



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse

Discipline ou spécialité : **Microbiologie et Biocatalyse Industrielles**

Présentée et soutenue par

Clément AURIOL
(Ingénieur Agronome ENSAT)

Le 4 avril 2011

Compréhension globale de l'évolution *in vivo* d'*Escherichia coli* lors de cultures sous contraintes de rapports NADPH/NADP⁺ artificiellement élevés

JURY

Marie-Francoise GORWA-GRAUSLUND
Dominique SCHNEIDER
Gwénaëlle BESTEL-CORRE
Denis POMPON
Nic LINDLEY
Philippe SOUCAILLE
Isabelle MEYNIAL-SALLES

Professeur, Lund University, Suède
Professeur, Université Joseph Fourier, Grenoble
Responsable Metabolic-Explorer, St Beauzire
Directeur de recherche, CNRS, CGM, Gif-sur-Yvette
Directeur de recherche, CNRS, LISBP, Toulouse
Professeur, INSA, Toulouse
Maître de conférences, INSA, Toulouse

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

Unité de recherche : Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (L.I.S.B.P), UMR5504, UMR792, CNRS, INRA, INSA, 135 avenue de Rangueil, 31077 Toulouse, France.

Directeurs de Thèse : Isabelle MEYNIAL-SALLES et Philippe SOUCAILLE

Rapporteurs : Marie-Francoise GORWA-GRAUSLUND et Dominique SCHNEIDER

Président du Jury : Nic LINDLEY

Spécialité : Microbiologie et Biocatalyse Industrielles

Prénom : **Clément**

Nom : **AURIOL**

Titre : **Compréhension globale de l'évolution *in vivo* d'*Escherichia coli* lors de cultures sous contraintes de rapports NADPH/NADP⁺ artificiellement élevés.**

Année : **2011 (4 avril)**

Lieu : **INSA TOULOUSE**

Résumé :

Le métabolisme central de la souche *E. coli* MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ a été rationnellement modifié afin de produire deux moles de NADPH et deux moles de NADH lors de l'oxydation du glucose en acétyl-CoA, alors qu'une souche sauvage produit quatre moles de NADH. La conséquence de cette modification est une forte diminution de son taux de croissance sur milieu minimum et glucose. Afin d'évaluer les aptitudes de cette souche à s'adapter à un tel stress métabolique, son évolution *in vivo* a été forcée lors de cultures par repiquages successifs sur glucose. Ainsi, après quatre cultures d'évolution un clone pur a été réisolé et caractérisé : un taux de croissance multiplié par six par rapport à la souche non évoluée a été mesuré. L'analyse par CGS (Séquençage par comparaison de génomes) a permis de corréliser l'augmentation du taux de croissance à l'apparition d'une mutation, NuoF*(E183A), dans la sous-unité NuoF du complexe respiratoire I, complexe NADH-dépendant. Des études biochimiques et physiologiques de l'impact de cette mutation ont permis de démontrer que le complexe I évolué peut oxyder à la fois le NADPH et le NADH, créant ainsi une nouvelle voie d'oxydation du NADPH dans la cellule. L'évolution *in vivo* a ensuite été poursuivie au cours de onze repiquages et un nouveau clone pur a été réisolé et caractérisé : un taux de croissance proche de la souche sauvage et onze fois supérieur à celui de la souche non évoluée a alors été mesuré. L'analyse par CGS a permis cette fois de corréliser l'augmentation du taux de croissance à l'apparition de deux mutations : NuoF*(E183A) et d'une deuxième dans la sous-unité α de l'ARN polymérase, *rpoA**. Enfin, une deuxième souche *E. coli* MG1655 $\Delta pfkAB \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ a été construite afin de détourner son métabolisme pour produire cette fois trois moles de NADPH et une mole de NADH lors de l'oxydation du glucose en acétyl-CoA. Cette souche étant incapable de se développer en milieu liquide et glucose, une étape de criblage en milieu solide et glucose a permis de sélectionner des clones capables de croître sur glucose. Tous ces clones possédaient soit la mutation NuoF*(E183A), soit une nouvelle mutation NuoF*(E183G), dont la caractérisation biochimique a montré que les deux enzymes évoluées permettent l'oxydation du NADPH par la chaîne respiratoire. Le phénomène d'évolution *in vivo* a conduit à la création d'une nouvelle fonction pour le NADPH qui n'est plus seulement impliqué dans les réactions de synthèse anabolique mais qui peut être utilisé pour produire directement de l'énergie catabolique. La compréhension globale du phénomène d'évolution a finalement permis la conception de nouvelles souches adaptées pour la production NADPH-dépendante de composés chimiques d'intérêt.

Mots clés : *Escherichia coli*, Evolution *in vivo*, Métabolisme du NADPH, Ingénierie métabolique, Bioconversion réductive.

Lieux des travaux de recherche :

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

Metabolic Explorer, 63360 Saint Beauzire, France

Titre de la thèse en anglais (*minuscules*): **Global understanding of *Escherichia coli* in vivo evolution during cultures constrained by high artificial NADPH/NADP⁺ ratios.**

Abstract:

Bacterial metabolism is characterized by robustness and plasticity that allow it to adjust to many metabolic perturbations. This present work demonstrates *Escherichia coli* abilities of evolution and adaptation under stress of NADPH accumulation. We constructed the *E. coli* MG1655 $\Delta pgi::FRT \Delta udhA::FRT \Delta edd::FRT \Delta qor::FRT$ strain where central metabolism has been rationally engineered to produce two mol of NADPH and two mol of NADH during the oxidation of glucose to acetyl-CoA, while a wild-type strain produces 4 mol of NADH per mole of glucose. Consequently, this strain presents a weak growth on glucose mineral medium. So as to evaluate bacterial abilities to overcome such metabolic stress, *in vivo* evolution of this strain has been forced in laboratory by serial transfer subcultures. After four evolution subcultures, an individual clone has been characterized by an six fold increased growth rate compared to non evolved strain. CGS (Comparative Genome Sequencing) analysis allowed us to correlate growth improvement with one mutation apparition in respiratory complex: NuoF*(E183A) in NuoF subunit from the NADH dependant complex I. Further biochemical and physiological studies demonstrated that the evolved respiratory complex is able to oxidize both NADH and NADPH, resulting in a new NADPH reoxydation pathway in the cell. *In vivo* evolution experiments were then continued until eleven subcultures, where a new individual clone has been characterized by an eleven fold increased growth rate compared to non evolved strain. Additional CGS analysis allowed us to correlate growth improvement with apparition of two mutations: NuoF*(E183A) and another mutation within the RNA polymerase alpha subunit, *rpoA**. Thus, a second *E. coli* MG1655 $\Delta pfkA::FRT \Delta pfkB::FRT \Delta udhA::FRT \Delta edd::FRT \Delta qor::FRT$ strain has been rationally engineered to produce three mol of NADPH and one mole of NADH per mole of glucose oxidized to acetyl-coA. As this strain was unable to grow in liquid glucose mineral medium, we performed a solid-state screening on glucose mineral medium that led to two different types of NuoF mutations in strains having recovered growth capacity. In addition to the previously seen E183A mutation other clones showed an E183G mutation, both having NADH and NADPH oxidizing ability. This result highlights need of this new NADPH reoxydation pathway for NADPH accumulating cells. This solution creates a new function for NADPH that is no longer restricted to anabolic synthesis reactions but can now be also used to directly produce catabolic energy. Finally, global understanding of evolution process allowed conception of new engineered strains, well designed for NADPH dependant production of chemicals of interest.

Key words : *Escherichia coli*, Adaptive evolution, NADPH metabolism, Metabolic engineering, Reductive bioconversion.

PUBLICATION

Stress-induced evolution of *Escherichia coli* points to original concepts in respiratory cofactor selectivity.

Auriol, C., Bestel-Corre, G., Claude, J., Soucaille, P., Meynial-Salles I. (2011) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **108**, pp. 1278-1283.

COMMUNICATIONS par AFFICHES

Understanding evolution of *Escherichia coli* under high NADPH/NADP⁺ ratio.

Isabelle Meynial-Salles, **Clément Auriol**, Gwénaëlle Bestel-Corre, Philippe Soucaille. (2008) Metabolic Engineering VII conference, Health and Sustainability, Puerto Vallarta, Mexico.

Evolution of *Escherichia coli* under high NADPH stress.

Clément Auriol, Gwénaëlle Bestel-Corre, Philippe Soucaille and Isabelle Meynial-Salles. (2010). Metabolic Engineering VIII: Metabolic Engineering for Green Growth, Jeju Island, République de Corée. Best Poster Award Elsevier Metabolic Engineering.

Table des matières

TABLE DES MATIERES	5
PRESENTATION DU PROJET DE RECHERCHE	13
1. INTRODUCTION	14
2. OBJECTIFS DES TRAVAUX DE RECHERCHE	17
CHAPITRE I INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	19
1. CAPACITES D'ADAPTATION DU METABOLISME BACTERIEN	20
1.1. Flexibilité et plasticité du métabolisme bactérien	20
1.1.1. Métabolisme d'<i>E. coli</i>	20
1.1.1.1. Organisation générale	21
1.1.1.2. Métabolisme central du glucose et biosynthèse des AA	22
1.1.2. Apport des modèles <i>in silico</i> dans l'étude de l'adaptation métabolique	23
1.1.2.1. Analyse des flux métaboliques	23
1.1.2.2. Modélisation sous contraintes	24
1.1.2.3. Intégration des réseaux de régulation	25
1.1.3. Réponse adaptative d'<i>E. coli</i> face à des contraintes métaboliques	26
1.1.3.1. Modification du réseau métabolique face à des perturbations environnementales	27
1.1.3.2. Réponses adaptatives chez des mutants métaboliques d' <i>E. coli</i>	28
1.1.3.3. La redondance métabolique : clé de la plasticité du métabolisme bactérien	28
1.2. Bases dynamiques et génétiques de l'adaptation des bactéries	29
1.2.1. Adaptation acquise par évolution : l'évolution adaptative	29
1.2.1.1. Définitions	29
1.2.1.2. Avantages des bactéries pour étudier l'évolution	30
1.2.1.3. Quantification de l'adaptation par des mesures de « fitness »	30
1.2.2. Dynamique de l'évolution adaptative bactérienne	30
1.2.2.1. Evolution de la «fitness»	30
1.2.2.2. Le devenir des mutations lors de l'évolution	31
1.2.2.3. Reproductibilité de l'évolution	32
1.2.3. Bases génétiques de l'évolution adaptative	32
1.2.3.1. Caractérisation des mutations « adaptatives »	32
1.2.3.2. Fonctions touchées dans l'évolution adaptative	32
1.3. L'étude de l'évolution à l'échelle du laboratoire	33
1.3.1. Stratégies et outils mis en œuvre pour étudier l'évolution adaptative	33
1.3.1.1. Mise en place du processus d'évolution	33
1.3.1.2. Recherche des mutations issues de l'évolution	35
1.3.1.3. Analyse des changements adaptatifs	36
1.3.2. Exemples d'évolution face à des contraintes environnementales ou génétiques	37
1.3.2.1. Evolution en parallèle d' <i>E. coli</i> sur 40 000 générations	37
1.3.2.2. Bases génétiques et moléculaires de l'évolution adaptative d' <i>E. coli</i> sur glycérol	38
1.3.2.3. Evolution dirigée <i>in vivo</i> d'une voie métabolique de levure chez <i>E. coli</i>	38
1.3.2.4. Adaptation de mutants d' <i>E. coli</i> face à la perte d'enzymes du métabolisme central	39
2. LE NADPH DANS LE METABOLISME D'ESCHERICHIA COLI	40
2.1. La production du NADPH dans la cellule	40
2.1.1. Les différentes voies de production du NADPH	40
2.1.2. Régulation générale de la production de NADPH	42
2.1.2.1. Régulation de la voie des pentoses phosphates	42
2.1.2.2. Régulation de l'activité Isocitrate déshydrogénase	42
2.1.2.3. Les transhydrogénases soluble et membranaire	42
2.2. Utilisation du NADPH dans la cellule	43
2.2.1. Synthèse de la biomasse	43

2.2.1.1.	Biosynthèse des acides aminés	43
2.2.1.2.	Biosynthèse des lipides	44
2.2.2.	Lutte contre le stress oxydatif cellulaire	45
2.3.	Perturbations de la production de NADPH	47
2.3.1.	Inactivation d'enzymes produisant le NADPH chez <i>E. coli</i>	47
2.3.1.1.	Déplétion du flux dans la voie des pentoses phosphates	47
2.3.1.2.	Délétion de l'isocitrate déshydrogénase (ICDH)	47
2.3.1.3.	Délétion de la transhydrogénase membranaire PntAB	48
2.3.2.	Augmentation des flux de production du NADPH	48
2.3.2.1.	Perturbations du métabolisme dans un mutant Δpgi	49
2.3.2.2.	Etablissement du shunt glyoxylique	49
2.3.2.3.	Rôle régulateur des transhydrogénases	49
2.3.3.	Flexibilité du métabolisme chez <i>E. coli</i> pour le maintien de l'équilibre en NADPH	50
 CHAPITRE II MATERIEL & METHODES		52
 1. MILIEUX DE CULTURE		53
1.1.	Milieux solides	53
1.2.	Milieux liquides	53
1.3.	Utilisation d'antibiotiques	54
 2. SOUCHES		55
 3. TECHNIQUES BASIQUES DE GENIE GENETIQUE		61
3.1.	Isolement et manipulation des acides nucléiques	61
3.1.1.	Mini-préparations d'ADN plasmidique d' <i>E. coli</i>	61
3.1.2.	Mini-préparations d'ADN génomique d' <i>E. coli</i>	61
3.1.3.	Techniques de clonage	61
3.1.4.	Amplification de fragments d'ADN	62
 4. OBTENTION DES MUTANTS PAR SUBSTITUTION DE GENE		62
4.1.	Obtention des fragments d'ADN linéaires substrats de recombinaison homologue	63
4.2.	Préparation des cellules compétentes MG1655 <i>pkD46</i>	66
4.3.	Transformation par électroporation	66
4.4.	Transfert d'un gène modifié d'une souche donneuse à une souche réceptrice par transduction généralisée à l'aide de phages	66
4.4.1.	Préparation d'un lysat de phages P1	67
4.4.2.	Transduction en utilisant un lysat de phages	67
4.5.	Elimination des marqueurs de résistance grâce au <i>pCP20</i>	68
4.6.	Vérification des transformants	69
4.6.1.	Cultures sur milieu sélectif	69
4.6.2.	Amplification par PCR de la zone modifiée et comparaison de la taille des fragments	69
 5. CONDITIONS DE CULTURES		70
5.1.	Précultures	70
5.2.	Cultures en fioles d'Erlenmeyer	70
5.3.	Cultures continues en bioréacteur	71
5.4.	Cultures discontinues en bioréacteur	71
5.5.	Cultures d'évolution par repiquages successifs	72
 6. TECHNIQUES ANALYTIQUES		72
6.1.	Détermination de la concentration en biomasse	72
6.1.1.	Mesure turbidimétrique	72
6.1.2.	Mesure gravimétrique	72
6.2.	Dosage des substrats et produits de fermentation	73
6.3.	Calcul des paramètres macrocinétiques	73
6.4.	Détermination de la concentration des cofacteurs NAD(P)	74

6.4.1.	Extraction des cofacteurs	74
6.4.2.	Dosage du NADP ⁺ et NADPH	74
6.4.3.	Dosage du NAD ⁺ et NADH	75
7.	MESURE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES	76
7.1.	<i>Préparation des extraits acellulaires</i>	76
7.2.	<i>Dosage des protéines</i>	76
7.3.	<i>Dosage de l'activité phosphoglucoisomérase</i>	76
7.4.	<i>Dosage de l'activité phosphofructokinase</i>	77
7.5.	<i>Dosage de l'activité transhydrogénase totale</i>	77
7.6.	<i>Dosage de l'activité aldéhyde réductase</i>	77
7.7.	<i>Dosage de l'activité alcool déshydrogénase</i>	77
8.	COMPARAISON DE LA SEQUENCE DU GENOME PAR HYBRIDATION SUR PUCES A ADN	78
8.1.	<i>Principe</i>	78
8.2.	<i>Mini-préparations d'ADN génomique d'E. coli</i>	79
8.3.	<i>Analyse des résultats de signaux d'hybridation</i>	79
8.4.	<i>Validation des mutations par séquençage local</i>	80
9.	CARACTERISATION DU FRAGMENT SOLUBLE DU COMPLEXE I (NUO)	80
9.1.	<i>Construction des vecteurs de surexpression</i>	80
9.2.	<i>Expression et purification</i>	81
9.3.	<i>Analyse en gel dénaturant de polyacrylamide des protéines</i>	82
9.3.1.	Préparation du gel SDS-PAGE	82
9.3.2.	Préparation des échantillons	82
9.3.3.	Migration et coloration	83
9.4.	<i>Analyse en Western-blot des protéines</i>	84
9.5.	<i>Caractérisation biochimique</i>	85
9.5.1.	Mesure de l'activité NAD(P)H ferricyanide réductase	85
9.5.2.	Détermination des constantes michaeliennes et catalytiques	85
9.6.	<i>Expériences sur vésicules inversées</i>	87
9.6.1.	Préparation de vésicules inversées	87
9.6.2.	Mesures des activités oxidoréductase de la chaîne respiratoire	87
9.6.3.	Détermination de la génération de la force protomotrice par quenching de la fluorescence	87
9.7.	<i>Modélisation 3D du fragment soluble</i>	88
10.	ANALYSE DE L'EXPRESSION DES GENES	88
10.1.	<i>Principe</i>	88
10.2.	<i>Préparation des ARN totaux</i>	91
10.2.1.	Prise d'échantillons	91
10.2.2.	Extraction des ARN totaux	91
10.2.3.	Concentration des ARN par SpeedVac	91
10.2.4.	Quantification et pureté des ARN	91
10.3.	<i>Marquage des ADNc</i>	91
10.4.	<i>Hybridation des ARN sur les lames de verre 3x6K E coli Microarray Slide</i>	92
10.5.	<i>Détection des signaux</i>	92
10.6.	<i>Quantification de l'expression des gènes et traitement des données obtenues</i>	93
11.	ANALYSE DES FLUX METABOLIQUES	93
11.1.	<i>Principe</i>	93
11.2.	<i>Expériences de marquage isotopique au ¹³C</i>	94
11.3.	<i>Analyses isotopiques par RMN</i>	94
11.3.1.	Définitions	94
11.3.2.	Préparation des échantillons	95
11.3.3.	Analyse des isotopomères de position par 2D-HSQC	95
11.3.4.	Détermination des enrichissements spécifiques	95
11.4.	<i>Calcul des flux métaboliques</i>	96

CHAPITRE III EVOLUTION *IN VIVO* DE LA SOUCHE NA 23 MG1655 Δ PGI Δ UDHA Δ EDD Δ QOR

97

1. CONSTRUCTION DE LA SOUCHE NADPH NA 23 PAR APPROCHE RATIONNELLE D'INGENIERIE METABOLIQUE	98
1.1. Stratégie d'ingénierie métabolique pour déséquilibrer le rapport NADPH/NADP⁺ en faveur du NADPH	98
1.1.1. Augmentation du flux de carbone dans la voie des pentoses phosphates	99
1.1.2. Suppression des voies de réoxydation du NADPH	99
1.2. Construction de la souche NADPH par délétion de 4 gènes	101
1.3. Vérification du mutant	102
1.3.1. PCR	102
1.3.2. Dosages des activités enzymatiques Pgi et UdhA	103
2. EVOLUTION DE LA SOUCHE NA 23 MG1655 ΔPGI ΔUDHA ΔEDD ΔQOR PAR REPIQUAGES SUCCESSIFS	103
2.1. Caractérisation phénotypique des souches NA 23 et MG1655	103
2.2. Cultures d'évolution sur 20 générations	105
2.2.1. Evolution du taux de croissance	105
2.2.2. Caractérisation phénotypique de 10 clones purs évolués sur 20 générations	105
2.3. Cultures d'évolution sur 60 générations	106
2.3.1. Evolution du taux de croissance et de la fitness	106
2.3.2. Caractérisation phénotypique de 10 clones purs évolués sur 65 générations	107
2.4. Comparaison de la souche non évoluée NA 23, intermédiaire NA 23E04 et évoluée NA 124E	108
3. DISCUSSION	110

CHAPITRE IV IDENTIFICATION ET CARACTERISATION DES MUTATIONS GENETIQUES RESPONSABLES DE L'EVOLUTION ADAPTATIVE

112

1. IDENTIFICATION ET VALIDATION DES MUTATIONS ADAPTATIVES	113
1.1. Recherche des mutations par comparaison de génomes	113
1.1.1. Principes généraux	113
1.1.2. Mutations identifiées	114
1.2. Impacts phénotypiques des mutations adaptatives	117
1.2.1. Souches évoluées et non évoluées reconstruites	117
1.2.2. Validation de l'impact adaptatif des mutations	117
1.2.3. Caractérisation phénotypique des souches non évoluées reconstruites	119
1.3. Diversité des mutations sur les 10 clones évolués	120
1.3.1. Recherche des cibles de l'évolution sur les populations évoluées	120
1.3.1.1. Séquençage du gène <i>nuoF*</i> sur les 10 clones évolués après 20 générations	120
1.3.1.2. Séquençage des gènes <i>nuoF*</i> et <i>rpoA*</i> sur les 10 clones évolués après 65 générations	120
1.3.2. Influences des mutations <i>rpoA</i> sur la croissance	121
1.3.3. Recherche de nouvelles mutations au sein de la population B	122
1.3.3.1. Séquençage du clone NA 131E issu de la population B	122
1.3.3.2. Recherche des mutations <i>cyaA*</i> et <i>pntB*</i> dans la population B	123
2. CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DE LA PROTEINE EVOLUEE NUOF*	124
2.1. Généralités sur la sous-unité protéique NuoF et le complexe I	124
2.1.1. Complexe I : premier maillon de la chaîne respiratoire	124
2.1.2. Architecture et organisation globale du fragment soluble NuoEFG	125
2.1.2.1. Origine et évolution moléculaires du complexe respiratoire I	125
2.1.2.2. Le complexe I est composé de 13 sous-unités	126
2.1.2.3. Le domaine NAD-binding commun aux déshydrogénases	127
2.1.3. Structure 3D du fragment soluble de <i>T. thermophilus</i>	127
2.1.3.1. Organisations des groupements prosthétiques redox	127

2.1.3.2.	Résidus impliqués dans l'ancrage du FMN et du NADH	128
2.1.4.	Modélisation tridimensionnelle <i>in silico</i> de la sous-unité évoluée NuoF*	129
2.1.4.1.	Homologies avec le complexe I d' <i>E. coli</i>	129
2.1.4.2.	Structure de la sous-unité protéique NuoF* et conséquences sur le site NADH binding	129
2.2.	Caractérisation biochimique de NuoEF*G	131
2.2.1.	Construction du plasmide d'expression	131
2.2.2.	Expression et purification	131
2.2.3.	Paramètres enzymatiques et cinétiques de NuoEF*G	133
2.2.3.1.	Activité spécifique ferricyanide réductase	133
2.2.3.2.	Constantes de cinétique michaelienne	133
2.2.3.3.	Efficacité catalytique	135
2.3.	Caractérisation <i>in vivo</i> du complexe I évolué	136
2.3.1.	Activités oxydases de la chaîne respiratoire « parentale » et « évoluée »	136
2.3.2.	Génération de la force protomotrice en présence de NADH et NADPH	137
2.4.	Conclusions et discussion	139
3.	IMPACT DE RPOA* SUR L'EXPRESSION DES GENES	140
3.1.	Généralités sur RpoA et l'ARN polymérase	140
3.1.1.	L'ARN polymérase chez <i>E. coli</i>	140
3.1.1.1.	Structure et organisation de l'ARNP	140
3.1.1.2.	Les 3 étapes clés de la transcription : Initiation, Elongation et Terminaison	141
3.1.1.3.	Phénomène de pause transcriptionnelle (Landick, 2006)	142
3.1.2.	Implication de RpoA dans la transcription	143
3.1.2.1.	Rôle structural et structure de RpoA	143
3.1.2.2.	Rôle dans l'initiation : Reconnaissance des promoteurs	143
3.2.	Impact de rpoA* sur le transcriptome de la souche NA 124E	145
3.2.1.	Gènes surexprimés chez la souche NA 124E	146
3.2.1.1.	Gènes impliqués dans la réplication, transcription, traduction	146
3.2.1.2.	Gènes codant pour des enzymes du métabolisme du carbone	146
3.2.2.	Gènes sous-exprimés chez la souche NA 124E	147
3.2.2.1.	Gènes associés à la fonction de motilité cellulaire	147
3.2.2.2.	Gènes impliqués dans le transport et la dégradation de sucres	148
3.2.2.3.	Gènes codant pour des enzymes du cycle de Krebs	148
3.2.2.4.	Gènes impliqués dans la réplication, transcription, traduction	148
3.2.3.	Validation des analyses transcriptomiques par RT-qPCR	151
3.2.3.1.	Expression relative de 9 gènes candidats	151
3.2.3.2.	Profil d'expression des souches NA 142 et NA 124E	152
3.3.	Interprétations et discussion	152
3.3.1.	Exploitation des données transcriptomiques globales et de RT-qPCR	152
3.3.1.1.	Sensibilité comparée des deux méthodes d'analyses	152
3.3.1.2.	Extrapolation aux souches NA 23 et NA 175	153
3.3.1.3.	Précision et confiance des données transcriptomiques sur lames	154
3.3.2.	Interprétations des données transcriptomiques	154
3.3.2.1.	Répression catabolique	154
3.3.2.2.	Augmentation des besoins biosynthétiques	155
3.3.2.3.	Répression des fonctions de motilité et chimiotactisme	155
3.3.3.	L'ARNP : cible privilégiée de l'évolution adaptative	156
3.3.3.1.	Ajustements transcriptionnels suite à des mutations dans l'ARNP	156
3.3.3.2.	Mutagenèse aléatoire dans RpoA : outil d'ingénierie métabolique	156

CHAPITRE V REARRANGEMENTS METABOLIQUES SURVENUS LORS DE L'EVOLUTION ADAPTATIVE 158

1.	ANALYSES DE FLUX METABOLIQUES PAR EXPERIENCES DE MARQUAGE ISOTOPIQUE	159
1.1.	Principes généraux	160
1.1.1.	Réseau métabolique étudié	160
1.1.2.	Définition et simplification liées à l'état stationnaire	160
1.1.3.	Réduction du réseau d'étude	161
1.2.	Cohérence des analyses de flux (Cécile Nicolas, 2007)	162
1.2.1.	Résidus de minimisation	162
1.2.2.	Cohérence du marquage isotopique	166

1.2.3.	Analyse de sensibilité	166
1.2.4.	Modélisation propre à la souche NA 175 MG1655 Δ pgi Δ udhA Δ qor Δ edd rpoA*	167
1.3.	Impacts des mutations sur le comportement métabolique des souches NA 23, NA 175, NA 142 et NA 124E	169
1.3.1.	Effets des mutations sur les voies de la glycolyse et d'Entner-Doudoroff	169
1.3.2.	Effets sur le cycle de Krebs et le shunt glyoxylique	170
1.3.3.	Discussion : corrélation fluxome-transcriptome	171
1.3.3.1.	Répression catabolique	171
1.3.3.2.	Shunt glyoxylique	173
2.	ETUDE APPROFONDIE DE L'EQUILIBRE DES COFACTEURS NAD(H) ET NADP(H)	174
2.1.	Etude de l'équilibre du NADPH	174
2.1.1.	Disponibilité des cofacteurs NADP(H)	174
2.1.1.1.	Impacts de nuoF* et rpoA* sur les concentrations en NADPH et NADP ⁺	174
2.1.1.2.	Impacts des mutations nuoF* et rpoA* sur le pool total de NADP(H)	175
2.1.2.	Flux de production de NADPH	176
2.2.	Etude de l'équilibre du NADH	177
2.2.1.	Disponibilité des cofacteurs NAD(H)	177
2.2.1.1.	Impacts des mutations nuoF* et rpoA* sur les concentrations en NADH et NAD ⁺	177
2.2.1.2.	Impacts des mutations nuoF* et rpoA* sur le pool total de NAD(H)	178
2.2.2.	Flux de production de NADH	179
2.3.	Interprétations et discussion	180
2.3.1.	Oxydation compétitive du NADH et du NADPH au sein du complexe I évolué	181
2.3.1.1.	Faibles impacts de nuoF* sur les ratios NAD(P)	181
2.3.1.2.	Effets conjugués de ropA* et nuoF*	181
2.3.2.	Augmentation des besoins biosynthétiques chez les souches rpoA*	182
2.3.3.	Besoins en ATP chez les souches accumulant le NADPH	182
CHAPITRE VI EVOLUTION IN VIVO DE LA SOUCHE NA 24 MG1655 ΔPFKAB ΔUDHA ΔEDD ΔQOR		183
1.	CONSTRUCTION DE LA SOUCHE NADPH PAR INGENIERIE METABOLIQUE	184
1.1.	Stratégie rationnelle d'ingénierie métabolique	184
1.2.	Construction et vérification de la souche NA 24	185
1.1.1.	Construction de la souche NA 24 par cinq délétions de gènes	185
1.1.2.	Vérification de la souche	187
1.1.2.1.	PCR	187
1.1.2.2.	Dosage de l'activité PfkAB	187
2.	ADAPTATION DE LA SOUCHE NA 24 MG1655 ΔPFKAB ΔUDHA ΔEDD ΔQOR SUR MILIEU SOLIDE	188
2.1.	Caractérisation de la souche NA 24 sur glucose et galactose	188
2.2.	Sélection de clone évolué sur milieu minimum solide et glucose	189
3.	IDENTIFICATION DES MUTATIONS SURVENUES LORS DE L'EVOLUTION	190
3.1.	Recherche de mutations dans les clones NA 24 évolués	190
3.2.	Un nouveau complexe I évolué	190
3.2.1.	Construction du plasmide d'expression	190
3.2.2.	Expression et purification	190
3.2.3.	Paramètres enzymatiques et cinétiques de NuoEF*(E183G)G	191
3.2.3.1.	Constantes de cinétique michaelienne	191
3.2.3.2.	Efficacité catalytique	192
4.	INTERPRETATIONS & DISCUSSION	193
CHAPITRE VII UTILISATION DES SOUCHES ACCUMULANT LE NADPH POUR LA BIOCONVERSION REDUCTIVE		195

1. BIOCONVERSIONS EN FIOLES EN CULTURE BATCH	196
1.1. Réduction asymétrique d'éthylacétoacétate en éthylhydroxybutyrate	196
1.1.1. Construction de la souche bioréductrice	196
1.1.2. Bioréduction d'éthylacétoacétate en éthylhydroxybutyrate sur milieu minimum et galactose	197
1.1.3. Impact de la bioconversion sur la croissance bactérienne	198
1.2. Réduction d'aldéhydes en alcools	200
1.2.1. Construction et caractérisation de la souche réductrice d'aldéhydes	200
1.2.1.1. Utilisation de l'aldéhyde réductase YqhD	200
1.2.1.2. Impact de l'induction de la protéine recombinante sur la croissance	200
1.2.1.3. Influence des aldéhydes sur la croissance bactérienne	201
1.2.2. Bioconversion de propionaldéhyde en propanol	202
1.2.2.1. Effet de la délétion <i>adhE</i>	202
1.2.2.2. Ajout du substrat en cours de culture	202
1.2.2.3. Comparaison avec une souche « sauvage » de référence	203
1.2.3. Bioconversion de glycolaldéhyde en éthylène glycol	204
2. BIOCONVERSION DE GLYCOLALDEHYDE EN ETHYLENE GLYCOL EN CHEMOSTAT	206
2.1. Particularités du procédé de bioconversion du glycolaldéhyde	206
2.1.1. Présentation du système chemostat	206
2.1.2. Instabilité et toxicité du glycolaldéhyde	207
2.1.3. Conditions de culture spécifiques pour la bioconversion en chemostat	208
2.1.3.1. Forte dégradation du glycolaldéhyde en conditions de culture continue	208
2.1.3.2. Influence du pH sur la dégradation du glycolaldéhyde	209
2.1.3.3. Influence des sels du milieu de culture sur la dégradation du glycolaldéhyde	210
2.2. Cultures continues de bioconversion	210
2.2.1. Cultures continues de bioconversion des souches NA 188 et NA 195E	210
2.2.2. Culture continue de la souche NA 195E à de très fortes concentrations en glycolaldéhyde	212
2.2.3. Bilans de bioconversion du glycolaldéhyde en éthylène glycol	214
2.2.3.1. Performances comparées des souches NA 195E et NA 188	214
2.2.3.2. Performances de la souche NA 195E en cultures continues	215
2.3. Bioconversion de glycolaldéhyde en éthylène glycol en culture discontinue	216
2.3.1. Principe de la culture discontinue à débit exponentiel	216
2.3.2. Cultures de références	217
2.3.3. Performances de la souche NA 195E en cultures discontinues	218
3. PERSPECTIVES D'APPLICATIONS	219
3.1. Bioconversion	219
3.2. Evolution in vivo d'enzymes	219
CONCLUSION GENERALE	221
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	226
TABLE DES ILLUSTRATIONS	243
LISTE DES FIGURES	244
LISTE DES TABLEAUX	248
ABREVIATIONS	251

Présentation du projet de recherche

1. Introduction

Dans le contexte économique actuel, la raréfaction du pétrole conduit les industriels à rechercher de nouvelles énergies produites à partir de sources renouvelables et à moindre coût. Un des enjeux économiques majeurs pour les décennies à venir est la valorisation des ressources agricoles comme source d'énergie renouvelable. Outre le développement de biocarburants produits par voies végétale ou bactérienne, d'autres procédés biotechnologiques utilisent les microorganismes pour produire des molécules d'intérêt pour l'industrie chimique et pharmaceutique à partir de matières premières renouvelables (glucose, saccharose, glycérol, cellulose...).

