un premier temps chez *E. coli* afin d'en vérifier sa fonctionnalité. Pour ce faire, une souche d' *E. coli* DH5- α a été transformée par le plasmide pUC57-*cad* sur la base de la résistance à l'ampicilline (gène de sélection des transformants), puis mise en culture dans le milieu LB. Après 24 heures de culture à 37 °C et sous agitation à 200 rpm, les cellules ont été centrifugées, lavées puis soumises à une sonication afin d'en réaliser un extrait brut acellulaire. L'activité CAD présente dans cet extrait brut a ensuite été évaluée en mesurant par HPLC la production d'itaconate à partir de cis-aconitate au cours du temps. Les résultats indiquent qu'une activité spécifique significative est présente dans l'extrait brut réalisé à partir d'une souche recombinante d'*E. coli* portant le gène *cad* alors que cette activité n'est pas détectée lorsque l'extrait est réalisé à partir d'une souche d'*E. coli* non transformée (**Tableau 5.1**). Ainsi, sur la base de ce résultat important, il est apparu que le gène *cad* modifié est bien fonctionnel et que son activité enzymatique correspondante était quantifiable. Dans ces conditions, il a semblé probable que ce même gène modifié était également fonctionnel chez *C. glutamicum* et que son expression pouvait se traduire au cours d'un procédé fermentaire par une production d'acide itaconique.

Tableau 5.1: Mesure de l'activité spécifique de l'enzyme CAD recombinante exprimée chez *E. coli* DH5 α pUC 57 *cad*. La même activité a été mesurée chez *E. coli* DH5 α , et constitue le témoin négatif.

Souche	Activité spécifique
<i>E.coli</i> DH5 α <i>cad</i>	8.7 nmoles itaconate .mg⁻¹ protéine. min⁻¹
<i>E.coli</i> DH5 α WT	0 nmoles itaconate .mg⁻¹ protéine. min⁻¹

V.2. Construction de la souche de *Corynebacterium glutamicum* capable de produire de l'acide itaconique

V.2.1. Stratégie et construction du plasmide nécessaire à l'expression du gène *cad*

La stratégie adoptée pour le développement de *C. glutamicum* recombinant et capable d'exprimer l'activité CAD a été de stabiliser le gène *cad* modifié par insertion dans le génome. Le choix du locus d'insertion s'est porté sur le gène *ldh*, codant pour une activité lactate déshydrogénase catabolique. Ainsi l'insertion dirigée du gène *cad* modifié au niveau du locus *ldh*, doit se traduire par (i) la suppression de la production d'acide lactique, (ii) l'expression conditionnelle du gène *cad* sous le contrôle du promoteur *ldh*. Ainsi, une telle souche recombinante serait capable d'exprimer le gène *cad*, tout en alimentant l'activité correspondante par le flux carboné initialement orienté vers la production d'acide lactique.

L'insertion du gène codant pour la CAD au niveau du locus *ldh*, passe par un mécanisme de remplacement allélique et donc par la construction d'un vecteur spécifique pUC*cad Aldh* (**Figure 5.5**). Pour ce faire, le gène *cad* modifié a été cloné entre deux fragments du gène *ldh*. Par ailleurs, un gène codant la résistance à la kanamycine a également été introduit afin de pouvoir sélectionner les transformants. Après linéarisation du plasmide, celui-ci a été introduit chez *C. glutamicum* par électroporation et un double événement de recombinaison au niveau des deux fragments *ldh* a ensuite été sélectionné sur la base de la résistance à la kanamycine.

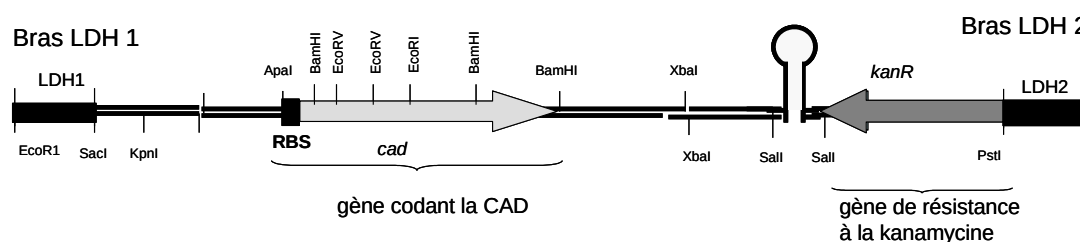


Figure 5.5: Carte physique et génétique de la construction plasmidique utilisée pUC *cad Δldh* pour l'obtention de la souche recombinante *C. glutamicum cad Δldh* capable d'exprimer l'activité CAD, et incapable de produire de l'acide lactique

V.2.2 Caractérisation de l'expression du gène codant la CAD chez *C. glutamicum*.

Après sélection des transformants kanamycine résistants, une colonie de *C. glutamicum cad Δldh* exprimant le gène *cad* et incapable de produire de l'acide lactique a été mise en culture dans le milieu BHI. Après croissance, la culture a été centrifugée et le culot cellulaire lavé avant de réaliser un extrait brut acellulaire.

Afin de caractériser la présence physique de l'enzyme CAD dans l'extrait brut, des anticorps polyclonaux de cochons d'Inde ont été produits par un prestataire de service (Eurogentec, Belgique) sur la base des peptides les plus immunogènes constatés dans la structure primaire de la protéine. Ces anticorps polyclonaux ont ensuite été utilisés pour caractériser la présence de la protéine CAD dans les extraits bruts recombinants par Western Blot (**Figure 5.6**).

L'analyse par Western Blot a révélé la présence d'une protéine spécifique d'environ 50 kDa dans les extraits protéiques issus de la souche recombinante, alors que celle-ci n'est pas détectée dans un extrait réalisé à partir de la souche non transformée. Ces résultats semblent bien confirmer la présence de l'enzyme CAD recombinante chez la souche *C. glutamicum* transformée. Par ailleurs, l'analyse enzymatique révèle qu'une activité CAD significative est mesurée dans l'extrait brut, soit $7,8 \text{ nmoles.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$

alors que celle-ci est absente chez la souche de *C. glutamicum* non modifiée. L'ensemble de ces résultats indique que non seulement la CAD s'accumule chez *C. glutamicum* mais qu'en plus l'enzyme y est fonctionnelle.

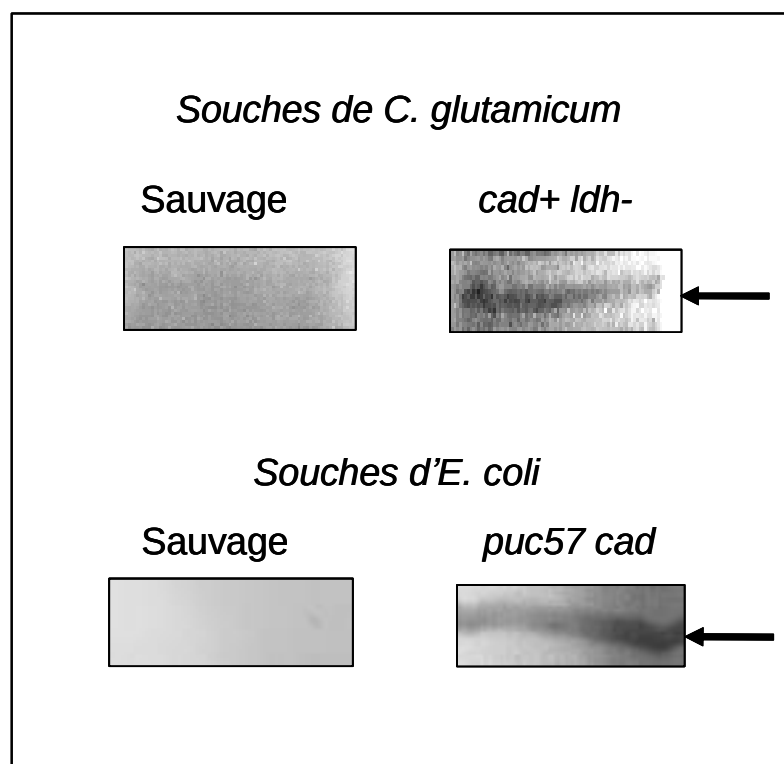


Figure 5.6: Analyse par Western Blot, des extraits protéiques cellulaires des souches recombinantes de *C. glutamicum* et d'*E. coli* exprimant l'activité CAD (*cad+ ldh-* et *puc57 cad* respectivement) comparativement aux souches parentales (sauvage). La flèche indique la présence de la CAD.

V.3 Performances fermentaires initiales de *C. glutamicum* 2262 *cad Aldh*

V.3.1 En fiole chicanée

Une fermentation préliminaire mettant en œuvre la souche recombinante de *C. glutamicum cad Aldh* a été réalisée à petite échelle (50 ml) afin de vérifier sa capacité à produire de l'acide itaconique. Cette fermentation, réalisée à 33°C et sous agitation

(250 rpm), permet dans des conditions non optimisées d'accumuler 3,5 mg/l d'acide itaconique. Bien que cette concentration finale d'itaconate soit relativement faible, elle encourage à mener une culture discontinue, dans des conditions contrôlées, dans le but d'améliorer le processus de fermentation.

V.3.2 En culture en mode discontinue, en aérobiose

Les concentrations en biomasse, glucose résiduel, itaconate ainsi que la concentration en oxygène dissous, par l'intermédiaire de la pression partielle en oxygène dissous, ont été mesurées au cours d'une culture réalisée avec une agitation fixée initialement à 700 rpm et avec un débit en air de 9,5 l/h. La pression partielle en oxygène dissous a été maintenue à 30% minimum ceci par modification de la vitesse d'agitation. Le pH a été régulé à 7,6 par ajout de soude 4N ou d'acide chlorhydrique 4N.

Au cours de cette culture, à partir de 33 g/l de glucose, 11 g/l de biomasse ont été produits (**Figure 5.7a**). La vitesse maximale de croissance mesurée était de l'ordre de 0,12 h⁻¹. La croissance bactérienne s'est traduit par une diminution de la concentration en oxygène dissous jusqu'à 37 h de culture, moment à partir duquel elle a remonté brusquement en raison de l'arrêt de la croissance de *C. glutamicum* 2262 *cad Δldh* (**Figure 5.7b**).

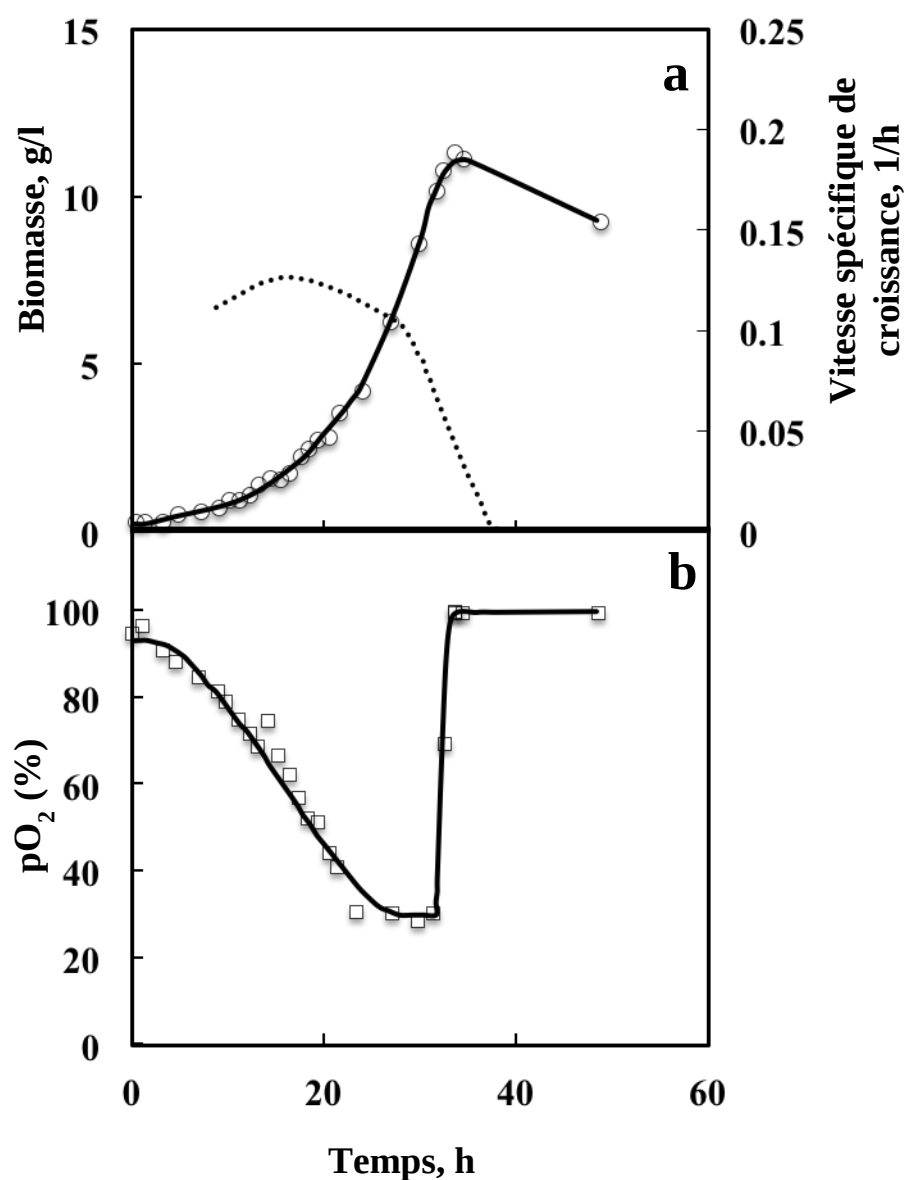


Figure 5.7: Cinétique de croissance de *C. glutamicum* 2262 *cad Aldh* lors d'une culture en mode discontinu, en aérobie.

Evolution de la concentration en biomasse (a) et de la pression partielle en oxygène (b). La ligne en pointillés représente la vitesse spécifique de croissance.

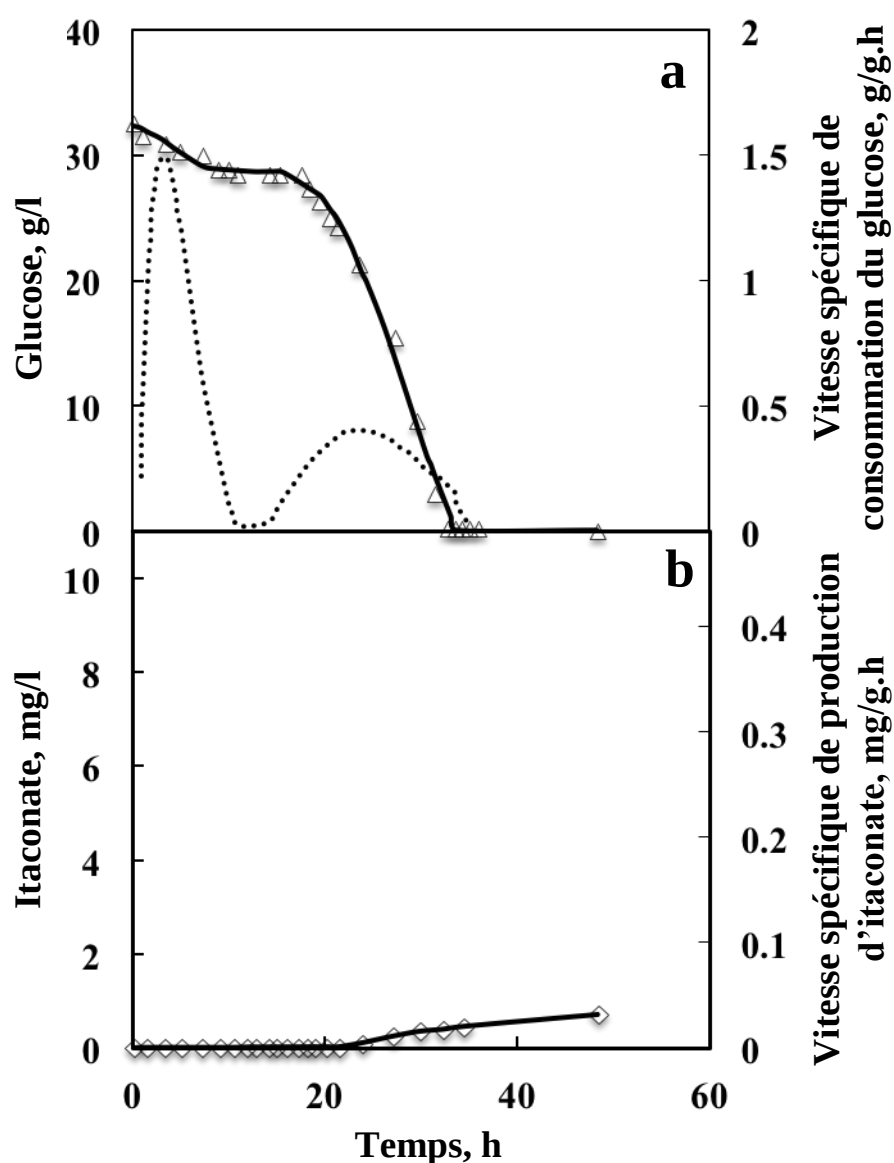


Figure 5.8: Production d'itaconate par *C. glutamicum* 2262 *cad Aldh* lors d'une culture en mode discontinu, en aérobie.

Evolution de la concentration en glucose résiduel (a) et de la concentration en itaconate (b). La ligne en pointillés représente la vitesse spécifique correspondante.

L'arrêt de la croissance après 37 h de culture s'explique par une consommation complète du glucose pendant ce laps de temps (**Figure 5.8a**). Dans ces conditions de culture, 0,6 mg/l d'itaconate sont produits (**Figure 5.8b**). L'activité CAD mesurée au

cours de cette culture est de 0,7 nmol/min/mg de protéine. S'il est comparé avec le résultat préliminaire obtenu en fiole d'Erlenmeyer, ce résultat peut paraître surprenant. Néanmoins, lors d'une culture en fiole, le transfert en oxygène est nettement moins performant qu'en bioréacteur. Une limitation en oxygène peut facilement apparaître dans ce type de système de culture contrairement à ce qui est mesuré ici en bioréacteur. En effet, la pression partielle en oxygène reste toujours supérieure à 30% (**Figure 5.7b**) ce qui signifie que *C. glutamicum* 2262 *cad Aldh* n'a été, à aucun moment, en limitation d'oxygène. Or, comme détaillé précédemment, chez cette souche, par remplacement allélique, le gène de la CAD a été mis sous le contrôle du promoteur du gène de la lactate déshydrogénase. Ce promoteur est contrôlé par le niveau en oxygène dans l'environnement de la bactérie, en étant surexprimé lors d'une limitation en oxygène. Dès lors, une surexpression de *cad* et donc une synthèse accrue d'acide itaconique est attendue, suite à une limitation en oxygène de *C. glutamicum* 2262 *cad Aldh*.

V.3.3. Influence d'une limitation en oxygène sur la production d'acide itaconique

Comme le gène CAD inséré a été contrôlé par le promoteur *ldhA* qui est induit fortement sous condition de limitation d'oxygène (Inui et al., 2004b; Inui et al., 2007; Okino et al., 2005), l'influence d'une limitation en oxygène sur la production d'acide itaconique par *C. glutamicum* 2262 *cad Aldh* a été testée lors d'une culture en mode discontinu, ceci avec le milieu MCGC dans lequel la seule source de carbone est du glucose.

L'arrêt de l'aération et le ralentissement de la vitesse d'agitation ont été réalisés après 17 h de culture, lorsque la DO₅₇₀ est de 10 comme défini précédemment (*cf.* chapitre III) (**Figure 5.9**).

L'arrêt de l'aération induit une diminution brutale de la concentration en oxygène dissous (**Figure 5.9b**) mais aussi un arrêt de la croissance cellulaire (**Figure 5.9a**). En conséquence la concentration maximale en biomasse obtenue est de 2,6 g/l. la vitesse maximale de croissance est obtenue pendant la première phase de la culture. Celle-ci est de l'ordre de 0,2 h⁻¹.

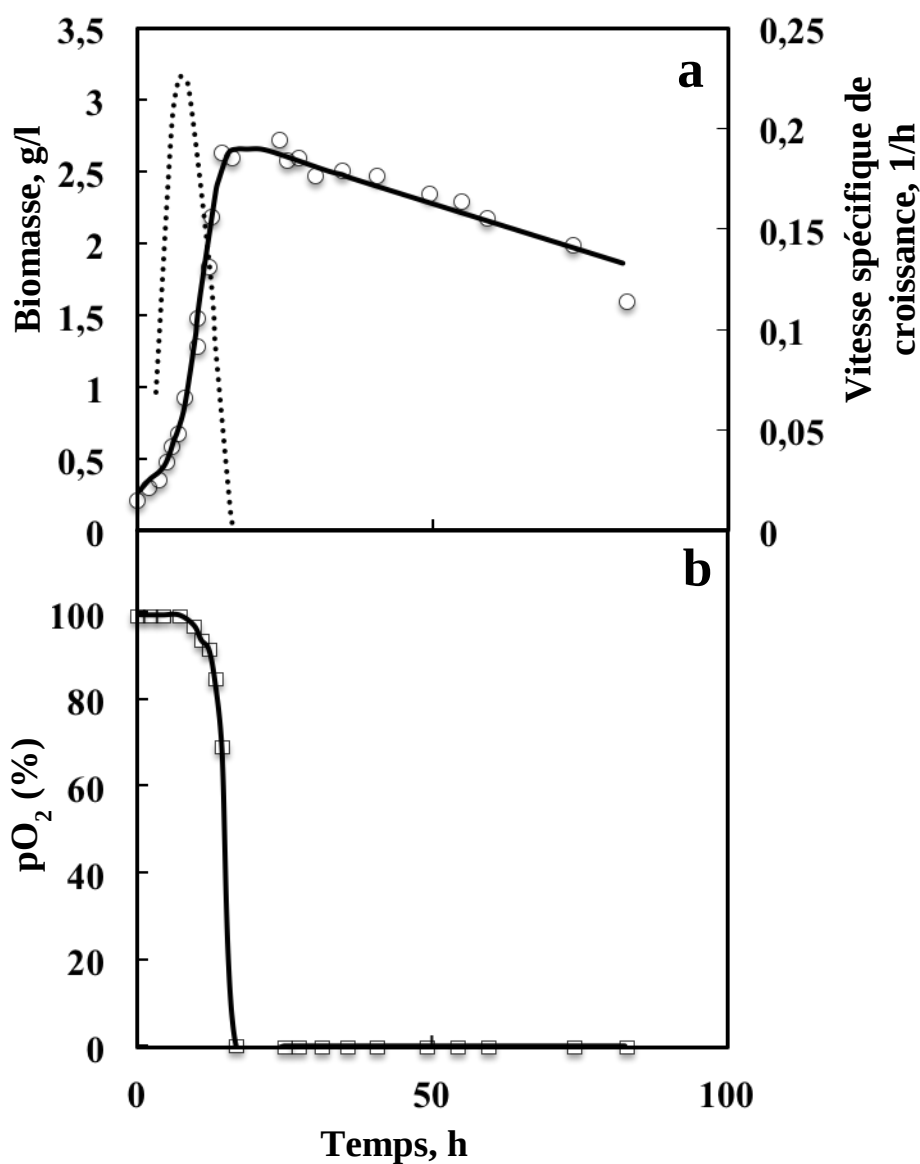


Figure 5.9: Cinétique de croissance de *C. glutamicum* 2262 *cad Aldh* lors d'une culture en mode discontinu avec arrêt de l'aération à DO₅₇₀ 10.

Evolution de la concentration en biomasse (a) et de la pression partielle en oxygène (b). La courbe en pointillés représente la vitesse spécifique de croissance.

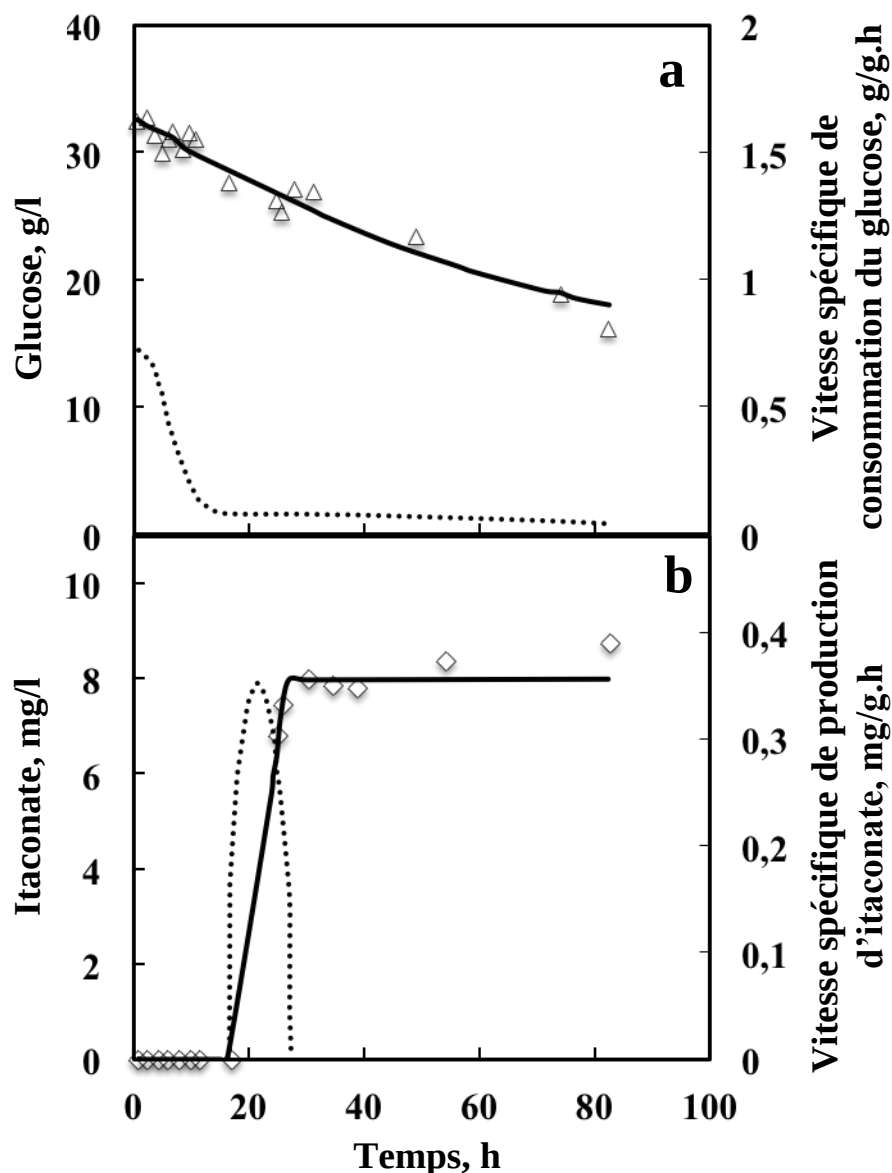


Figure 5.10: Production d'itaconate par *C. glutamicum* 2262 *cad Aldh* lors d'une culture en mode discontinu avec arrêt de l'aération lorsque la DO_{570} a atteint 10 (2,6 g/l).

Evolution de la concentration en glucose résiduel (a), de la concentration en itaconate (b). Les courbes en pointillés représentent la vitesse spécifique correspondante.

C. glutamicum 2262 *cad Aldh* ne consomme pas la totalité du glucose présent initialement dans le milieu de culture (**Figure 5.10a**). Seuls 13 g/l sont consommés. La consommation de glucose est fortement affectée par la limitation en oxygène imposée après 17 h de culture. Dans ces conditions de culture, 8 mg/l d'acide

itaconique sont produits. Une limitation en oxygène semble donc être favorable à la production d'acide itaconique puisque la production initiale d'acide itaconique avec *C. glutamicum* 2262 *cad Aldh* était de 3,5 mg/l sans contrôle de ce paramètre lors de cultures en fioles d'Erlenmeyer.

Une mesure de l'activité cis-aconitate décarboxylase a été réalisée lors de la phase de culture avec la limitation en oxygène. L'activité mesurée était de 8 nmol/min/mg de protéines. Il est à noter que la production d'acide itaconique semble être découplée de la croissance puisqu'elle débute après 18h de culture alors que la vitesse spécifique de croissance est déjà nulle. Malheureusement, la production d'acide itaconique ne se maintient pas dans le temps puisqu'après 28 h de culture, la vitesse spécifique de production d'acide itaconique est nulle.

Malgré l'arrêt de la production d'acide itaconique et de la croissance, le glucose est encore consommé après 30 h de culture. Une recherche d'autres métabolites co-produits au cours de cette culture a donc été effectuée. Le principal co-métabolite retrouvé est l'acide succinique avec 1,3 g/l en fin de culture. Des traces d'acide malique, d'acide acétique et d'acide glutamique ont également été observées. Les concentrations finales de ces acides n'excèdent pas 0,3 g/l.

V.3.4. Influence d'une variation de la température du milieu de culture

C. glutamicum 2262, à partir de laquelle *C. glutamicum* 2262 *cad Aldh* a été construite, est une souche thermosensible. Suite à une élévation de la température du milieu de culture de 33 à 39°C, elle est capable de produire jusqu'à 85 g/l de glutamate à partir de glucose comme seule source de carbone (Uy et al., 2003; Uy et al., 2005). Puisque le cis-aconitate, précurseur de l'acide itaconique, se trouve dans la branche oxydative du cycle de Krebs en amont de l' α -cétoglutarate, l'influence du changement de la température sur la production d'acide itaconique par *C. glutamicum* 2262 *cad Aldh* dans des conditions de privation d'oxygène a été étudiée.

Afin d'évaluer l'effet du changement de la température de *C. glutamicum* 2262 *cad Aldh* sur la production d'itaconate, un choc de la température a été imposé sur les cultures réalisées en mode discontinu. La culture a d'abord été développée à 33°C

pendant 21 h puis, une fois une DO_{570} de 10 atteintes, la température a été rapidement augmentée à 39°C. Au même moment, l'aération de la culture a été arrêté, ceci pendant le reste des 60 h de culture.