Les biotechnologies blanches s'appliquent plus particulièrement à la production de composés chimiques de commodités ou de spécialités ; elles s'opposent aux biotechnologies rouges et vertes qui s'adressent respectivement aux marchés de la pharmacie et de l'agriculture. L'essor des biotechnologies blanches constituent une filière alternative à la synthèse pétrochimique en apportant des solutions de production moins coûteuses et moins polluantes sur l'ensemble du procédé de production. Les prévisions économiques du cabinet de conseil McKinsey & Company ont envisagé une progression du marché des biotechnologies blanches de 60% en 5 ans (de 2005 à 2010), atteignant ainsi des parts de marché de 10% dans la chimie, avec un volume total de 125 milliards d'euros (Figure 1).

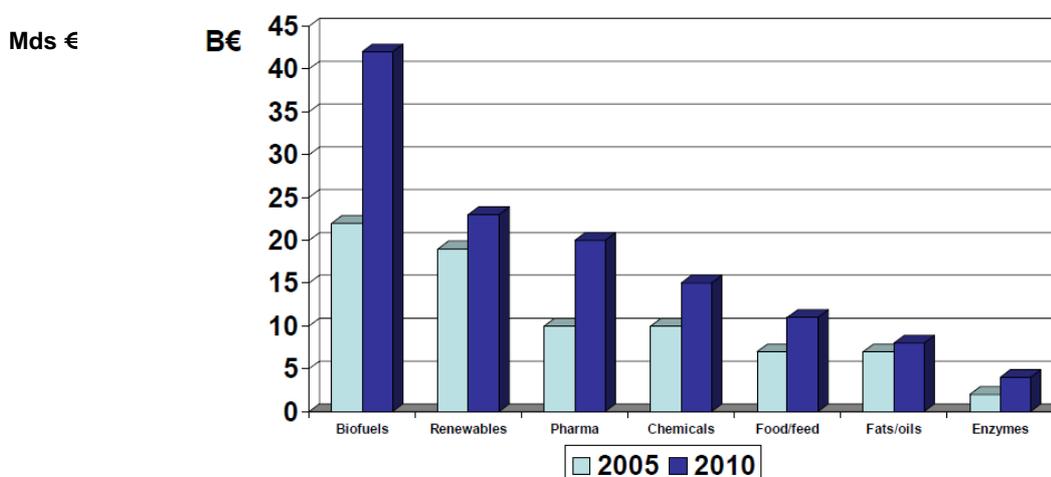


Figure 1 : Détails du marché des biotechnologies blanches dans la chimie en milliard d'euros (d'après McKinsey, 2006).

La production de molécules d'intérêt pour la chimie peut faire intervenir des réactions d'oxydo-réduction mettant en jeu un substrat dont la transformation sera catalysée par une ou plusieurs enzymes en présence d'un agent réducteur.

Ces réactions de réduction biocatalytique peuvent constituer des étapes clés dans les processus de synthèse asymétrique et présentent des fortes potentialités dans le domaine de la production industrielle d'énantiomère pur pour les industries pharmaceutiques et chimiques.

Par exemple, la production de polyhydroxybutyrate (PHB) (Lim *et al.*, 2002), la transformation de xylose en xylitol (Chin *et al.*, 2008), la réduction asymétrique d'éthylacétoacétate (EAA) en éthylhydroxybutyrate (EHB) (Nakashimada *et al.*, 2001), et la réduction énantiosélective de

Présentation du projet de recherche

cétones en alcool (Zhang *et al.*, 2009) utilisent des réactions de bioconversion réductives NAD(P)H-dépendantes, où le coenzyme NAD(P)H fournit le pouvoir réducteur à la réaction.

Cependant, à l'échelle industrielle, le NAD(P)H est un facteur limitant à la production de molécules d'intérêt en raison de son coût élevé. Aussi, plusieurs stratégies ont été développées pour fournir et régénérer le NADPH en continu telles que l'utilisation d'enzymes purifiées, comme la glucose déshydrogénase de *Bacillus subtilis* (Hummel, 1999), ou de microorganismes optimisés par couplage des réactions de bioconversion et de régénération des cofacteurs. Par exemple, Weckbecker et Hummel (2004) ont mis au point un système de biocatalyse cellulaire ayant pour but la réduction des cétones en alcools, basé sur l'utilisation d'une souche surexprimant l'alcool déshydrogénase (ADH), la pyridine nucléotide transhydrogénase (PNT) et la formate déshydrogénase (FDH). Dans ce système, la première enzyme va catalyser la réaction de bioréduction alors que les deux autres vont participer à la régénération du NADPH (Figure 2A).

Basé sur le même principe de réaction de couplage, Zhang *et al.* (2009) ont élaboré un système de bioconversion utilisant un mélange de deux souches perméabilisées : une dédiée à la réduction des cétones par surexpression d'une kétéo-réductase, et l'autre dédiée à la régénération de NADPH via la surexpression de la glucose déshydrogénase. La perméabilisation des membranes permet ainsi l'échange des cofacteurs entre ces deux souches (Figure 2B).

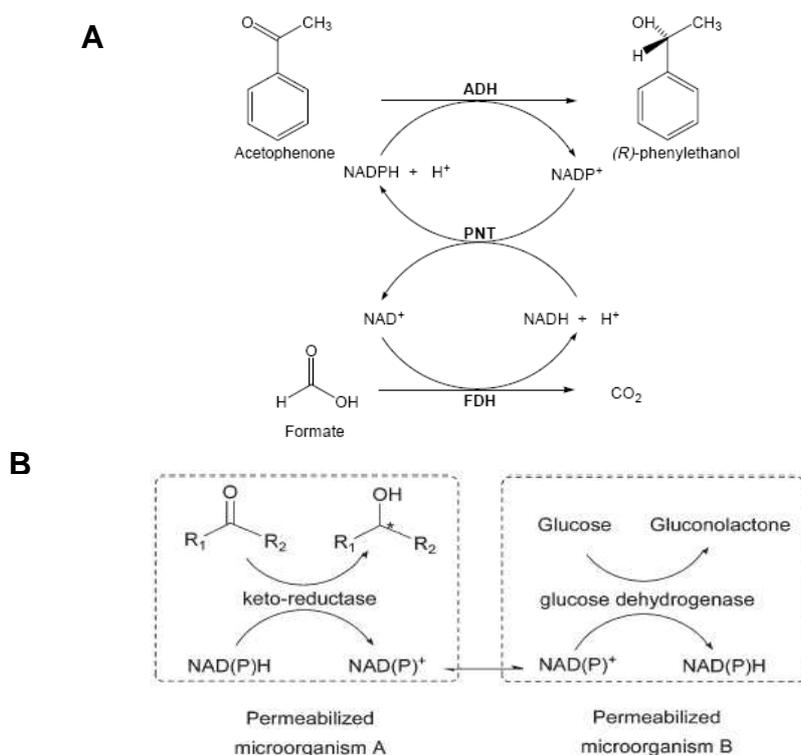


Figure 2 : Principe du couplage des réactions NAD(P)H réductases et régénératrices de NADPH pour la transformation des cétones en alcools. (D'après Zhang *et al.*, 2006, et Weckbecker & Hummel, 2004).

La figure 2A illustre le principe de bioréduction par l'utilisation d'une souche unique optimisée pour la réduction des cétones et la régénération du NADPH. La figure 2B montre un système de bioréduction par l'utilisation d'un mélange de deux souches perméabilisées, une optimisée pour la réduction de cétones et l'autre pour la régénération du NAD(P)H.

Présentation du projet de recherche

Bien qu'efficaces, ces approches permettent uniquement de limiter les coûts de production par la régénération du cofacteur, mais ne permettent pas de modifier la spécificité de substrat d'une enzyme afin de l'adapter à un substrat moins coûteux. En effet, le choix du substrat dépend du produit final souhaité et du catalyseur enzymatique. Mais la haute spécificité d'une enzyme pour un substrat donné limite souvent le choix. Différents outils d'évolution dirigée permettent de modifier et/ou d'améliorer les propriétés biochimiques d'une enzyme. Des stratégies d'évolution moléculaire *in vitro* basées sur la modification puis le criblage, souvent à haut débit, de banques de mutants, permettent l'obtention et la sélection de variants enzymatiques améliorés pour les propriétés recherchées (Boersma et al., 2007 ; Kaur & Sharma, 2006). Il existe aussi des stratégies d'évolution *in vivo* lors de cultures continues, où la cellule va modifier et sélectionner d'elle-même une enzyme cible plus performante que l'enzyme native, en réponse à une contrainte métabolique (Meynial Salles et al., 2007).

Il est envisageable de développer ce dernier type d'approche pour l'évolution *in vivo* d'enzymes NADPH-dépendantes afin de sélectionner des enzymes évoluées capables d'utiliser un substrat d'intérêt moins spécifique que le substrat de référence, mais présentant l'avantage d'être peu coûteux et abondant. Une telle stratégie nécessite la conception d'une cellule bactérienne qui serait considérée comme une « usine cellulaire » pour laquelle le métabolisme est réorienté de telle sorte qu'elle soit capable de produire du NADPH sans pouvoir le reconsommer. Cette accumulation de NADPH va affecter négativement la croissance et l'introduction dans cette cellule d'une enzyme NADPH dépendante permet à la cellule de régénérer le NADP⁺ nécessaire à son équilibre redox : la croissance de la cellule est alors dépendante de l'activité de l'enzyme exogène (Figure 3).

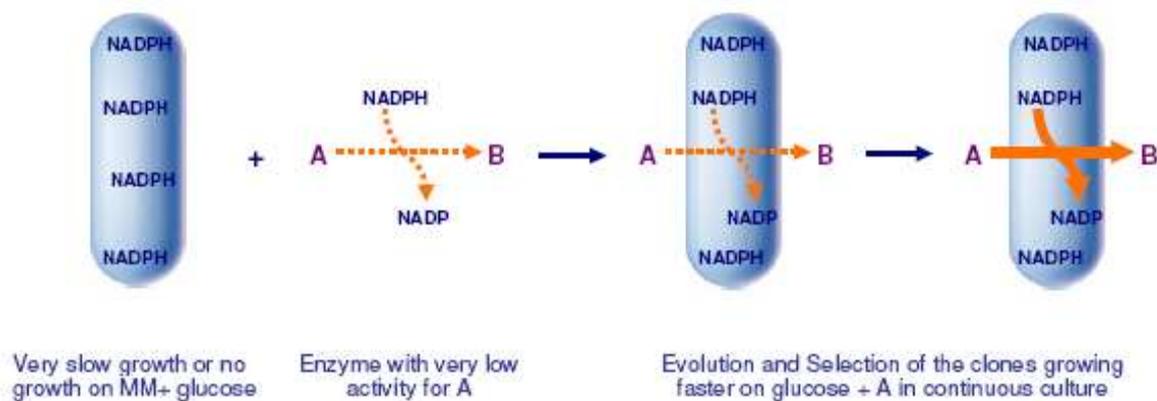


Figure 3 : Principe d'adaptation d'une enzyme NADPH dépendante à un substrat A dans une souche surproduisant le NADPH en culture continue.

La culture en continue de cette « usine cellulaire » exprimant l'enzyme NADPH dépendante devrait permettre de sélectionner, après un certain temps de culture, l'enzyme évoluée capable de réduire le nouveau substrat d'intérêt, en sélectionnant les clones dont la croissance est la plus rapide.

Parmi les cellules bactériennes susceptibles de répondre à cette approche *Escherichia coli* (*E. coli*) présente de nombreux atouts (séquençage du génome, bonne connaissance du métabolisme, nombreux outils génétiques...). Il est donc envisageable de construire des souches d'*E. coli* dont le métabolisme est rationnellement modifié pour accumuler du NADPH, et dans lesquels le rapport NADPH/NADP⁺ est plus élevé que dans une souche sauvage.

2. Objectifs des travaux de recherche

La bonne connaissance du métabolisme d'*E. coli*, et plus précisément des voies cataboliques de production du NADPH, permet d'envisager des stratégies d'ingénierie métabolique pour détourner les flux de carbone de la bactérie afin de forcer l'accumulation du NADPH dans la cellule.

Ainsi, le premier objectif du projet de recherche, dans lequel s'inscrit le présent travail de thèse, est la construction de souches d'*E. coli*, dont le métabolisme central est rationnellement modifié par délétions de gènes, leur permettant d'accumuler le NADPH, sans pouvoir le réoxyder. Elles seront ensuite utilisées dans le cadre, d'une part de bioréduction pour la production de molécule d'intérêt pour la chimie, et d'autre part d'évolution *in vivo* d'enzymes NADPH dépendantes afin d'en améliorer leur efficacité catalytique.

Cependant, avant de pouvoir utiliser ces souches pour de telles applications, il est nécessaire de s'assurer de leur viabilité et de leur stabilité. C'est le but du deuxième objectif de ce projet. En effet, les souches optimisées pour des productions industrielles doivent présenter une stabilité aussi bien métabolique que génétique pour s'assurer de la robustesse et de la répétabilité du procédé de production.

La grande flexibilité du métabolisme d'*E. coli*, conférée par son équipement enzymatique et l'organisation de son réseau métabolique, lui assure de grandes capacités d'adaptation face à des perturbations métaboliques, d'origine génétique (contraintes propres à la cellule), ou environnementale (contraintes indépendantes de la cellule).

Ainsi, la contrainte métabolique instaurée par l'augmentation des flux de production de NADPH va exercer de fortes pressions d'évolution sur la cellule, visant à conserver un équilibre oxydo-réducteur optimal pour sa viabilité.

Les présents travaux de recherche s'articulent autour de l'étude du métabolisme et de la stabilité génétique de souches d'*E. coli* accumulant le NADPH, et démontrent les capacités d'adaptation surprenantes de cette bactérie à de fortes modifications de son patrimoine génétique par évolution naturelle, dite évolution *in vivo*.

Ainsi, ce travail repose sur la compréhension des bases dynamiques, génétiques, moléculaires et métaboliques de l'évolution *in vivo* d'*E. coli* en milieu minimum et glucose sous contraintes d'un rapport NADPH/NADP⁺ élevé.

Pour cela, dans un premier temps, une souche d'*E. coli* a été rationnellement modifiée par une augmentation de son flux de carbone au niveau de la voie des pentoses phosphates. Cette modification devrait conduire à la production de deux moles de NADH et deux de NADPH lors de l'oxydation du glucose en acétyl-CoA, contre quatre moles de NADH pour la souche sauvage *E. coli* MG1655.

Par la suite, cette souche a été soumise à une évolution forcée en laboratoire par repiquages successifs en cultures discontinues. Deux clones, évolués après 20 et 65 générations, ont été plus particulièrement étudiés permettant de mieux comprendre la dynamique du phénomène d'évolution *in vivo*. Les cibles génétiques responsables du phénomène d'évolution ont ensuite été identifiées dans cette souche évoluée, puis caractérisées tant au niveau moléculaire que métabolique, avec notamment une analyse des flux intracellulaires.

Présentation du projet de recherche

Parallèlement, une autre étude du phénomène d'évolution adaptative a été entreprise sur une seconde souche présentant un fort déséquilibre de son pool de NADPH, par la production théorique de trois moles de NADPH et une de NADH par mole de glucose oxydée en acétyl-CoA. Pour ce faire, cette souche, incapable de se développer sur glucose, a subi une sélection en milieu solide minimum et glucose pour forcer son adaptation. Comme précédemment, des clones évolués ont été étudiés ainsi que les cibles génétiques responsables de leur évolution.

Pour finir, une étude de ces souches accumulant du NADPH a été réalisée en cultures batch, fed-batch et continues afin de tester leurs aptitudes d' « usines cellulaires » dans la catalyse de réactions de bioréduction, et plus particulièrement dans la conversion d'éthylacétoacétate (EAA) en éthyl-3-hydroxybutyrate (EHB), et d'aldéhydes en alcools. La viabilité de ces souches et la faisabilité du process de bioconversion ont été démontrées avec succès par la réalisation d'expérience de biocatalyse cellulaire. Des perspectives d'applications pour la production d'EHB, produit à haute valeur ajoutée utilisée comme arôme de fruits rouges, ou pour la détoxification de solvants par réduction des aldéhydes, sont donc envisageables pour les souches accumulant le NADPH.

Chapitre I

Introduction bibliographique

1. Capacités d'adaptation du métabolisme bactérien

1.1. Flexibilité et plasticité du métabolisme bactérien

1.1.1. Métabolisme d'*E. coli*

Escherichia coli est une des bactéries les plus étudiées, et certainement un des organismes vivants les mieux caractérisés. Depuis sa découverte en 1885 par Théodore Escherich, plus d'un siècle de travaux expérimentaux, avec plus récemment le séquençage de son génome (Blattner et al., 1997) et le développement de la biologie dite « post-génomique », ont permis d'accroître les connaissances physiologiques, biochimiques, génétiques et moléculaires sur ce microorganisme. L'annotation du génome a permis d'élaborer un modèle complet de la bactérie. D'après la dernière mise à jour de la base de données d'EcoCyc (3 décembre 2010), la souche de référence d'*Escherichia coli* K-12 est ainsi constituée de 4490 gènes, dont 1451 codent pour des enzymes et 254 des transporteurs cellulaires.

L'ensemble des données générées sur *E. coli* est organisé en quatre sous-ensembles, représentant cinq niveaux organisationnels et fonctionnels dans la cellule : le génome constitué de l'ensemble des gènes, le transcriptome constitué de l'ensemble des ARNs, le protéome (et l'interactome) constitué de l'ensemble des protéines (et de leurs interactions respectives), le métabolome et le fluxome constitué respectivement par l'ensemble des métabolites et des flux de production ou de consommation de ces derniers, et enfin le régulome qui est constitué de l'ensemble des interactions dynamiques entre les 4 niveaux précédents (Figure 4).

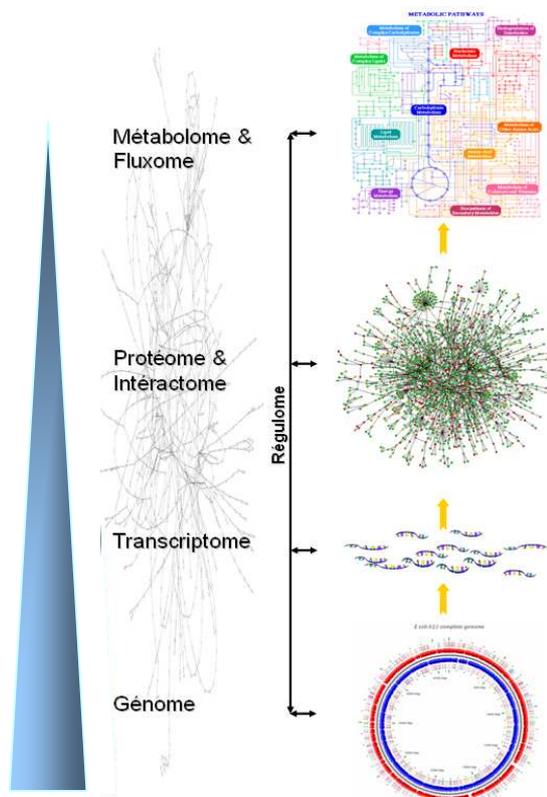


Figure 4 : Les 5 niveaux organisationnels et fonctionnels chez la cellule bactérienne

L'ensemble de ces connaissances a ainsi permis de reconstituer le réseau métabolique d'*E. coli*, ainsi que les systèmes de régulation qui assurent l'homéostasie de la cellule.

1.1.1.1. Organisation générale

Les récents travaux de Keseler *et al.* (2009), ont montré que le métabolisme d'*E. coli* est composé de 1326 réactions métaboliques entre 1362 composés, le tout organisé en 2342 voies métaboliques. Sur les 1362 composés présents chez *E. coli*, seulement 50 participent à 8 réactions ou plus (Tableau 1) représentant ainsi des carrefours métaboliques. Parmi ces métabolites, l'eau et les cofacteurs ATP et NAD(P)(H) sont les plus connectés. De plus, 11 intermédiaires du métabolisme central (pyruvate, acétyl-CoA, α -kétoglutarate, glucose, glyceraldéhyde-3-phosphate, acétate, oxaloacétate, dihydroxyacétone-phosphate, glucose-1-phosphate, phosphoénolpyruvate et fructose-6-phosphate) forment aussi des carrefours métaboliques et sont à la base du réseau métabolique. Ces métabolites intermédiaires sont générés lors du catabolisme de différentes sources carbonées, comme le glucose, et fournissent l'énergie et les précurseurs indispensables à la synthèse des acides aminés (AA), des acides nucléiques et des lipides (Gottschalk, 1986 ; Keseler *et al.*, 2005).

Tableau 1 : Carrefours métaboliques. (D'après Ouzounis & Karp, 2000).
Les métabolites peuvent aussi bien intervenir en tant que réactif ou que produit.

Occurrence	Name of metabolite	Occurrence	Name of metabolite
205	H ₂ O	13	glyceraldehyde-3-phosphate
152	ATP	13	THF
101	ADP	13	acetate
100	phosphate	12	PRPP
89	pyrophosphate	12	[acyl carrier protein]
66	NAD	12	oxaloacetic acid
60	NADH	11	dihydroxy-acetone-phosphate
54	CO ₂	11	GDP
53	H ⁺	11	glucose-1-phosphate
49	AMP	11	UMP
48	NH ₃	10	e ⁻
48	NADP	10	phosphoenolpyruvate
45	NADPH	10	acceptor
44	Coenzyme A	10	reduced acceptor
43	L-glutamate	10	GTP
41	pyruvate	10	L-serine
29	acetyl-CoA	10	fructose-6-phosphate
26	O ₂	9	L-cysteine
24	2-oxoglutarate	9	reduced thioredoxin
23	S-adenosyl-L-methionine	9	oxidized thioredoxin
18	S-adenosyl-homocysteine	9	reduced glutathione
16	L-aspartate	8	acyl-ACP
16	L-glutamine	8	L-glycine
15	H ₂ O ₂	8	GMP
14	glucose	8	formate

Les travaux antérieurs de Karp *et al.* (2007) ont reporté que le réseau métabolique d'*E. coli* est constitué de 1008 réactions entre les différents métabolites, dont 722 sont associées avec une des 194 voies métaboliques. Les 286 réactions restantes ne sont assignées à aucune voie métabolique. Les 1008 réactions du réseau métabolique sont catalysées par un total de 918 enzymes, dont 482 sont des enzymes monomériques et 436 sont des multimères. Ces enzymes sont codées par 991 gènes distincts, soit 22% du génome (Figure 5). Le nombre d'enzymes est inférieur au nombre de réactions qu'elles catalysent car certaines enzymes peuvent catalyser plusieurs réactions. Enfin, des enzymes et certaines voies métaboliques sont encore inconnus, mettant en évidence quelques lacunes sur la connaissance du métabolisme d'*E. coli*.

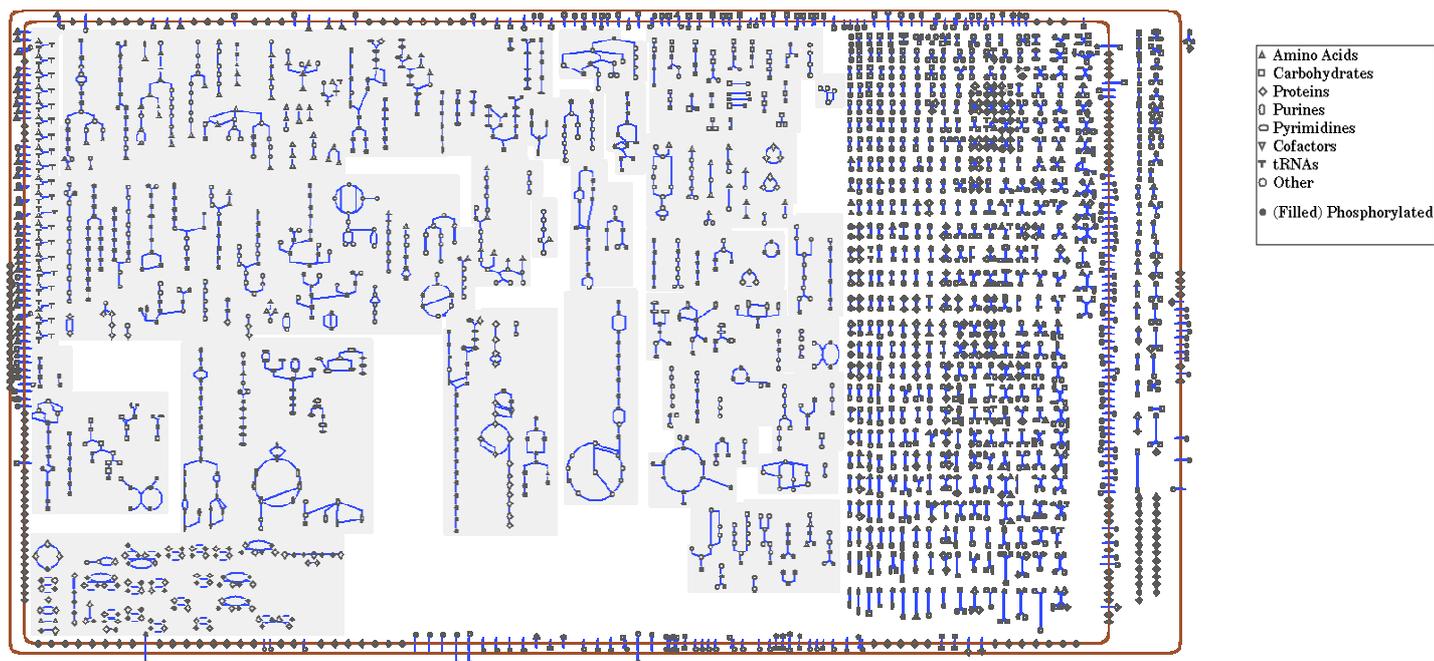


Figure 5 : Représentation schématique de toutes les réactions métaboliques connues chez *E. coli* (<http://ecocyc.org>)(Neidhardt, 1987).

Les réactions sont regroupées par voies métaboliques, où chaque point correspond à un métabolite et chaque lien à une réaction. A droite sont représentées les réactions qui ne sont associées à aucune voie.

1.1.1.2. Métabolisme central du glucose et biosynthèse des AA

Le métabolisme central du glucose constitue le squelette du métabolisme d'*E. coli* car il fournit à la cellule tous les composés indispensables à sa croissance et sa survie. Ainsi, la dégradation du glucose, notamment par le cycle de Krebs, produit de l'énergie (ATP) et des intermédiaires réducteurs (NADH, UQH₂) qui serviront de donneurs d'électrons pour les réactions productrices d'ATP de la chaîne respiratoire.

De plus, le métabolisme central dégrade le glucose afin de synthétiser tous les précurseurs métaboliques indispensables à la synthèse des acides aminés. Ainsi, suivant leur origine biosynthétique, les acides aminés peuvent être classés en 5 familles (Figure 6):

- Famille du glutamate (rose)
- Famille du pyruvate (beige)
- Famille de l'aspartate (vert)
- Famille du shikimate (bleu)
- Famille de la sérine (violet)

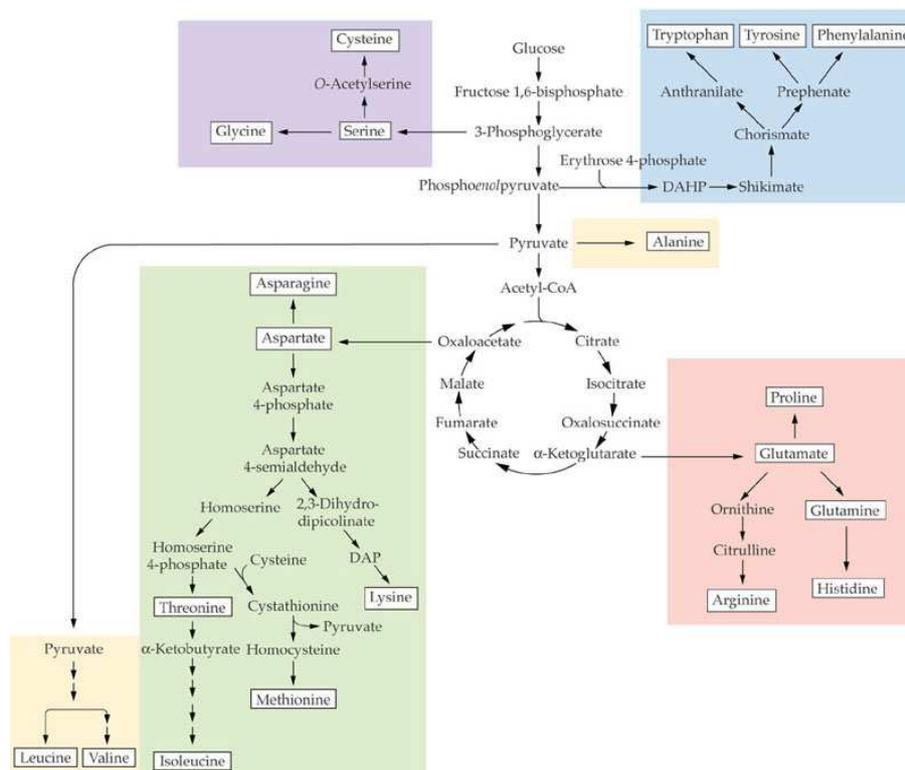


Figure 6 : Représentation schématique des voies de biosynthèse des acides aminés.
Les couleurs représentent les 5 familles d'acides aminés classées en fonction du précurseur métabolique.

La biosynthèse des acides aminés utilise essentiellement le NADPH comme intermédiaire réducteur, synthétisé principalement par le métabolisme central (voir paragraphe 3.2.1). Ces acides aminés sont indispensables à la croissance de la bactérie car ils constituent les briques élémentaires de la synthèse des protéines, constituants majoritaires de la biomasse représentant 55% du poids sec cellulaire (Neidhardt, 1987).

Le reste du poids sec cellulaire est constitué à 20,5% d'ARN, 3,1% d'ADN, 9,1% de lipides, 3,4% de lipopolysaccharides, 2,5% de peptidoglycanes, 2,5% de glycogène, 0,4% de polyamines et 3,5% de métabolites divers, cofacteurs et ions (Neidhardt, 1987).

1.1.2. Apport des modèles *in silico* dans l'étude de l'adaptation métabolique

La connaissance de la structure globale et des fonctionnalités du métabolisme d'*E. coli*, associées aux données physiologiques expérimentales, ont permis d'élaborer des modèles *in silico* du métabolisme bactérien. Ces modèles associés à des analyses de flux métaboliques permettent entre autre, de prédire et d'étudier le comportement du réseau en conditions normale ou perturbée (Feist & Palsson, 2008).

1.1.2.1. Analyse des flux métaboliques

L'étude des flux métaboliques est basée sur des expériences de marquage isotopique des métabolites synthétisés par la cellule en croissance sur un substrat marqué au carbone 13 ou à l'azote 15 (¹³C, ¹⁵N). L'analyse par RMN et/ou spectrométrie de masse des profils isotopiques des

Chapitre I – Introduction bibliographique

métabolites récoltés en phase exponentielle de croissance permet de calculer les vitesses réelles des flux intracellulaires à partir de données expérimentales connues (composition de la biomasse, réseau métabolique...) et par le biais de modèles mathématiques d'optimisation (Szyperki, 1995 ; Wiechert, 2001a et 2000b).

Le modèle mathématique d'analyse des flux métaboliques repose sur deux hypothèses essentielles :

➤ une voie métabolique est définie par la suite de réactions biochimiques ; le flux d'une voie métabolique est la somme des vitesses des réactions individuelles (Figure 7).

➤ pour des conditions d'état stationnaire, il n'y a pas d'accumulation de métabolites, donc la somme des flux entrants est égale à celle des flux sortants (Figure 8).

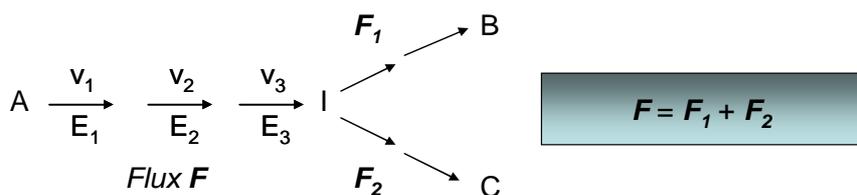


Figure 7 : Flux au travers d'une bifurcation métabolique.

A, substrat ; B et C, produits ; I, intermédiaire réactionnel ; E, enzyme catalysant la réaction à une vitesse v ; F, flux métabolique.

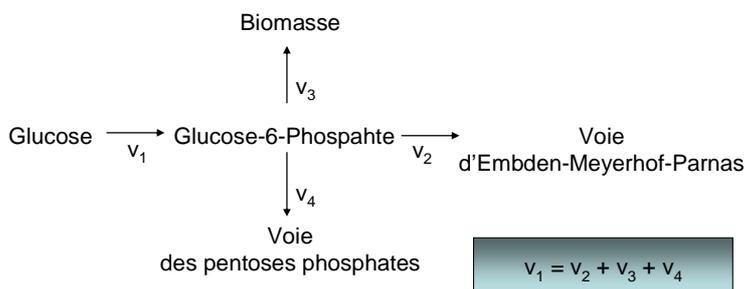


Figure 8 : Exemple de l'équilibre métabolique du glucose-6-phosphate.

v, vitesse de réaction.

Ainsi, ces hypothèses permettent de relier les variables entre elles, et apportent des informations supplémentaires pour calculer certains flux intracellulaires difficilement mesurables expérimentalement. Dans l'exemple du glucose-6-phosphate, les flux v₁ et v₃ peuvent être mesurés directement, correspondant respectivement à la vitesse de consommation du substrat initial (q_s) et à la vitesse de production de la biomasse (μ). Avec le traitement des données des profils isotopiques, la vitesse v₂ pourra alors être calculée, et v₄ déterminée par déduction.

1.1.2.2. Modélisation sous contraintes

La modélisation sous contrainte est une approche stœchiométrique d'analyse des flux qui permet de lever la forte sous-détermination des réseaux métaboliques par l'addition de contraintes sur chaque flux du système (Cécile Nicolas, 2007).

Les contraintes du modèle sont régies par des lois physiques universelles, comme la loi de la conservation de la masse et les principes thermodynamiques, mais aussi par des variables propres au système étudié, telles que des contraintes environnementales (substrat...) et la stœchiométrie

Chapitre I – Introduction bibliographique

des réactions biochimiques sur le réseau métabolique. Bien que soumises à de telles contraintes, la modélisation aboutit à un ensemble de solutions possibles correspondant à plusieurs états fonctionnels du réseau métabolique. La solution retenue correspond ainsi à une utilisation optimale du réseau métabolique pour favoriser la croissance cellulaire (Edwards *et al.*, 2001).

Les modélisations sous contraintes, basées sur le principe d'optimisation du réseau métabolique, permettent de prédire les comportements optimaux, les rendements (Edwards *et al.*, 2001 ; Segre *et al.*, 2002), les capacités et la viabilité du réseau métabolique suite à la délétion de gènes. Elles aident ainsi à prévoir le caractère létal ou non d'une délétion (Edwards & Palsson, 2000a).

Edwards et Palsson (2000b) ont évalué le caractère essentiel des gènes codant pour les enzymes du métabolisme central d'*E. coli* à l'aide d'un modèle métabolique sous contraintes. Ce modèle a permis la prédiction du comportement, c'est-à-dire la croissance ou non de mutants de délétion de chacun des gènes impliqués dans le métabolisme central, avec une fiabilité de 86% par rapport aux données expérimentales.

1.1.2.3. Intégration des réseaux de régulation

De nombreux mécanismes régulent à plusieurs niveaux la distribution des flux métaboliques : au niveau génétique avec la mise en place de contrôle transcriptionnel et post-transcriptionnel ; au niveau enzymatique avec les contrôles cinétiques et allostériques. Toutefois, la régulation transcriptionnelle est considérée comme le mécanisme régulateur dominant du métabolisme bactérien. Actuellement la régulation de la transcription d'*E. coli* sur glucose est connue pour être contrôlée par une dizaine de régulateurs, dont le plus important est ArcA, contrôlant les flux au travers du cycle de Krebs (Perrenoud & Sauer, 2005). De plus, l'entrée de glucose par phosphorylation via le système PTS d'import du glucose va entraîner une diminution de la concentration en AMPc par répression de l'activité de l'adénylate cyclase (Park *et al.*, 2006). La baisse de disponibilité d'AMPc dans la cellule va contribuer à diminuer la formation de complexe CRP-AMPc, complexe régulant la transcription de gènes impliqués dans la dégradation de sucres autres que le glucose. Cette régulation transcriptionnelle globale est connue sous le nom de répression catabolique, phénomène qui permet à la bactérie d'utiliser préférentiellement le glucose (diauxie), quand d'autres sucres sont aussi présents dans le milieu de culture (Deutscher, 2008 ; Kimata *et al.*, 1997).

L'intégration des données de régulation transcriptionnelle dans les modèles a permis de renforcer leur robustesse et d'augmenter ainsi la corrélation de 86% à 91,4% entre les données simulées et expérimentales (Figure 9) (Covert & Palsson, 2002).

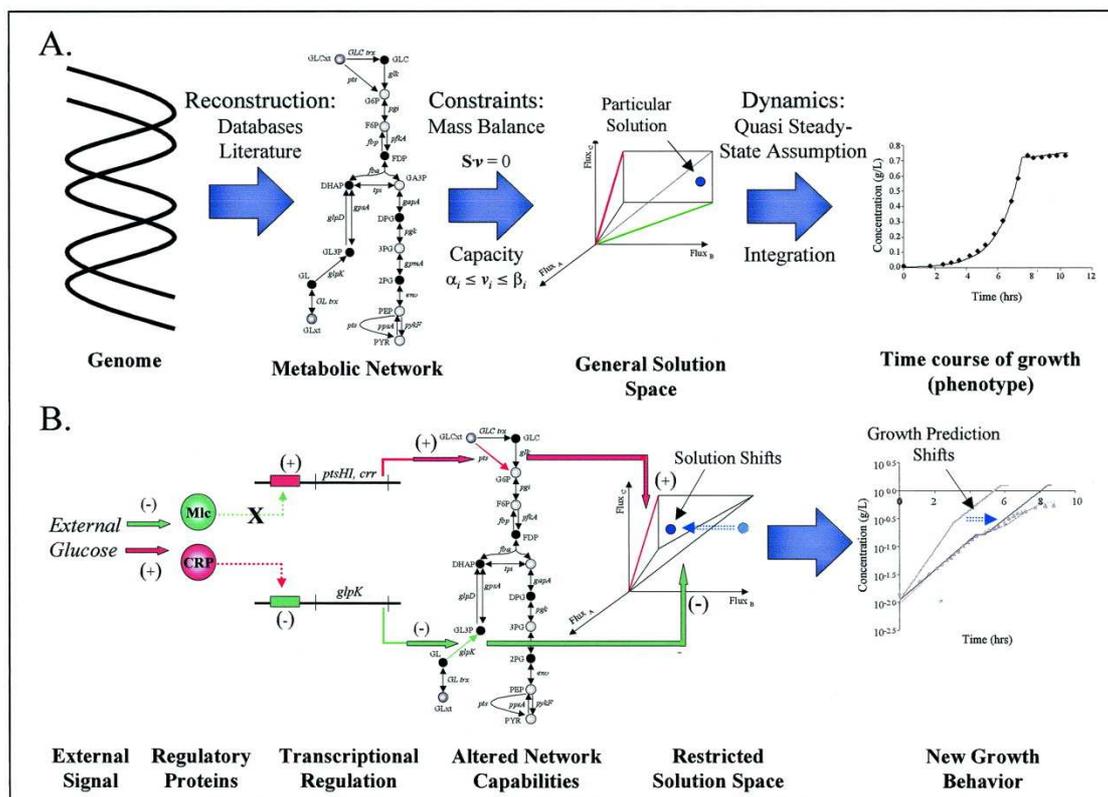


Figure 9 : Principe des modèles *in silico* sous contraintes intégrant les données du métabolisme et de la régulation transcriptionnelle. (D’après Covert & Palsson, 2002).

A. modèle métabolique sous contrainte intégrant seulement les données génomiques. B. Intégration de données de régulation transcriptionnelle, limitant ainsi l’espace des solutions.

L’apport des schémas de régulation transcriptionnelle permet de réduire l’espace des solutions en diminuant le nombre de réactions du réseau métabolique. Par exemple, selon les conditions environnementales, la présence de protéines régulatrices va réprimer la transcription de certains gènes, donc inactiver certaines réactions biochimiques du réseau métabolique limitant ainsi les états fonctionnels de ce réseau (Covert *et al.*, 2004 ; Herrgård & Palsson, 2004).

1.1.3. Réponse adaptative d’*E. coli* face à des contraintes métaboliques

La complexité du réseau métabolique bactérien associée à une régulation transcriptionnelle fine confère à la cellule une forte robustesse métabolique de part la flexibilité adaptative des différentes voies du réseau métabolique. L’outil d’analyse des flux permet de mettre en évidence cette grande plasticité du métabolisme en étudiant les réarrangements de flux métaboliques au niveau du métabolisme central, en réponse à des contraintes métaboliques. Les contraintes métaboliques subies par la bactérie peuvent être environnementales (liées à la disponibilité du substrat, la température ou à la présence de substances toxiques), et/ou génétiques (inactivation d’enzymes clés dans le métabolisme par la délétion du gène codant correspondant).

1.1.3.1. Modification du réseau métabolique face à des perturbations environnementales

Chez *E. coli*, les études ayant pour objectif d'évaluer l'impact de stress environnementaux ont été réalisées sur des souches ayant subi des limitations nutritionnelles en carbone par culture sur des milieux avec comme seule source de carbone le glucose ou l'acétate. Les modifications de la distribution des flux métaboliques ainsi obtenues ont alors été suivies à l'aide d'un marquage isotopique (Fischer & Sauer, 2003 ; Sauer *et al.*, 1999 ; Zhao & Shimizu, 2003)

Lors de la croissance d'*E. coli* sur glucose en conditions de répression catabolique (cultures batch ou cultures continues à des taux de dilution supérieurs à 0,2 h⁻¹), l'oxydation complète du glucose est assurée par le cycle de Krebs. En conditions de limitation de glucose à de faibles vitesses de croissance (cultures continues à des taux de dilution inférieurs à 0,2 h⁻¹), des analyses de flux ont permis de mettre en évidence l'activation de voies latentes, telles que le cycle PEP-glyoxylate dont la PEP carboxykinase supposée inactive sur glucose (Sauer *et al.*, 1999). Comme il a été montré que le cycle futile PEP-cycle du glyoxylate est aussi actif lors de cultures batch en excès de glucose d'un mutant *E. coli* accumulant le NADPH, une des fonctions pourrait être de découpler l'oxydation complète des carbohydrates avec la production de NADPH via le cycle de Krebs (Figure 10)(Fischer & Sauer, 2003).

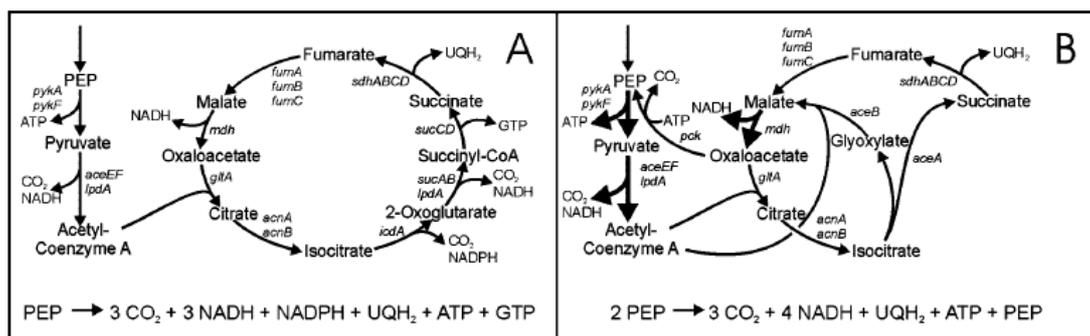


Figure 10 : Equations bilans de l'oxydation complète du PEP au cours (A) du cycle de Krebs et (B) du cycle du PEP-glyoxylate. (D'après Fischer & Sauer, 2003).

Les flèches plus épaisses indiquent que ces réactions ont lieu deux fois par mole de PEP.

Lors de la croissance d'*E. coli* sur acétate en culture continue limitée en carbone, le cycle de Krebs et le shunt glyoxylique voient leur activité respective fortement augmentée, alors que celle de la voie des pentoses phosphates est significativement diminuée, comparativement à la croissance sur glucose (Zhao & Shimizu, 2003).

Sauer *et al.* (1999) ont aussi montré qu'en conditions d'anaérobie et de limitation en ammonium, les réarrangements de flux se font au niveau du cycle de Krebs, par une augmentation significative de l'activité PEP carboxylase.

L'ensemble des travaux précédents montre que la réponse adaptative d'*E. coli* soumis à différentes contraintes métaboliques d'ordre environnemental est l'ajustement des flux au niveau du cycle de Krebs et des voies anaplerotiques.

1.1.3.2. Réponses adaptatives chez des mutants métaboliques d'*E. coli*

L'inactivation d'enzymes par délétion du gène correspondant est aisément réalisable par le biais des outils de biologie moléculaire (Datsenko & Wanner, 2000). Une collection de 3985 mutants de délétion de gènes non essentiels a été obtenue chez *E. coli* (Baba *et al.*, 2006), permettant ainsi l'étude de nombreux mutants métaboliques.

Les modèles *in silico*, confirmés par des données expérimentales, ont démontré que seuls 7 gènes sur 43 (*rpiAB*, *pgk*, *acnAB*, *gltA*, *icdA*, *tktAB* et *gapAC*), codant pour des enzymes du métabolisme central, sont essentiels pour la croissance d'*E. coli* en croissance aérobie sur glucose, leur délétion étant létale (Edwards & Palsson, 2000b ; Kim & Copley, 2007). Plus globalement, sur les 227 gènes impliqués dans le métabolisme du glucose et la biosynthèse des acides aminés, 80 ne sont pas essentiels (Kim & Copley, 2007).

Sur l'ensemble des délétions des gènes non létales du métabolisme central, moins d'une dizaine entraînent une diminution significative du taux de croissance : *pgi* codant pour la phosphoglucoisomérase, première enzyme de la glycolyse, (Canonaco *et al.*, 2001), *pfkA* codant pour la phosphofructokinase A, deuxième enzyme de la glycolyse, *mae/pck* codant respectivement pour l'enzyme malique et la PEP-carboxykinase, catalysant deux réactions de la gluconéogenèse, *sdhA/mdh* codant respectivement pour la succinate déshydrogénase et la malate déshydrogénase, enzymes du cycle de Krebs (Fischer & Sauer, 2003b), *tpi*, codant pour la triosephosphate isomérase de la glycolyse, et *ppc* codant pour la phosphoénolpyruvate carboxylase (Fong *et al.*, 2006). Ainsi, peu de gènes ont une fonction essentielle dans le métabolisme d'*E. coli*. Ce caractère robuste du réseau métabolique est en partie dû à l'existence de voies métaboliques parallèles pour la synthèse d'un même précurseur vital, et de plusieurs enzymes possédant la même activité.

L'adaptation d'*E. coli* face à des perturbations de la structure du réseau métabolique se traduit généralement par deux types d'ajustement métabolique : l'activation de voies préexistantes et l'induction de voies latentes pour lesquelles les flux métaboliques sont respectivement faibles voire inexistantes dans les conditions de référence.

Face à la délétion des gènes *pykAF* codant pour la pyruvate kinase, les flux métaboliques sont augmentés au travers des deux réactions anaplérotiques catalysées par la PEP carboxylase et l'enzyme malique, assurant la production de pyruvate indispensable à la croissance sur glucose (Emmerling *et al.*, 2002 ; Sauer *et al.*, 1999 ; Siddiquee *et al.*, 2004).

Face à la délétion du gène *lpdA* codant pour la lipoamide déshydrogénase, le métabolisme bactérien répond par une augmentation des flux au travers des voies anaplérotiques et une induction des voies d'Entner-Doudoroff et du glyoxylate (Li *et al.*, 2006).

Un autre exemple d'adaptation chez *E. coli* suite à la délétion du gène *tpi*, est la conversion du DHAP en pyruvate par l'induction de la voie latente du méthylglyoxal. Cette conversion permet d'éviter l'accumulation de DHAP qui est dégradé en méthylglyoxal, composé toxique pour la cellule, qui sera finalement converti en pyruvate (Fong *et al.*, 2006).

1.1.3.3. La redondance métabolique : clé de la plasticité du métabolisme bactérien

Chez *E. coli*, la capacité d'assurer la synthèse des composés élémentaires essentiels face à des contraintes métaboliques montre la robustesse du réseau métabolique. Deux concepts généraux permettent d'expliquer ces fortes capacités d'adaptation : i) l'interconnectivité des voies

métaboliques permettent aux flux de contourner une étape bloquante ou d'emprunter des voies alternatives (préexistantes ou induites) ; ii) la diversité et la richesse de l'appareillage enzymatique, avec la présence d'isoenzymes, d'enzymes à large spécificité de substrat et d'enzymes multifonctionnelles, permettent la substitution d'éventuelles enzymes manquantes ou défectueuses (Kim & Copley, 2007).

Par exemple, l'enzyme FumC catalyse l'activité fumarase en conditions aérobies, alors que les deux autres isoenzymes, FumA et FumB, sont inactives en présence d'oxygène suite à l'oxydation de leurs centres fer-soufre (Tseng *et al.*, 2001). Un autre exemple de flexibilité enzymatique repose sur la large spécificité de substrat des transaminases qui peuvent réagir avec des composés aminés possédant 4 à 7 atomes de carbone (Kim, 1964).

Cette redondance du métabolisme, tant au niveau du réseau métabolique qu'au niveau enzymatique, est probablement l'héritage de processus d'évolution et de pressions de sélection. Depuis des millions d'années, *E. coli* s'est adaptée à plusieurs habitats, en exploitant de façon optimale les ressources variées présentes dans l'environnement pour la synthèse de ses composés vitaux (hétérotrophie pour la source carbonée). Son appareillage métabolique a ainsi été enrichi de nouvelles voies métaboliques, actives ou non selon les conditions de croissance.

1.2. Bases dynamiques et génétiques de l'adaptation des bactéries

1.2.1. Adaptation acquise par évolution : l'évolution adaptative

1.2.1.1. Définitions

Le précédent chapitre a présenté la bactérie comme un organisme capable de s'adapter rapidement (en un temps inférieur à une génération cellulaire) à diverses contraintes métaboliques grâce à la grande flexibilité de son réseau métabolique et de son système de régulation. D'autres mécanismes, agissant sur le long terme (en un temps supérieur à plusieurs générations cellulaires), confèrent à la bactérie des capacités adaptatives face à une contrainte métabolique. Ces capacités apparaissent par évolution et sont sélectionnées lors de la propagation de la bactérie au cours du temps car elles lui confèrent un avantage adaptatif. Ce phénomène, appelé évolution adaptative, se traduit par une amélioration des capacités reproductives de l'organisme, i.e. la croissance pour une population asexuée, par rapport à un environnement donné, et est acquis par des modifications génétiques du patrimoine parental.

Ces contraintes métaboliques subies par la bactérie inhibent généralement la croissance, et vont créer une pression de sélection sur le développement de la lignée bactérienne. L'évolution adaptative sera donc dépendante de ces contraintes, et des pressions de sélection résultantes. Elle va se traduire par la sélection d'individus les mieux adaptés à l'environnement, c'est-à-dire ayant un métabolisme qui pourra contourner au mieux ces contraintes métaboliques.

1.2.1.2. Avantages des bactéries pour étudier l'évolution

Les microorganismes tels que les bactéries présentent de nombreux avantages pour l'étude de l'évolution d'organismes en laboratoire. Leur reproduction rapide permet ainsi l'étude de nombreuses générations en peu de temps. De plus, leur robustesse permet un stockage à long terme des différentes souches, et donc une comparaison des souches ancestrales et des souches évoluées. Enfin, l'abondance des données moléculaires et génomiques pour ces organismes et le développement d'outils performants permettent une analyse globale de leur comportement.

La croissance des bactéries en laboratoire permet un contrôle optimal de leur environnement de croissance. Ainsi, la maîtrise de l'environnement de culture est primordiale car elle permet de contrôler les différentes variables de croissance et ainsi jouer sur des pressions de sélection données.

1.2.1.3. Quantification de l'adaptation par des mesures de « fitness »

L'adaptation acquise par évolution et sélection naturelle peut être quantifiée par la mesure de la « fitness », ou aptitude d'un individu à se reproduire dans un environnement défini grâce à son génotype. Dans le cas précis d'individus unicellulaires asexués comme les bactéries, leur reproduction est assurée par doublement de la cellule. La «fitness» d'une bactérie reflète donc les capacités de cette dernière à se développer dans un environnement précis.

La «fitness» d'une souche évoluée est généralement exprimée par rapport à celle de la souche mère non évoluée, et est appelée «fitness» relative. Elle peut être calculée en mesurant les taux de croissance respectifs des souches évoluée et parentale (ou souche non évoluée) en croissance compétitive dans le même milieu de culture. Le rapport des taux de croissance évoluée sur parentale détermine ainsi la «fitness» relative de la souche évoluée, et évalue le gain de vitesse de croissance de cette dernière (Lenski, 1991). Si les interactions et les compétitions entre les souches évoluée et parentale sont supposées négligeables, la «fitness» relative de la souche évoluée peut être simplifiée au rapport des taux de croissance (évolué/parental) mesurés indépendamment dans des conditions identiques.

1.2.2. Dynamique de l'évolution adaptative bactérienne

1.2.2.1. Evolution de la «fitness»

L'évolution adaptative par sélection naturelle résulte en l'apparition de mutations stables conduisant à l'amélioration des capacités de l'organisme pour un environnement donné. La dynamique de l'évolution est ainsi conditionnée par un jeu d'apparition de mutations plus ou moins bénéfiques pour la bactérie par rapport à son environnement. Les bénéfices apportés par les mutations au cours de l'évolution peuvent ainsi être quantifiés par les gains de «fitness» de l'organisme en cours d'évolution.

De manière générale, le gain de «fitness» est rapide en début d'évolution adaptative et tend à ralentir au cours du temps (Figure 11).

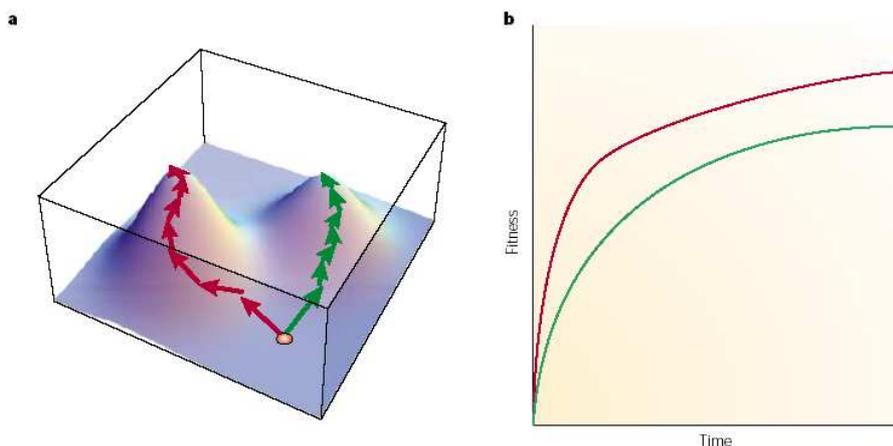


Figure 11 : Paysage de «fitness» et dynamique de l'évolution d'un individu en deux trajectoires adaptatives possibles. (D'après Elena & Lenski, 2003).

a. Paysage hypothétique d'adaptation avec deux pics de «fitness» pour les deux populations issues d'un ancêtre commun. b. Gain d'aptitudes adaptatives au cours du temps, rapide dans les premiers temps puis plus lent à l'approche du pic de «fitness» local.

Ainsi, lorsque l'individu non évolué va être placé dans un nouvel environnement, il va atteindre assez rapidement un pic ou un plateau adaptatif puis son adaptation aura tendance à se stabiliser. Toutefois, le gain de «fitness» tend toujours à augmenter au cours du temps indiquant que l'adaptation est continue et potentiellement infinie dans un environnement donné.

1.2.2.2. Le devenir des mutations lors de l'évolution

Les dynamiques de l'évolution, initialement rapide puis ralentie mais en constante augmentation, s'expliquent par plusieurs épiphénomènes. Premièrement, le temps nécessaire pour qu'une mutation bénéfique devienne majoritaire dans une population est inversement proportionnel aux avantages qu'elle procure : pour une mutation procurant 10% d'avantage, il faudra 250 générations pour qu'elle devienne majoritaire ; pour 0,1% d'avantage, il faudra 25000 générations. Or, il est plus probable de voir apparaître des mutations conférant de faibles avantages, donc leurs effets bénéfiques ne seront visibles que sur des longues périodes de temps. Deuxièmement, la plupart des mutations bénéfiques sont perdues par dérive génétique, résultant d'une fluctuation aléatoire des fréquences alléliques au fil des générations. Troisièmement, il peut y avoir une compétition entre des clones possédant des mutations bénéfiques différentes, et comme il ne peut y avoir de recombinaison génomique au sein d'une population asexuée, seules quelques unes deviendront majoritaires et les autres seront perdues.

Les mutations les plus bénéfiques, qui ont le plus d'impact sur les gains de «fitness» par rapport au temps, sont aussi les plus rares et ne sont pas fixées systématiquement dans le génotype de la population en cours d'évolution. Pour toutes ces raisons, l'adaptation d'un individu à un environnement donné est lente et continue, l'individu évoluant par plateaux adaptatifs, correspondant à l'apparition de mutations bénéfiques (Cooper & Lenski, 2000).

1.2.2.3. Reproductibilité de l'évolution

L'évolution de deux populations issues d'un ancêtre commun dans le même environnement conduit généralement à des caractères adaptatifs différents. Ces divergences indiquent que plusieurs pics de « fitness » peuvent exister pour un même individu évoluant dans un environnement défini. L'évolution n'est donc pas reproductible, en raison du caractère aléatoire de l'apparition des mutations (Lenski & Travisano, 1994).