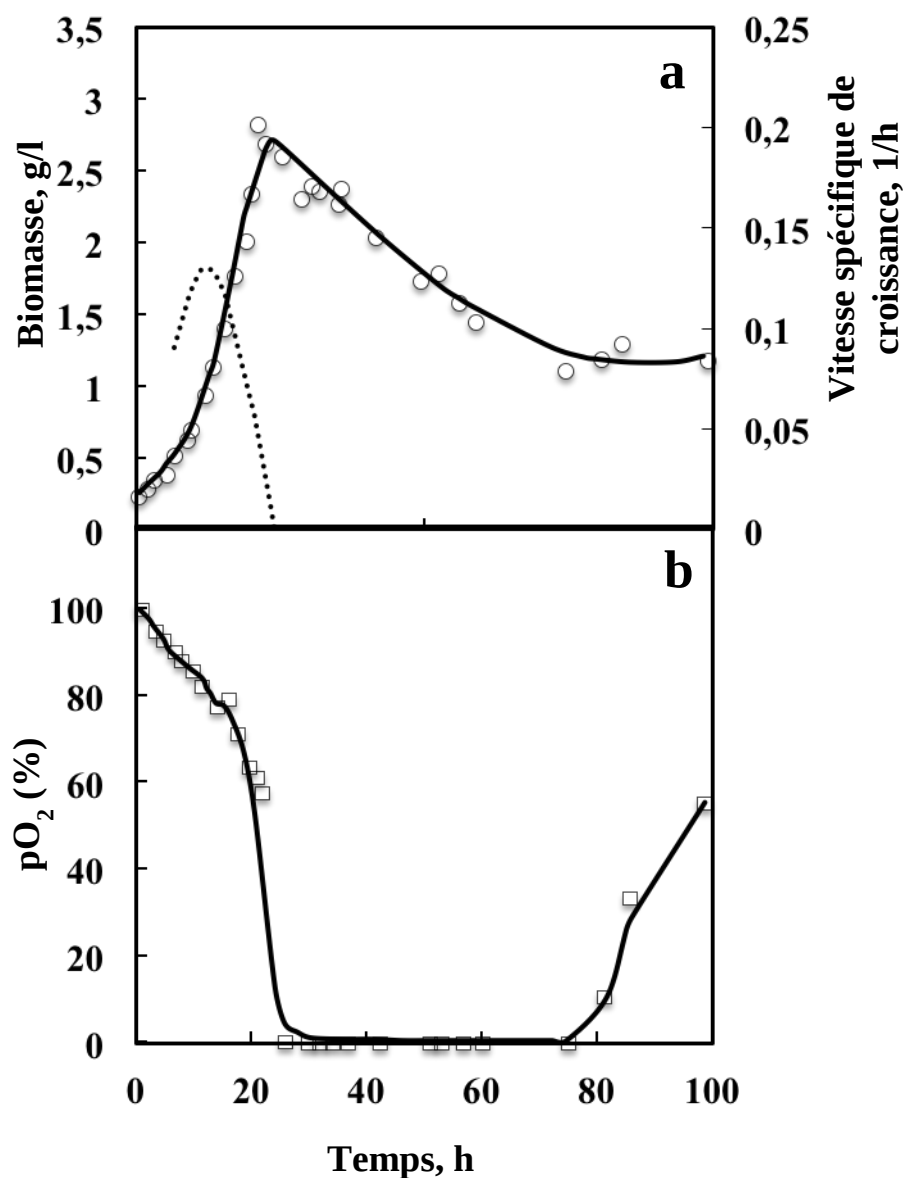


Figure 5.11: Cinétique de croissance de *C. glutamicum* 2262 *cad Aldh* lors d'une culture en mode discontinu avec, simultanément, arrêt de l'aération et élévation de la température du milieu de culture de 33 à 39°C lorsque la DO_{570} a atteint 10 (2,6 g/l). Evolution de la concentration en biomasse (a) et de la pression partielle en oxygène (b). La courbe en pointillés représente la vitesse spécifique de croissance.

Comme précédemment, la concentration en oxygène dissous tombe rapidement à zéro après l'arrêt de l'aération (**Figure 5.11b**). L'application à la fois de la limitation de l'oxygène et du choc température abouti à une diminution de la vitesse spécifique de croissance jusqu'à une valeur égale à zéro. La **figure 5.11a** montre clairement que le changement de température induit un ralentissement de la croissance et une baisse significative de la concentration en biomasse. Cette diminution pourrait être due à une mort cellulaire ou bien à une diminution de la taille des cellules.

Comme précédemment observé en limitation en oxygène, *C. glutamicum* 2262 *cad Aldh* ne consomme pas la totalité du glucose. En effet, seuls 12 g/l de la source en carbone sont consommés (**Figure 5.12a**). La consommation en glucose est fortement affectée par l'application simultanée de la limitation en oxygène et de l'augmentation de la température puisque après 38 h de culture plus aucune consommation de glucose n'est constatée ce qui traduit l'arrêt complet de l'activité métabolique des cellules.

Lors de cette culture, seuls 3,7 mg/l d'acide itaconique ont été produits soit deux fois moins que lors de l'expérience précédente (**Figure 5.12b**). L'activité CAD est cependant identique à celle mesurée précédemment puisqu'elle atteint 8 nmol/min/mg de protéine. Une nouvelle fois, la production d'acide itaconique est mesurée essentiellement après l'arrêt de la croissance des bactéries. Le principal co-métabolite est l'acide succinique avec une concentration finale de 6 g/l. Une telle concentration traduit un fonctionnement de la branche réductrice du cycle de Krebs au détriment de la branche oxydante ce qui pourrait expliquer les performances plus faibles obtenues. De l'acide malique (0,3 g/l), de l'acide glutamique (0,3 g/l) ainsi que de l'acide α -cétoglutarique, de l'acide citrique et de l'acide pyruvique (<0,1 g/l) sont aussi présents en fin de culture.

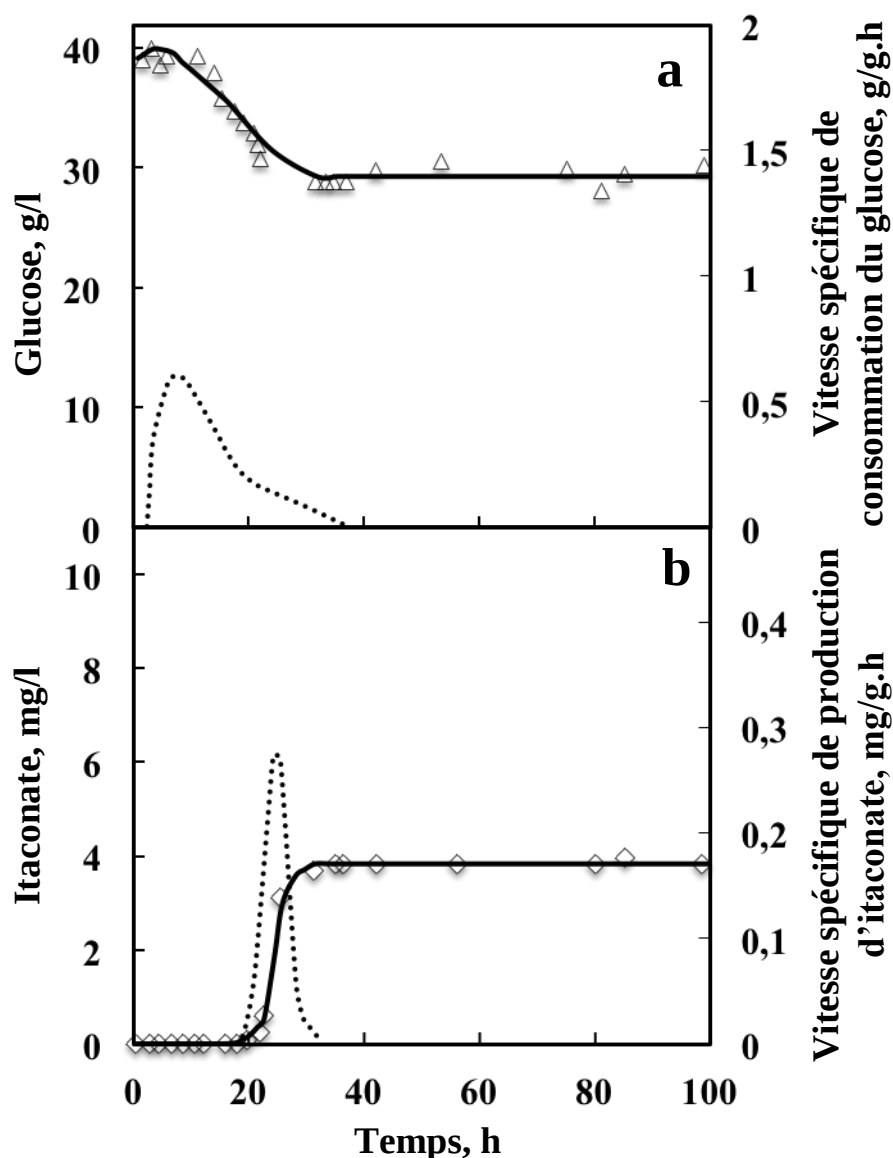


Figure 5.12: Production d'itaconate par *C. glutamicum* 2262 *cad Aldh* lors d'une culture en mode discontinu avec, simultanément, arrêt de l'aération et élévation de la température du milieu de culture de 33 à 39°C lorsque la DO_{570} de 10 a été atteinte (2,6 g/l).

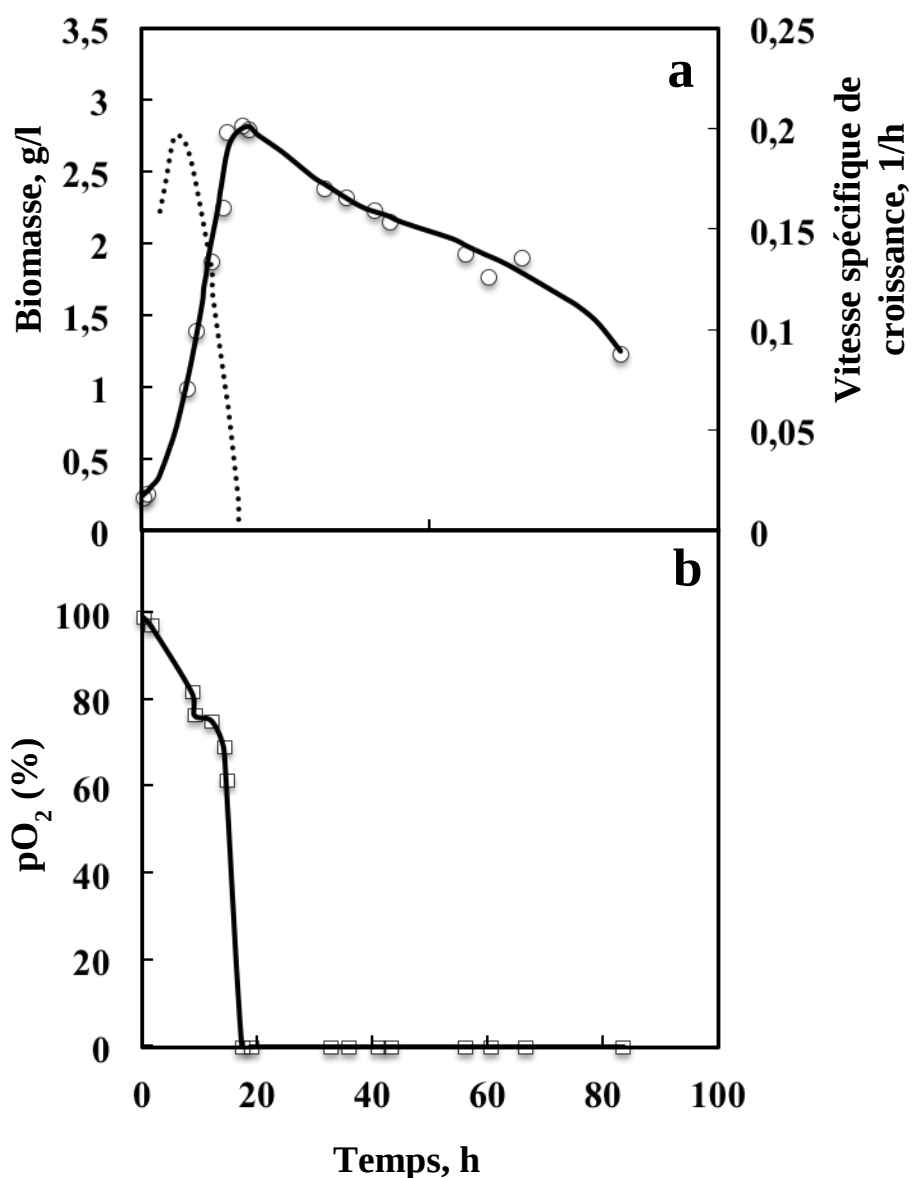
Evolution de la concentration en glucose résiduel (a) et de la concentration en itaconate (b). Les courbes en pointillés représentent la vitesse spécifique correspondante.

V.3.5. Influence d'une limitation en substrat azoté

Il a été montré que plusieurs gènes codant pour des protéines impliquées dans les voies de biosynthèse de L-acides aminés de *C. glutamicum* sont sous régulés dans les cultures limitées en azote (Silberbach et al., 2005a; Silberbach et al., 2005b). Par conséquent, la limitation en azote peut entraîner une diminution des flux de carbone à travers la biosynthèse des acides aminés et par conséquent favoriser la biosynthèse d'itaconate.

C. glutamicum 2262 *cad Aldh* a donc été cultivé en limitation d'azote afin de réduire, voire annuler la synthèse de glutamate au cours du choc de température. La concentration initiale en sulfate d'ammonium, seule source en azote dans le milieu MCGC, a été réduite de 8 g/l à 3 g/l. Avec une telle concentration et en tenant compte de la croissance bactérienne, la limitation en azote intervient au même moment que la limitation en oxygène et le changement de température du milieu de culture qui ont été effectués comme présentés précédemment.

Comme observé systématiquement depuis le début de cette étude, l'arrêt de l'aération se traduit par une chute à zéro de la concentration en oxygène dissous (**Figure 5.13b**). Cet arrêt de l'aération a été réalisé après 18 h de culture. Immédiatement, la croissance bactérienne s'arrête et la concentration maximale en biomasse est donc de 2,6 g/l après 18 h de culture (**Figure 5.13a**). La concentration en biomasse décroît ensuite jusqu'à l'arrêt de la culture, soit après 82 h. Bien que l'azote soit nécessaire pour la division cellulaire, la synthèse de la paroi cellulaire et l'absorption du glucose (Silberbach et al., 2005a; Silberbach et al., 2005b), la réduction de la concentration en azote après la phase de croissance n'affecte pas la croissance cellulaire et la consommation de glucose au cours de la phase de fermentation.



Seuls 11 g/l de glucose sont consommés au cours de cette culture (**Figure 5.14a**). La consommation de glucose devient nulle après environ 50 h de culture ce qui, une nouvelle fois, traduit l'arrêt d'activité métabolique de *C. glutamicum* 2262 *cad Aldh*. Au cours de cette culture, seul 0,6 mg/l d'itaconate sont produits, après que la croissance soit arrêtée (**Figure 5.14b**). Pourtant, l'activité CAD mesurée est supérieure à celle précédemment mesurée lors des autres procédés avec *C. glutamicum* 2262 *cad Aldh*. Celle-ci est de 16,5 nmol/min/mg de protéine.

Lors de cette culture, très peu de co-métabolites a été retrouvé dans le milieu de culture. En effet, seuls 0,3 g/l de malate et 0,7 g/l de succinate ont été mesurés en fin de culture.

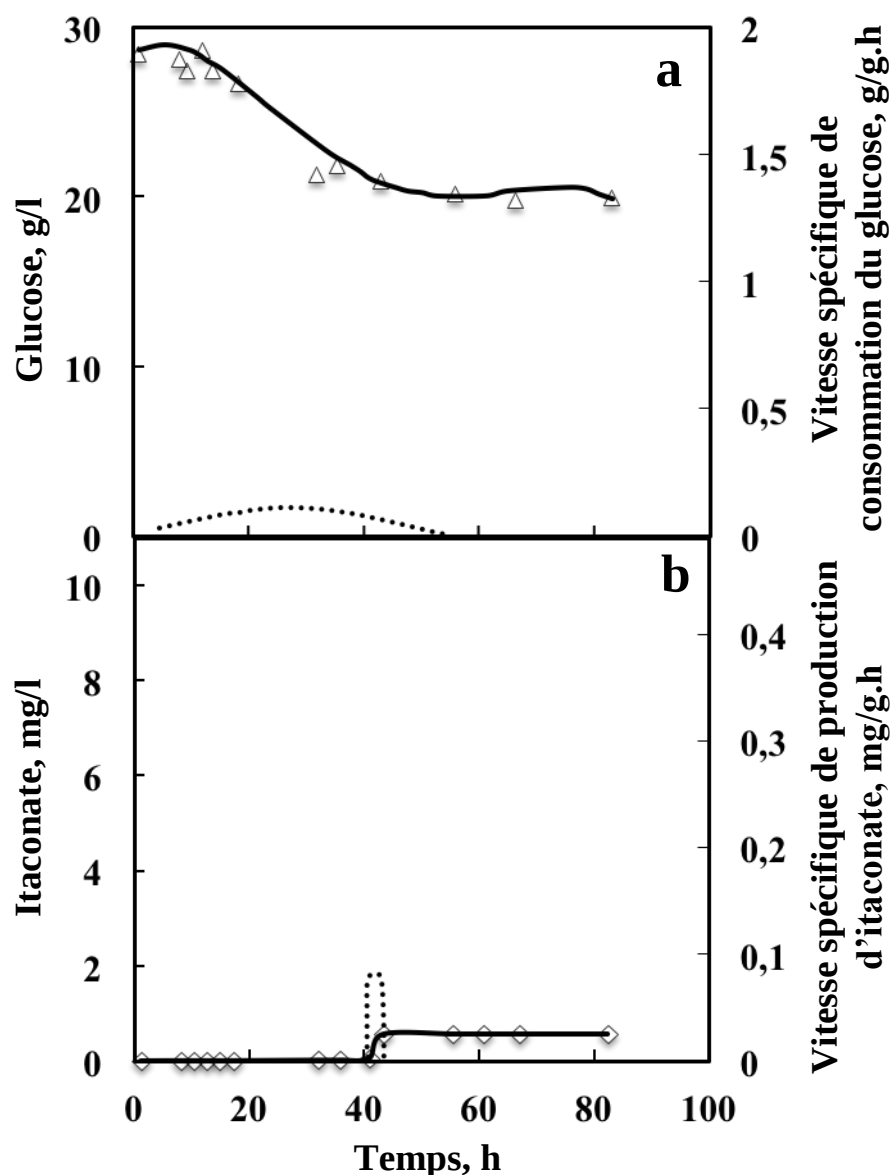


Figure 5.14: Production d'itaconate par *C. glutamicum* 2262 *cad Aldh* lors d'une culture en mode discontinu avec une limitation en substrat azoté et avec, simultanément, arrêt de l'aération et élévation de la température du milieu de culture de 33 à 39°C lorsque la DO_{570} a atteint 10 (2,6 g/l).

Evolution de la concentration en glucose résiduel (a) et de la concentration en itaconate (b). Les courbes en pointillés représentent la vitesse spécifique correspondante.

V.3.6 Discussion

Au cours de ces travaux, il a été montré que la souche modifiée, *C. glutamicum* 2262 *cad Aldh*, était capable d'exprimer le gène CAD et avait la capacité de produire de l'acide itaconique. L'influence de trois paramètres, tels que la limitation en oxygène, l'élévation de température, et/ou la limitation en azote a été testée lors du procédé de production d'acide itaconique par *C. glutamicum* 2262 *cad Aldh*. L'application d'une de ces contraintes, quelle qu'elle soit, se traduit immédiatement par un arrêt de la croissance bactérienne. Les différentes contraintes ont été appliquées à une concentration en biomasse de 2,6 g/l environ, cette valeur étant la concentration maximale mesurée lors des procédés avec stress.

Les performances obtenues sont regroupés dans le tableau suivant (**Tableau 5.2**)

Tableau 5.2: Concentrations maximales en biomasse ($X_{\max}$), en itaconate ($[\text{itaconate}]_{\max}$) et activités spécifiques de la CAD obtenues avec *C. glutamicum* 2262 *cad Aldh* lors de cultures en mode discontinu sans ($\emptyset$) ou avec application de différents stress.

	$X_{\max}$ (g/l)	$[\text{itaconate}]_{\max}$ (mg/l)	Activité CAD (nmol/min/mg)
$\emptyset$	11	0,6	0,7
Limitation en oxygène	2,6	8	8
Limitation en oxygène + élévation de température	2,6	3,7	8
Limitation en oxygène + élévation de température + limitation en azote	2,6	0,6	16,5

Comme le promoteur *ldhA* est fortement induit dans des conditions de limitation en oxygène *C. glutamicum* (Inui et al., 2004b; Inui et al., 2007; Okino et al., 2005) et que le gène CAD est contrôlé par ce promoteur, une limitation de l'oxygène a été

appliquée tout d'abord pour améliorer la production de AI par *C. glutamicum* 2262 *cad Δldh*. Cette limitation a été appliquée selon les conditions précédemment établies au cours de ce travail (*cf.* chapitre III).

Comme attendu, l'application d'une limitation en oxygène provoque une augmentation de l'activité CAD et, par conséquent, une augmentation de la production d'itaconate. L'itaconate est immédiatement produit lors de la suppression de l'aération (**Figure 5.10b**) ce qui suggère une activation du promoteur *ldhA* et l'expression du gène *cad* comme cela a été confirmé par Western Blot. En conséquence, la production de l'itaconate chez *C. glutamicum* 2262 *cad Δldh* dans les conditions de limitation en oxygène est plus de treize fois supérieure à celle obtenue dans des conditions aérobies (**Tableau 5.2**).

Comme la productivité de cette souche demeure très faible par rapport à celle d'*A. terreus*, le procédé de culture a été modifié pour tenter d'améliorer la production d'itaconate.

L'augmentation de la température par exemple est connue pour induire une transition métabolique chez la souche thermosensible *C. glutamicum* 2262, ce qui se traduit par une forte production de glutamate et entraîne la formation de L-lactate comme co-produit (Uy et al. 2003). La formation de L-lactate suggèrent que promoteur *ldhA* est activé lors du changement de température puisqu'une limitation en oxygène est observée à ce moment précis du fait d'une forte augmentation de la respiration par *C. glutamicum* 2262. De plus, la production de glutamate sous-entend un flux de carbone accru dans la branche oxydatrice du cycle de Krebs jusqu'à l' α -cétooglutarate, précurseur du glutamate. Or, le cis-aconitate, précurseur de l'acide itaconique, se trouve dans le cycle de Krebs en amont de l' α -cétooglutarate. Il est donc envisageable qu'une élévation de la température du milieu de culture de 33 à 39°C, en augmentant le flux de carbone dans le cycle de Krebs, permette une synthèse plus importante de cis-aconitate et donc d'itaconate. Étonnamment, l'élévation de la température du milieu de culture simultanément avec la suppression d'oxygène n'affecte pas l'activité de la CAD mais s'avère être défavorable à la production d'itaconate (**Tableau 5.2**). En effet, une diminution de la production de l'itaconate alors que l'activité de CAD est inchangée, pourrait être le résultat d'une orientation préférentielle du flux vers la

production de glutamate. Dans ces conditions, il serait possible de rendre le carbone plus disponible pour la synthèse d'itaconate en bloquant celle du glutamate.

Comme montré lors d'analyses du transcriptome de *C. glutamicum*, une sous-régulation des gènes codant des protéines pour la synthèse de différents L-acides aminés est observée dans les cellules en conditions de limitation en azote (Silberbach et al., 2005a; Silberbach et al., 2005b). C'est pourquoi la limitation en azote a été réalisée au même moment que la limitation en oxygène, associé à un changement de température du milieu de culture. Ce phénomène, associé à une limitation du substrat NH_4^+ de l' α -cétooglutarate, devait se traduire par une quasi absence de production concurrente de glutamate lors de l'élévation de température. Bien que la réduction d'azote entraîne une augmentation de deux fois de l'activité enzymatique CAD, la production de l'itaconate n'a pas été améliorée et est restée très faible.

Du point de vue comparatif, l'application de la seule condition de limitation en oxygène a montré que la production d'itaconate était la plus élevée tandis que l'activité de la CAD était la plus forte lorsque la limitation en oxygène, le choc température et la limitation en azote ont été appliqués. Quelles que soient les conditions appliquées, les vitesses spécifiques de production de l'itaconate présentaient des profils similaires : après une production rapide dans les premières heures, la vitesse spécifique de production d'itaconate diminue considérablement jusqu'à être nulle jusqu'à la fin de la culture (**Figure 5.14b**). Une façon d'améliorer la production itaconate serait d'optimiser le procédé de fermentation pour maintenir l'activité métabolique nécessaire à la production d'itaconate. Une autre stratégie pourrait être d'améliorer la production d'un précurseur de l'itaconate tel que le cis aconitate.

CONCLUSIONS

L'objectif principal de cette thèse était l'utilisation de la souche *C. glutamicum* 2262, souche d'origine industrielle et modèle de l'espèce *C. glutamicum* pour notre laboratoire, comme une plate-forme d'ingénierie métabolique pour la production de métabolites tels que l'éthanol et l'itaconate dans des conditions de privation d'oxygène. En raison d'un rendement élevé de la production d'acide lactique observé généralement chez *C. glutamicum* dans des conditions anaérobies, la voie de synthèse de l'acide lactique a été exploitée pour la production d'éthanol et d'itaconate.

Au cours de ce travail un procédé de culture en une seule étape, qui couple la croissance cellulaire en aérobiose et la production d'acide lactique en anaérobiose, a été établi chez *C. glutamicum* 2262. En analysant, de façon systématique, l'effet du moment de l'arrêt de l'apport en oxygène pour passer d'une phase de croissance cellulaire en une phase de production, nous avons observé que l'arrêt de l'aération de la culture à une DO₅₇₀ de 10 (2,6 g/l en biomasse) était le moment le plus adéquat. Suite à l'application de ces conditions de culture, *C. glutamicum* 2262 a pu produire 27 g/l de l'acide lactique avec un rendement de conversion du glucose en lactate élevé, de l'ordre de 70% lors d'une culture en mode discontinu. D'autre part, en culture en mode semi-continu, 56 g/l de lactate ont ainsi été produits. Il s'agit là de la production de lactate la plus forte observée pour *C. glutamicum* jusqu'à ce jour, ceci sans passer par une étape de concentration de la biomasse. Par ailleurs, en initiant la phase de production à une concentration en biomasse relativement faible, moins de 4 g/l, le procédé établi a permis d'obtenir un rendement lactate produit par rapport à la concentration en biomasse beaucoup plus élevé que ceux donnés dans la littérature que ce soit en mode discontinu ou en mode semi-continu (7,3 et 14,3 g/g vs. 3,2 g/g) (Okino et al., 2005).

La stratégie d'augmentation de la concentration initiale du glucose de 40 à 70 g/l a permis une augmentation de la concentration finale en lactate de l'ordre 27 à 47,5 g/l. Cependant l'obtention de cette augmentation a nécessité un allongement du temps de culture ce qui se traduit par une diminution de 40% de la productivité volumique.

L'élévation de la température à 39 °C appliquée au moment de la transition entre la phase de croissance et la phase de production du lactate n'a pas permis une

amélioration de la concentration finale en lactate, et de sa productivité. Mais, elle a permis d'obtenir une concentration importante de succinate de l'ordre de 9 g/l. L'élévation de la température du milieu de culture, en anaérobiose semble donc favoriser la synthèse de succinate. Notons que le niveau de production de succinate obtenu ici avec *C. glutamicum* 2262 est supérieur à ceux obtenus avec *C. glutamicum* R chez laquelle la production de succinate a précédemment été étudiée (Okino et al., 2005).

Le procédé de production de lactate qui a été établi dans la première partie du travail traduit donc la capacité de *C. glutamicum* à orienter son métabolisme vers la synthèse de lactate lors d'une phase de culture anaérobie. Cette propriété a été exploitée en vue de produire des métabolites non naturellement synthétisés par *C. glutamicum* 2262, l'éthanol et l'itaconate. La synthèse de chacune de ces molécules nécessite, bien évidemment, une modification génétique de la souche utilisée. Dans le cas de la synthèse d'éthanol, les gènes *pdc* et *adh* de *Z. mobilis* ont été exprimés sous le contrôle du promoteur de *ldhA* endogène de *C. glutamicum*. Cette modification a été réalisée chez *C. glutamicum* 2262 et chez une souche de *C. glutamicum* 2262 déficiente en lactate déshydrogénase. Bien que les productivités en éthanol des souches modifiées génétiquement soient restées très faibles en comparaison des résultats obtenus dans d'autres travaux de recherche, la suppression de *ldhA* a entraîné une augmentation de la productivité en éthanol d'un facteur quinze. Chez toutes les souches modifiées génétiquement, le métabolisme central semble avoir été fortement affecté par l'apport des gènes de la pyruvate décarboxylase et de l'alcool déshydrogénase. En effet, le principal acide organique synthétisé est l'acétate y compris chez les souches qui sont encore en capacité de synthétiser du lactate.

En ce qui concerne la synthèse d'itaconate, une stratégie proche de celle de la synthèse d'éthanol a été suivie. La séquence du gène de la cis-aconitate décarboxylase d'*A. terreus* a été optimisée et insérée dans le locus *ldhA* de *C. glutamicum* 2262. La souche ainsi construite a montré dans des conditions de privation d'oxygène une activité enzymatique CAD faible et une production très faible d'itaconate. Les essais de conduite du procédé, application d'une variation de la température du milieu de culture et une limitation en azote n'ont pas eu d'effet concluant sur la productivité en itaconate.