Dans certains cas, il peut y avoir convergence dans l'adaptation de deux populations évoluant en parallèle, se traduisant par des gains de «fitness» identiques pour les populations évoluées comparées à l'ancêtre commun. Mais bien qu'il y ait convergence, les mécanismes traduisant l'évolution adaptative sont souvent différents. Par exemple, deux populations évoluées avec la même «fitness» relative peuvent avoir des profils d'expression de gène différents, reflétant des génotypes évolués divergents (Fong *et al.*, 2005).

1.2.3. Bases génétiques de l'évolution adaptative

L'étude seule de la dynamique de l'évolution adaptative ne suffit pas à comprendre les mécanismes régissant l'acquisition de l'adaptation. En effet, des évolutions en parallèle d'un même individu peuvent se traduire par un même gain de «fitness» mais résultant de génotypes différents. Pour comprendre comment les ajustements évolutifs vont améliorer les capacités d'un individu, il faut connaître les bases génétiques du phénomène, cela se résumant à l'identification puis la caractérisation des mutations responsables de l'évolution adaptative.

1.2.3.1. Caractérisation des mutations « adaptatives »

Lorsque des mutations apparues lors de l'évolution adaptative sont identifiées (voir paragraphe 1.3.1.2), ces mutations doivent être validées comme celles responsables de l'adaptation. Pour cela, un des moyens consiste à introduire une à une les mutations du génotype évolué dans le génotype parental et à mesurer les gains de « fitness » que ces dernières engendrent.

Cette validation des mutations est indispensable car elle permet de différencier les mutations impliquées dans le phénomène d'adaptation qu'elles engendrent, des mutations neutres ou délétères qui ont pu être fixées aléatoirement par dérive génétique (random drift) ou par sélection d'une autre mutation physiquement proche sur le chromosome (auto-stop génétique)(Elena & Lenski, 2003).

Enfin, il existe aussi des mutations bénéfiques, neutres voire délétères qui, associées à d'autres mutations, présentent des effets adaptatifs bénéfiques. Il s'agit alors d'épistasie, les effets de chaque mutation n'étant pas additionnels.

1.2.3.2. Fonctions touchées dans l'évolution adaptative

Les mutations qui apparaissent lors de l'évolution sont des phénomènes aléatoires. Suivant les avantages adaptatifs qu'elles procurent à l'individu en cours d'évolution, elles pourront être sélectionnées et fixées dans le génotype évolué suivant la pression de sélection. Les mutations

identifiées après évolution sont donc souvent directement liées à la fonction cellulaire qui subit la plus grande contrainte.

Ainsi, l'adaptation en parallèle de plusieurs clones d'*E. coli* MG1655 en croissance sur glycérol après évolution sur 700 générations est permise par plusieurs mutations, dont certaines touchent le même gène *glpK*. Ces mutations sur le gène *glpK*, codant pour la glycérol kinase qui catalyse la première étape de dégradation du glycérol, sont les seules clairement identifiées comme responsables de l'évolution adaptative (Honisch *et al.*, 2004).

De même, lorsque *E. coli* est soumise à des conditions de stress de congélation-décongélation-croissance sur 1000 générations, cette dernière montre des capacités de survie améliorées, avec entre autre l'apparition d'une mutation dans le gène *cls*, qui code pour une cardiolipide synthétase, améliorant ainsi la fluidité de la membrane. Une seconde modification génétique correspondant à une insertion au niveau de la région intergénique *uspA-uspB*, apporte aussi une augmentation de la « fitness » dans les conditions de stress de congélation-décongélation-croissance, mais dont les mécanismes physiologiques restent inexplicables (Sleight *et al.*, 2008).

Les mutations apparues après évolution touchent aussi des fonctions générales non directement liées aux pressions de sélection établies. Ainsi les fonctions de régulation globales sont quelques fois affectées par des mutations dans des gènes régulateurs. Ces mutations vont souvent avoir de forts effets pléiotropiques entraînant des changements dans le profil d'expression des gènes. Ces mutations qui affectent les schémas de régulation ont souvent de forts effets positifs sur la «fitness» du clone évolué (voir paragraphe 1.3.2)(Cooper *et al.*, 2003 ; Herring *et al.*, 2006).

1.3. L'étude de l'évolution à l'échelle du laboratoire

L'étude de l'évolution des bactéries en laboratoire permet, sur des temps relativement courts, d'étudier les principes généraux et les mécanismes qui gouvernent le phénomène d'évolution adaptative. Cette étude permet aussi de se rendre compte de la flexibilité du génome bactérien qui peut s'adapter à de multiples contraintes métaboliques par de simples modifications de gènes.

Etudier l'évolution adaptative à l'échelle du laboratoire nécessite trois étapes : i) l'évolution proprement dite de l'organisme cible avec une ou des contraintes adaptatives définies ; ii) l'identification des événements mutationnels survenus lors de l'évolution adaptative, et la validation de leur contribution positive au phénomène d'adaptation ; iii) la caractérisation biochimique et/ou moléculaire de ces mutations pour expliquer un gain de «fitness» par un mécanisme moléculaire (amélioration de l'activité d'enzymes, modification du profil transcriptionnel...). Ces trois étapes mettent en jeu des principes et des outils spécifiques qui seront détaillés dans les paragraphes suivants.

1.3.1. Stratégies et outils mis en œuvre pour étudier l'évolution adaptative

1.3.1.1. Mise en place du processus d'évolution

Pour étudier l'évolution adaptative d'un organisme, il faut pouvoir le comparer à son ancêtre, et ainsi espérer trouver les modifications génétiques à l'origine de l'adaptation. Pour pouvoir réaliser une telle comparaison, deux solutions sont possibles : posséder l'organisme évolué

et son fossile (pouvant se résumer seulement à une empreinte physique et/ou génétique), ou posséder l'organisme non évolué et lui faire subir une évolution « forcée » en laboratoire pour ainsi obtenir l'organisme évolué.

La deuxième solution permet évidemment d'approfondir au maximum l'étude des mécanismes de l'évolution adaptative car les paramètres physiologiques et moléculaires des organismes évolués et non évolués peuvent être comparés dans les mêmes conditions, ce qui est rarement le cas lorsque les travaux sont réalisés sur des données fossiles.

Pour mimer l'évolution naturelle subie par un microorganisme au cours du temps, il faut forcer ce dernier à se reproduire dans un environnement défini et à une vitesse optimale pour favoriser les effets de la sélection naturelle. Pour des microorganismes asexués tels que les bactéries, cela revient à maintenir une phase exponentielle de croissance tout au long du processus d'évolution. Pour maintenir ce stade de croissance, la bactérie doit être approvisionnée constamment en éléments minéraux et source carbonée indispensables à sa croissance, et éviter toute déplétion qui entraînerait la mort des cellules. Deux procédés sont couramment utilisés pour maintenir la bactérie en phase exponentielle de croissance : i) les cultures discontinues successives (repiquage successif des cellules dans du milieu frais) (Figure 12) ; ii) la culture continue en chemostat (Figure 13).

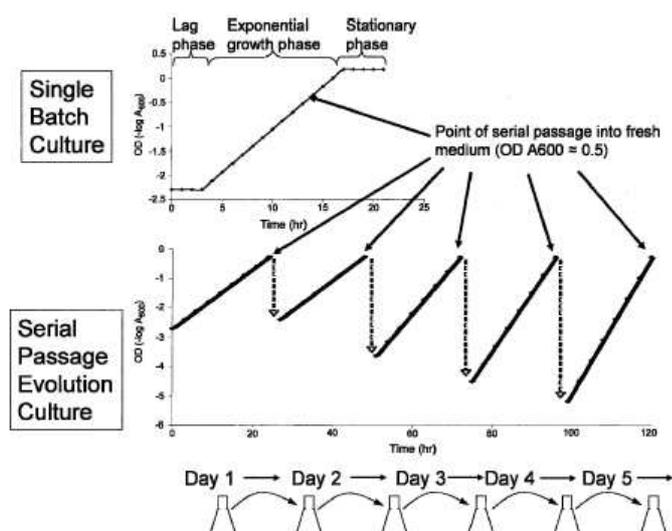


Figure 12 : Représentation schématique des cultures d'évolution par repiquages successifs en milieu frais. (D'après Fong *et al.*, 2005).

L'évolution adaptative est permise par un prolongement de la phase exponentielle de croissance par repiquage journalier des populations en évolution dans du milieu frais, et cela avant qu'elles n'atteignent la phase stationnaire de croissance.

Le procédé d'évolution *in vivo* en cultures discontinues successives est techniquement très simple à mettre en œuvre, et permet d'étudier aisément l'évolution parallèle de plusieurs lignées issues d'un même ancêtre commun.

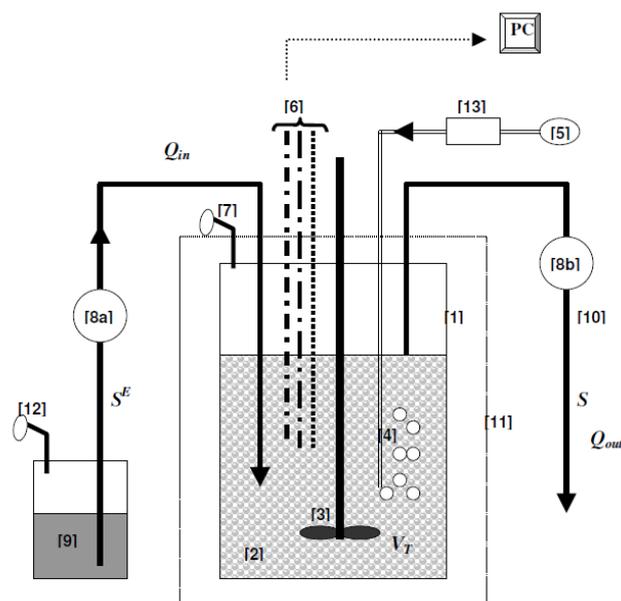


Figure 13 : Schéma simplifié d'un chemostat en mode continu. (D'après Jacques Thierie, 2005).

[1] Enceinte du bioréacteur [2] Milieu de culture et cellules [3] Agitateur [4] Diffuseur de gaz (air, oxygène, azote,...) [5] Surpresseur [6] Capteurs divers (t° , pH, O_2 ,...) [7] Sortie stérile des gaz ou appareils de mesure (CO_2 ,...) [8a,b] Pompe et débitmètre volumétrique [9] Milieu de culture stérile [10] Sortie du milieu d'excès [11] Enceinte thermostatée [12] Bouchon poreux stérilisant [13] Débitmètre à gaz et humidificateur. Q_{in} et Q_{out} sont respectivement les flux volumiques d'entrée et de sortie V_T est le volume utile total S_0 et S sont les concentrations en substrat limitant à l'entrée et à la sortie du chemostat.

Le principe de la culture continue en chemostat est d'apporter du milieu frais en permanence dans le bioréacteur (à une vitesse Q_{in}). Le volume de ce dernier est maintenu constant par soutirage (à une vitesse Q_{out}), de telle sorte à n'avoir pas d'accumulation de substrats/produits et avoir un renouvellement des cellules. La vitesse d'apport/export du chemostat ($Q = Q_{in} = Q_{out}$) va ainsi définir la vitesse de dilution D du chemostat par rapport au volume du milieu dans le réacteur ($D = Q/V_T = \mu$). Pour se placer dans des conditions d'évolutions, la vitesse de dilution doit être proche du taux de croissance de l'organisme étudié pour que la pression de sélection soit effective et optimale (Meynial Salles *et al.*, 2007).

1.3.1.2. Recherche des mutations issues de l'évolution

La recherche des mutations survenues lors de l'évolution adaptative est une étape clé pour la compréhension des bases génétiques et moléculaires de l'adaptation. Le séquençage de l'individu évolué, et si besoin celui de l'ancêtre, permet ainsi par comparaison des deux génomes d'identifier les modifications génomiques. Toutefois, le coût et la précision d'un séquençage capillaire classique ne sont pas conformes aux exigences liées à l'étude de populations évoluées. De tels travaux nécessitent une précision suffisante pour détecter des mutations ponctuelles sur l'ensemble d'un génome. Ils demandent aussi une rapidité et une flexibilité du système de séquençage pour pouvoir multiplier aisément les analyses, comme lors de l'étude de plusieurs lignées bactériennes évoluées.

Des techniques applicables à l'étude de populations évoluées plus rapides et plus précises ont été développées pour détecter des mutations ponctuelles. Ainsi, des méthodes analytiques utilisant des technologies de spectrométrie de masse MALDI-TOF (Honisch *et al.*, 2004) ou d'HPLC dénaturante (Raghunathan & Palsson, 2003) sont utilisées pour détecter des mutations ponctuelles sur des régions préalablement choisies, et caractérisées par la suite par séquençage direct. D'autres

méthodes permettant d'explorer l'ensemble du génome bactérien par une recherche systématique de modifications génomiques ont été mises au point telles que la comparaison de génomes sur puce à ADN et le pyroséquençage sur puce. La comparaison de génome sur puce à ADN analyse les signaux d'hybridation de deux génomes, par exemple évolué et non évolué, par rapport à un génome de référence synthétisé *in situ* sur la puce (Herring *et al.*, 2006 ; Wick *et al.*, 2005). Les différences de signaux permettent ainsi de détecter des modifications génomiques ponctuelles sur l'ensemble du génome, et les mutations associées sont ensuite caractérisées par un séquençage de la région génomique correspondante. Seules les techniques de séquençage direct, comme le pyroséquençage par synthèse d'ADN (Velicer *et al.*, 2006) ou le séquençage *in situ* en fluorescence de billes par la technologie « polony » (contraction de polymérase et colony)(Shendure *et al.*, 2005) permettent de caractériser directement, en une seule étape, les mutations sur l'ensemble du génome.

1.3.1.3. Analyse des changements adaptatifs

Lorsque les événements mutationnels survenus lors de l'évolution adaptative ont été identifiés, il faut s'assurer qu'ils sont bien responsables du gain de croissance, ou de « fitness », observé chez l'individu évolué. Dans un premier temps, pour valider le bénéfice de ces mutations, il suffit de les tester une par une puis en combinaison dans le génotype non évolué, par le biais de manipulations génétiques. L'étude du gain de «fitness» sur la souche parentale avec chacune des mutations ou avec leurs combinaisons va permettre la caractérisation phénotypique de ces mutations, seules ou combinées avec d'autres.

La deuxième étape repose sur la caractérisation moléculaire de ces mutations. Cette caractérisation va dépendre intrinsèquement du gène ou de la fonction touchée par la mutation, et suivant le cas va faire appel à des méthodes d'investigation globales ou localisées. Lorsqu'un gène codant pour une enzyme est touché par une mutation adaptative, l'enzyme évoluée va être, dans la mesure du possible, purifiée et caractérisée de telle sorte à évaluer l'impact de la mutation sur ses propriétés biochimiques et par extrapolation sur les propriétés du microorganisme. Ainsi, des travaux sur l'évolution adaptative d'*E. coli* sur glycérol ont mis en évidence qu'une mutation dans le gène *glpK* est responsable de l'augmentation d'un facteur 12 de l'activité de la glycérol kinase, et d'une diminution de 33% de l'inhibition de cette dernière par le fructose-1,6-biphosphate, expliquant ainsi en partie le gain de croissance observée sur glycérol (Honisch *et al.*, 2004). Lorsque la mutation identifiée est localisée sur un gène régulateur ou susceptible d'engendrer des effets pléiotropiques, il est alors préférable de comparer les individus évolués et non évolués par des approches d'analyses globales, avec des outils comme l'analyse de flux métaboliques, l'analyse des profils transcriptomiques (Fong *et al.*, 2006) et/ou d'expression protéique (Pelosi *et al.*, 2006).

1.3.2. Exemples d'évolution face à des contraintes environnementales ou génétiques

Cette partie présente quatre exemples d'évolution en laboratoire, face à des contraintes environnementales ou génétiques, avec en particulier le détail des différentes méthodes d'investigation employées pour la recherche des cibles de l'évolution adaptative.

1.3.2.1. Evolution en parallèle d'*E. coli* sur 40 000 générations

Les travaux de RE Lenski (Lenski, 1991 ; Philippe *et al.*, 2007) ont grandement contribué à comprendre le phénomène d'évolution adaptative des bactéries. En effet, il a initié des expériences d'évolution en parallèle avec 12 répliques de populations d'*E. coli* évoluant continuellement pendant 20 ans (repiquage journalier en culture discontinue), soit plus de 40 000 générations, en milieu minimum limité en glucose. L'étude phénotypique et génotypique des 12 populations évoluées pendant 20 000 générations a permis de mieux comprendre la dynamique et la diversité du phénomène d'évolution adaptative (Cooper & Lenski, 2000 ; Lenski & Travisano, 1994). Une caractérisation génomique des mêmes populations a par la suite été effectuée par la technique de RFLP, en utilisant les séquences d'insertions (IS) connues chez *E. coli* comme sonde moléculaire, et a permis de mettre en évidence quelques mutations apparues lors de l'évolution adaptative, touchant des gènes impliqués dans le métabolisme central (inactivation de *pykF* et *nadR*), dans la synthèse de la paroi cellulaire (mutations proche du promoteur *pbpA-rodA*) et dans des fonctions mal définies (inactivation de *hokB-sokB* et *yfcU*) (Schneider *et al.*, 2000). Une partie des bases génétiques de l'évolution adaptative d'*E. coli* sur 20 000 générations sur glucose a ainsi été établie par une approche de recherche de gènes candidats. Les changements dans l'expression des gènes et dans les profils protéiques globaux dans les populations évoluées ont permis de cibler des mutations bénéfiques apparues chez plusieurs populations évoluées dans les gènes *spoT* et *malT*, respectivement. Ainsi, la mutation dans le gène *spoT* a été identifiée par des changements d'expression de gènes dont la régulation est contrôlée par la guanosine tetraphosphate, effecteur synthétisé par l'enzyme Spot (Cooper *et al.*, 2003). La mutation dans le gène *malT* a été identifiée par l'analyse de profils protéiques révélant des diminutions de l'expression de l'opéron maltose dans plusieurs lignées évoluées (Pelosi *et al.*, 2006).

Un fait intéressant mis en évidence dans la plupart des populations évoluées sur 2000 générations est la découverte de phénotypes possédant une augmentation du degré de super enroulement de l'ADN. L'étude d'une des 12 populations a permis de détecter deux mutations dans les gènes *topA* et *fis*, dont les enzymes correspondantes contrôlent la topologie de l'ADN. Le contrôle du super enroulement de l'ADN est semble-t-il une cible clé de la sélection de populations évoluant en conditions limitées en glucose (Crozat *et al.*, 2005).

Néanmoins, une explication génétique complète du phénomène d'évolution adaptative n'a pu être donnée car certaines mutations bénéfiques n'ont pas été découvertes. Une approche par séquençage global des différents génotypes évolués pourrait probablement remédier à ce problème.

1.3.2.2. Bases génétiques et moléculaires de l'évolution adaptative d'*E. coli* sur glycérol

Une évolution d'*E. coli* en laboratoire en croissance sur glycérol a été menée par l'équipe de BO Palsson (Fong *et al.*, 2005 ; Honisch *et al.*, 2004), qui a repiqué successivement la bactérie dans du milieu frais et cela sur environ 660 générations (44 jours). Le phénotype de croissance de la population finale évoluée est en accord avec les prédictions des modèles *in silico* d'optimisation de la croissance (Ibarra *et al.*, 2002), se traduisant par une augmentation du taux de croissance de 0,22 h⁻¹ à 0,55 h⁻¹. La recherche des mutations responsables de l'adaptation a été réalisée à l'aide de deux approches : une analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF sur 4,4% du génome total des clones évolués (Honisch *et al.*, 2004) et une comparaison de génomes de clones évolués sur puce à ADN (Herring *et al.*, 2006). Même si la première approche n'a pas permis de détecter toutes les mutations adaptatives, des mutations dans le gène *glpK* sont retrouvées dans tous les clones évolués par les deux méthodes (voir paragraphe 1.3.1.3). D'autres mutations détectées uniquement par la comparaison de génomes sur puces touchent les gènes *rpoB* et *rpoC*, codant pour les sous-unités β et β' de l'ARN polymérase, et ont un fort impact sur l'adaptation sur glycérol sûrement à cause d'ajustements transcriptionnels. Plus précisément, l'expression de 672 ORF a statistiquement changé. Par exemple, l'expression de centaines d'ORF impliquées dans les fonctions de motilité cellulaire, de résistance au stress acide et de croissance en phase stationnaire, est sous-réglée. Les fonctions de maturation des protéines et de structuration des ribosomes sont aussi touchées avec une augmentation des transcrits des gènes correspondants (Fong *et al.*, 2005 ; Herring *et al.*, 2006). Deux classes de mutations bénéfiques ont ainsi été identifiées pour supporter l'évolution adaptative : les mutations améliorant la fonction limitante visée par la pression de sélection, ici l'utilisation du glycérol, et les mutations affectant les schémas globaux de transcription.

1.3.2.3. Evolution dirigée *in vivo* d'une voie métabolique de levure chez *E. coli*

Meynial Salles *et al.* (2007) ont réalisé récemment une évolution dirigée *in vivo* sur deux protéines de levures, GPD1 et GPD2, respectivement la glycérol-3-P déshydrogénase et la glycérol-3-P phosphatase. Ces deux protéines, qui constituent la voie de production du glycérol à partir du DHAP chez *Saccharomyces cerevisiae* ont été introduites chez *E. coli* par l'intermédiaire d'un plasmide codant pour les deux gènes *gpd1* et *gpd2*. Le métabolisme de cette souche a ainsi été rationnellement modifié de telle sorte que le DHAP, substrat de la voie du glycérol, ne puisse pas être assimilé par la voie de la glycolyse afin de forcer la cellule à produire du glycérol à l'aide de GPD1 et GPD2. Cette évolution a été effectuée en chemostat avec un taux de dilution proche du taux de croissance du microorganisme cible, de telle sorte à exercer une forte pression de sélection sur la voie de production du glycérol, par la présence en excès de glucose, et donc d'un excès de DHAP. L'évolution en continu du microorganisme permet une adaptation plus rapide car les temps de latence de croissance lors des repiquages sont supprimés. Ainsi, après 750 heures de culture, une population adaptée est apparue, possédant un flux de production de glycérol plus important, d'où moins d'accumulation de DHAP. Le séquençage du plasmide codant pour les deux gènes *gpd1* et *gpd2* de clones isolés a permis de mettre en évidence une délétion partielle des deux gènes conduisant à une protéine de fusion plus efficace, possédant les deux activités glycérol-3-phosphate déshydrogénase et phosphatase.

1.3.2.4. Adaptation de mutants d'*E. coli* face à la perte d'enzymes du métabolisme central

Fong *et al.* (2006) ont étudié les capacités d'évolution adaptative de quatre mutants de délétion du métabolisme central du glucose, les mutants Δpgi , Δppc , Δpta et Δtpi , après évolution par repiquages successifs sur milieu minimum et glucose sur 30 à 50 jours (600 à 800 générations). Deux cultures d'évolution ont été menées en parallèle pour chacun des quatre mutants métaboliques. Les 8 populations finales évoluées ont montré des paramètres physiologiques proches de la souche sauvage, alors que la croissance des clones non évolués est significativement affectée par ces mutations. L'analyse et la comparaison des deux mutants évolués pour chacune des mutations confirment le caractère aléatoire de l'évolution, où deux évolutions en parallèle peuvent aboutir à des phénotypes améliorés différents.

Les bases génétiques de l'évolution de ces huit populations n'ont pas été établies par la recherche des mutations survenues, mais des bases métaboliques et moléculaires ont été avancées par des études comparatives de fluxomiques et de transcriptomiques.

De manière générale, la réponse du métabolisme face à l'introduction de fortes perturbations génétiques est l'induction de voies latentes de manière à contourner localement le flux touché par la délétion. La robustesse du métabolisme bactérien est prouvée au travers de l'étude des 4 mutants : la délétion du gène *pgi* est compensée par l'activation de la voie d'Entner-Doudoroff et par l'établissement du shunt glyoxylique ; un mutant Δppc va induire le cycle PEP-glyoxylate avec l'activation des voies anaplérotiques (PEP carboxykinase + enzyme malique) pour pallier à l'absence d'activité PEP-carboxylase. L'inactivation de la triose phosphate isomérase (TPI) va conduire à l'induction de la voie du méthylglyoxal responsable de la dégradation du DHAP en pyruvate. Enfin, un mutant Δpta va contrebalancer l'absence de voie de sécrétion de l'acétate en activant la voie de sécrétion du pyruvate.

Après une période d'évolution adaptative, la capacité des voies latentes déjà actives va être améliorée, comme le prouve l'augmentation de l'activité enzymatique de la voie du méthylglyoxal conduisant finalement à la production de pyruvate chez les mutants Δtpi . Dans d'autres cas, comme la perte des activités du shunt glyoxylique chez les mutants *pgiE1* et les deux mutants Δtpi , l'utilisation de ces voies préexistantes mais inactives chez la souche sauvage est perdue après évolution, prouvant que la première réponse d'adaptation métabolique n'est pas toujours la solution adaptative optimale.

De manière générale, l'activation de ces voies latentes est corrélée avec l'augmentation du niveau d'expression des gènes correspondants. Les réponses métaboliques aux perturbations génétiques sont donc régies par des mécanismes de régulations génétiques, conférant une grande robustesse au métabolisme bactérien.

2. Le NADPH dans le métabolisme d'*Escherichia coli*

Sur les 11 métabolites intermédiaires essentiels du métabolisme central, les cofacteurs NADH et NADPH participent à environ 220 réactions, dont une centaine pour le NADP(H) (Ouzounis & Karp, 2000). Ces cofacteurs NAD(P) constituent des carrefours métaboliques car ils vont apporter du pouvoir oxydo-réducteur à de nombreuses réactions. Les pools de NAD(H) et NADP(H) sont intrinsèquement liés, le NADH et le NADPH étant essentiellement produits à partir de leur forme respective oxydée lors des réactions du catabolisme. Le NADPH va servir de pouvoir réducteur pour les réactions anaboliques (Figure 14).

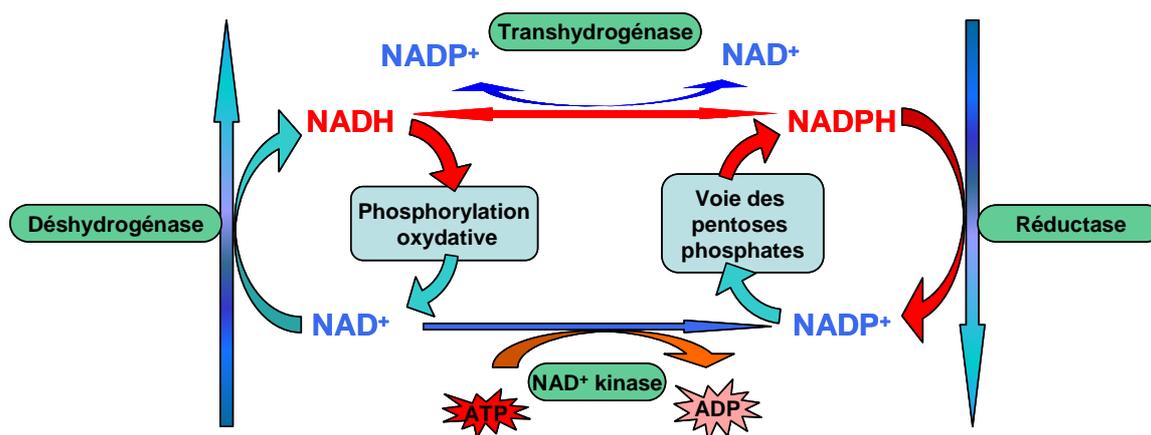


Figure 14 : Schéma du cycle du NADH et NADPH dans le métabolisme bactérien et des principales fonctions impliquées dans leur consommation/production.

2.1. La production du NADPH dans la cellule

2.1.1. Les différentes voies de production du NADPH

Les voies métaboliques de production du NADPH, et plus précisément les réactions enzymatiques productrices de ce cofacteur sont bien identifiées chez *E. coli* en conditions de culture aérobie sur glucose et sont localisées essentiellement dans le métabolisme central. En effet d'après les travaux de Sauer *et al.* (2004), 35-45% du NADPH est produit par les réactions oxydatives de la voie des pentoses phosphates (voie PP), 20-25% est produit par l'isocitrate déshydrogénase (ICDH) dans le cycle de Krebs, et enfin, 35-45% est produit par la transhydrogénase membranaire PntAB (Figure 15).

L'enzyme malique catalyse l'oxydation du malate en pyruvate et présente deux isoformes produisant respectivement le NADH ou le NADPH. Cette enzyme pourrait donc jouer un rôle dans la production de NADPH. Or, il a été montré que le flux de production de l'enzyme malique est négligeable sauf quand la cellule ne produit pas assez de NADPH, comme par exemple dans le cas de mutant de délétion du gène *zwf* codant pour la glucose-6-phosphate déshydrogénase, enzyme de la voie des pentoses phosphates (Nicolas *et al.*, 2007).