PERSPECTIVES

Bien que la construction de souches modifiées génétiquement de *C. glutamicum* 2262 pour la production d'éthanol et d'itaconate n'aient pas permis d'aboutir aux résultats initialement escomptés en terme notamment de concentration finale, cette stratégie pose néanmoins des premiers jalons quant à l'utilisation de cette souche comme plateforme métabolique pour la production en anaérobiose de métabolites d'intérêt. *C. glutamicum* 2262 est une souche qui a été sélectionnée pour sa capacité à surproduire du glutamate. A ce titre, son métabolisme peut présenter quelques différences par rapport à d'autres souches de *C. glutamicum*. La modification du métabolisme suite à l'introduction des gènes de PDC et ADH laisse suspecter que la régulation de celui-ci est peut être différente de ce qui est connu chez ces autres souches, notamment *C. glutamicum* R (Inui, 2004). De nouvelles études sur la régulation du métabolisme de *C. glutamicum* 2262 semblent donc nécessaires afin de pouvoir améliorer la productivité en métabolites d'intérêt chez des souches modifiées génétiquement dérivant de cette souche. Ceci est une première perspective.

Il apparaît évident que l'amélioration de l'expression des gènes par l'utilisation d'un vecteur d'expression alternatif est nécessaire pour accroître les activités enzymatiques de PDC et d'ADH et par conséquent pour augmenter la productivité en éthanol. Deux vecteurs différents: pMTL500E et pMTL540E ont été utilisés pour exprimer l'opéron PET. Bien que ces deux vecteurs portent des origines de réplication différentes, avant notre travail, aucune étude utilisant ces vecteurs pour l'expression des gènes dans *C. glutamicum* n'avait été réalisée. Par conséquent, des vecteurs contenant d'autres origines de réplication, tels que pBL1 et pGA1, qui sont souvent utilisées pour l'expression des gènes étrangers dans *C. glutamicum* (Srivastava et Deb, 2005), pourraient être une solution possible pour une expression plus forte de l'opéron PET. En outre, l'optimisation de l'usage des codons pour l'expression de l'opéron PET chez *C. glutamicum* pourrait, également, être envisagée.

Pour générer des souches produisant de l'itaconate, le gène CAD a été intégré dans le génome de *C. glutamicum*. Cette stratégie permet d'obtenir des souches recombinantes *a priori* stables. Mais étant alors intégré dans le chromosome le nombre de copies du gène est inévitablement faible, plus faible que dans le cas de l'utilisation d'un plasmide réplcatif. De ce fait, dans nos travaux, le gène CAD n'a pu

être exprimé que modestement conduisant à une faible production d'itaconate. Pour augmenter l'activité enzymatique de la souche recombinante en gardant son expression stable, il faudrait augmenter le nombre de copies du gène *cad* dans le génome, ceci par des intégrations supplémentaires dans des régions génomiques non essentielles. Cette stratégie a été utilisée pour améliorer l'expression de gènes étrangers dans *C. glutamicum* dans des conditions de privation d'oxygène (Sasaki et al., 2008). Elle pourrait être développée ici également.

Une autre stratégie pourrait être d'améliorer la production d'un précurseur de l'itaconate tels que le citrate. Récemment, il a en effet été démontré que la citrate synthase codée par le gène *gltA* est réprimée dans des conditions de limitation d'oxygène, conduisant à la diminution de la production de citrate, un précurseur de l'itaconate (Inui, 2007), semblable à ce qui est observé chez *B. subtilis* (Nakano et al., 1998). Par conséquent, il semblerait approprié de s'intéresser aussi à la production d'itaconate en conditions aérobies. Mais cette approche nécessiterait de revoir complètement la stratégie de modification génétique de *C. glutamicum* puisqu'en anaérobiose le gène *ldhA* n'est pas surexprimé.

Par d'ailleurs, il est intéressant de noter que les niveaux de production de succinate obtenus avec *C. glutamicum* 2262 lors d'une élévation de température de fermentation de 33 à 39 °C en culture en mode discontinu sont supérieurs à ceux obtenus avec *C. glutamicum* R chez laquelle la production de succinate a été précédemment étudiée (Okino et al., 2005). *C. glutamicum* 2262 pourrait donc être une souche intéressante pour le développement d'un procédé de production de succinate en anaérobiose. Plus particulièrement, la délétion du gène *ldhA* codant la L-lactate déshydrogénase ou la surexpression de *pyc* codant la pyruvate carboxylase ou la surexpression du *sucE1*, un nouveau exportateur du succinate pourrait conduire à une augmentation significative la production de succinate.

Rappelons enfin que dans des conditions de limitation d'oxygène le gène *sigB* qui code un facteur sigma du groupe 2 de l'ARN polymérase de *C. glutamicum*, est surrégulé. L'élimination de *sigB* pourrait conduire à réduire le niveau de transcription des gènes impliqués dans le métabolisme du glucose en acides organique, y compris les gènes *fba*, *tpi*, *gapA*, et *pgk*. La surexpression de *sigB* pourrait donc améliorer la

consommation de glucose dans des conditions de limitation d'oxygène pour augmenter la concentration des produits finaux.

Voilà donc des directions possibles qui pourraient être développées ultérieurement et qui permettraient de mieux comprendre le métabolisme *C. glutamicum* 2262 en anaérobiose et d'une façon plus générale d'augmenter l'intérêt de souches issues de *C. glutamicum* en tant que plate-forme biotechnologique pour la production industrielles de métabolites d'intérêt.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abe, S., Takayama, K., and Kinoshita, S. 1967. Taxonomical studies on glutamic acidproducing bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **13**: 279-301.
- Alterthum, F., and Ingram, L.O. 1989. Efficient ethanol production from glucose, lactose, and xylose by recombinant *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **55**(8): 1943-1948.
- Aoki, R., Wada, M., Takesue, N., Tanaka, K., and Yokota, A. 2005. Enhanced glutamic acid production by a H⁺-ATPase-defective mutant of *Corynebacterium glutamicum*. *Biosci Biotechnol Biochem* **69**(8): 1466-1472.
- Arfman, N., Worrell, V., and Ingram, L.O. 1992. Use of the tac promoter and lacIq for the controlled expression of *Zymomonas mobilis* fermentative genes in *Escherichia coli* and *Zymomonas mobilis*. *J Bacteriol* **174**(22): 7370-7378.
- Arndt, A., and Eikmanns, B.J. 2007. The alcohol dehydrogenase gene *adhA* in *Corynebacterium glutamicum* is subject to carbon catabolite repression. *J Bacteriol* **189**(20): 7408-7416.
- Asakura, Y., Kimura, E., Usuda, Y., Kawahara, Y., Matsui, K., Osumi, T., and Nakamatsu, T. 2007. Altered metabolic flux due to deletion of *odhA* causes L-glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol* **73**(4): 1308-1319.
- Bailey, B.K. 1996. Performance of ethanol was a transportation fuel. In: Wyman CE (ed) *Handbook on bioethanol: production and utilization*. Taylor & Francis, Washington DC, p 37.
- Bailey, J.E. 1991. Toward a science of metabolic engineering. *Science* **252**(5013): 1668-1675.
- Barreiro, C., Nakunst, D., Huser, A.T., de Paz, H.D., Kalinowski, J., Martin, J.F. 2009. Microarray studies reveal a 'differential response' to moderate or severe heat shock of the HrcA- and HspRdependent systems in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology* **155**:359-372
- Barrett, E., Stanton, C., Zelder, O., Fitzgerald, G., and Ross, R.P. 2004. Heterologous expression of lactose- and galactose-utilizing pathways from lactic acid bacteria in *Corynebacterium glutamicum* for production of lysine in whey. *Appl Environ Microbiol* **70**(5): 2861-2866.
- Baup, S. 1837. Über eine neue pyrogen- citronensäure, und über benennung der pyrogen säure überhaupt. *Ann de Chim et de Phys* **19**: 29-38.
- Becker, J. and Wittmann, C. 2012. Systems and synthetic metabolic engineering for amino acid production-the heartbeat of industrial strain development. *Curr. Opin. Biotech.* **23**: 718-726 (2012).
- Beckers, G., Nolden, L., and Burkovski, A. 2001. Glutamate synthase of *Corynebacterium glutamicum* is not essential for glutamate synthesis and is regulated by the nitrogen status. *Microbiology* **147**(Pt 11): 2961-2970.

- Bentley, R., and Thiessen, C.P. 1957a. Biosynthesis of itaconic acid in *Aspergillus terreus*. I. Tracer studies with C14-labeled substrates. *J Biol Chem* **226**(2): 673-687.
- Bentley, R., and Thiessen, C.P. 1957b. Biosynthesis of itaconic acid in *Aspergillus terreus*. II. Early stages in glucose dissimilation and the role of citrate. *J Biol Chem* **226**(2): 689-701.
- Bentley, R., and Thiessen, C.P. 1957c. Biosynthesis of itaconic acid in *Aspergillus terreus*. III. The properties and reaction mechanism of cis-aconitic acid decarboxylase. *J Biol Chem* **226**(2): 703-720.
- Benthin, S., and Villadsen, J. 1995. Production of optically pure D-lactate by *Lactobacillus bulgaricus* and purification by crystallization and liquid-liquid extraction. *Appl Microbiol Biotechnol* **42**: 826-829.
- Blombach, B., Riester, T., Wieschalka, S., Ziert, C., Youn, J.W., Wendisch, V.F., and Eikmanns, B.J. 2011. *Corynebacterium glutamicum* tailored for efficient isobutanol production. *Appl Environ Microbiol* **77**(10): 3300-3310.
- Blombach, B., Schreiner, M.E., Moch, M., Oldiges, M., and Eikmanns, B.J. 2007. Effect of pyruvate dehydrogenase complex deficiency on L-lysine production with *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol* **76**(3): 615-623.
- Blombach, B., and Seibold, G.M. 2010. Carbohydrate metabolism in *Corynebacterium glutamicum* and applications for the metabolic engineering of L-lysine production strains. *Appl Microbiol Biotechnol* **86**(5): 1313-1322.
- Bokas, D., Uy, D., Grattepanche, F., Duportail, G., Guedon, E., Delaunay, S., and Goergen, J.L. 2007. Cell envelope fluidity modification for an effective glutamate excretion in *Corynebacterium glutamicum* 2262. *Appl Microbiol Biotechnol* **76**(4): 773-781.
- Bonnarme, P., Gillet, B., Sepulchre, A.M., Role, C., Beloeil, J.C., and Ducrocq, C. 1995. Itaconate biosynthesis in *Aspergillus terreus*. *J Bacteriol* **177**(12): 3573-3578.
- Bothast, R.J., Nichols, N.N., and Dien, B.S. 1999. Fermentations with new recombinant organisms. *Biotechnol Prog* **15**(5): 867-875.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Bringer-Meyer, S., Schimz, K.-L., and Sahm, H. 1986. Pyruvate Decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. Isolation and Partial Characterization. *Arch.Microbiol.* **146**: 105-110.
- Bucher, M., Brandle, R., and Kuhlemeier, C. 1994. Ethanol fermentation in transgenic tobacco expressing *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase. *Embo J* **13**(12): 2755-2763.
- Burdette, D.S., Jung, S.H., Shen, G.J., Hollingsworth, R.I., and Zeikus, J.G. 2002. Physiological function of alcohol dehydrogenases and long-chain (C(30)) fatty acids in

- alcohol tolerance of *Thermoanaerobacter ethanolicus*. Appl Environ Microbiol **68**(4): 1914-1918.
- Burton, K. 1974. The enthalpy change for the reduction of nicotinamide--adenine dinucleotide. Biochem J **143**(2): 365-368.
- Claes, W.A., Puhler, A., and Kalinowski, J. 2002. Identification of two prpDBC gene clusters in *Corynebacterium glutamicum* and their involvement in propionate degradation via the 2-methylcitrate cycle. J Bacteriol **184**(10): 2728-2739.
- Cocaign-Bousquet, M., Guyonvarch, A., and Lindley, N.D. 1996. Growth rate dependent modulation of carbon flux through central metabolism and the kinetic consequences for glucose-limited chemostat cultures of *Corynebacterium glutamicum*. Appl. Environ. Microbiol. **62**: 429-436.
- Cocaign-Bousquet, M., Monnet, C., and Lindley, N.D. 1993. Batch kinetics of *Corynebacterium glutamicum* during growth on various carbon substrates: use of substrate mixtures to localise metabolic bottlenecks. Appl. Microbiol. Biotechnol. **40**: 526-530.
- Conway, T., and Ingram, L.O. 1989. Similarity of *Escherichia coli* propanediol oxidoreductase (fucO product) and an unusual alcohol dehydrogenase from *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol **171**(7): 3754-3759.
- Conway, T., Osman, Y.A., Konnan, J.I., Hoffmann, E.M., and Ingram, L.O. 1987a. Promoter and nucleotide sequences of the *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase. J Bacteriol **169**(3): 949-954.
- Conway, T., Sewell, G.W., Osman, Y.A., and Ingram, L.O. 1987b. Cloning and sequencing of the alcohol dehydrogenase II gene from *Zymomonas mobilis*. J Bacteriol **169**(6): 2591-2597.
- Datta, R., Tsai, S.P., Bonsignore, P., Moon, S.H., and Frank, J.R. 1995. Technological and economic potential of poly (lactic acid) and lactic acid derivatives. FEMS Microbiol Rev **16**: 221-231.
- Dawes, E.A., Ribbons, D.W., and Large, P.J. 1966. The route of ethanol formation in *Zymomonas mobilis*. Biochem J **98**(3): 795-803.
- Delaunay, S., Gounon, P., Lapujade, P., Mailly, E., Oriol, E., Engasser, J.-M., Lindley, N. D. et Goergen, J.-L. 1999. An improved temperature-triggered process for glutamate production with *Corynebacterium glutamicum*. Enz Microbiol Technol **25**, 762-768.
- Delaunay, S., Lapujade, P., Engasser, J.M., and Goergen, J.L. 2002. Flexibility of the metabolism of *Corynebacterium glutamicum* 2262, a glutamic acid-producing bacterium, in response to temperature upshocks. Journal of industrial microbiology & biotechnology **28**(6): 333-337.
- Deng, M.D., and Coleman, J.R. 1999. Ethanol synthesis by genetic engineering in cyanobacteria. Appl Environ Microbiol **65**(2): 523-528.

- Dien, B.S., Cotta, M.A., and Jeffries, T.W. 2003. Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. *Appl Microbiol Biotechnol* **63**(3): 258-266.
- Dietrich, C., Nato, A., Bost, B., Le Marechal, P., and Guyonvarch, A. 2009. Regulation of *ldh* expression during biotin-limited growth of *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology* **155**(Pt 4): 1360-1375.
- Dobritzsch, D., Konig, S., Schneider, G., and Lu, G. 1998. High resolution crystal structure of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. Implications for substrate activation in pyruvate decarboxylases. *J Biol Chem* **273**(32): 20196-20204.
- Dominguez, H., Coccagn-Bousquet, M., and Lindley, N.D. 1993a. Simultaneous consumption of glucose and fructose from sugar mixtures during batch growth of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**: 600-603.
- Dominguez, H., and Lindley, N.D. 1996. Complete Sucrose Metabolism Requires Fructose Phosphotransferase Activity in *Corynebacterium glutamicum* To Ensure Phosphorylation of Liberated Fructose. *Appl Environ Microbiol* **62**(10): 3878-3880.
- Dominguez, H., Nezondet, C., Lindley, N.D., and Coccagn, M. 1993b. Modified carbon flux during oxygen limited growth of *Corynebacterium glutamicum* and the consequences for amino acid overproduction. *Biotechnology letters* **15**(5): 449-454.
- Dominguez, H., Rollin, C., Guyonvarch, A., Guerquin-Kern, J.L., Coccagn-Bousquet, M., and Lindley, N.D. 1998. Carbon-flux distribution in the central metabolic pathways of *Corynebacterium glutamicum* during growth on fructose. *Eur J Biochem* **254**(1): 96-102.
- Dwiarti, L., Otsuka, M., Miura, S., Yaguchi, M., and Okabe, M. 2007. Itaconic acid production using sago starch hydrolysate by *Aspergillus terreus* TN484-M1. *Bioresour Technol* **98**(17): 3329-3337.
- Eggeling, L., and Bott, M. 2005. Handbook of *Corynebacterium glutamicum*. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Ehira, S., Shirai, T., Teramoto, H., Inui, M., and Yukawa, H. 2008. Group 2 sigma factor SigB of *Corynebacterium glutamicum* positively regulates glucose metabolism under conditions of oxygen deprivation. *Appl Environ Microbiol* **74**(16): 5146-5152.
- Eikmanns, B.J. 1992. Identification, sequence analysis, and expression of a *Corynebacterium glutamicum* gene cluster encoding the three glycolytic enzymes glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 3-phosphoglycerate kinase, and triosephosphate isomerase. *J Bacteriol* **174**(19): 6076-6086.
- Eikmanns, B.J., Follettie, M.T., Griot, M.U., and Sinskey, A.J. 1989. The phosphoenolpyruvate carboxylase gene of *Corynebacterium glutamicum*: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression. *Mol Gen Genet* **218**(2): 330-339.
- Emmerling, M., Bailey, J.E., and Sauer, U. 2000. Altered regulation of pyruvate kinase or co-overexpression of phosphofructokinase increases glycolytic fluxes in resting *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* **67**(5): 623-627.

- Engels, V., Lindner, S.N., and Wendisch, V.F. 2008. The global repressor SugR controls expression of genes of glycolysis and of the L-lactate dehydrogenase LdhA in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **190**(24): 8033-8044.
- Engels, V., and Wendisch, V.F. 2007. The DeoR-type regulator SugR represses expression of ptsG in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **189**(8): 2955-2966.
- Ferraboschi, P., Casati, S., Grisenti, P., and Santaniello, E. 1994. Selective enzymatic transformations of itaconic acid derivatives: An access to potentially useful building blocks. *Tetrahedron* **50**: 3251-3258.
- Flieger, M., Kantorova, M., Prell, A., Rezanka, T., and Votruba, J. 2003. Biodegradable plastics from renewable sources. *Folia Microbiol (Praha)* **48**(1): 27-44.
- Flippin, M., Sun, J., Robellet, X., Karaffa, L., Fekete, E., Zeng, A.P., and Kubicek, C.P. 2009. Biodiversity and evolution of primary carbon metabolism in *Aspergillus nidulans* and other *Aspergillus* spp. *Fungal Genet Biol* **46** Suppl 1: S19-S44.
- Fukui, K., Koseki, C., Yamamoto, Y., Nakamura, J., Sasahara, A., Yuji, R., Hashiguchi, K., Usuda, Y., Matsui, K., Kojima, H., and Abe, K. 2011. Identification of succinate exporter in *Corynebacterium glutamicum* and its physiological roles under anaerobic conditions. *J Biotechnol* **154**(1): 25-34.
- Gaigalat, L., Schluter, J.P., Hartmann, M., Mormann, S., Tauch, A., Puhler, A., and Kalinowski, J. 2007. The DeoR-type transcriptional regulator SugR acts as a repressor for genes encoding the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system (PTS) in *Corynebacterium glutamicum*. *BMC Mol Biol* **8**: 104.
- Garrigues, C., Loubiere, P., Lindley, N.D., and Cocalin-Bousquet, M. 1997. Control of the shift from homolactic acid to mixed-acid fermentation in *Lactococcus lactis*: predominant role of the NADH/NAD⁺ ratio. *J Bacteriol* **179**(17): 5282-5287.
- Garvie, E.I. 1980. Bacterial lactate dehydrogenases. *Microbiol Rev* **44**(1): 106-139.
- Georgi, T., Rittmann, D., and Wendisch, V.F. 2005. Lysine and glutamate production by *Corynebacterium glutamicum* on glucose, fructose and sucrose: roles of malic enzyme and fructose-1,6-bisphosphatase. *Metab Eng* **7**(4): 291-301.
- Georgi, T., Engels, V., Wendisch, V.F. 2007. Regulation of L-lactate utilization by the FadR – type regulator LldR of *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **190**(3): 963-971.
- Gerstmeier, R., Wendisch, V.F., Schnicke, S., Ruan, H., Farwic, M., Reinscheid, D., and Eikmanns, B.J. 2003. Acetate metabolism and the regulation in *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biotechnology* **104**: 99-122.
- Gold, R.S., Meagher, M.M., Tong, S., Hutkins, R.W., and Conway, T. 1996. Cloning and expression of the *Zymomonas mobilis* "production of ethanol" genes in *Lactobacillus casei*. *Curr Microbiol* **33**(4): 256-260.
- Gourdon, P., Raherimandimby, M., Dominguez, H., Cocalin-Bousquet, M., and Lindley, N.D. 2003. Osmotic stress, glucose transport capacity and consequences for glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol* **104**(1-3): 77-85.

- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. **166**:557–580.
- Hasegawa, S., Uematsu, K., Natsuma, Y., Suda, M., Hiraga, K., Jojima, T., Inui, M., Yukawa, H. 2012. Improvement of the redox balance increases L-valine production by *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation conditions. Appl Environ Microbiol **78**(3):865-75
- Hespell, R.B., Wyckoff, H., Dien, B.S., and Bothast, R.J. 1996. Stabilization of pet operon plasmids and ethanol production in *Escherichia coli* strains lacking lactate dehydrogenase and pyruvate formate-lyase activities. Appl Environ Microbiol **62**(12): 4594-4597.
- Hodgson, J. 1998. LION and Degussa apply genomics to fermentation. Nat Biotechnol **16**(8): 715.
- Hofvendahl, K., and Hahn-Hagerdal, B. 2000. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources(1). Enzyme Microb Technol **26**(2-4): 87-107.
- Hols, P., Kleerebezem, M., Schanck, A.N., Ferain, T., Hugenholtz, J., Delcour, J., and de Vos, W.M. 1999. Conversion of *Lactococcus lactis* from homolactic to homoalanine fermentation through metabolic engineering. Nat Biotechnol **17**(6): 588-592.
- Hoppner, T.C., and Doelle, H.W. 1983. Purification and Kinetic Characteristics of Pyruvate Decarboxylase and Ethanol Dehydrogenase from *Zymomonas mobilis* in Relation to Ethanol Production. Eur.J.Appl.Microbiol.Biotechnol. **17**: 152-157.
- Huhn, S., Jolkver, E., Kramer, R., and Marin, K. 2011. Identification of the membrane protein SucE and its role in succinate transport in *Corynebacterium glutamicum*. Appl Microbiol Biotechnol **89**(2): 327-335.
- Huthmacher, K., Pfefferle, W., Puhler, A., and Kalinowski, J. 2002. Strategy to sequence the genome of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032: use of a cosmid and a bacterial artificial chromosome library. J Biotechnol **95**(1): 25-38.
- Ikeda, M., and Nakagawa, S. 2003. The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological processes. Appl Microbiol Biotechnol **62**(2-3): 99-109.
- Ingram, L.O. 1990. Ethanol tolerance in bacteria. Crit Rev Biotechnol **9**(4): 305-319.
- Ingram, L.O., Aldrich, H.C., Borges, A.C., Causey, T.B., Martinez, A., Morales, F., Saleh, A., Underwood, S.A., Yomano, L.P., York, S.W., Zaldivar, J., and Zhou, S. 1999. Enteric bacterial catalysts for fuel ethanol production. Biotechnol Prog **15**(5): 855-866.
- Ingram, L.O., Conway, T., Clark, D.P., Sewell, G.W., and Preston, J.F. 1987. Genetic engineering of ethanol production in *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol **53**(10): 2420-2425.
- Ingram, L.O., Gomez, P.F., Lai, X., Moniruzzaman, M., Wood, B.E., Yomano, L.P., and York, S.W. 1998. Metabolic engineering of bacteria for ethanol production. Biotechnol Bioeng **58**(2-3): 204-214.

- Inui, M., Kawaguchi, H., Murakami, S., Vertes, A.A., and Yukawa, H. 2004a. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for fuel ethanol production under oxygen-deprivation conditions. *J Mol Microbiol Biotechnol* **8**(4): 243-254.
- Inui, M., Murakami, S., Okino, S., Kawaguchi, H., Vertes, A.A., and Yukawa, H. 2004b. Metabolic analysis of *Corynebacterium glutamicum* during lactate and succinate productions under oxygen deprivation conditions. *J Mol Microbiol Biotechnol* **7**(4): 182-196.
- Inui, M., Suda, M., Okino, S., Nonaka, H., Puskas, L.G., Vertes, A.A., and Yukawa, H. 2007. Transcriptional profiling of *Corynebacterium glutamicum* metabolism during organic acid production under oxygen deprivation conditions. *Microbiology* **153**(8): 2491-2504.
- Jakob, K., Satorhelyi, P., Lange, C., Wendisch, V.F., Silakowski, B., Scherer, S., Neuhaus K. 2007. Gene expression analysis of *Corynebacterium glutamicum* subjected to long-term lactic acid adaptation. *J Bacteriol* **189**:5582–5590.
- Jaklitsch, W.M., Kubicek, C.P., Scrutton, M.C. 1991. The subcellular organization of itaconate biosynthesis in *Aspergillus terreus*. *J. Gen. Microbiol.* **137**:533-539.
- Jakoby, M., Kramer, R., and Burkovski, A. 1999. Nitrogen regulation in *Corynebacterium glutamicum*: isolation of genes involved and biochemical characterization of corresponding proteins. *FEMS Microbiol Lett* **173**(2): 303-310.
- Jeffries, T.W., and Jin, Y.S. 2004. Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol* **63**(5): 495-509.
- Jetten, M.S., Gubler, M.E., Lee, S.H., and Sinskey, A.J. 1994a. Structural and functional analysis of pyruvate kinase from *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol* **60**(7): 2501-2507.
- Jetten, M.S.M., Pitoc, G.A., Follettie, M.T., and Sinskey, A.J. 1994b. Regulation of phospho(enol)-pyruvate-and oxaloacetate-converting enzymes in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol* **41**(1): 47-52.
- Jojima, T., Fujii, M., Mori, E., Inui, M., and Yukawa, H. 2010. Engineering of sugar metabolism of *Corynebacterium glutamicum* for production of amino acid L-alanine under oxygen deprivation. *Appl Microbiol Biotechnol* **87**(1): 159-165.
- Kalinowski, J., Bathe, B., Bartels, D., Bischoff, N., Bott, M., Burkovski, A., Dusch, N., Eggeling, L., Eikmanns, B.J., Gaigalat, L., Goesmann, A., Hartmann, M., Huthmacher, K., Kramer, R., Linke, B., McHardy, A.C., Meyer, F., Mockel, B., Pfefferle, W., Puhler, A., Rey, D.A., Ruckert, C., Rupp, O., Sahm, H., Wendisch, V.F., Wiegrabe, I., and Tauch, A. 2003. The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. *J Biotechnol* **104**(1-3): 5-25.
- Kalnenieks, U., Galinina, N., Toma, M.M., and Marjutina, U. 2002. Ethanol cycle in an ethanologenic bacterium. *FEBS Lett* **522**(1-3): 6-8.

- Kalnenieks, U., Galinina, N., Toma, M.M., and Poole, R.K. 2000. Cyanide inhibits respiration yet stimulates aerobic growth of *Zymomonas mobilis*. *Microbiology* **146** (Pt 6): 1259-1266.
- Kanamasa, S., Dwiarti, L., Okabe, M., and Park, E.Y. 2008. Cloning and functional characterization of the cis-aconitic acid decarboxylase (CAD) gene from *Aspergillus terreus*. *Appl Microbiol Biotechnol* **80**(2): 223-229.
- Katsumata, R., Ozaki, A., Oka, T., and Furuya, A. 1984. Protoplast transformation of glutamate-producing bacteria with plasmid DNA. *J Bacteriol* **159**(1): 306-311.
- Kawahara, Y., Takahashi-Fuke, K., Shimizu, E., Nakamatsu, T., and Nakamori, S. 1997. Relationship between the glutamate production and the activity of 2-oxoglutarate dehydrogenase in *Brevibacterium lactofermentum*. *Biosci Biotechnol Biochem* **61**(7): 1109-1112.
- Kelle, R., Hermann, T., and Bathe, B. 2005. L-Lysine production, Handbook of *Corynebacterium glutamicum*. In L. Eggeling and M. Bott (ed.). 11: 465–488. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Kim, J., Fukuda, H., Hirasawa, T., Nagahisa, K., Nagai, K., Wachi, M., and Shimizu, H. 2010. Requirement of de novo synthesis of the OdhI protein in penicillin-induced glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*. *Applied microbiology and biotechnology* **86**(3): 911-920.
- Kim, J., Hirasawa, T., Sato, Y., Nagahisa, K., Furusawa, C., and Shimizu, H. 2009. Effect of odhA overexpression and odhA antisense RNA expression on Tween-40-triggered glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*. *Applied microbiology and biotechnology* **81**(6): 1097-1106.
- Kin, R., Sai, T., and So, S. 1998. Itaconate copolymer with quadratic nonlinear optical characteristic. JP Patent. pp. 10,293,331.
- Kinoshita, S., Udaka, S. and Shimono, M. 1957. Studies on the amino acid fermentation Part I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *J Gen Microbiol* **3**: 193-205.
- Kirchner, O., and Tauch, A. 2003. Tools for genetic engineering in the amino acid-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol* **104**(1-3): 287-299.
- Koffas, M.A., Jung, G.Y., Aon, J.C., and Stephanopoulos, G. 2002. Effect of pyruvate carboxylase overexpression on the physiology of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol* **68**(11): 5422-5428.
- Kramer, R., and Lambert, C. 1990. Uptake of glutamate in *Corynebacterium glutamicum*. 2. Evidence for a primary active transport system. *Eur J Biochem* **194**(3): 937-944.
- Kramer, R., Lambert, C., Hoischen, C., and Ebbighausen, H. 1990. Uptake of glutamate in *Corynebacterium glutamicum*. 1. Kinetic properties and regulation by internal pH and potassium. *Eur J Biochem* **194**(3): 929-935.