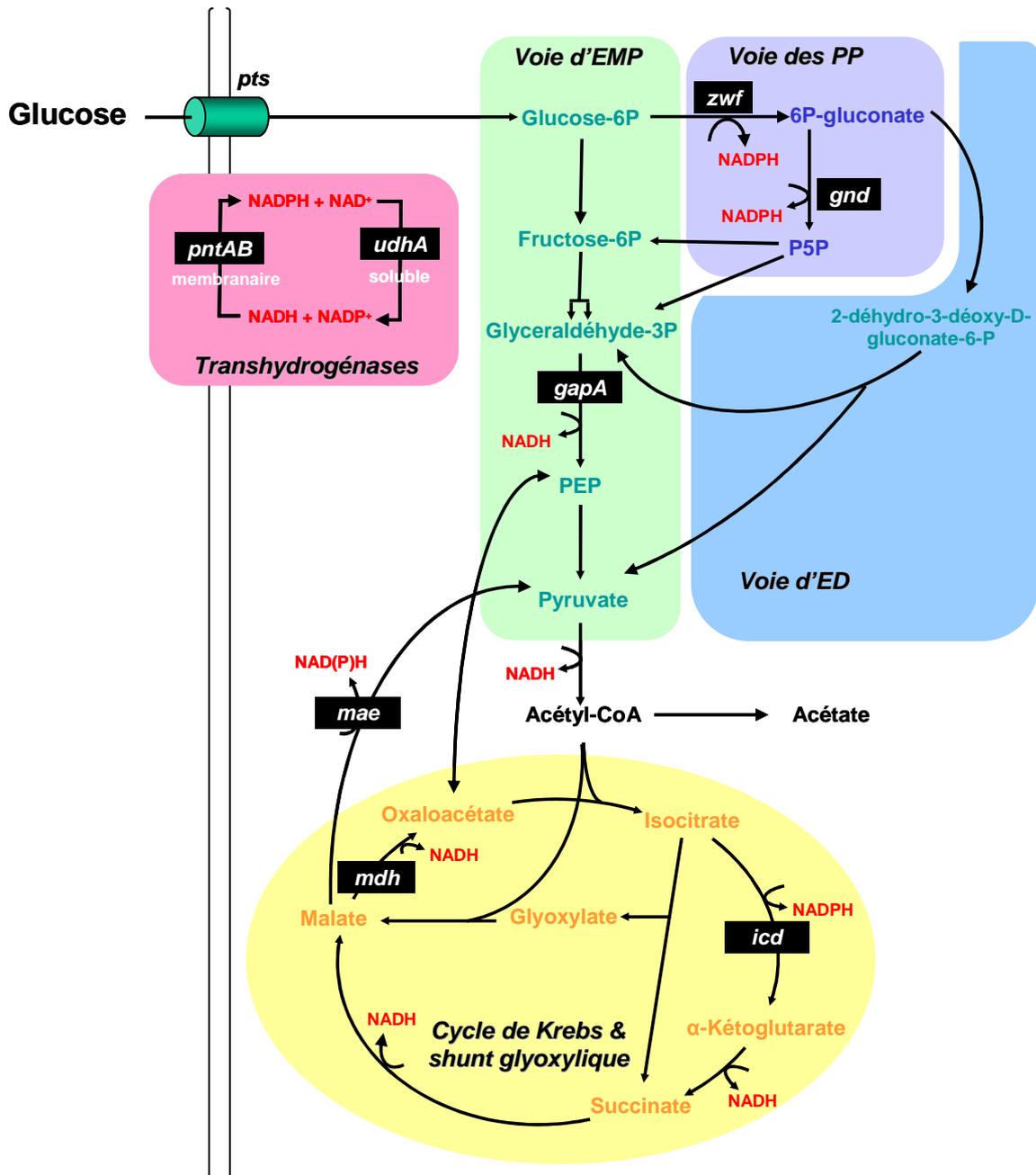


Figure 15 : Réseau simplifié du métabolisme central du glucose avec les voies de production des cofacteurs NAD(P)H chez *E. coli*.

Le glucose est importé dans la cellule grâce au transporteur de sucres phosphoénolpyruvate (PEP) dépendant PTS (PhosphoTransferase System), puis sa dégradation est effectuée via la glycolyse, ou la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), et/ou via les voies des pentoses phosphates (PP) et d'Entner-Doudoroff (ED).

2.1.2. Régulation générale de la production de NADPH

2.1.2.1. Régulation de la voie des pentoses phosphates

Dans la voie des pentoses phosphates, le NADPH est produit par deux enzymes lors de la conversion du glucose-6-phosphate en ribulose-5-phosphate : i) la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH), qui catalyse l'oxydation du glucose-6-phosphate en gluconolactone-6-P, et ii) la 6-phosphogluconate déshydrogénase (6PGDH), qui catalyse la décarboxylation oxydative du 6-phosphogluconate en ribulose-5-phosphate. L'expression des deux gènes respectifs, *zwf* et *gnd*, est essentiellement régulée par le taux de croissance (Wolf *et al.*, 1979). En effet, lorsque le taux de croissance augmente, le niveau de transcription de ces gènes augmente. De plus, l'activité de la G6PDH est inhibée de façon allostérique par le NADPH (Sanwal, 1970), ce qui explique que la cellule a recours à la voie des pentoses phosphates uniquement lorsque la disponibilité en NADPH est faible. Finalement, la dégradation du glucose via la voie des pentoses phosphates est essentiellement contrôlée par la régulation de la G6PDH, enzyme qui catalyse la première réaction de la voie des pentoses phosphates.

2.1.2.2. Régulation de l'activité Isocitrate déshydrogénase

L'isocitrate déshydrogénase (ICDH) catalyse la décarboxylation oxydative de l'isocitrate en α -kétoglutarate au sein du cycle de Krebs. L'isocitrate peut aussi être transformée en glyoxylate (shunt glyoxylique) par l'isocitrate lyase (ICL). Cependant, ICDH ayant une meilleure affinité pour l'isocitrate qu'ICL, c'est la régulation de l'activité d'ICDH qui va conditionner l'établissement du shunt glyoxylique. L'activation du shunt glyoxylique a ainsi été montrée dans des conditions de limitation en glucose ou d'excès de NADPH dans la cellule (Fischer et Sauer, 2003a). Une des fonctions supposées du shunt glyoxylique est de découpler les réactions cataboliques du cycle de Krebs avec la production de NADPH (Bautista *et al.*, 1979), suggérant que l'activité d'ICDH est régulée par la concentration cellulaire en NADPH et/ou par le rapport NADPH/NADP⁺.

ICDH est régulée par phosphorylation et déphosphorylation, inhibant ou activant respectivement l'enzyme (Cozzone & El-Mansi, 2005 ; Nimmo & Nimmo, 1984). Le cycle de phosphorylation d'ICDH est catalysé par l'enzyme bifonctionnelle ICDH kinase/phosphatase (AceK). L'activité ICDH phosphatase est activée par l'AMP, le 3-phosphoglycérate, le pyruvate et l'isocitrate, alors que le NADPH est connu pour inhiber les activités phosphatase et kinase en se fixant directement à ICDH (Miller *et al.*, 2000).

2.1.2.3. Les transhydrogénases soluble et membranaire

Les transhydrogénases soluble et membranaire, respectivement UdhA et PntAB, sont essentielles dans le métabolisme d'*E. coli* car elles participent au maintien de la balance du pouvoir oxydo-réducteur de la cellule par la régulation des pools de NADH et NADPH. Ces deux enzymes permettent ainsi le transfert du pouvoir redox de l'anabolisme vers le catabolisme, et inversement, suivant les besoins de la cellule. Ainsi, il a été démontré que le niveau d'expression des gènes codant pour les deux transhydrogénases, *udhA* et *pntAB*, est régulé par l'état oxydo-réducteur de la cellule, c'est-à-dire par la disponibilité du NADPH (c.f. paragraphe 2.3.2.3)(Sauer *et al.*, 2004). La production de NADPH via PntAB est donc fonction de la demande en NADPH de la cellule. Enfin, il est fort probable qu'UdhA soit aussi sujette à des régulations allostériques par le NADPH et le NADP⁺,

provoquant respectivement son activation ou son inactivation, pour contrôler au mieux l'équilibre entre les pools de NADPH et NADH (Widmer & Kaplan, 1977).

2.2. Utilisation du NADPH dans la cellule

2.2.1. Synthèse de la biomasse

La connaissance globale du métabolisme de la bactérie permet de calculer les besoins totaux en NADPH grâce à des modèles stœchiométriques basés sur la composition de la biomasse d'*E. coli*, et ces besoins sont évalués à 17,3 mmol de NADPH par gramme de poids sec (Pramanik & Keasling, 1997).

Le NADPH est utilisé par la cellule en tant qu'agent réducteur dans les réactions de l'anabolisme, liées à la production de biomasse. Ainsi, les voies de biosynthèse des acides aminés, des lipides et des ARN sont les plus consommatrices en NADPH, et représentent environ 93% des besoins totaux en NADPH de la cellule, avec une répartition respective de 66, 21 et 6%. Les 7% restant sont utilisés pour la biosynthèse de l'ADN, des lipopolysaccharides, des peptidoglycanes, du glycogène et des polyamines (Neidhardt, 1987).

2.2.1.1. Biosynthèse des acides aminés

L'identification et l'étude des voies métaboliques de biosynthèse des acides aminés permettent de connaître le nombre de mole(s) de NADPH consommée(s) par mole d'un acide aminé donné produite. Pour chaque acide aminé produit dans la cellule, les besoins en NADPH et précurseurs métaboliques issus du métabolisme central sont clairement identifiés (Tableau 2).

Tableau 2 : Besoins en précurseurs et en NADPH pour la synthèse des 20 acides aminés chez *E. coli*

pyr, Pyruvate ; α -kg, α -Kétoglutarate ; oaa, Oxaloacétate ; gap, Glycéraldéhyde-3-Phosphate ; ri5p, Ribose-5-Phosphate, e4p, Erythrose-4-Phosphate ; pep, Phosphoénolpyruvate ; accoa, Acétyl-CoenzymeA

Acide Aminé	Précurseur(s) métabolique(s) engagé(s) (mol/mol)			NADPH requis (mol/mol)
Alanine	1 pyr			1
Arginine	1 α -kg			4
Asparagine	1 oaa			1
Aspartate	1 oaa			1
Cystéine	1 gap			5
Glutamate	1 α -kg			1
Glutamine	1 α -kg			1
Glycine	1 gap			1
Histidine	1 ri5p			1
Isoleucine	1 pyr	1 oaa		5
Leucine	2 pyr	1 accoa		2
Lysine	1 pyr	1 oaa		4
Méthionine	1 oaa			8
Phénylalanine	1 e4p	2 pep		2
Proline	1 α -kg			3
Sérine	1 gap			1
Thréonine	1 oaa			3
Tryptophane	1 ri5p	1 e4p	1 pep	2
Tyrosine	1 e4p	2 pep		2
Valine	2 pyr			2

Les voies de biosynthèse qui ont des besoins forts en NADPH sont les voies de biosynthèse de la méthionine, de la cystéine et de l'isoleucine, avec respectivement un besoin de 8, 5 et 5 moles de NADPH par mole d'acide aminé produite.

2.2.1.2. Biosynthèse des lipides

Le NADPH intervient aussi dans l'élongation d'acides gras saturés et insaturés (Figure 16 A) et dans la synthèse du CDP-diacylglycérol (Figure 16 B), précurseur du cardiolipide et du phosphatidyl-éthanolamine, deux phospholipides constituant la membrane cellulaire.

La synthèse d'acides gras à partir d'acétyl-CoA et des phospholipides (cardiolipide et phosphatidyl-éthanolamine) à partir de DHAP, consomme respectivement 4 et 1 moles de NADPH par mole d'acide gras produite.

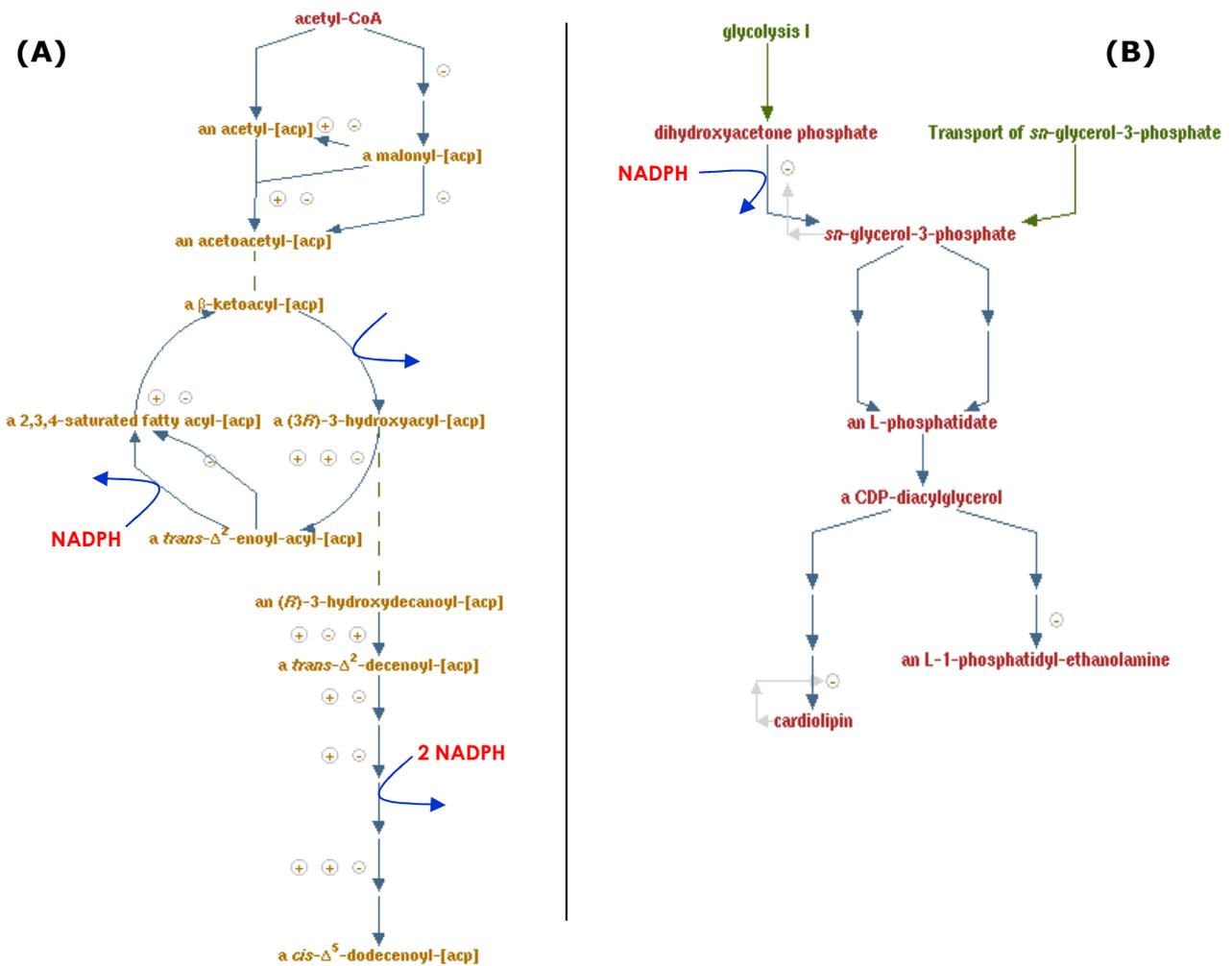


Figure 16 : Réseau métabolique simplifié de la synthèse des acides gras (A) et des phospholipides (B) chez *E. coli* (<http://ecocyc.org>).

2.2.2. Lutte contre le stress oxydatif cellulaire

En condition aérobie, *Escherichia coli* utilise l'oxygène moléculaire (O_2) comme accepteur final d'électrons lors de la respiration. La réduction de l'oxygène génère ainsi des radicaux libres oxygénés (OH^\cdot , $O_2^{\cdot-}$, NO^\cdot) et des espèces réactives de l'oxygène (H_2O_2 , $ONOOH$) issus de la réduction incomplète de produits secondaires de la chaîne respiratoire ou issus de réactions enzymatiques (Figure 17).

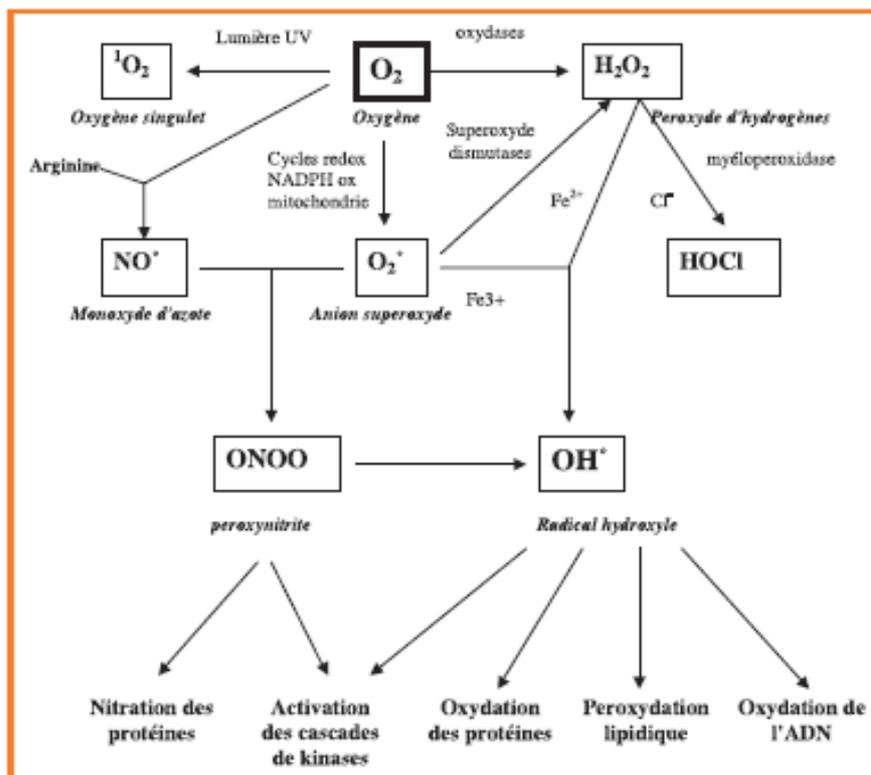


Figure 17 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l’oxygène impliqués en biologie.

Ainsi, le radical hydroxyle OH[•], produit via la réaction de Fenton, à partir de l’ion Fe²⁺ et du peroxyde d’hydrogène H₂O₂, peut causer des dommages irréversibles à l’ADN, aux protéines et aux lipides de la cellule.

La régulation fine des pools d’antioxydants non enzymatiques comme le NADH et le NADPH est donc vitale pour la bactérie pour lutter au mieux contre le stress oxydatif généré par ces molécules dites superoxydantes.

Il existe chez *E. coli* les régulateurs *soxRS* et *oxyRS* qui régulent l’expression de nombreux gènes impliqués dans la neutralisation des radicaux libres et des espèces réactives de l’oxygène (Cabiscol *et al.*, 2000). Ainsi, Giró *et al.* (2006) ont montré que sous des conditions de stress oxydant engendrées par du méthylviologène (MV), le régulateur *soxRS* est responsable de l’activation des gènes *zwf* et *fpr*, codant respectivement pour la G6PDH et la ferrédoxine (flavodoxine) – NADP⁺ réductase (FPR). Leur modèle suggère que l’augmentation de l’expression de *zwf* augmente la disponibilité en NADPH, qui sert alors à maintenir à l’état réduit la ferrédoxine et la flavodoxine. Ces deux molécules pourront par la suite réduire des protéines oxydées lors de conditions de stress oxydatif.

Pour combattre les radicaux libres oxygénés et les espèces réactives de l’oxygène, la cellule va ainsi maintenir un pool de NADPH élevé, au détriment du pool de NADH, pour favoriser l’action détoxifiante des enzymes NADPH dépendantes qui réduisent les espèces réactives de l’oxygène (Brumaghim *et al.*, 2003 ; Krapp *et al.*, 2002 ; Singh *et al.*, 2007).

2.3. Perturbations de la production de NADPH

L'équilibre du pool NADPH peut être perturbé par des changements de conditions oxydo-réductrices dans la cellule, notamment lors de changements d'environnement (croissance sur acétate) ou lors de stress oxydatif (cf. paragraphe précédent). La délétion de gènes clés du métabolisme peut aussi conduire à de fortes perturbations de la production du NADPH, ce dernier étant produit à hauteur d'environ 60% par le métabolisme central (voie des pentoses phosphates + ICDH).

En plus de l'intérêt d'étudier les régulations du pool de NADPH, les perturbations du métabolisme par des approches rationnelles d'ingénierie métabolique permettent d'augmenter la disponibilité du NADPH dans la cellule dans le but d'améliorer des réactions de réduction dans des procédés de production à applications industrielles.

2.3.1. Inactivation d'enzymes produisant le NADPH chez *E. coli*

L'inactivation des enzymes responsables de la majeure production du NADPH dans la cellule permet d'étudier les mécanismes de régulation qui compensent la baisse de production de NADPH.

2.3.1.1. Déplétion du flux dans la voie des pentoses phosphates

La voie des pentoses phosphates contribue à hauteur de 35-45% à la production totale de NADPH chez *E. coli*. La délétion du gène *zwf*, codant la G6PDH, entraîne la déplétion du flux de carbone dans la voie des pentoses phosphates, cette enzyme catalysant la première réaction de cette voie. La conséquence directe sur le métabolisme bactérien est qu'une des sources de NADPH de la cellule est tarie, obligeant cette dernière à s'adapter pour palier aux demandes en NADPH pour la synthèse de sa biomasse. Des études de répartitions des flux de carbone dans le métabolisme de mutant *E. coli* MG1655 Δzwf ont ainsi pu établir des adaptations immédiates du métabolisme central. Pour compenser le manque de NADPH normalement produit via la voie des pentoses phosphates, le flux est augmenté au travers du cycle de Krebs, entraînant ainsi une production accrue de NADPH via ICDH (Zhao *et al.*, 2004). Récemment, l'étude de Nicolas *et al.* (2007) basée sur l'analyse de flux par RMN et GC-MS, a permis de mettre en évidence la contribution des voies anaplérotiques dans la production de NADPH par l'enzyme malique NADP⁺-dépendante (MaeB). Ainsi, une partie de l'augmentation du flux dans le cycle de Krebs est redirigée vers l'enzyme malique, contribuant avec ICDH à la production de NADPH de façon satisfaisante pour la cellule. Le mutant *E. coli* MG1655 Δzwf a d'ailleurs des paramètres physiologiques (taux de croissance μ , vitesse spécifique de consommation de glucose q_s , vitesse spécifique de production d'acétate v_{Ac}) similaires à la souche sauvage, ce qui laisse supposer que le métabolisme de ce mutant n'est pas profondément perturbé par l'inactivation de l'enzyme G6PDH.

2.3.1.2. Délétion de l'isocitrate déshydrogénase (ICDH)

ICDH est une enzyme clé du cycle de Krebs car elle est responsable de 20 à 25% de la production de NADPH totale dans la cellule et sa régulation détermine la partie du flux partant vers le shunt glyoxylique. En milieu minimum et glucose, la délétion du gène *icd* est létale. Toutefois, en milieu riche et glucose, l'inactivation de l'enzyme ICDH conduit à des changements significatifs du

métabolisme bactérien du mutant, notamment avec des vitesses physiologiques (taux de croissance μ , vitesse spécifique de consommation de glucose q_s , vitesse spécifique de production d'acétate v_{Ac}) et un rapport NADPH/NADP⁺ plus faibles que ceux de la souche sauvage (Kabir & Shimizu, 2004). Toutefois, des arrangements métaboliques permettent au mutant Δicd de minimiser l'effet de la délétion sur la baisse de production du NADPH. Ainsi, l'activité des enzymes de la voie des pentoses phosphates, la G6PDH et 6PGDH, sont augmentées pour favoriser la production de NADPH. Comme pour la délétion du gène *zwf*, l'enzyme malique NADP⁺-dépendante est fortement surrégulée, devenant probablement une source significative de NADPH dans la cellule. Enfin, une nette diminution de la disponibilité en NADH et l'augmentation de l'activité transhydrogénase dans la cellule laissent supposer qu'une augmentation de la production du NADPH via PntAB a eu lieu.

2.3.1.3. Délétion de la transhydrogénase membranaire PntAB

Les transhydrogénases membranaire et soluble jouent un rôle primordial dans la régulation des pools NAD(P), notamment l'activité de PntAB quand le métabolisme central ne produit pas suffisamment de NADPH pour les besoins physiologiques de la bactérie. Cette enzyme qui produit 35 à 45% du NADPH dans la cellule, n'est pourtant pas vitale. En effet, un mutant d'*E. coli* MG1655 $\Delta pntAB$ est capable de se développer sur milieu minimum et glucose avec un taux de croissance légèrement plus faible que la souche sauvage. Il a ainsi été montré que pour compenser ce manque de production en NADPH, le métabolisme bactérien augmente le flux de carbone au travers de la voie des pentoses phosphates, avec une possible augmentation du flux au travers de l'activité de MaeB (Fischer & Sauer, 2003).

La perturbation de l'équilibre du NADPH chez *E. coli* montre que la cellule a plusieurs solutions pour compenser un manque de production du NADPH par les trois voies connues (voie des pentoses phosphates, ICDH, PntAB). Ainsi, si une des trois voies est inactivée et ne peut assurer sa production relative de NADPH, les deux autres voies vont compenser ce déficit par une augmentation de leur flux respectif. Des voies silencieuses dans des conditions standards peuvent aussi être induites pour pallier à ces perturbations, comme l'enzyme malique NADP⁺-dépendante qui peut, selon les besoins, fournir le NADPH manquant à la cellule. Le métabolisme bactérien prouve ainsi sa plasticité et ses capacités d'adaptation face à des perturbations majeures du métabolisme, que ce soit par des réarrangements de flux métaboliques ou l'activation de voies muettes.

2.3.2. Augmentation des flux de production du NADPH

Une stratégie utilisée pour augmenter la concentration du NADPH dans la cellule est d'augmenter sa production via une redirection du flux de carbone dans la voie des pentoses phosphates. Pour cela, deux stratégies couramment utilisées consistent à: i) rediriger la totalité du flux entrant de glucose vers la voie des pentoses phosphates en bloquant la voie de la glycolyse par l'inactivation de la phosphoglucoisomérase (PGI), i.e. par la délétion du gène *pgi*; ii) augmenter le flux dans la voie des pentoses phosphates par une surexpression des gènes *zwf* et/ou *gnd*, corrélée à une augmentation respective de l'activité G6PDH et 6PGDH. Toutefois, la surexpression de ces deux gènes n'entraîne pas de réarrangements majeurs de flux, laissant supposer que la production

de NADPH n'est que faiblement perturbé, surement lié avec un contrôle précis de l'activité de la G6PDH par des régulations biochimiques (Nicolas *et al.*, 2007).

2.3.2.1. Perturbations du métabolisme dans un mutant Δpgi

La délétion du gène *pgi* chez *E. coli* entraîne une interruption du flux glycolytique dans le métabolisme central du glucose par l'inactivation de l'enzyme PGI, diminuant fortement les vitesses spécifiques de croissance et de consommation du glucose du mutant, avec environ des facteurs 5 et 2, respectivement. Chez un mutant *E. coli* MG1655 Δpgi , le glucose est ainsi dégradé via la voie des pentoses phosphates perturbant ainsi le métabolisme bactérien pour deux raisons majeures : i) la capacité de la voie des pentoses phosphates à supporter des flux importants de carbone est limitée par rapport à la glycolyse, d'où une vitesse spécifique de consommation du glucose beaucoup plus faible chez un mutant Δpgi que chez la souche sauvage ; ii) l'augmentation du flux de carbone au travers de la voie des pentoses phosphates va considérablement augmenter la production de NADPH, et cet excès va être difficilement réoxydé par la cellule, inhibant ainsi le métabolisme à cause des perturbations des équilibres redox. Dans de telles conditions de surproduction de NADPH dans la cellule, le métabolisme bactérien a recours à deux voies métaboliques régulatrices : l'établissement du shunt glyoxylique et modulation de l'activité des transhydrogénases (Canonaco *et al.*, 2001 ; Hua *et al.*, 2003).

Des études de flux sur un mutant Δpgi montrent aussi la capacité très limitée de la voie d'Entner-Doudoroff à supporter des flux de carbone élevés. Le flux de carbone dans la voie d'Entner-Doudoroff chez un mutant Δpgi est de 15% du flux entrant avec 84% vers la voie des pentoses phosphates, contre 5% chez la souche sauvage, avec 26% vers la voie des pentoses phosphates.

2.3.2.2. Etablissement du shunt glyoxylique

En conditions d'excès de production de NADPH dans la cellule, i.e. croissance sur des substrats alternatifs au glucose comme l'acétate, ou lorsque peu de biomasse est synthétisée, le shunt glyoxylique est activé, conduisant à une oxydation complète du PEP via les voies anapérotiques (voir paragraphe 1.3.2.4 et Figure 10).

Les bilans stœchiométriques de l'oxydation du PEP via le cycle de Krebs et par les voies anapérotiques du cycle PEP-glyoxylate sont quasiment identiques et comportent le même nombre de réactions enzymatiques. Seulement une mole supplémentaire de NADH est produite avec une mole de NADPH en moins pour le cycle PEP-glyoxylate. Le rôle physiologique de l'activation de ce cycle, par exemple dans un mutant Δpgi , est donc de produire une mole de NADPH en moins par mole de PEP, en évitant l'activité d'ICDH NADP⁺-dépendante (Fischer & Sauer, 2003).

2.3.2.3. Rôle régulateur des transhydrogénases

Le rôle de la transhydrogénase membranaire PntAB est de réguler les pools de NAD(P) et notamment d'assurer une production de NADPH quand celle-ci est défaillante dans la cellule, comme par exemple chez un mutant Δzwf . Canonaco *et al.* (2001) ont démontré que la transhydrogénase soluble UdhA, qui participe aussi à la régulation des pools NAD(P), joue un rôle primordial dans la réoxydation du NADPH, plus particulièrement quand celui-ci est en excès. La surexpression du gène *udhA* dans un mutant Δpgi va ainsi augmenter sa vitesse de croissance de 25%. L'activité NADPH-

dépendante d'UdhA est vitale à la cellule dans des conditions métaboliques d'excès de NADPH, car un double mutant $\Delta pgi \Delta udhA$ n'est pas viable sur milieu minimum complétement en glucose (Sauer *et al.*, 2004).

L'activité des transhydrogénases est régulée au niveau transcriptomique, avec la quantité respective de leurs ARNm qui est contrôlée par la disponibilité en NADPH dans la cellule (Figure 18).

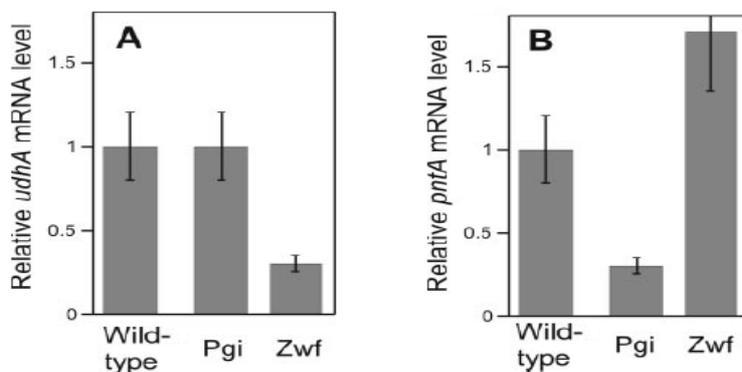


Figure 18 : Niveaux relatifs des transcrits *udhA* (A) et *pntA* (B) déterminés par RT-qPCR. (D'après Sauer *et al.*, 2004).

Les valeurs sont normalisées par le niveau des transcrits chez la souche sauvage d'*E. coli* MG1655 en croissance aérobie sur glucose.

Lorsque la production de NADPH est supérieure aux besoins physiologiques (mutant Δpgi) la transcription de *pntA* est inhibée. Quand la demande en NADPH est supérieure à sa production (mutant *E. coli* MG1655 Δzwf), la transcription du gène *pntA* est activée, et celle d'*udhA* est inhibée.

2.3.3. Flexibilité du métabolisme chez *E. coli* pour le maintien de l'équilibre en NADPH

Les besoins en NADPH pour la croissance d'*E. coli* sont assurés par trois voies (voie des pentoses phosphates, PntAB et ICDH), voire une quatrième (MaeB) en cas de besoin. Cette redondance des voies de production du NADPH permet ainsi de compenser des perturbations de la production du NADPH ; les mutants $\Delta pntAB$ et Δzwf ont ainsi un taux de croissance relativement peu affecté, et le mutant $\Delta zwf \Delta edd \Delta eda \Delta pntAB$ est viable (Tableau 3).

Les mutants de surproduction du NADPH, mutant Δpgi , ont leur croissance plus significativement affectée, mettant ainsi en évidence l'importance d'UdhA et les capacités limitées de réoxydation du NADPH chez *E. coli* (Canonaco *et al.*, 2001 ; Sauer *et al.*, 2004)(Tableau 3).

Tableau 3 : Taux de croissance sur glucose de mutants d'*E. coli* dont les voies de production et de consommation du NADPH sont perturbées. (D'après Sauer *et al.*, 2004)

Strain	Known genetic markers ^a	Growth rate <i>h</i> ⁻¹
MG1655 ^b	F ⁻ λ ⁻ <i>rph-1</i> (wild-type)	0.67 ± 0.01 ^c
UdhA	MG1655 Δ <i>udhA</i> (soluble transhydrogenase deficient)	0.67 ± 0.02
PntAB	MG1655 Δ <i>pntAB</i> (membrane-bound transhydrogenase deficient)	0.45 ± 0.05
UdhA-PntAB	MG1655 Δ <i>udhA</i> Δ <i>pntAB</i>	0.52 ± 0.04
EDP	MG1655 Δ(<i>edd eda</i>) (Entner-Doudoroff pathway deficient)	0.67 ± 0.03
Zwf-EDP	MG1655 Δ(<i>zwf edd eda</i>) (Zwf = glucose-6P dehydrogenase deficient)	0.52 ± 0.04
Zwf-EDP-UdhA	MG1655 Δ(<i>zwf edd eda</i>) Δ <i>udhA</i>	0.56 ± 0.01
Zwf-EDP-PntAB	MG1655 Δ(<i>zwf edd eda</i>) Δ <i>pntAB</i>	0.05 ± 0.03
Pgi	MG1655 Δ <i>pgi</i> (phosphoglucose isomerase deficient)	0.18 ± 0.02
Pgi-EDP	MG1655 Δ <i>pgi</i> Δ(<i>edd eda</i>)	0.20 ± 0.03
Pgi-Zwf-EDP	MG1655 Δ <i>pgi</i> Δ(<i>zwf edd eda</i>)	0
Pgi-UdhA	MG1655 Δ <i>pgi</i> Δ <i>udhA</i>	0

Lorsque les flux de production et de consommation du NADP sont perturbés, les deux transhydrogénases UdhA et PntAB ont un rôle essentiel dans le maintien de l'équilibre des pools NAD(H) et NADP(H), et constituent une passerelle de régulation entre l'anabolisme et le catabolisme chez *E. coli*, assurant la flexibilité du métabolisme bactérien.

E. coli possède de fortes capacités d'adaptation métabolique, que ce soit face à des contraintes métaboliques, à des modifications environnementales, ou à des perturbations génétiques. Cette adaptation peut être décomposée en deux phases distinctes dans le temps : une réponse à court-terme entraînant des réarrangements des flux métaboliques grâce à la flexibilité du réseau métabolique, et une réponse à long terme par évolution adaptative mettant en jeu l'apparition de mutations bénéfiques. Mais jusqu'où vont les capacités d'adaptation d'*E. coli* faces à des perturbations sévères de l'anabolisme et/ou du catabolisme ? Peut-elle faire face par évolution à des perturbations majeures dans des réseaux moins complexes, donc moins redondants ? Peut-elle s'adapter à des contraintes métaboliques touchant la régulation de l'équilibre redox, régulation directement liée aux voies de production du NADH et du NADPH et aux transhydrogénases ?

Chapitre II

Matériel & Méthodes

1. Milieux de culture

1.1. Milieux solides

Les cultures en milieu solide sont utilisées essentiellement pour l'isolement de colonies. Ces cultures sont effectuées soit sur un milieu riche de type Lysogeny Broth (LB) (Bertani, 1951) et soit sur milieu minimum de type M9 (Sambrook J. & Russel D.W., 2001). Leur composition respective est présentée dans les tableaux 4 et 5.

Tableau 4 : Composition du milieu LB agar en g.l⁻¹.

Tryptone	10
Extrait de levure	5
Chlorure de sodium	10
Agar	15

Tableau 5 : Composition du milieu M9 agar g.l⁻¹.

Na ₂ HPO ₄	6
KH ₂ PO ₄	3
NaCl	0,5
NH ₄ Cl	1
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,5
CaCl ₂ , 2H ₂ O	0,015
Agar	15

Le milieu M9 solide est complété, après stérilisation, avec du glucose et de la thiamine (stérilisés séparément par filtration) à des concentrations finales respectives de 5 g.l⁻¹ et 1 mg.l⁻¹.

1.2. Milieux liquides

Différents types de milieux liquides sont utilisés incluant des milieux riches ou synthétiques (chimiquement définis). Trois milieux riches différents sont employés : LB, SOB et SOC. Le milieu LB sert à effectuer les inocula à partir des souches conservées dans du glycérol à -80 °C. Le milieu SOB est utilisé pour la préparation des cellules compétentes et le milieu SOC est utilisé pour la croissance des transformants après électroporation. La composition de ces milieux est présentée dans le tableau 6.

Tableau 6 : Composition des milieux LB, SOC et SOB en g.l⁻¹.

	LB	SOB	SOC
Tryptone	10	20	20
Extrait de levure	5	5	5
Chlorure de sodium	10	0,58	0,58
KCl		0,19	0,19
MgCl ₂		1,9	0,95
Glucose		0	3,66

Le milieu minimal synthétique, appelé MML8b, est utilisé pour réaliser les précultures et les cultures des différentes souches. Le milieu synthétique (Tableau 7) est complété, après stérilisation, avec de la thiamine, du FeSO₄ et du glucose (ou galactose) stériles à des concentrations finales respectives de 10 mg.l⁻¹, 40 mg.l⁻¹ et 5 g.l⁻¹.

Tableau 7 : Composition du milieu minimum synthétique de culture dit « MML8b ».

(NH ₄) ₂ SO ₄	37,9 mM
K ₂ HPO ₄	46 mM
NaHPO ₄	14,1 mM
(NH ₄) ₂ HPO ₄	60,6 mM
NH ₄ Cl	2,4 mM
MgSO ₄	4,1 mM
CaCl ₂	0,3 mM
ZnSO ₄	14 µM
CuCl ₂	12 µM
MnSO ₄	118 µM
CoCl ₂	34 µM
H ₃ BO ₃	16 µM
NaMoO ₄	2 µM

1.3. Utilisation d'antibiotiques

Lorsque la souche mise en culture possède un ou des marqueurs de résistance aux antibiotiques, qu'ils soient génomiques ou plasmidiques, le milieu de culture, solide ou liquide, est complété avec le ou les antibiotiques correspondants. La concentration finale de chaque antibiotique dans le milieu de culture, solide ou liquide, est indiquée dans le tableau 8.

Tableau 8 : Concentrations finales des antibiotiques utilisés en µg.ml⁻¹.

Ampicilline	100
Chloramphénicol	30
Kanamycine	50
Spectinomycine	100

2. Souches

Les différentes souches utilisées pour cette étude sont issues des souches *E. coli* MG1655 et *E. coli* BL21(DE3), cette dernière étant exclusivement utilisée pour la production de protéines recombinantes (voir paragraphe 9). La souche *E. coli* MG1655 est une souche dérivée de la souche sauvage *E. coli* K-12. Les relations entre les deux souches sont illustrées sur la Figure 19. La souche *E. coli* MG1655 présente trois différences majeures avec la souche *E. coli* K-12. Premièrement, elle est dépourvue du facteur de fertilité F, qui confère la propriété de recombinaison sexuée. En outre, pour les souches d'*E. coli* ayant perdu le plasmide F⁺, le milieu de culture doit être complété en thiamine (Sambrook J. & Russel D.W., 2001). Deuxièmement, elle a perdu le caractère lysogénique pour le phage λ. Enfin, les deux souches présentent une différence au niveau du gène *rpoS*, qui code pour la sous-unité sigma S de l'ARN polymérase. La souche *E. coli* K-12 présente, en effet, un codon stop (codon 33) contrairement à la souche *E. coli* MG1655 qui possède donc un gène *rpoS* fonctionnel (Hayashi *et al.*, 2006).

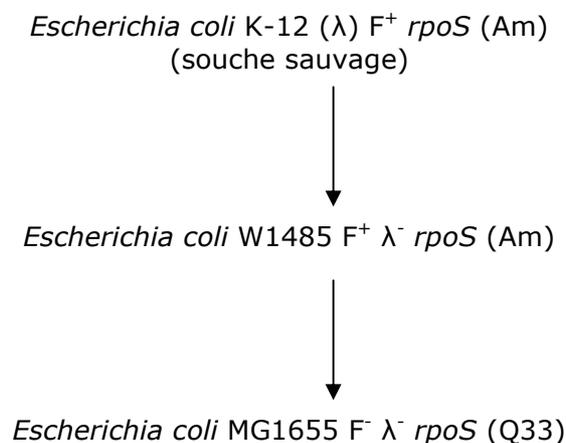


Figure 19 : Filiation génétique entre les souches *E. coli* K-12 et *E. coli* MG1655. (D'après Hayashi *et al.*, 2006).

Les différentes souches utilisées dans la présente étude sont répertoriées dans le tableau 9.

Tableau 9 : Souches bactériennes d'*Escherichia coli* et plasmides utilisés lors de la présente étude.

Souche	Génotype/Caractéristiques	Filiation/Obtention	Références
MG1655	F ⁻ λ ^{ilvG-} rfb-50 rph-1	issue d' <i>E. coli</i> K-12	(Blattner <i>et al.</i> , 1997)
NA 23	MG1655 Δ <i>pgi</i> ::FRT Δ <i>udhA</i> ::FRT Δ <i>qor</i> ::FRT Δ <i>edd</i> ::FRT	souche non évoluée	cette étude
NA 24	MG1655 Δ <i>pfkAB</i> ::FRT Δ <i>udhA</i> ::FRT Δ <i>qor</i> ::FRT Δ <i>edd</i> ::FRT	souche non évoluée	cette étude
NA 23E04	MG1655 Δ <i>pgi</i> ::FRT Δ <i>udhA</i> ::FRT Δ <i>qor</i> ::FRT Δ <i>edd</i> ::FRT	souche NA 23 évoluée après 20 générations sur MML8b et glucose	cette étude
NA 24E04	MG1655 Δ <i>pgi</i> ::FRT Δ <i>udhA</i> ::FRT Δ <i>qor</i> ::FRT Δ <i>edd</i> ::FRT	souche NA 23 évoluée après 20 générations sur MML8b et glucose	cette étude
NA 25E04	MG1655 Δ <i>pgi</i> ::FRT Δ <i>udhA</i> ::FRT Δ <i>qor</i> ::FRT Δ <i>edd</i> ::FRT	souche NA 23 évoluée après 20 générations sur MML8b et glucose	cette étude
NA 26E04	MG1655 Δ <i>pgi</i> ::FRT Δ <i>udhA</i> ::FRT Δ <i>qor</i> ::FRT Δ <i>edd</i> ::FRT	souche NA 23 évoluée après 20 générations sur MML8b et glucose	cette étude
NA 27E04	MG1655 Δ <i>pgi</i> ::FRT Δ <i>udhA</i> ::FRT Δ <i>qor</i> ::FRT Δ <i>edd</i> ::FRT	souche NA 23 évoluée après 20 générations sur MML8b et glucose	cette étude
NA 28E04	MG1655 Δ <i>pgi</i> ::FRT Δ <i>udhA</i> ::FRT Δ <i>qor</i> ::FRT Δ <i>edd</i> ::FRT	souche NA 23 évoluée après 20 générations sur MML8b et glucose	cette étude
NA 29E04	MG1655 Δ <i>pgi</i> ::FRT Δ <i>udhA</i> ::FRT Δ <i>qor</i> ::FRT Δ <i>edd</i> ::FRT	souche NA 23 évoluée après 20 générations sur MML8b et glucose	cette étude
NA 30E04	MG1655 Δ <i>pgi</i> ::FRT Δ <i>udhA</i> ::FRT Δ <i>qor</i> ::FRT Δ <i>edd</i> ::FRT	souche NA 23 évoluée après 20 générations sur MML8b et glucose	cette étude
NA 31E04	MG1655 Δ <i>pgi</i> ::FRT Δ <i>udhA</i> ::FRT Δ <i>qor</i> ::FRT Δ <i>edd</i> ::FRT	souche NA 23 évoluée après 20 générations sur MML8b et glucose	cette étude
NA 32E04	MG1655 Δ <i>pgi</i> ::FRT Δ <i>udhA</i> ::FRT Δ <i>qor</i> ::FRT Δ <i>edd</i> ::FRT	souche NA 23 évoluée après 20 générations sur MML8b et glucose	cette étude

Souche	Génotype/Caractéristiques	Filiation/Obtention	Références
NA 124E	MG1655 $\Delta pgi::FRT \Delta udhA::FRT \Delta qor::FRT \Delta edd::FRT$	souche NA 23 évoluée après 60 générations sur MML8b et glucose	cette étude
NA 125E	MG1655 $\Delta pgi::FRT \Delta udhA::FRT \Delta qor::FRT \Delta edd::FRT$	souche NA 23 évoluée après 60 générations sur MML8b et glucose	cette étude
NA 126E	MG1655 $\Delta pgi::FRT \Delta udhA::FRT \Delta qor::FRT \Delta edd::FRT$	souche NA 23 évoluée après 60 générations sur MML8b et glucose	cette étude
NA 127E	MG1655 $\Delta pgi::FRT \Delta udhA::FRT \Delta qor::FRT \Delta edd::FRT$	souche NA 23 évoluée après 60 générations sur MML8b et glucose	cette étude
NA 128E	MG1655 $\Delta pgi::FRT \Delta udhA::FRT \Delta qor::FRT \Delta edd::FRT$	souche NA 23 évoluée après 60 générations sur MML8b et glucose	cette étude
NA 129E	MG1655 $\Delta pgi::FRT \Delta udhA::FRT \Delta qor::FRT \Delta edd::FRT$	souche NA 23 évoluée après 60 générations sur MML8b et glucose	cette étude
NA 130E	MG1655 $\Delta pgi::FRT \Delta udhA::FRT \Delta qor::FRT \Delta edd::FRT$	souche NA 23 évoluée après 60 générations sur MML8b et glucose	cette étude
NA 131E	MG1655 $\Delta pgi::FRT \Delta udhA::FRT \Delta qor::FRT \Delta edd::FRT$	souche NA 23 évoluée après 60 générations sur MML8b et glucose	cette étude
NA 132E	MG1655 $\Delta pgi::FRT \Delta udhA::FRT \Delta qor::FRT \Delta edd::FRT$	souche NA 23 évoluée après 60 générations sur MML8b et glucose	cette étude
NA 133E	MG1655 $\Delta pgi::FRT \Delta udhA::FRT \Delta qor::FRT \Delta edd::FRT$	souche NA 23 évoluée après 60 générations sur MML8b et glucose	cette étude

Souche	Génotype/Caractéristiques	Filiation/Obtention	Références
NA 141E	MG1655 Δ pgi::FRT Δ udhA::FRT Δ qor::FRT Δ edd::FRT <i>nuoF</i> -FRT- Km^R -FRT	construite à partir de NA 124E avec l'insertion de <i>nuoF</i>	cette étude
NA 142	MG1655 Δ pgi::FRT Δ udhA::FRT Δ qor::FRT Δ edd::FRT <i>nuoF</i> *(E183A)-FRT- Km^R -FRT	construite à partir de NA 23 avec l'insertion de <i>nuoF</i> *	cette étude
NA 173E	MG1655 Δ pgi::FRT Δ udhA::FRT Δ qor::FRT Δ edd::FRT <i>rpoA</i> -FRT- Cm^R -FRT	construite à partir de NA 124E avec l'insertion de <i>rpoA</i>	cette étude
NA 175	MG1655 Δ pgi::FRT Δ udhA::FRT Δ qor::FRT Δ edd::FRT <i>rpoA</i> *-FRT- Cm^R -FRT	construite à partir de NA 23 avec l'insertion de <i>rpoA</i> *	cette étude
NA 176	MG1655 Δ pgi::FRT Δ udhA::FRT Δ qor::FRT Δ edd::FRT <i>nuoF</i> *(E183A)-FRT- Km^R -FRT <i>rpoA</i> *-FRT- Cm^R -FRT	construite à partir de NA 23 avec l'insertion de <i>nuoF</i> * et <i>rpoA</i> *	cette étude
NA 177E	MG1655 Δ pgi::FRT Δ udhA::FRT Δ qor::FRT Δ edd::FRT <i>rpoA</i> -FRT- Cm^R -FRT <i>nuoF</i> -FRT- Km^R -FRT	construite à partir de NA 124E avec l'insertion de <i>rpoA</i> et <i>nuoF</i>	cette étude

Souche	Génotype/Caractéristiques	Filiation/Obtention	Références
NA 172E	MG1655 Δ pgi::FRT Δ udhA::FRT Δ qor::FRT Δ edd::FRT <i>nuoF</i> -FRT- Km ^R -FRT pME101-yqhD- Sp ^R	Souche de bioconversion « aldéhyde réductase » issue de la souche NA 141E	cette étude
NA 178	MG1655 pME101-yqhD- Sp ^R	Souche de bioconversion de référence « aldéhyde réductase » issue de la souche MG1655	cette étude
NA 179	MG1655 Δ adhE:: Cm ^R pME101-yqhD- Sp ^R	Souche de bioconversion de référence « aldéhyde réductase » optimisée pour la production d'alcool, issue de la souche MG1655	cette étude
NA 180E	MG1655 Δ pgi::FRT Δ udhA::FRT Δ qor::FRT Δ edd::FRT Δ adhE:: Cm ^R <i>nuoF</i> -FRT- Km ^R -FRT pME101-yqhD- Sp ^R	Souche de bioconversion « aldéhyde réductase » optimisée pour la production d'alcool, issue de la souche NA 141E	cette étude
NA 188	MG1655 Δ adhE ::FRT Δ aldA:: Cm ^R pME101-yqhD- Sp ^R	Souche de bioconversion de référence « aldéhyde réductase » optimisée pour la production d'éthylène glycol, issue de la souche MG1655	cette étude
NA 189E	MG1655 Δ pgi::FRT Δ udhA::FRT Δ qor::FRT Δ edd::FRT Δ adhE ::FRT Δ aldA:: Cm ^R <i>nuoF</i> -FRT- Km ^R -FRT pME101-yqhD- Sp ^R	Souche de bioconversion « aldéhyde réductase » optimisée pour la production d'éthylène glycol, issue de la souche NA 141E	cette étude
NA 195E	MG1655 Δ pgi::FRT Δ udhA::FRT Δ qor::FRT Δ edd::FRT <i>rpoA</i> -FRT- Cm ^R -FRT Δ adhE::FRT Δ aldA:: Cm ^R pME101-yqhD- Sp ^R	Souche de bioconversion « aldéhyde réductase » optimisée pour la production d'éthylène glycol, issue de la souche NA 173E	cette étude
BW25141	(<i>lacIq rrmBT14 DlacZWJ16 DphoBR580 hsdR514 DaraBADAH33 DrhaBADLD78 galU95 end-ABT333 uidA(DMlu)::pir1 recA1</i>)	issue d' <i>E. coli</i> K-12 strain BD792	(Datsenko & Wanner, 2000)
DH5 α	F ⁻ <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG</i> Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺), λ -		(Meselson & Yuan, 1968)
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) λ (DE3 [<i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i>])	issue d' <i>E. coli</i> B834	(Studier & Moffatt, 1986)

Plasmide	Génotype/Caractéristiques	Références
pKD46	Ap^R , <i>araC-P_{araB} γ, β, et exo</i> surexpression du système de recombinaison du bactériophage λ	(Datsenko & Wanner, 2000)
pKD3	Cm^R , <i>FRT - cat - FRT</i>	(Datsenko & Wanner, 2000)
pKD4	Km^R , <i>FRT - kan - FRT</i>	(Datsenko & Wanner, 2000)
pCP20	Ap^R , <i>FLP</i> , réplication thermosensible Surexpression de la FLP recombinase de <i>S. cerevisiae</i>	(Cherepanov & Wackernagel, 1995)
pET11a/ <i>nuoB-G/NuoF_c</i>	Ap^R , <i>nuoBCDEFG</i> , gène <i>nuoF</i> fusionné au Strep-tag II en C-term, surexpression du fragment soluble du complexe I	(Friedrich <i>et al.</i> , 1989)
pET11a/ <i>nuoB-G/NuoF*(E183A)_c</i>	Ap^R , mutation NuoF(E183A) introduite dans le plasmide pET11a/ <i>nuoB-G/NuoF_c</i>	cette étude
pET11a/ <i>nuoB-G/NuoF*(E183G)_c</i>	Ap^R , mutation NuoF(E183G) introduite dans le plasmide pET11a/ <i>nuoB-G/NuoF_c</i>	cette étude
pSK-PgapA-GRE2p	Ap^R , promoteur du gène <i>gapA</i> , GRE2p surexpression de la méthylglyoxal réductase de <i>S. cerevisiae</i>	cette étude
pME101- <i>yqhD</i>	Sp^R , <i>lacl</i> , <i>P_{trc}</i> , <i>yqhD</i> plasmide issu de la fusion des plasmides pCL1920 et pTRC99A et surexprimant l'aldéhyde réductase	cette étude

3. Techniques basiques de génie génétique

3.1. Isolement et manipulation des acides nucléiques

3.1.1. Mini-préparations d'ADN plasmidique d'*E. coli*

Les mini-préparations d'ADN plasmidique sont réalisées sur 1 à 2 ml d'une culture sur la nuit en milieu LB additionné d'antibiotique(s) (si nécessaire) à l'aide de mini-colonnes du kit QIAprep (QIAGEN). Les mini-colonnes sont utilisées pour obtenir une préparation d'ADN très propre, destinée à être manipulée (digestion, ligation, ...) 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 grande quantité de matériel.

3.1.2. Mini-préparations d'ADN génomique d'*E. coli*

L'ADN génomique est extrait sur 1,5 ml de culture sur la nuit en milieu LB éventuellement additionné d'antibiotique(s). Après deux lavages du culot (v/v) par de l'eau stérile glacée, les cellules sont reprises dans 50 µl d'eau stérile glacée et sont éclatées à 95 °C pendant 5 minutes. L'ADN génomique est récupéré dans le surnageant après une centrifugation de 14000 g pendant 5 minutes.

3.1.3. Techniques de clonage

Les techniques de digestions et de clonages sont réalisées selon les procédures standards (Sambrook J. & Russel D.W., 2001) et selon les recommandations des fournisseurs (New England Biolabs). La séparation et l'analyse des tailles de fragments d'ADN sont réalisées par électrophorèse sur gel d'agarose (de 0,8 à 2 % d'agarose selon la taille des fragments, dans un tampon TAE 0,5X). Les fragments d'ADN sont purifiés à partir de gels d'agarose avec les kits de purification sur gel QIAquick (Qiagen). Du tampon de charge (1X final, Tableau 10) est ajouté aux échantillons avant dépôt. Le marqueur de taille 1 kb (GIBCO/BRL) est couramment employé. L'ADN est visualisé aux ultraviolets ($\lambda = 254$ ou 312 nm) après coloration du gel dans une solution de bromure d'éthyldium (BET) à environ $0,5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Tableau 10 : Composition du tampon de charge (6X).

Bleu de bromophénol	0,25%
Xylène cyanol FF	0,25%
Glycérol dans l'eau	30%

3.1.4. Amplification de fragments d'ADN

L'amplification de fragments d'ADN pour le clonage est réalisée par la technique d'amplification en chaîne (PCR). La réaction est effectuée en utilisant une ADN polymérase hautement fidèle et thermorésistante. Les amplifications PCR sont réalisées grâce au kit Pwo ADN polymérase (Roche Molecular Biochemicals). Le volume réactionnel est de 50 µl. La composition du mélange et les conditions standards d'amplification sont détaillées dans les tableaux 11 et 12.

Tableau 11: Composition du mélange réactionnel pour la PCR en µl (volume final de 50 µl).

Composants	Volume (µl)
H2O stérile	35,5
dNTPs, 10 µM	1
Amorce sens 10 µM	1
Amorce antisens 10 µM	1
ADN matrice (≈ 15 ng)	1
Tampon Pwo (10x)	5
MgSO ₄	5
Polymérase Pwo	0,5

Tableau 12 : Conditions de PCR utilisées.

1 cycle	Dénaturation	2 min	95 °C
25 cycles	Dénaturation	10 s	95 °C
	Hybridation	30 s	55 °C à 63 °C
	Polymérisation	3 min	72 °C
1 cycle	Polymérisation	7 min	72 °C

4. Obtention des mutants par substitution de gène

Les mutants de délétion et les mutants alléliques sont obtenus par la technique de remplacement de gènes par une cassette de résistance à un antibiotique, ou du gène muté flanqué de la cassette de résistance dans le cas des mutants alléliques (Datsenko & Wanner, 2000). Les cellules *E. coli* MG1655 pkD46 compétentes, sauvages ou possédant l'allèle souhaité, sont transformées par un fragment d'ADN linéaire possédant des zones d'homologie avec le chromosome au niveau des séquences nucléotidiques flanquant le gène cible. Le plasmide pkD46 porte les gènes codant pour le système de recombinaison du Bactériophage λ constitué de 3 enzymes : Gama qui inhibe le système RecBCD, et Beta et exo qui favorisent la recombinaison de l'ADN linéaire.

Un lysat de phages P1 de cette souche possédant le gène cible muté sera ensuite effectué, et servira à introduire cette mutation dans d'autres souches d'études par transduction (voir paragraphe 4.4).

Si un marqueur de résistance aux antibiotiques identique à celui présent sur l'ADN linéaire pour l'inactivation de gène est déjà présent dans la souche de travail, le marqueur génomique doit être excisé par l'intermédiaire du plasmide pCP20 (voir paragraphe **4.5**).

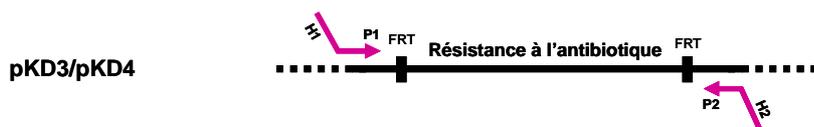
4.1. Obtention des fragments d'ADN linéaires substrats de recombinaison homologue

Les différents fragments d'ADN linéaire, substrats de recombinaison homologue, sont obtenus par PCR en utilisant deux amorces spécifiques de la modification génétique voulue (Tableau 15). Pour réaliser la délétion d'un gène par remplacement de celui-ci par une cassette de résistance à un antibiotique, les deux amorces utilisées comportent à leur extrémité 5' une séquence de 80 pb homologue aux extrémités du gène cible (H1 et H2 dans la Figure 20), et à leur extrémité 3' une séquence de 20 pb homologue aux plasmides pkD4 et pkD3 (P1 et P2 dans la Figure 20, **en gras** dans le Tableau 15). Pour réaliser le remplacement d'un gène, les deux amorces utilisées comportent à leur extrémité 5' une séquence de 80 pb homologue à la séquence adjacente, ou à proximité, au gène d'intérêt (H1 et H2 dans la Figure 21), et à leur extrémité 3' une séquence de 20 pb homologue aux plasmides pkD4 et pkD3 (P1 et P2 dans la Figure 21, **en gras** dans le Tableau 15), permettant ainsi l'introduction d'une cassette de résistance à proximité du gène d'intérêt sans introduire de modification des régions adjacentes au gène échangé.

Les amorces permettent d'amplifier par PCR les gènes de résistance à la kanamycine ou au chloramphénicol portés par le plasmide pkD4 ou pkD3 respectivement, plasmides utilisés comme matrice de la réaction PCR (Figures 20 et 21, Etape 1).

Les réactions de PCR sont catalysées par la Taq polymérase. Les séquences des différentes amorces et les conditions de PCR sont répertoriées dans les Tableaux 13, 14 et 15. Les produits PCR sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8 %. Les fragments PCR correspondant à la taille attendue sont extraits du gel d'agarose à l'aide du kit QIAgen® QIAquick. Les fragments ainsi purifiés sont ensuite utilisés comme substrats de la recombinaison homologue *in vivo*.

Etape 1 : Ampliation PCR du fragment d'ADN linéaire



Etape 2 : Transformation des cellules pKD46 (recombinase λ Red)



Etape 3 : Sélection des transformants sur milieu sélectif contenant l'antibiotique correspondant au marqueur



Etape 4 : Elimination de la cassette de résistance à l'antibiotique par le pCP20 (recombinase FLP)



Figure 20 : Principe de la délétion de gène par introduction d'un produit PCR

Tableau 13 : Composition du mélange réactionnel pour la PCR en μ L.

Composants	Volume final de 50 μ L
H ₂ O stérile	40,3
dNTPs, 10 μ M	2
Amorce sens 10 μ M	1
Amorce antisens 10 μ M	1
ADN matrice pkD3 ou pkD4	1
Tampon Taq (10x)	5
Taq polymérase (5 U. μ l ⁻¹)	0,7

Tableau 14 : Conditions de PCR utilisées.