- Kronmeyer, W., Peekhaus, N., Kramer, R., Sahm, H., and Eggeling, L. 1995. Structure of the gluABCD cluster encoding the glutamate uptake system of *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **177**(5): 1152-1158.
- Kuenz, A., Gallenmuller, Y., Willke, T., and Vorlop, K.D. 2012. Microbial production of itaconic acid: developing a stable platform for high product concentrations. *Appl Microbiol Biotechnol* **96**(5): 1209-1216.
- Kyla-Nikkila, K., Hujanen, M., Leisola, M., and Palva, A. 2000. Metabolic engineering of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 for production of pure L-(+)-lactic acid. *Appl Environ Microbiol* **66**(9): 3835-3841.
- Larisch, C., Nakunst, D., Huser, A.T., Tauch, A., Kalinowski, J. 2007. The alternative sigma factor SigB of *Corynebacterium glutamicum* modulates global gene expression during transition from exponential growth to stationary phase. *BMC Genomics* 8:4
- Lawford, H.G., and Rousseau, J.D. 1995. Comparative energetics of glucose and xylose metabolism in ethanologenic recombinant *Escherichia coli* B. *Appl Biochem Biotechnol*
- Leuchtenberger, W., Huthmacher, K., and Drauz, K. 2005. Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* **69**(1): 1-8.
- Li, A., Pfelzer, N., Zuijderwijk, R., Brickwedde, A., van Zeijl, C., and Punt, P. 2013. Reduced by-product formation and modified oxygen availability improve itaconic acid production in *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol*.
- Liebl, W. 2005. *Corynebacterium* taxonomy. In: Eggeling, L., Bott, M. (Eds.), *Handbook of Corynebacterium glutamicum*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 9–34.
- Liebl, W., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., and Schleifer, K.H. 1991. The genus *Corynebacterium* – nonmedical. Springer, New York.
- Litsanov, B., Brocker, M., and Bott, M. 2012. Toward homosuccinate fermentation: metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for anaerobic production of succinate from glucose and formate. *Appl Environ Microbiol* **78**(9): 3325-3337.
- Liu, Q., Ouyang, S.P., Kim, J., and Chen, G.Q. 2007. The impact of PHB accumulation on L-glutamate production by recombinant *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of biotechnology* **132**(3): 273-279.
- Ma, K., Loessner, H., Heider, J., Johnson, M.K., and Adams, M.W. 1995. Effects of elemental sulfur on the metabolism of the deep-sea hyperthermophilic archaeon *Thermococcus* strain ES-1: characterization of a sulfur-regulated, non-heme iron alcohol dehydrogenase. *J Bacteriol* **177**(16): 4748-4756.
- Marquet, M., Uribellarea, J.L., Huchénq, A., Lanéelle, G., and Goma, G. 1986. Glutamate excretion by *Corynebacterium glutamicum*: a study of glutamate accumulation during a fermentation course. *FEMS Microbiol. Lett.* **25**: 220-223.

- Martinez, I., Bennett, G.N., and San, K.Y. 2010. Metabolic impact of the level of aeration during cell growth on anaerobic succinate production by an engineered *Escherichia coli* strain. *Metab Eng* **12**(6): 499-509.
- Merkens, H., Beckers, G., Wirtz, A., and Burkovski, A. 2005. Vanillate metabolism in *Corynebacterium glutamicum*. *Curr Microbiol* **51**(1): 59-65.
- Miles, J.S., and Guest, J.R. 1987. Molecular genetic aspects of the citric acid cycle of *Escherichia coli*. *Biochem Soc Symp* **54**: 45-65.
- Molenaar, D., van der Rest, M.E., Drysch, A., and Yucel, R. 2000. Functions of the membrane-associated and cytoplasmic malate dehydrogenases in the citric acid cycle of *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **182**(24): 6884-6891.
- Molenaar, D., van der Rest, M.E., and Petrovic, S. 1998. Biochemical and genetic characterization of the membrane-associated malate dehydrogenase (acceptor) from *Corynebacterium glutamicum*. *Eur J Biochem* **254**(2): 395-403.
- Moon, M.W., Kim, H.J., Oh, T.K., Shin, C.S., Lee, J.S., Kim, S.J., and Lee, J.K. 2005. Analyses of enzyme II gene mutants for sugar transport and heterologous expression of fructokinase gene in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *FEMS Microbiol Lett* **244**(2): 259-266.
- Mori, M., and Shiio, I. 1985a. Purification and some properties of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Brevibacterium flavum* and its aspartate-overproducing mutant. *J Biochem* **97**(4): 1119-1128.
- Mori, M., and Shiio, I. 1985b. Synergistic inhibition of phosphoenolpyruvate carboxylase by aspartate and 2-oxoglutarate in *Brevibacterium flavum*. *J Biochem* **98**(6): 1621-1630.
- Mori, M., and Shiio, I. 1987. Phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase systems and sugar metabolism in *Brevibacterium flavum*. *Agric. Biol. Chem.* **51**: 2671-2678.
- Nakamura, J., Hirano, S., Ito, H., and Wachi, M. 2007. Mutations of the *Corynebacterium glutamicum* NCgl1221 gene, encoding a mechanosensitive channel homolog, induce L-glutamic acid production. *Appl Environ Microbiol* **73**(14): 4491-4498.
- Nakano, M.M., Zuber, P., and Sonenshein, A.L. 1998. Anaerobic Regulation of *Bacillus subtilis* Krebs Cycle Genes. *J Bacteriol* **180**(13): 3304-3311.
- Neale, A.D., Scopes, R.K., Wettenhall, R.E., and Hoogenraad, N.J. 1987a. Nucleotide sequence of the pyruvate decarboxylase gene from *Zymomonas mobilis*. *Nucleic Acids Res* **15**(4): 1753-1761.
- Neale, A.D., Scopes, R.K., Wettenhall, R.E., and Hoogenraad, N.J. 1987b. Pyruvate decarboxylase of *Zymomonas mobilis*: isolation, properties, and genetic expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **169**(3): 1024-1028.
- Netzer, R., Peters-Wendisch, P., Eggeling, L., and Sahm, H. 2004. Cometabolism of a nongrowth substrate: L-serine utilization by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol* **70**(12): 7148-7155.

- Neuweger, H., Persicke, M., Albaum, S.P., Bekel, T., Dondrup, M., Huser, A.T., Winnebald, J., Schneider, J., Kalinowski, J., and Goesmann, A. 2009. Visualizing post genomics data-sets on customized pathway maps by ProMeTra-aeration-dependent gene expression and metabolism of *Corynebacterium glutamicum* as an example. *BMC Syst Biol* **3**: 82.
- Nevoigt, E. 2008. Progress in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **72**(3): 379-412.
- Niebisch, A., Kabus, A., Schultz, C., Weil, B., and Bott, M. 2006. Corynebacterial protein kinase G controls 2-oxoglutarate dehydrogenase activity via the phosphorylation status of the OdhI protein. *J Biol Chem* **281**(18): 12300-12307.
- Nishimura, T., A. A. Vertès, Y. Shinoda, M. Inui, and H. Yukawa. 2007. Anaerobic growth of *Corynebacterium glutamicum* using nitrate as a terminal electron acceptor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **75**: 889-897.
- Okabe, M., Lies, D., Kanamasa, S., and Park, E.Y. 2009. Biotechnological production of itaconic acid and its biosynthesis in *Aspergillus terreus*. *Appl Microbiol Biotechnol* **84**(4): 597-606
- O'Mullan, P.J., Buchholz, S.E., Chase, T., and Eveleigh, D.E. 1995. Roles of alcohol dehydrogenases of *Zymomonas mobilis* (ZADH): characterization of a ZADH-2-negative mutant. *Appl. Microbiol. Biotech.* **43**(675-678).
- Ohnishi, J., Katahira, R., Mitsuhashi, S., Kakita, S., and Ikeda, M. 2005. A novel gnd mutation leading to increased L-lysine production in *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol Lett* **242**(2): 265-274.
- Ohnishi, J., Mitsuhashi, S., Hayashi, M., Ando, S., Yokoi, H., Ochiai, K., and Ikeda, M. 2002. A novel methodology employing *Corynebacterium glutamicum* genome information to generate a new L-lysine-producing mutant. *Appl Microbiol Biotechnol* **58**(2): 217-223.
- Okino, S., Inui, M., and Yukawa, H. 2005. Production of organic acids by *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation. *Appl Microbiol Biotechnol* **68**(4): 475-480.
- Okino, S., Noburyu, R., Suda, M., Jojima, T., Inui, M., and Yukawa, H. 2008a. An efficient succinic acid production process in a metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* strain. *Appl Microbiol Biotechnol* **81**(3): 459-464.
- Okino, S., Suda, M., Fujikura, K., Inui, M., and Yukawa, H. 2008b. Production of D-lactic acid by *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation. *Appl Microbiol Biotechnol* **78**(3): 449-454.
- Omumasaba, C.A., Okai, N., Inui, M., and Yukawa, H. 2004. *Corynebacterium glutamicum* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoforms with opposite, ATP-dependent regulation. *J Mol Microbiol Biotechnol* **8**(2): 91-103.

- Oultram, J. D., Burr, I. D., Elmore, M. J., and Minton, N. P. 1993. Cloning and sequence analysis of the genes encoding phosphotransbutyrylase and butyrate kinase from *Clostridium acetobutylicum* NCIMB 8052. *Gene* **131**(1): 107-112.
- Oultram, I.D., Loughlin, M., Swinfield, T.J., Bre h m, J.K., Thompson, D.E., Minton, N.P. 1988. Introduction of plasmids into whole cells of *Clostridium acetobutylicum* by electroporation. *FEMS Microbiology Letters* **56**(1988) 83-88.
- Ozaki, A., Katsumata, R., Oka, T., and Furuya, A. 1984. Functional expression of the genes of *Escherichia coli* in gram-positive *Corynebacterium glutamicum*. *Mol Gen Genet* **196**(1): 175-178.
- Ozaki, H., and Shiio, I. 1969. Regulation of the TCA and glyoxylate cycles in *Brevibacterium flavum*. II. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase and pyruvate kinase. *J Biochem* **66**(3): 297-311.
- Parche, S., Burkovski, A., Sprenger, G.A., Weil, B., Kramer, R., and Titgemeyer, F. 2001. *Corynebacterium glutamicum*: a dissection of the PTS. *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**(3): 423-428.
- Park, D.H., and Plapp, B.V. 1991. Isoenzymes of horse liver alcohol dehydrogenase active on ethanol and steroids. cDNA cloning, expression, and comparison of active sites. *J Biol Chem* **266**(20): 13296-13302.
- Park, S.Y., Kim, H.K., Yoo, S.K., Oh, T.K., and Lee, J.K. 2000. Characterization of glk, a gene coding for glucose kinase of *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol Lett* **188**(2): 209-215.
- Peters-Wendisch, P.G., Kreutzer, C., Kalinowski, J., Patek, M., Sahm, H., and Eikmanns, B.J. 1998. Pyruvate carboxylase from *Corynebacterium glutamicum*: characterization, expression and inactivation of the pyc gene. *Microbiology* **144** (Pt 4): 915-927.
- Peters-Wendisch, P.G., Schiel, B., Wendisch, V.F., Katsoulidis, E., Mockel, B., Sahm, H., and Eikmanns, B.J. 2001. Pyruvate carboxylase is a major bottleneck for glutamate and lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**(2): 295-300.
- Pons, B.J., Duchiron, F., Duperray, F., Guyonvarch, A., Melaouene, S., and More, J. . 1993. Les corynébactéries. In Leveau, J.Y., Bouix, N. (eds). *Microbiologie industrielle*. Paris: Tec & Doc-Lavoisier et Apria. pp. 393-421.
- Raj, K.C., Talarico, L.A., Ingram, L.O., and Maupin-Furlow, J.A. 2002. Cloning and characterization of the *Zymobacter palmae* pyruvate decarboxylase gene (pdc) and comparison to bacterial homologues. *Appl Environ Microbiol* **68**(6): 2869-2876.
- Reid, M.F., and Fewson, C.A. 1994. Molecular characterization of microbial alcohol dehydrogenases. *Crit Rev Microbiol* **20**(1): 13-56.
- Riedel, C., Rittmann, D., Dangel, P., Mockel, B., Petersen, S., Sahm, H., and Eikmanns, B.J. 2001. Characterization of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene from *Corynebacterium glutamicum* and significance of the enzyme for growth and amino acid production. *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**(4): 573-583.

- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sasaki, M., Jojima, T., Inui, M., and Yukawa, H. 2008. Simultaneous utilization of D-cellobiose, D-glucose, and D-xylose by recombinant *Corynebacterium glutamicum* under oxygen-deprived conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* **81**(4):691–699.
- Sasaki, M., Jojima, T., Inui, M., and Yukawa, H. 2010. Xylitol production by recombinant *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation. *Appl Microbiol Biotechnol* **86**(4): 1057-1066.
- Sato, H., Orishimo, K., Shirai, T., Hirasawa, T., Nagahisa, K., Shimizu, H., and Wachi, M. 2008. Distinct roles of two anaplerotic pathways in glutamate production induced by biotin limitation in *Corynebacterium glutamicum*. *J Biosci Bioeng* **106**(1): 51-58.
- Sauer, U., and Eikmanns, B.J. 2005. The PEP-pyruvate-oxaloacetate node as the switch point for carbon flux distribution in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **29**(4): 765-794.
- Schmitt, B. 1975. Aldehyde dehydrogenase activity of a complex particle from *E. coli*. *Biochimie* **57**(9): 1001-1004.
- Schreiner, M.E., and Eikmanns, B.J. 2005. Pyruvate:quinone oxidoreductase from *Corynebacterium glutamicum*: purification and biochemical characterization. *J Bacteriol* **187**(3): 862-871.
- Schreiner, M.E., Riedel, C., Holatko, J., Patek, M., and Eikmanns, B.J. 2006. Pyruvate:quinone oxidoreductase in *Corynebacterium glutamicum*: molecular analysis of the pqq gene, significance of the enzyme, and phylogenetic aspects. *J Bacteriol* **188**(4): 1341-1350.
- Schwinde, J.W., Hertz, P.F., Sahm, H., Eikmanns, B.J., and Guyonvarch, A. 2001. Lipoamide dehydrogenase from *Corynebacterium glutamicum*: molecular and physiological analysis of the lpd gene and characterization of the enzyme. *Microbiology* **147**(Pt 8): 2223-2231.
- Schwinde, J.W., Thum-Schmitz, N., Eikmanns, B.J., and Sahm, H. 1993. Transcriptional analysis of the gap-pgk-tpi-ppc gene cluster of *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **175**(12): 3905-3908.
- Seibold, G., Auchter, M., Berens, S., Kalinowski, J., and Eikmanns, B.J. 2006. Utilization of soluble starch by a recombinant *Corynebacterium glutamicum* strain: growth and lysine production. *J Biotechnol* **124**(2): 381-391.
- Sekine, H., Shimada, T., Hayashi, C., Ishiguro, A., Tomita, F., and Yokota, A. 2001. H⁺-ATPase defect in *Corynebacterium glutamicum* abolishes glutamic acid production with enhancement of glucose consumption rate. *Appl Microbiol Biotechnol* **57**(4): 534-540.
- Shiio, I., and Ujigawa, K. 1978. Enzymes of the glutamate and aspartate synthetic pathways in a glutamate-producing bacterium, *Brevibacterium flavum*. *J Biochem* **84**(3): 647-657.

- Shimizu, H., Tanaka, H., Nakato, A., Nagahisa, K., Kimura, E., and Shioya, S. 2003. Effects of the changes in enzyme activities on metabolic flux redistribution around the 2-oxoglutarate branch in glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*. *Bioprocess Biosyst Eng* **25**(5): 291-298.
- Silberbach, M., Huser, A., Kalinowski, J., Puhler, A., Walter, B., Kramer, R., and Burkovski, A. 2005a. DNA microarray analysis of the nitrogen starvation response of *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol* **119**(4): 357-367.
- Silberbach, M., Schafer, M., Huser, A. T., Kalinowski, J., Puhler, A., Kramer, R., and Burkovski, A. 2005b. Adaptation of *Corynebacterium glutamicum* to ammonium limitation: a global analysis using transcriptome and proteome techniques, *Appl Environ Microbiol* **71**(5): 2391-2402.
- Sonntag, K., Schwinde, J., de Graaf, A.A., Marx, A., Eikmanns, B.J., Wiechert, W., and Sahm, H. 1995. ¹³C NMR studies of the fluxes in the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* during growth and overproduction of amino acids in batch cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol* **44**: 489-495.
- Stackebrandt, E., Rainey, F.A., and Ward-Rainey, N.L. 1997. Proposal for a new hierarchical classification system, Actinobacteria classis nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**: 479-491.
- Stansen, C., Uy, D., Delaunay, S., Eggeling, L., Goergen, J.L., and Wendisch, V.F. 2005. Characterization of a *Corynebacterium glutamicum* lactate utilization operon induced during temperature-triggered glutamate production. *Appl Environ Microbiol* **71**(10): 5920-5928.
- Stephanopoulos, G., and Vallino, J.J. 1991. Network rigidity and metabolic engineering in metabolite overproduction. *Science* **252**(5013): 1675-1681.
- Stulke, J., and Hillen, W. 1999. Carbon catabolite repression in bacteria. *Curr Opin Microbiol* **2**(2): 195-201.
- Srivastava, P., and Deb, J.K. 2005. Gene expression systems in corynebacteria. *Protein Expr Purif.* **40**(2):221–229.
- Suda, M., Teramoto, H., Imamiya, T., Inui, M., and Yukawa, H. 2008. Transcriptional regulation of *Corynebacterium glutamicum* methionine biosynthesis genes in response to methionine supplementation under oxygen deprivation. *Appl Microbiol Biotechnol* **81**(3): 505-513.
- Sugimoto, S., and Shii, I. 1989a. Regulation of enzymes for erythrose 4-phosphate synthesis in *Brevibacterium flavum*. *Agric. Biol. Chem.* **53**: 2081-2087.
- Sugimoto, S.-i., and Shii, I. 1989b. Fructose metabolism and regulation of 1-phosphofructokinase and 6-phosphofructokinase in *Brevibacterium flavum*. *Agricultural and biological chemistry* **53**(5): 1261-1268.
- Takeno, S., Ohnishi, J., Komatsu, T., Masaki, T., Sen, K. & Ikeda, M. 2007. Anaerobic growth and potential for amino acid production by nitrate respiration in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol* **75**: 1173–1182.

- Talarico, L.A., Gil, M.A., Yomano, L.P., Ingram, L.O., and Maupin-Furlow, J.A. 2005. Construction and expression of an ethanol production operon in Gram-positive bacteria. *Microbiology* **151**(Pt 12): 4023-4031.
- Talarico, L.A., Ingram, L.O., and Maupin-Furlow, J.A. 2001. Production of the Gram-positive *Sarcina ventriculi* pyruvate decarboxylase in *Escherichia coli*. *Microbiology* **147**(Pt 9): 2425-2435.
- Tanaka, Y., Okai, N., Teramoto, H., Inui, M., and Yukawa, H. 2008a. Regulation of the expression of phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system (PTS) genes in *Corynebacterium glutamicum* R. *Microbiology* **154**(Pt 1): 264-274.
- Tanaka, Y., Teramoto, H., Inui, M., and Yukawa, H. 2008b. Regulation of expression of general components of the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system (PTS) by the global regulator SugR in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol* **78**(2): 309-318.
- Tani, A., Sakai, Y., Ishige, T., and Kato, N. 2000. ThermosTableau NADP(+)-dependent medium-chain alcohol dehydrogenase from *Acinetobacter* sp. strain M-1: purification and characterization and gene expression in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **66**(12): 5231-5235.
- Tauch, A., Homann, I., Mormann, S., Ruberg, S., Billault, A., Bathe, B., Brand, S., Brockmann-Gretza, O., Ruckert, C., Schischka, N., Wrenger, C., Hoheisel, J., Mockel, B., Huthmacher, K., Pfefferle, W., Puhler, A., and Kalinowski, J. 2002. Strategy to sequence the genome of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032: use of a cosmid and a bacterial artificial chromosome library. *J Biotechnol* **95**(1): 25-38.
- Teramoto, H., Inui, M., and Yukawa, H. 2010. Regulation of genes involved in sugar uptake, glycolysis and lactate production in *Corynebacterium glutamicum*. *Future Microbiol* **5**(10): 1475-1481.
- Tevz, G., Bencina, M., and Legisa, M. 2010. Enhancing itaconic acid production by *Aspergillus terreus*. *Appl Microbiol Biotechnol* **87**(5): 1657-1664.
- Toyoda, K., Teramoto, H., Inui, M., and Yukawa, H. 2008. Expression of the gapA gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Corynebacterium glutamicum* is regulated by the global regulator SugR. *Appl Microbiol Biotechnol* **81**(2): 291-301.
- Toyoda, K., Teramoto, H., Inui, M., and Yukawa, H. 2009. The ldhA gene, encoding fermentative L-lactate dehydrogenase of *Corynebacterium glutamicum*, is under the control of positive feedback regulation mediated by LldR. *J Bacteriol* **191**(13): 4251-4258.
- Tsuchidate, T., Tateno, T., Okai, N., Tanaka, T., Ogino, C., and Kondo, A. 2011. Glutamate production from beta-glucan using endoglucanase-secreting *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol* **90**(3): 895-901.
- Uy, D., Delaunay, S., Goergen, J. L., and Engasser, J. M. 2005. Dynamics of glutamate synthesis and excretion fluxes in batch and continuous cultures of temperature-triggered *Corynebacterium glutamicum*. *Bioprocess Biosyst Eng* **27** (3): 153-162.

- Uy, D., Delaunay, S., Germain, P., Engasser, J.M., and Goergen, J.L. 2003. Instability of glutamate production by *Corynebacterium glutamicum* 2262 in continuous culture using the temperature-triggered process. *J Biotechnol* **104**(1-3): 173-184.
- Vallino, J., and Stephanopoulos, G. 1993. Metabolic flux distributions in *Corynebacterium glutamicum* during growth and lysine overproduction. *Biotechnol Bioeng.* **41**(6): 633-646
- Vangnai, A.S., Arp, D.J., and Sayavedra-Soto, L.A. 2002. Two distinct alcohol dehydrogenases participate in butane metabolism by *Pseudomonas butanovora*. *J Bacteriol* **184**(7): 1916-1924.
- Vemuri, G.N., Eiteman, M.A., and Altman, E. 2002. Succinate production in dual-phase *Escherichia coli* fermentations depends on the time of transition from aerobic to anaerobic conditions. *J Ind Microbiol Biotechnol* **28**(6): 325-332.
- Viikari, L. 1988. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas*. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* **7**: 237-261.
- Von der Osten, C. H., Gioannetti, C. et Sinskey, A. J. 1989. Design of a defined for growth of *Corynebacterium glutamicum* in which citrate facilitates iron uptake. *Biotechnol Lett* **11**, 11-16.
- Wendisch, V.F. 2003. Genome-wide expression analysis in *Corynebacterium glutamicum* using DNA microarrays. *J Biotechnol* **104**(1-3): 273-285.
- Wendisch, V.F. 2007. Amino acid biosynthesis - pathways, regulation and metabolic engineering. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Wendisch, V.F., Bott, M., and Eikmanns, B.J. 2006. Metabolic engineering of *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* for biotechnological production of organic acids and amino acids. *Curr Opin Microbiol* **9**(3): 268-274.
- Wendisch, V.F., de Graaf, A.A., Sahm, H., and Eikmanns, B.J. 2000. Quantitative determination of metabolic fluxes during cointilization of two carbon sources: comparative analyses with *Corynebacterium glutamicum* during growth on acetate and/or glucose. *J Bacteriol* **182**(11): 3088-3096.
- Willke, T., Vorlop, K.D. 2001. Biotechnological production of itaconic acid. *Appl Microbiol Biotechnol* **56**(3-4): 289-95.
- Wood, B.E., and Ingram, L.O. 1992. Ethanol production from cellobiose, amorphous cellulose, and crystalline cellulose by recombinant *Klebsiella oxytoca* containing chromosomally integrated *Zymomonas mobilis* genes for ethanol production and plasmids expressing thermostable cellulase genes from *Clostridium thermocellum*. *Appl Environ Microbiol* **58**(7): 2103-2110.
- Woods S A, Miles J S, Roberts R E, Guest J R. 1986. Structural and functional relationships between fumarase and aspartase: nucleotide sequence of the fumarase (fumC) and aspartase (aspA) genes of *Escherichia coli* K-12. *Biochem J.* **237**:547–557.

- Yamamoto, S., Gunji, W., Suzuki, H., Toda, H., Suda, M., Jojima, T., Inui, M., and Yukawa, H. 2012. Overexpression of genes encoding glycolytic enzymes in *Corynebacterium glutamicum* enhances glucose metabolism and alanine production under oxygen deprivation conditions. *Appl Environ Microbiol* **78**(12): 4447-4457.
- Yao, W., Chu, C., Deng, X., Zhang, Y., Liu, M., Zheng, P., and Sun, Z. 2009a. Display of alpha-amylase on the surface of *Corynebacterium glutamicum* cells by using NCgl1221 as the anchoring protein, and production of glutamate from starch. *Arch Microbiol* **191**(10): 751-759.
- Yao, W., Deng, X., Zhong, H., Liu, M., Zheng, P., Sun, Z., and Zhang, Y. 2009b. Double deletion of *dtsR1* and *pyc* induce efficient L-glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum*. *J Ind Microbiol Biotechnol* **36**(7): 911-921.
- Yoon, S.Y., Noh, H.S., Kim, E.H., and Kong, K.H. 2002. The highly stable alcohol dehydrogenase of *Thermomicrobium roseum*: purification and molecular characterization. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **132**(2): 415-422.
- Yukawa, H., Inui, M., and Vertès, A.A. 2007a. Genomes and Genome-Level Engineering of Amino Acid-Producing Bacteria. In: V. F. Wendisch (ed.), *Amino acid biosynthesis pathways, regulation and metabolic engineering*. Springer, Heidelberg, Germany.
- Yukawa, H., Omumasaba, C.A., Nonaka, H., Kos, P., Okai, N., Suzuki, N., Suda, M., Tsuge, Y., Watanabe, J., Ikeda, Y., Vertes, A.A., and Inui, M. 2007b. Comparative analysis of the *Corynebacterium glutamicum* group and complete genome sequence of strain R. *Microbiology* **153**(Pt 4): 1042-1058.
- Zaldivar, J., Nielsen, J., Olsson L. 2001. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Appl Microbiol Biotechnol* **56**(1-2):17-34.
- Zeikus, J.G., Jain, M.K., and Elankovan, P. 1999. Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**(5): 542-552.

Titre: Étude du métabolisme de *Corynebacterium glutamicum* au cours de procédés aéro-anaérobies et ses applications en génie métabolique.

L'objectif de cette thèse est l'étude du métabolisme de *Corynebacterium glutamicum*, et de ses potentialités, au cours de procédés aéro-anaérobies. Après une première phase avec apport d'oxygène pour permettre la croissance bactérienne, une phase anaérobie est induite par arrêt de l'aération et réduction de la vitesse d'agitation. Dans ces conditions, le lactate est le principal métabolite produit. La synthèse de ce dernier a été améliorée en jouant, essentiellement, sur le moment de la transition entre les 2 phases. *C. glutamicum* 2262 peut ainsi produire 27 g/l de lactate en mode discontinu et 55 g/l en mode semi-continu, suite à un arrêt de l'aération lorsque la concentration en biomasse est d'environ 2,6 g/l. Afin d'exploiter la voie de synthèse d'acide lactique chez *C. glutamicum* pour la production d'éthanol, les gènes PDC et ADH de *Zymomonas mobilis* ont été exprimés sous le contrôle du promoteur *ldhA* endogène de *C. glutamicum* 2262 et d'une souche de *C. glutamicum* 2262 sans *ldhA*. Bien que les productivités en éthanol de ces souches aient été relativement faibles, la suppression de *ldhA* a entraîné des augmentations de la concentration en éthanol d'environ 15 fois. Une stratégie similaire a été utilisée pour la production d'itaconate. Comme dans le cas de l'éthanol, la concentration en itaconate obtenue est demeurée très faible malgré des essais d'amélioration du procédé de mise en œuvre de la souche productrice d'itaconate.

Mots-clé : *Corynebacterium glutamicum*, anaérobiose, lactate, éthanol, itaconate.

Title: Study of *Corynebacterium glutamicum* metabolism during aero-anaerobic processes and its applications in metabolic engineering.

The objective of this work is the study of *Corynebacterium glutamicum* metabolism, and of its potentialities, during an aero-anaerobic process. After a first phase during which the oxygen was supplied to favor the bacterial growth, the anaerobic phase was induced by the stopping of the oxygen supply and the decreasing of the agitation speed. In these culture conditions, lactate was the main metabolite produced. The production of this organic acid has been increased by modifying the transition time between the aerobic and the anaerobic phases. *C. glutamicum* 2262 was able to produce up to 27 g/l lactate during a batch process and up to 55 g/l during a fed batch process. To exploit the lactic acid synthesis pathway of *C. glutamicum* for ethanol production, the PDC and ADH genes from *Zymomonas mobilis* were expressed under the control of the endogenous promoter of *ldhA*, in the wild-type strain and in a *ldhA*-disrupted strain of *C. glutamicum* 2262. Although the ethanol productivities of these engineered strains were relatively low, the depletion of *ldhA* resulted in the increases of ethanol final concentration up to 15 times. A similar strategy was applied for the production of itaconate. As previously for the ethanol production, the final concentration of itaconate remained very low despite of some modifications of the process.

Keywords: *Corynebacterium glutamicum*, anaerobic condition, lactate, ethanol, itaconate.