1 cycle	Dénaturation	2 min	95 °C
5 cycles	Dénaturation	10 s	95 °C
	Hybridation	30 s	55 °C à 37 °C
	Polymérisation	2 min	72 °C
25 cycles	Dénaturation	10 s	95 °C
	Polymérisation	2 min 30	72 °C
1 cycle		7 min	72 °C

Tableau 15 : Amorces pour l'obtention par PCR des substrats de recombinaison

Amorces	Séquence
DudhAF	5'-GGTGC GCGCGTCGCAGTTATCGAGCGTTATCAAAATGTTGGCGGCGGTTGCACCCACTGGGGCACCATCCCGTCGAAAGCCATATGAATATCCTCCTTAG-3'
DudhAR	5'-CCCAGAATCTCTTTTGTTCCTCCGATGGAACAAAATTTTCAGCGTGCCACGTTTCATGCCGACGATTTGTGCGCGTGCCAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG-3'
DpgiF	5'-CCAACGCAGACCGCTGCCTGGCAGGCACTACAGAAACACTTCGATGAAATGAAAGACGTTACGATCGCCGATCTTTTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG-3'
DpgiR	5'-GCGCCACGCTTTATAGCGGTTAATCAGACCATTGGTCGAGCTATCGTGGCTGCTGATTTCTTTATCATCTTTCAGCTCTGCATATGAATATCCTCCTTAG-3'
DqorF	5'-GGTGGCCCGGAAGTACTTCAAGCCGTAGAGTTCACTCCTGCCGATCCGGCGGAGAATGAAATCCAGGTCGAAAATAAAGCCATATGAATATCCTCCTTAG-3'
DqorR	5'-CGCCCGCTTTCCAGAATCTCATGCGCACGCTGCGCATCCTTCAGCGATATTTCTGCTGCTCGGCGACATCGACCTTAATGTAGGCTGGAGCTGCTTCG-3'
DeddF	5'-CGCGCGAGACTCGCTCTGCTTATCTCGCCCGGATAGAACAAGCGAAAACCTTCGACCGTTCATCGTTCGCAGTTGGCATGCGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG-3'
DeddR	5'-CGCAAGGCGCTGAATAATTCAGTCCTGTCCACGCGTGACGCGCTCAGGTCAGGAATGTGCGGTTTCGCGAGCAGCCCATATGAATATCCTCCTTAG-3'
DpfkAF	5'-GGTGTGTTGACAAGCGGCGGTGATGCGCCAGGCATGAACGCCGCAATTCGCGGGGTTGTTCTGTTCTGCGCTGACAGAAGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG-3'
DpfkAR	5'-TTCGCGCAGTCCAGCCAGTCACCTTTGAACGGACGCTTCATGTTTTCGATAGCGTCGATGATGTCGTGGTGAACCAGCTGCATATGAATATCCTCCTTAG-3'
DpfkBF	5'-GCGCCCTCTCTCGATAGCGCAACAATTACCCCGCAAATTTATCCGAAGGAAAACCTGCGCTGTACCGCACCGGTGTTTCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG-3'
DpfkBR	5'-GCGGGAAAGGTAAGCGTAAATTTTTGCGTATCGTCATGGGAGCACAGACGTGTTCCCTGATTGAGTGTGGCTGCACTCCATATGAATATCCTCCTTAG-3'
Km_nuoF	5'-GCAAAATTCAGGCAGTTATGTTTAGAGTATTTTGGCGATAGTCGTACACAGTTCACCTAACGCTCTGCGTCTATCTACTATGTAGGCTGGAGCTGCTTCG-3'
Km_nuoR	5'-CAATGCCGCTGATGTAATCTGTTACTTTGTAAGTCAGAAAGCCGCCGACATGCTCGGCGGTTTTTCTGAAAAAGAAGGGACATATGAATATCCTCCTTAG-3'
Km_rpoAF	5'-TCGCTTGCCTTCTGCTATATGGCGCTCTGCCACTGGTCAAGTAACCACATAAATACTCCAGGGGATGAACAAAAGAGCATATGAATATCCTCCTTAG-3'
Km_rpoAR	5'-AATCTGAAGCAACGTAAAAAACCCGCCCGCGGGTTTTTTTATACCCGTAGTATCCCACTTATCTAC AATAGCTGTATGTAGGCTGGAGCTGCTTCG-3'

4.2. Préparation des cellules compétentes MG1655 pKD46

Les cellules compétentes MG1655 pKD46 sont préparées à partir de colonies isolées sur milieu solide LB+Ampicilline (Ap) ($100 \mu\text{g.ml}^{-1}$). Toutes les cultures sont réalisées à $30 \text{ }^\circ\text{C}$, car le plasmide pKD46 est un plasmide à réplication thermosensible et peut être détruit à des températures supérieures. 5 ml de milieu liquide LB+Ap ($100 \mu\text{g.ml}^{-1}$) sontensemencés par une colonie. Après une nuit de culture à $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 200 μl de suspension cellulaire sont utilisés pour inoculer 20 ml de milieu de culture liquide SOB+Ap ($100 \mu\text{g.ml}^{-1}$) conditionnés en fiole d'Erlenmeyer à $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Lorsque la $\text{DO}_{600\text{nm}}$ atteint 0,1, l'induction des fonctions de recombinaison portées par le plasmide pKD46 est réalisée avec 200 μl d'arabinose (1 M) stérile. Lorsque la $\text{DO}_{600\text{nm}}$ est comprise entre 0,4 et 0,6, les cellules sont centrifugées 10 minutes à 8000 g et à $4 \text{ }^\circ\text{C}$, puis lavées avec 20 ml d'eau stérile froide ($4 \text{ }^\circ\text{C}$). Deux lavages sont ensuite effectués avec du glycérol stérile froid (10 %, à $4 \text{ }^\circ\text{C}$), le premier avec 8 ml et le second avec 800 μl . Après centrifugation (10 min à 8000 g), le culot est repris dans 200 μl de glycérol (10 %) stérile. Les cellules sont aliquotées par 50 μl dans des tubes froids de 1,5 ml et conservées à $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

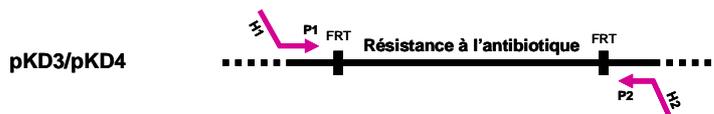
4.3. Transformation par électroporation

Entre 10 ng et 100 ng de produit PCR, substrat de la recombinaison homologue, sont mélangés à 50 μl de cellules compétentes, obtenues comme indiquées ci-dessus. Après 5 minutes de contact dans la glace, le mélange est transféré dans une cuve à électroporation de 2 mm. L'électroporation est réalisée sous une capacitance de 25 μF , une tension de 2500 V et une résistance de 200 Ω . La suspension est reprise rapidement dans 945 μl de SOC puis transférée dans un tube stérile avant d'être mis en culture à $30 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant 15 h sous agitation. Les transformants sont vérifiés comme décrit dans le paragraphe 4.6.

4.4. Transfert d'un gène modifié d'une souche donneuse à une souche réceptrice par transduction généralisée à l'aide de phages

Le remplacement d'un gène sauvage par un gène modifié (ou inversement) est effectué par transduction grâce à des phages P1 lysogéniques. Le lysat de phages est préparé à l'aide d'une souche possédant le gène modifié avec à proximité un marqueur de résistance à un antibiotique, préalablement introduit par la technique de transformation par de l'ADN linéaire décrite ci-dessus (Figure 21).

Etape 1 : Ampliation PCR du fragment d'ADN linéaire



Etape 2 : Transformation des cellules pKD46 (recombinase λ Red)



Etape 3 : Sélection des transformants sur milieu sélectif contenant l'antibiotique correspondant au marqueur



Etape 4 : Transduction par un lysat de phages contenant le gène à introduire flanqué du marqueur de résistance

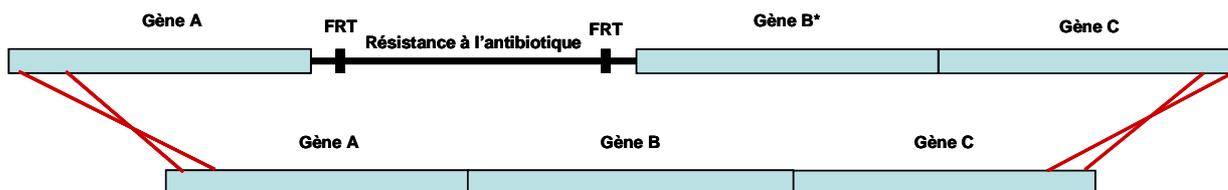


Figure 21 : Principe du transfert de gène par transduction généralisée

4.4.1. Préparation d'un lysat de phages P1

Une colonie unique de la souche possédant le gène cible avec le marqueur de résistance est ensemencée dans 5 ml de LB avec l'antibiotique correspondant et est incubée à 37 °C pendant 15 h. 100 μ l de la préculture sont transférés dans un tube de 50 ml contenant 10 ml de milieu LB + Glucose 2 g/L + CaCl₂ 5 mM qui est incubé à 37 °C avec agitation. Après une heure d'incubation, 200 μ l de lysat P1vir (environ 5.10⁸ phages/ml) réalisé sur une souche sauvage MG1655 sont ajoutés, et l'incubation est poursuivie à 37 °C pendant 2 à 3 heures jusqu'à la lyse cellulaire de la culture. Au moins une demi-heure après l'observation de la lyse complète, la culture lysée est transférée dans un tube de 15 ml où est ajouté 200 μ l de chloroforme. Après agitation vigoureuse, le mélange diphasique est centrifugé 10 minutes à 4500 g. Les $\frac{3}{4}$ supérieurs du surnageant sont transférés dans un nouveau tube stérile de 15 ml et mélangés avec 200 μ l supplémentaire de chloroforme. Le lysat peut ainsi être stocké à 4 °C pendant 3 à 4 mois.

4.4.2. Transduction en utilisant un lysat de phages

Une colonie unique de la souche réceptrice est ensemencée dans 5 ml de LB avec l'antibiotique correspondant et est incubée à 37 °C pendant 15 h. 1,5 ml de la préculture est

centrifugée à 1500g pendant 10 minutes et le culot cellulaire est resuspendu dans 600 µL de MgSO₄ 10 mM + CaCl₂ 5 mM. 3 tubes de 1,5 ml A, B et C, sont préparés avec respectivement 0, 100 µl et 100 µl de lysat de phages auxquels sont ajoutés respectivement 100 µl de la suspension cellulaire précédente (tube A, témoin négatif cellules), 100 µl d'eau stérile (tube B, témoin négatif lysat), et 100 µl de suspension cellulaire (tube C). Les tubes A et B servent à vérifier si des souches résistantes à l'antibiotique utilisé ne seraient pas présentes dans les cellules hôtes ou dans le lysat de phages. Les 3 tubes sont incubés à 30 °C pendant 20 minutes sans agitation pour permettre la transduction, puis 100 µl de citrate de sodium 1 M est ajouté pour décrocher les phages des cellules. Ensuite, 1 ml de milieu riche LB est ajouté à chaque tube et le mélange est ainsi incubé à 37 °C pendant une heure sous agitation. Après centrifugation 3 minutes à 7000 g, les culots cellulaires resuspendus dans un faible volume d'eau stérile sont étalés sur milieu LB solide possédant une concentration d'antibiotique divisée par deux par rapport aux concentrations habituelles d'usages et les cellules sont incubées 15 heures à 37°C. Quatre colonies issues de la transduction sont étalées à nouveau sur milieu LB solide avec une concentration d'antibiotique normale, et les colonies issues de cette deuxième sélection sont vérifiées suivant la démarche décrite dans le paragraphe **4.6.2**.

4.5. Elimination des marqueurs de résistance grâce au pCP20

Deux marqueurs de résistance aux antibiotiques sont disponibles, résistance au chloramphénicol et à la kanamycine, pour l'introduction de modification génomique chez *E. coli* par transformation d'ADN linéaire ou par transduction phagique. Pour l'introduction d'une troisième modification (ou 5^{ème}, 7^{ème}...), il est indispensable d'éliminer les cassettes de résistance de la souche à modifier. L'excision des cassettes est rendue possible grâce à la présence de régions FRT flanquant la cassette de résistance. Ces régions contiennent une séquence reconnue spécifiquement par la recombinase Flp de la levure (Figure 20, étape 4). Cette enzyme catalyse la recombinaison homologue des régions FRT, ce qui conduit à l'excision de la cassette sous forme d'ADN circulaire incapable de répllication.

Le vecteur pCP20 à répllication thermosensible, qui exprime constitutivement la recombinase Flp de la levure (gène *flp*), a été utilisé pour transformer la souche d'*E. coli* à modifier. La préparation des cellules compétentes de la souche à modifier est décrite précédemment (paragraphe **4.2**, sans induction à l'arabinose), et l'expression phénotypique après transformation est réalisée à 30 °C pendant 15h. Les transformants sont sélectionnés sur milieu solide LB + Ampicilline à 30 °C (le pCP20 contient le gène *bla* de résistance à l'ampicilline).

Un transformant est strié sur milieu solide LB incubé à 42 °C, ce qui assure la perte du plasmide. Une dizaine de colonies est repiquée sur milieu solide LB, LB + Ap, LB + antibiotique(s) correspondant à la (aux) cassette(s) à éliminer, et incubée à 30 °C. Les clones provenant d'une cellule où la (ou les) cassette(s) de résistance a été excisée et où le pCP20 a été perdu sont sensibles aux deux (voire trois) antibiotiques.

La vérification des cassettes de résistance est effectuée par amplification de l'ADN génomique sur les régions concernées, selon la démarche décrite dans le paragraphe **4.6.2**.

4.6. Vérification des transformants

Suite à une étape de transformation ou de transduction généralisée, la vérification de l'efficacité de la recombinaison site homologue se fait en plusieurs étapes. Tout d'abord, les transformants/transductants sont sélectionnés après croissance sur un milieu sélectif, contenant l'antibiotique correspondant au gène de résistance inséré. Ensuite, une amplification de la région modifiée est réalisée par PCR pour chaque transformant sélectionné.

4.6.1. Cultures sur milieu sélectif

Les cellules cultivées sur milieu SOC sont étalées sur milieu solide LB supplémenté avec l'antibiotique approprié par rapport au substrat de la recombinaison homologue. La culture se fait à 37 °C pendant 24 h. Les colonies isolées sont ensuite repiquées dans 5 ml de milieu liquide LB supplémenté avec l'antibiotique approprié et mises en culture à 37 °C pendant 15 h. Les cellules capables de croître sur milieu sélectif sont ensuite utilisées pour la deuxième étape de vérification.

4.6.2. Amplification par PCR de la zone modifiée et comparaison de la taille des fragments

L'ADN chromosomique des différentes souches recombinantes et de la souche sauvage *E. coli* MG1655 (témoin négatif) est extrait, suivant le protocole décrit précédemment (paragraphe 3.1.2), et sert de matrice à la réaction PCR avec les amorces répertoriées dans le tableau 16.

Tableau 16 : Amorces utilisées pour les PCR pour la vérification des mutations.

Amorces	Séquence
VDudhAF	GTTCCAGATAGTCCGCAAGTTCCGC
VDudhAR	CGGGTAGTTAAAGGTGGTGTGACG
VDpgiF	GCGGGGCGGTTGTCAACGATGGGGTCATGC
VDpgiR	CGGTATGATTTCCGTTAAATTACAGACAAG
VDqorF	CGCCAACACCGACTGCTCCGCTTCGATCG
VDqorR	CAGCGTTATGACCGCTGGCGTTACTAAGGG
VDeddF	GGGTAGACTCCATTACTGAGGCGTGGGCG
VDeddR	CCCCGGAATCAGAGGAATAGTCCC
VDpfkAF	CGCACGCGGCAGTCAGGGCCGACCCGC
VDpfkAR	CCCTACGCCCCACTTGTTCATCGCCCG
VDpfkBF	TGGCAGGATCATCCATGACAGTAAAAACGG
VDpfkBR	GCCGTTGCACTTTGGGTAAGCCCCG
VKm_nuoF	GCCGCAGATGTCCCGAATTTCCAGG
VKm_nuoR	CTTGTGGTGGCTGGTGGGTGCCG
VKm_rpoAF	GCGGATCATCGTGACGGATACC
VKm_rpoAR	GCTAATCGTCGTCTGGCATTCCG

Une séparation par électrophorèse est réalisée avec un 10^{ème} du volume de la réaction, sur gel d'agarose 0,8 %. Les tailles des fragments attendus pour les différentes modifications génétiques, avec et sans cassette de résistance aux antibiotiques (après excision), sont indiquées dans le tableau 17 et comparées par rapport aux tailles attendues dans une souche non modifiée.

Tableau 17 : Comparaison de la taille des fragments PCR attendus dans les souches recombinantes et la souche MG1655

La modification des gènes concernent des délétions de gènes sauf pour les gènes *nuo* et *rpoA* ou il s'agit de substitution de gène.

	Tailles des produits d'amplification (kb)		
	gène sauvage	gène modifié + marqueur	gène modifié sans marqueur
<i>udhA</i>	2,1	2,2	1
<i>pgi</i>	2,1	1,6	0,63
<i>qor</i>	1,4	2,1	0,63
<i>edd</i>	2,6	2	1
<i>nuo</i>	0,6	2,5	0,64
<i>rpoA</i>	0,56	1,7	0,76

Le volume de produit PCR restant est purifié sur colonne avec le kit Qiagen® QIAquick et séquencé pour analyser la séquence des différentes zones modifiées.

5. Conditions de cultures

5.1. Précultures

Les différentes souches sont conservées à -80 °C dans du glycérol (20 %). La préculture est réalisée dans 5 ml de milieu LB + antibiotique à 37 °C pendant 12 h sous agitation, à partir d'une souche conservée dans du glycérol (20 %) avec une oeuse stérile. Pour des cultures finales en fioles (et en réacteur), un inoculum est réalisé avec 1 ml (2 ml) de la première préculture dans 9 ml (18 ml) de milieu MML8b complet + glucose (5 g.l⁻¹) + antibiotique à 37 °C pendant 8 h.

5.2. Cultures en fioles d'Erlenmeyer

Les cultures sont réalisées à 37 °C en fiole d'Erlenmeyer bafflée de 500 ml contenant 50 ml de milieu MML8b + glucose ou galactose (5 g.l⁻¹). L'ensemencement est effectué à partir de l'inoculum après lavage des cellules, de telle sorte que la DO_{600nm} initiale soit égale à 0,1. La croissance bactérienne est suivie tout au long de la phase exponentielle jusqu'à la phase stationnaire pour la caractérisation phénotypique.

5.3. Cultures continues en bioréacteur

Les cultures sont réalisées dans un bioréacteur de 500 ml contenant 200 ml de milieu à 37 °C avec 400 rpm d'agitation, une aération en air à 2 sl.h⁻¹ et à un pH de 6,5 ou 6,8 régulé par ajout de NH₄ 33%. La pression partielle en oxygène est mesurée à l'aide d'une sonde à oxygène et est maintenue à 30% tout au long de la culture par régulation du pourcentage d'oxygène dans le mélange d'air apporté. L'ensemencement est effectué au 100^{ème} à partir de l'inoculum et après lavage de l'inoculum avec du milieu MML8b sans glucose. Après inoculation, le réacteur est placé en mode batch sur environ une vingtaine d'heures ; ensuite le mode continue est initié par une double alimentation continue de la culture en milieu de culture et en aldéhyde (concentrations en glucose et en glycolaldéhyde variables) à un débit de 2 à 5 ml.h⁻¹ et par un prélèvement haut à une vitesse constante.

5.4. Cultures discontinues en bioréacteur

Les cultures discontinues ou « fed-batch » sont réalisées dans un bioréacteur de 500 ml contenant 200 ml de milieu à 37 °C avec 400 rpm d'agitation, une aération en air à 5 sl.h⁻¹ et à un pH de 6,5 régulé par ajout de NH₄ 33%. La pression partielle en oxygène est mesurée à l'aide d'une sonde à oxygène et est maintenue à 30% tout au long de la culture par régulation du pourcentage d'oxygène dans le mélange air apporté.

Les cultures suivent un profil exponentiel imposé par le débit F qui est défini au cours du temps par la fonction suivante :

$$F = \mu \times X_0 \times V_0 \times \exp(\mu t) / ([S_{feed}] \times Y_{x/s})$$

où μ est le taux de dilution imposé à la culture

X_0 est la concentration en biomasse initiale

V_0 le volume initial

$[S_{feed}]$ la concentration en glucose du Fed

$Y_{x/s}$ le rendement biomasse/glucose

Le système utilisé pour la bioconversion du glycolaldéhyde en éthylène glycol utilise deux alimentations indépendantes, une pour le glucose à 450 g/l et l'autre pour le glycolaldéhyde à 100 g/l, la somme des deux débits étant égale à F. Ainsi, les débits du glucose et du glycolaldéhyde sont fixées à 30 et 70% du débit total, respectivement.

5.5. Cultures d'évolution par repiquages successifs

Les cultures d'évolution de souches bactériennes sont effectuées par repiquage successifs en fiole dans du milieu frais MML8b. Les conditions de croissance sont identiques à celles décrites dans le paragraphe **5.2**. Les cultures d'évolution sont suivies fréquemment (journalièrement ou heure par heure suivant le taux de croissance), de telle sorte à repiquer les cellules dans du milieu frais, à une DO_{600nm} initiale de 0,1, avant qu'elles n'entrent en phase stationnaire, afin de prolonger la phase exponentielle de croissance. Pour chaque culture d'évolution, le taux de croissance de la population est calculé et un échantillon est conservé à $-80^{\circ}C$ dans du glycérol 20 %.

L'évolution d'une population bactérienne est considérée comme terminée, tout du moins sur une échelle de temps limitée, lorsque quatre cultures successives possèdent le même taux de croissance. A la fin de l'évolution, les populations finales évoluées sont étalées deux fois consécutivement sur milieu solide afin de réisoler puis de purifier 10 clones évolués pour la suite des expérimentations. Plus précisément, un échantillon de chaque population évoluée est prélevé et dilué de telle sorte à obtenir une suspension cellulaire d'environ une centaine de cellules par boîte de milieu solide. La dilution a été effectuée selon la base qu'une solution bactérienne de 0,4 UDO_{600nm} a une concentration cellulaire de $2 \cdot 10^8$ cellules par millilitre.

6. Techniques analytiques

6.1. Détermination de la concentration en biomasse

6.1.1. Mesure turbidimétrique

La densité cellulaire des cultures est estimée par mesure de l'absorbance à 600 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre (Biochrom Libra), dans des cuves de 1 cm de trajet optique. Des dilutions éventuelles sont nécessaires pour rester dans la gamme de linéarité (0,05-0,6 UDO) du spectrophotomètre.

6.1.2. Mesure gravimétrique

La concentration massique en biomasse est déterminée en parallèle par méthode gravimétrique. Un volume de 10 ml de suspension cellulaire est prélevé au cours de la culture, centrifugé et lavé, dans un tube de 15 ml préalablement séché au lyophilisateur (0,06 mbar, à $-50^{\circ}C$) pendant 15 h et pesé à la balance de précision. Le tube contenant le culot cellulaire est incubé à $-80^{\circ}C$ pendant au moins 15 heures, et ensuite séché au lyophilisateur dans les mêmes conditions puis pesé. La concentration de biomasse contenue dans le volume de la suspension cellulaire prélevé est déterminée par différence et exprimée en $g \cdot l^{-1}$ de culture. La relation permettant la détermination de la concentration en biomasse X en $g \cdot l^{-1}$ à partir de la mesure de la DO à 600 nm est établie comme suit : $X = 0,34 (\pm 0,01) \times DO$.

6.2. Dosage des substrats et produits de fermentation

Les surnageants des échantillons prélevés lors des cultures en fioles erlenmeyer et en fermenteur sont filtrés sur 0,2 µm et analysés par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Le système HPLC utilisé (Agilent series 1200) est équipé d'un passeur automatique (Agilent series 1200), d'une précolonne (Biorad Microguard) et d'une colonne de type H⁺ (Biorad HPX-87H, 300 nm x 7,8 mm) qui permet une séparation par échange d'ions et exclusion. L'analyse des échantillons est réalisée à 40 °C avec un débit d'éluant (H₂SO₄ 5 mM) de 0,6 ml.min⁻¹. La détection est assurée par un spectrophotomètre UV (Agilent series 1200 G1362A) à 210 nm pour les acides organiques tels que l'acétate et par un réfractomètre (Agilent series 1200 G1314B) pour les sucres tels que le glucose. Les concentrations des différents composés dans les surnageants de culture sont déterminées à l'aide d'une courbe de calibration établie à partir de solutions étalons.

Parallèlement, la concentration en glucose est aussi mesurée au cours des cultures en fiole erlenmeyer par un analyseur automatique YSI 27 A (YELLOW SPRINGS INSTRUMENTS®). Le principe repose sur la détection de l'eau oxygénée libérée lors de la transformation du glucose en acide gluconique par un glucose oxydase immobilisée sur une membrane, suivant cette réaction :



L'oxydation de H₂O₂ par une électrode de platine libère un flux d'électrons. Le courant ainsi créé est proportionnel à la concentration en glucose. Après étalonnage de l'appareil, la concentration en glucose est affichée sur l'écran digital en mg.dl⁻¹. La précision est de l'ordre de 10%.

6.3. Calcul des paramètres macrocinétiques

Les vitesses spécifiques de croissance, de consommation du substrat et de production de métabolites extracellulaires sont déterminées au cours de la phase exponentielle de croissance. Les vitesses spécifiques correspondent à chacune des vitesses de réaction ramenées à la quantité de biomasse produite.

La vitesse spécifique de croissance, ou taux de croissance (en h⁻¹) est définie par :

$$\mu = 1/X \times dX/dt, \text{ avec } X \text{ représentant la biomasse en g.l}^{-1} \text{ (1),}$$

d'où après intégration entre les temps t₁ et t₂ :

$$\mu = (\ln(X_2) - \ln(X_1)) / (t_2 - t_1)$$

Les vitesses spécifiques de réaction (de consommation ou de production) d'une variable e en (g.g⁻¹.h⁻¹) sont définies par :

$$q_e = |1/X \times de/dt|, \text{ avec } e \text{ représentant la concentration du produit ou du substrat en g.l}^{-1},$$

or d'après l'équation (1), l'expression devient :

$$q_e = |\mu \times de/dX|,$$

d'où après intégration entre les temps t₁ et t₂ (avec µ constant sur la période exponentielle) :

$$q_e = |\mu \times (e_2 - e_1) / (X_2 - X_1)|$$

6.4. Détermination de la concentration des cofacteurs NAD(P)

6.4.1. Extraction des cofacteurs

Une extraction en milieu acide permet de retenir les formes oxydées des nucléotides (NAD⁺, NADP⁺) et de détruire les formes réduites (NADH, NADPH), alors qu'à l'inverse, un milieu alcalin permet de retenir les formes réduites et de détruire les formes oxydées.

Les cultures pour l'extraction des cofacteurs sont réalisées en fiole erlenmeyer, comme décrit dans le paragraphe 5.2, contenant un volume de 30 ml de milieu MML8b à 10 g/l de glucose, afin de pouvoir collecter des échantillons suffisamment concentrés en biomasse. 5 ml d'une culture en fiole à une DO_{600nm} = 8 – 10 (avant le début de la phase stationnaire), sont mélangés rapidement et vigoureusement avec 2,5 ml de solution acide HCl 4N pour l'extraction acide, et avec 2,5 ml de solution basique KOH 4N pour l'extraction basique. Les mélanges cellulaires sont ensuite incubés à 70 °C pendant 10 minutes sous agitation à 750 rpm pour permettre la lyse des cellules et libérer les cofacteurs dans la solution. Le surnageant des lysats est récupéré après une étape de centrifugation à 10000 g pendant 15 minutes.

Le pH des surnageants est ajusté suivant la forme du cofacteur à récupérer. Pour les formes oxydées (NAD⁺ et NADP⁺, lyse acide), le pH est ajusté entre pH 6 et 6,5, avec une solution de KOH 4N et après ajout d'1 ml de tampon 500 mM Hepes pH 6,3. Pour les formes réduites (NADH et NADPH, lyse basique), le pH est ajusté entre pH 7,5 et 8, avec une solution de HCl 4N et après ajout d'1 ml de tampon 500 mM Hepes pH 7,7.

Les solutions sont ensuite ajustées au même volume avec de l'eau ultrapure et sont filtrées sur 0,45 µm. Les échantillons correspondant à chaque cofacteur sont aliquotés et stockés à -80 °C.

Les réactions de dosage des cofacteurs sont réalisées par cyclage avec l'alcool déshydrogénase et l'isocitrate déshydrogénase, pour le dosage respectif du NAD(H) et du NADP(H). Les protocoles sont adaptés pour le format microplaque de la publication de Gibon et Larher (1997).

6.4.2. Dosage du NADP⁺ et NADPH

Le dosage des deux formes NADP⁺ et NADPH est basé sur le principe de cyclage avec l'isocitrate déshydrogénase (ICDH)(réduction du NADP⁺) et la phénazine méthosulfate (PMS)(oxydation du NADPH) couplé à la transformation du thiazolyl blue (MTT) en son dérivé formazane, détecté par spectrométrie d'absorption à 570 nm (Figure 22).

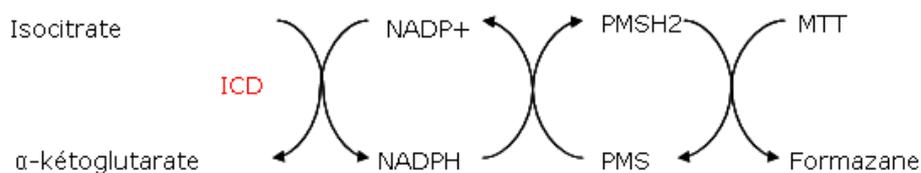


Figure 22 : Réaction cyclique de dosage du NADPH et NADP+ par ICDH

Le NADPH et le NADP⁺ sont dosés en présence d'1 U.ml⁻¹ d'ICD, 130 mM TEA-HCl pH 7,4, 50 mM MgCl₂, 0,3 mM PMS, 0,5 mM MTT et 10 mM d'isocitrate, dans volume final de 300 µl, à 37 °C pendant une heure.

6.4.3. Dosage du NAD⁺ et NADH

Le dosage des deux formes NAD⁺ et NADH est basé sur le principe de cyclage avec l'alcool déshydrogénase (ADH)(réduction du NAD⁺) et la phénazine éthosulfate (PES)(oxydation du NADH) couplé à la transformation du thiazolyl bleu (MTT) en son dérivé formazane, détecté par spectrométrie d'absorption à 570 nm (Figure 23).

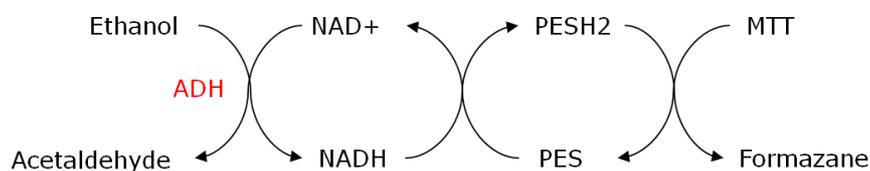


Figure 23 : Réaction cyclique de dosage du NADH et NAD⁺ par ADH

Le NADH et le NAD⁺ sont dosés en présence de 0,093 mg.ml⁻¹ d'ADH, 130 mM TEA-HCl pH 7,4, 5 mM Na₂EDTA, 2 mM PES, 0,5 mM MTT et 1 M d'éthanol, dans volume final de 280 µl, à 37 °C pendant une heure.

Pour les quatre cofacteurs, des cinétiques des gammes de dosages sont établies pour des concentrations d'échantillons étalons de 0,1 µM à 1 µM, et cela en parallèle des cinétiques des réactions de dosage des échantillons. Le temps correspondant au meilleur facteur de corrélation pour les gammes étalons est retenu pour calculer les concentrations respectives de chaque échantillon.

7. Mesure des activités enzymatiques

7.1. Préparation des extraits acellulaires

Un échantillon correspondant à environ 25 mg de poids sec de cellules est prélevé pendant la phase exponentielle de croissance puis centrifugé à 7000 g pendant 10 min à 4 °C. Le culot est lavé par deux fois avec un volume de milieu MML8b équivalent au volume de culture, puis resuspendu dans 1 ml de tampon de cassage comprenant 100 mM de K_2HPO_4 , 25 mM de KH_2PO_4 , pH = 7,6, 0,1 mM de pyridoxal phosphate, 0,1 mM de dithiothreitol et des inhibiteurs de protéases (une pastille pour 10 ml, Complete Mini EDTA Free, Roche).

Les cellules sont éclatées mécaniquement par cassage par billes (0,2 mm, 30 s à 6500 g, Fastprep), puis les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation 30 minutes à 15000 g à 4 °C. Le surnageant contenant les extraits acellulaires est dessalé sur colonne (Zebra™ Desalt Spin, Perbio Science SAS). L'extrait dessalé est utilisé pour le dosage des activités enzymatiques ainsi que de la concentration en protéines.

7.2. Dosage des protéines

La concentration en protéines est déterminée par la méthode de microbradford adaptée de la méthode de Bradford (Bradford, 1976), après dilution éventuelle des extraits cellulaires pour se placer dans la gamme de linéarité de la courbe étalon (0,02-0,16 g.l⁻¹). Cette méthode évite les interférences avec les acides nucléiques et avec les réactifs possédant des groupements thiols. Les concentrations en protéines sont déterminées à l'aide d'une courbe étalon réalisée à partir d'une solution mère de sérum albumine bovine (BSA) à 0,2 g.l⁻¹.

7.3. Dosage de l'activité phosphoglucoisomérase

La mesure de l'activité *in vitro* phosphoglucoisomérase est réalisée par couplage avec l'enzyme G6PDH par suivi de l'augmentation de l'absorbance à 340 nm par la réduction du NADP⁺ ($\epsilon = 6,29 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). L'échantillon protéique est préparé selon le mode opératoire du paragraphe **7.1**. La réaction est réalisée dans un tampon Tris-HCl 100mM pH 8,3, 1 mM d'EDTA, 10 mM de D-Fructose-6-P, 1 mM de NADP⁺, en présence de 8,3 U.ml⁻¹ d'enzyme G6PDH. L'activité de transformation du D-Fructose-6-P en D-glucose-6-P est ainsi égale à l'activité G6PDH qui est suivie via l'augmentation de l'absorbance à 340 nm, réduction du NADP⁺, à 30 °C pendant 30 minutes.

7.4. Dosage de l'activité phosphofructokinase

La mesure de l'activité *in vitro* phosphofructokinase est réalisée par couplage avec les enzymes fructose -1,6- biphosphate aldolase, triose phosphate isomérase et glycérophosphate déshydrogénase, avec un suivi de la diminution de l'absorbance à 340 nm par l'oxydation du NADH ($\epsilon = 6,29 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). L'échantillon protéique est préparé selon le mode opératoire du paragraphe **7.1**. La réaction est réalisée dans un tampon Tris-HCl 100mM pH 8,2, 1 mM de MgCl_2 , 200 μM de NADH, 10 mM de NH_4Cl , 200 μM de D-Fructose-6-P, 1 mM de GDP, 1 mM d'ATP et en présence de 0,7 $\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$ de fructose -1,6- biphosphate aldolase, 21 $\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$ de triose phosphate isomérase et 2,7 $\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$ de glycérophosphate déshydrogénase. La réaction est initiée par ajout d'ATP et est suivie à 30 °C pendant 30 minutes.

7.5. Dosage de l'activité transhydrogénase totale

Le dosage enzymatique *in vitro* de l'activité transhydrogénase totale qui suit la réduction directe du 3-acétylpyridine adénine dinucléotide (AcPyAD^+ , analogue du NAD^+) est adapté de la publication de Yamaguchi et Stout (2003). L'échantillon protéique, préparé selon le mode opératoire du paragraphe **7.1**, a été dilué à 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en présence de 50 mM de MES-KOH pH 6,0, 200 μM de NADH, 200 μM d' AcPyAD^+ et 10 μM de NADPH. La réduction de l' AcPyAD^+ a été suivie via l'augmentation de l'absorbance à 375 nm ($\epsilon = 6,1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) à 37 °C pendant 30 minutes.

7.6. Dosage de l'activité aldéhyde réductase

L'activité aldéhyde réductase a été mesurée en suivant la diminution de l'absorbance à 340 nm par l'oxydation du NAD(P)H ($\epsilon = 6,29 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). L'échantillon protéique est préparé selon le mode opératoire du paragraphe **7.1**. La réaction est réalisée dans un tampon Hepes 20 mM à pH 7,5, 100 μM de sulfate de zinc, 400 μM de NAD(P)H en présence de 10 mM d'aldéhyde (propionaldéhyde ou glycolaldéhyde), et incubé à 30 °C pendant 30 minutes.

7.7. Dosage de l'activité alcool déshydrogénase

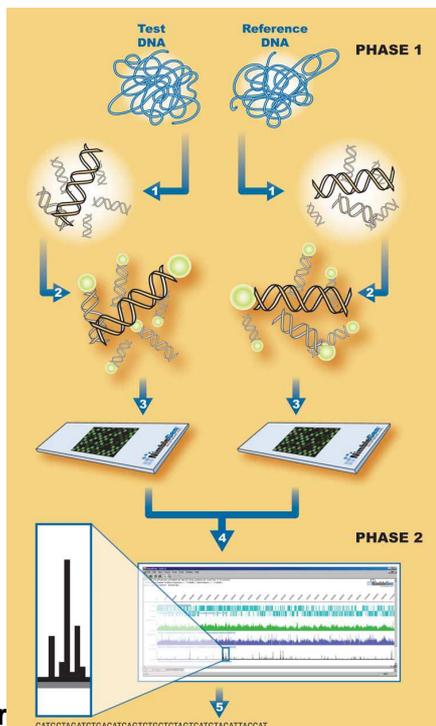
L'activité alcool déshydrogénase a été mesurée par l'augmentation de l'absorbance à 340 nm par la réduction du NAD(P)^+ ($\epsilon = 6,29 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). L'échantillon protéique est préparé selon le mode opératoire du paragraphe **7.1**. La réaction est réalisée dans un tampon Tris-HCl 50 mM pH 9, 4 mM de NAD(P)^+ en présence de 200 mM d'alcool (propanol ou éthylène glycol), et incubé à 30 °C pendant 30 minutes.

8. Comparaison de la séquence du génome par hybridation sur puces à ADN

8.1. Principe

La comparaison de séquence de génome entier par hybridation sur puces à ADN permet d'étudier, nucléotide par nucléotide, la séquence de deux génomes (un génome test et un de référence), en comparant leurs signaux respectifs d'hybridation sur une puce où est synthétisé *in situ* le génome référence d'*E. coli* K-12.

Dans la présente étude, cette application est utilisée pour la recherche de mutations susceptibles d'être survenues après une période d'évolution. La comparaison de séquence de génome entier a été effectuée par la société Nimblegen (Roche Nimblegen, USA) grâce à sa technologie CGS (Comparative Genome Sequencing). Le principe de la technologie CGS est décrit dans la figure 24 :



Figur

Phase 1 : Hybridation du génome sur puces

- Etape 1 : digestion de l'ADN génomique en pool de fragments de faibles poids moléculaires.
- Etape 2 : marquage par sonde fluorescente des fragments d'ADN.
- Etape 3 : hybridation de chaque pool sur une puce où est synthétisé *in situ* le génome entier d'*E. coli* K-12.

Phase 1 : Hybridation du génome sur puces

- Etape 1 : digestion de l'ADN génomique en pool de fragments de faibles poids moléculaires.
- Etape 2 : marquage par sonde fluorescente des fragments d'ADN.

➤ Etape 3 : hybridation de chaque pool sur une puce où est

La première étape de la comparaison des séquences des génomes va être de digérer l'ADN génomique des souches test et de référence en fragments de faible poids moléculaire. Ensuite, chaque fragment va être marqué individuellement par fluorescence. Chaque pool marqué est hybridé sur une puce contenant le génome d'*E. coli* K-12 synthétisé de façon *in situ*, chaque spot correspondant à une position précise du génome. Un spot correspond à une sonde de 29 mers, et une sonde est synthétisée tous les 7 bp du génome, de telle sorte que le génome est recouvert plusieurs fois par le jeu de superposition des sondes. Finalement pour la taille du génome d'*E. coli* (~ 4,5 Mb), il faut 5 puces à ADN pour analyser la totalité de la séquence nucléotidique.

8.2. Mini-préparations d'ADN génomique d'*E. coli*

Les ADN génomiques sont extraits à partir de 2 ml d'une culture sur la nuit en milieu LB additionné d'antibiotique(s) à l'aide de mini-colonnes du kit QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) en suivant le protocole pour les bactéries (avec traitement à la RNase). La qualité et la quantité d'ADN extrait puis purifié sont évaluées par lecture de l'absorbance UV à trois longueurs d'onde 260nm, 280nm, et 230nm (Eppendorf Biophotometer). La concentration de l'ADN en µg/µl est déterminée par la corrélation : $DO_{260nm} \times 0,05$. Pour satisfaire les exigences de qualités requises pour les expériences de comparaison de séquences de génomes sur puces, la concentration en ADN doit être au moins de 1 µg/µl (avec une quantité minimale de 10 µg d'ADN), et les rapports DO_{260nm}/DO_{280nm} (estimation de la présence de protéines) et DO_{260nm}/DO_{230nm} (estimation de la présence de solvants) doivent être supérieurs à 1,7 et 1,5 respectivement.

8.3. Analyse des résultats de signaux d'hybridation

La comparaison des signaux bruts d'hybridation (un point correspond à un spot d'hybridation, soit 29 bp, Figure 25) permet d'identifier des différences d'intensité d'hybridation qui sont induites par des séquences nucléotidiques qui diffèrent par une ou plusieurs bases.

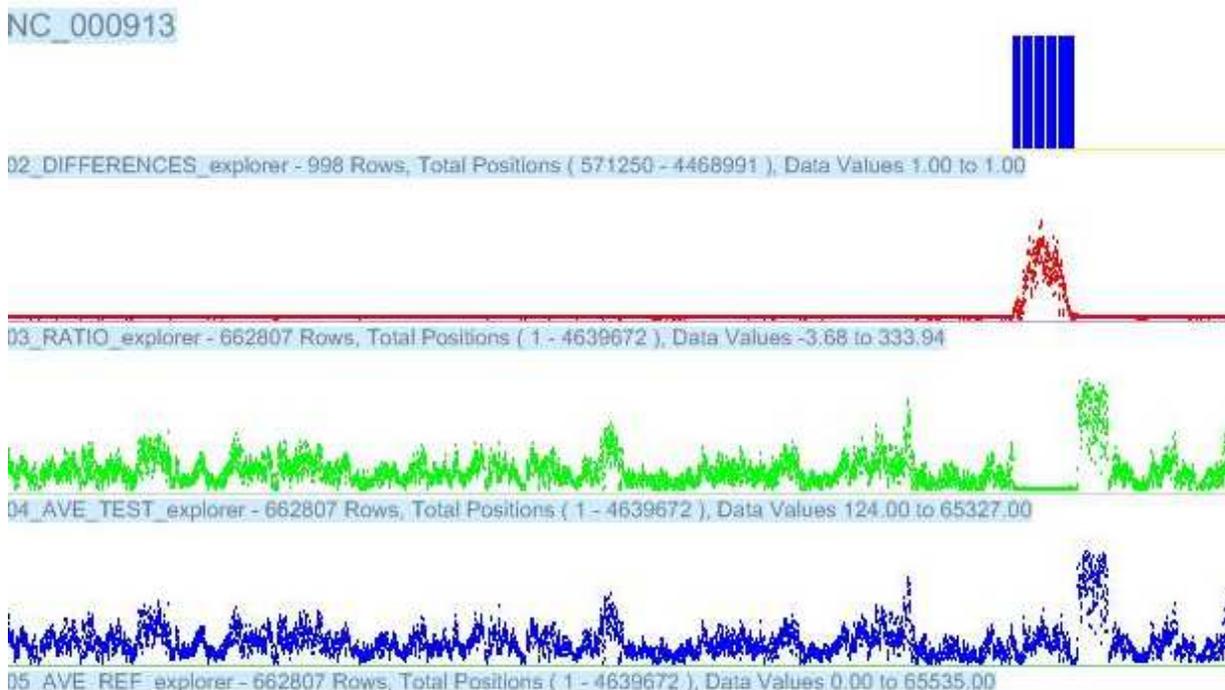


Figure 25 : Signaux d'hybridation du génome test (en vert) comparés aux signaux du génome de référence (en bleu).

Le signal rouge correspond au ratio spot par spot des deux signaux, et quand une différence de signal est jugée significative (ratio élevé sur plusieurs spots par rapport au bruit de fond), la différence est indiquée en bleu (ligne du haut).

Les mutations éventuelles sont indiquées de façon binaire par le signal bleu du haut, mais parfois une étude plus détaillée du signal « ratio » en rouge peut être nécessaire pour détecter des mutations qui auraient été jugées non significatives de part la différence de signaux (Faux négatifs). Cela peut être le cas notamment quand le bruit de fond du signal d'hybridation est élevé.

8.4. Validation des mutations par séquençage local

Pour valider les régions nucléotidiques considérées comme modifiées par la technologie de comparaison de séquence de génome entier sur puces, une validation par séquençage direct de la zone locale cible est effectuée pour ainsi écarter les faux positifs. Les modifications identifiées sont reliées à des coordonnées du génome d'*E. coli* K-12 (coordonnées à 7 bp près), ce qui permet de localiser très précisément la mutation éventuelle et donc de dessiner des amorces pour le séquençage direct de la zone correspondante (Tableau 18).

Tableau 18 : Amorces de vérifications des mutations détectées par CGS

Amorces	Séquence
ybcmdel_F	TGGGAGCAACTAAAAACATCTGTTTCCCGAGGC
ybcQdel_R	CTAATCTGATTACGAAAAAGATATGTTGCGGGAGGC
nuoF_F	TTTCAGACCATCACGCATACCACCG
nuoF_R	TGGCTACATCTTCCTGCGTGGCG
rpoA_F	CGAACCAGTGAACCTGCCATATTGCGG
rpoA_R	GATGTCGAAATCGTCAAGCCGCAGC
trmA_F	TAGCAGGGAAACCACCGCCTGATTACTC
trmA_R	GCAATCATCGCACCTTTCCTTACCGC

9. Caractérisation du fragment soluble du complexe I (Nuo)

9.1. Construction des vecteurs de surexpression

La production du fragment soluble du complexe I (NuoEFG) est réalisée grâce au vecteur de surexpression fourni par le Dr. Thorsten Friedrich : le plasmide pET11a/*nuoB-G/NuoFc* (Bungert *et al.*, 1999). Pour la production du fragment soluble évolué, NuoEF*G, le même plasmide est utilisé avec l'introduction de la mutation NuoF(E183A) ou NuoF(E183G). Ainsi, le plasmide pET11a/*nuoB-G/NuoF*c* est construit par sous clonage du fragment d'ADN 5'-²⁸⁸⁸XhoI/NheI⁴³⁹⁶-3' (en exposant les coordonnées sur le plasmide) amplifié (protocole Pwo) à partir de l'ADN génomique de la souche NA 124E ou NA 155E (voir Tabelau 6) pour obtenir respectivement un fragment NuoF(E183A) ou NuoF(E183G) ; les deux amorces utilisées sont les suivantes : 5'- TCCGTTATTGTGACAGCGTGG -3', qui a été dessiné dans le but d'amplifier la séquence en amont du site XhoI présent dans le gène

nuoE et 5'- CTCCAGCTAGCCCAGCGCTCTTTCAGCAGG -3' (les résidus soulignés correspondent au site NheI) qui a été dessinée dans le but d'introduire le site de restriction NheI entre la partie terminale de *nuoF* et le Strep-tag II. L'amplicon correspondant est digéré par les enzymes XhoI/NheI et est introduit dans le vecteur pET-11a/*nuoB-G/NuoFc* ouvert XhoI/NheI par ligation.

9.2. Expression et purification

Des cellules compétentes *E. coli* BL21(DE3) ont été transformées respectivement par les plasmides pET11a/*nuoB-G/NuoFc*, pET11a/*nuoB-G/NuoFc*(E183A) et pET11a/*nuoB-G/NuoFc*(E183G). Les transformants sont vérifiés par extraction et digestion de l'ADN plasmidique, comme décrit dans le paragraphe 3.1.

Les conditions de culture pour la production de protéines recombinantes et les modalités de purification sont adaptées des publications de (Braun *et al.*, 1998) et (Bungert *et al.*, 1999).

La culture d'expression des fragments solubles sauvage et évoluée est réalisée dans une fiole de 5 litres contenant un litre de milieu riche LB complété avec du citrate d'ammonium ferrique (100 µg/ml final, ajout à 20 µg/ml toutes les heures), du sulfide de sodium (2 µg/ml final), de la riboflavine (20 µg/ml final) et de l'ampicilline (100 µg/ml final). L'inoculation est réalisée à $DO_{600nm} = 0,1$, et l'induction à $DO_{600nm} = 0,8$ avec de l'IPTG à 0,1 mM final. Après environ 3 heures de cultures (début de phase stationnaire), les cellules sont récoltées et stockées à -80°C.

Pour la purification, les cellules sont reprises dans du tampon froid MES/NaOH 50mM, 50 mM NaCl, pH 6,6, en présence de DNase à 10 µg/ml et d'un mélange d'inhibiteur de protéases (Complete Mini EDTA Free, Roche), afin d'obtenir une concentration finale en biomasse humide de 0,1 g/ml. Le passage cellulaire est effectué par sonication (puissance de 35 Watts ; 4 cycles de 30 s sonication, et 2 min dans la glace). Les débris cellulaires et les membranes cytoplasmiques sont éliminés par ultracentrifugation à 250000g pendant 1 heure à 4 °C. Le surnageant récupéré est traité avec une solution d'avidine (0,16 g.l⁻¹) pour empêcher la contamination de la colonne Strep-Tactin par la biotine. Ce mélange est incubé une demi-heure à 4 °C et centrifugé 5 minutes à 10000 g pour éliminer les particules non solubles dans le culot. Le surnageant est déposé à un débit de 1,4 ml/min sur une colonne Strep-Tactin Superflow de 7 ml (IBA) préalablement équilibrée avec 35 ml (5 volumes colonne) de tampon MES/NaOH 50mM, 50 mM NaCl, pH 6,6. Ensuite la colonne est lavée avec 35 ml (5 volumes colonne) de tampon MES/NaOH 50mM, 50 mM NaCl, pH 6,6. L'élution de la protéine marquée est réalisée à un débit de 0,8 ml/min avec 21 ml (3 volumes colonne) de tampon MES/NaOH 50mM, 50 mM NaCl, pH 6,6, desthiobiotine 2,5 mM. La protéine recombinante est souvent le plus concentrée dans la fraction d'élution n°3, chaque fraction étant de 3,5 ml. La protéine recombinante ainsi élue est conservée 5 jours maximum à 4°C. La régénération de la colonne se fait avec 50 ml de tampon 100mM Tris-Cl pH 8,0, 150mM NaCl, 1 mM HABA (coloration en rouge vif si l'efficacité de la colonne est bonne).

9.3. Analyse en gel dénaturant de polyacrylamide des protéines

9.3.1. Préparation du gel SDS-PAGE

Les protéines sont séparées sur un gel de polyacrylamide contenant du SDS (SDS-PAGE). Un gel d'alignement (à 4 % de polyacrylamide) précède le gel de séparation (à 10 % de polyacrylamide). Les compositions des gels sont indiquées dans les tableaux 19 et 20.

Tableau 19 : Composition du gel d'alignement SDS-PAGE

Mélange acrylamide/bisacrylamide, 40 % (37,5:1)	4 %
Tampon Tris-HCl, 1M (pH 6,8)	0,25 M
SDS (20 %)	0,1 %
Colorant Phenol Red (Sigma)	0,005 %
APS (10 %)	0,05 %
TEMED	0,05 %

Tableau 20 : Composition du gel de séparation SDS-PAGE

Mélange acrylamide/bisacrylamide 40 % (37,5 :1)	10 %
Tampon Tris-HCl, 1,5 M (pH 8,8)	0,375 M
SDS (20 %)	0,1 %
APS (10 %)	0,05 %
TEMED	0,05 %

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

9.3.2. Préparation des échantillons

Les échantillons mélangés au tampon de dénaturation 5X (Tableau 21) sont incubés à 100°C, pendant 5 minutes avant le dépôt sur gel. 25 µl d'échantillons protéiques sont déposés par puits. Le marqueur de taille utilisé est le marqueur précoloré SDS-PAGE Ruler de Fermentas (10 kDa à 170 kDa).

Tableau 21 : Composition du tampon de dénaturation (5 X)

Tampon Tris-HCl 1M (pH 6,8)	0,0625 M
Glycérol	10 %
SDS 20 %	10 %
β -mercaptoéthanol	5 %
Bleu de bromophénol	0,05 %

9.3.3. Migration et coloration

La migration des gels est réalisée à 150 V, 20 - 30 mA, pendant environ une heure, dans un tampon de migration dont la composition est décrite dans le tableau 22.

Tableau 22 : Composition du tampon de migration 1 X

Tris base pH 8,3 3 g.l ⁻¹
Glycine 14,4 g.l ⁻¹
SDS 1 g.l ⁻¹ (5 ml de SDS 20 %)

Après migration le gel est coloré (2 h) dans une solution de coloration au bleu de Coomassie (Tableau 23).

Tableau 23 : Composition de la solution de coloration au bleu de Coomassie

50 % (v/v) méthanol
10 % (v/v) acide acétique
0,25 % (w/v) Coomassie blue R250 (Bio-Rad)

La décoloration est réalisée par plusieurs lavages dans une solution de décoloration (Tableau 24).

Tableau 24 : Composition de la solution de décoloration

10 % acide acétique
30 % éthanol

9.4. Analyse en Western-blot des protéines

Les protéines de fusion possédant l'étiquette Strep-tag peuvent être spécifiquement observées sur membrane en réalisant un Western-Blot. Après séparation sur gel de polyacrylamide, les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose par application d'un champ électrique. L'électrotransfert s'effectue pendant 1 heure à 100 V dans du tampon de transfert réfrigéré (Tableau 25). Pour être visible sur membrane, le marqueur de taille déposé sur le gel polyacrylamide doit être précoloré.

Tableau 25 : Composition du tampon de transfert

Tris Base 3 g.l ⁻¹
Glycine 14,4 g.l ⁻¹
Méthanol 20 %

Après l'électrotransfert, la membrane de nitrocellulose est saturée avec 20 ml d'une solution de BSA 3% - PBS/Tween 0,5 % pendant 1 heure à température ambiante. Trois lavages sont ensuite effectués pendant 5 minutes avec une solution PBS/Tween 0,1 % pour éliminer l'excès de BSA. La membrane est ensuite incubée 10 minutes dans 10 ml de solution de PBS/Tween 0,1 % - avidine 2 µg.ml⁻¹ pour empêcher les protéines biotinylées de se lier à la Strep-Tactin. Après lavage, la membrane est incubée durant 1 heure avec 10 µl de solution de Strep-Tactin conjuguée à la peroxydase (Strep-Tactin HPR) (IBA, GmbH, Göttingen, Allemagne) à la dilution 1:830. La Strep-Tactin est une protéine synthétique se liant à l'étiquette Strep-tag. Trois lavages de 5 minutes sont effectués avec une solution de PBS/Tween 0,1 %, suivis de 2 lavages de 5 minutes avec une solution de PBS. La membrane est révélée avec une solution de révélation, contenant du 4-chloro-1-naphtol et du peroxyde d'hydrogène, qui permet de visualiser les bandes protéiques en violet-bleu (Tableau 26).

Tableau 26 : Composition de la solution de révélation

2 ml d'une tablette de 4-chloro-1-naphtol (Sigma) dissoute dans 10 ml de méthanol
10 ml de tampon Triéthanolamine pH 7,5
5 µl de peroxyde d'hydrogène 30 %.

9.5. Caractérisation biochimique

9.5.1. Mesure de l'activité NAD(P)H ferricyanide réductase

Le dosage enzymatique *in vitro* de consommation du NAD(P)H qui suit la réduction directe du ferricyanide de potassium est adapté de la publication de Friedrich *et al.* (Friedrich *et al.*, 1989).

Les réactions enzymatiques sont effectuées dans des cuves thermostatées à 25 °C. Le milieu réactionnel final contenant 100 à 200 ng d'extrait protéique purifié, 100 µM de NAD(P)H, 1 mM de ferricyanide de potassium et 35 mM de tampon MES/NaOH NaCl, est de 1 ml ; il est incubé préalablement 3 minutes à 25 °C avant addition du cofacteur NAD(P)H qui initie le test enzymatique. Le spectrophotomètre employé pour les dosages enzymatiques est un SAFAS HP8453A UV/Visible (Hewlett-Packard Chemstation). Les activités spécifiques sont déterminées dans une gamme où la linéarité avec la concentration protéique (déterminée par la méthode de Bradford) a été établie.

La réduction du ferricyanide de potassium est suivie par l'augmentation de l'absorbance à 410 nm ($\epsilon = 1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). La réduction d'une molécule de ferricyanide de potassium est couplée à la consommation d'une molécule de cofacteur.

9.5.2. Détermination des constantes michaeliennes et catalytiques

Pour déterminer les paramètres cinétiques K_m et V_{max} , la quantité de ferricyanide est fixée et les mesures de vitesse initiale de catalyse sont réalisées en faisant varier la quantité de cofacteurs (NADH ou NADPH). La constante de Michaelis K_m et la vitesse maximale V_{max} sont alors obtenues par la régression non linéaire de la vitesse initiale en fonction de la concentration en substrat (Figure 26).

La mesure de la vitesse initiale de réaction est effectuée au fluorimètre par le suivi du NAD(P)H, qui, excité par une longueur d'onde de 340 nm, va émettre à 460 nm. La corrélation de la valeur d'émission à 460 nm pour une concentration de NAD(P)H donnée est obtenue par la réalisation d'une courbe d'étalonnage pour des concentrations de 0,5 à 50 µM. Pour chaque mesure d'activité à une concentration de cofacteur donnée, deux mesures indépendantes sont réalisées. Le calcul des constantes est réalisé sur la moyenne des deux séries.

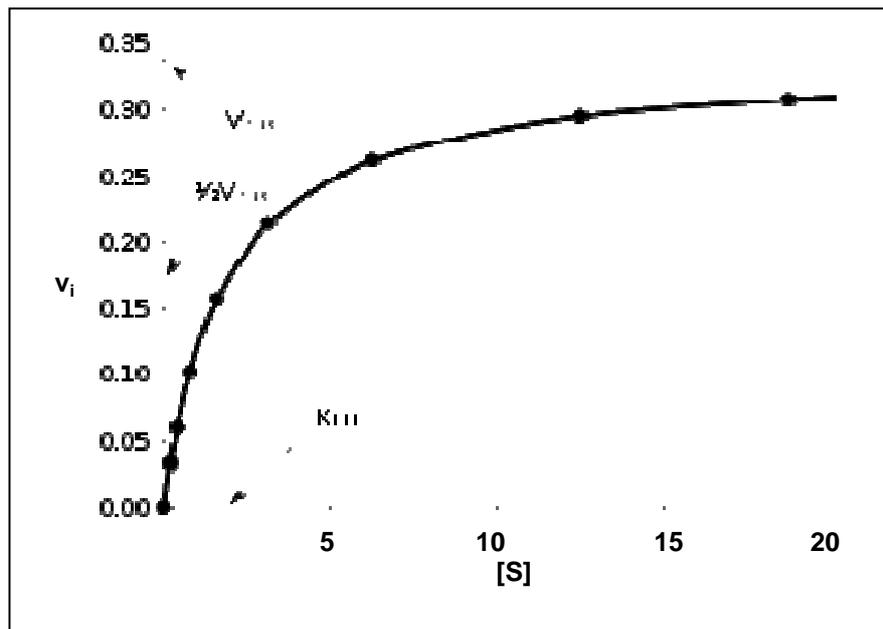


Figure 26 : Equation et représentation graphique de Lineweaver & Burk des constantes cinétiques enzymatiques.

v_i représente la vitesse initiale de la réaction et $[S]$ la concentration en substrat (ici NAD(P)H).

Les enzymes purifiées sont aussi caractérisées par leur constante, k_{cat} , qui est définie comme étant le nombre de molécules de substrat converties en produit par unité de temps par chaque site actif, quand l'enzyme est saturée :

$$K_{cat} = V_{max} / \text{mole d'enzyme} = V_{max} / [E]_T$$

Dans les conditions physiologiques, l'enzyme est non-saturé, la concentration du substrat est généralement inférieure au K_M de l'enzyme, d'où $[S] \ll K_M$ et la concentration d'enzyme libre est à peu près égale à la concentration d'enzyme totale, d'où $[E] \approx [E]_T$. La vitesse de réaction enzymatique est donc proportionnelle à l'efficacité catalytique, définie par le rapport K_{cat}/K_M :

$$v = \frac{V_m \cdot [S]}{K_m + [S]} \approx \frac{K_{cat} [E][S]}{K_m}$$

9.6. Expériences sur vésicules inversées

Les vésicules cellulaires inversées permettent d'étudier les protéines membranaires qui se retrouvent après traitement en contact avec le milieu extérieur. Les expériences sur vésicules inversées rendent possible l'étude de la chaîne respiratoire qui reste fonctionnelle. Dans la présente étude, l'activité NAD(P)H oxidase et la force protomotrice de la chaîne respiratoire ont été évaluées chez les souches sauvage, parentale et évoluée.

9.6.1. Préparation de vésicules inversées

Les vésicules inversées sont préparées d'après la méthode décrite par Matsushita *et al* (1987). Les cellules sont récoltées en phase exponentielle de croissance (environ 4 g de biomasse humide à partir de 500 ml de culture en MML8b avec 10 g/l de glucose), et elles sont lavées une fois avec du tampon potassium phosphate 50 mM pH 7,5. Les culots cellulaires sont ensuite repris dans 20 ml de tampon potassium phosphate 50 mM pH 7,5 MgSO₄ 5 mM contenant 50 U/ml de benzonase (Sigma, St. Quentin Fallavier, France) pour digérer les acides nucléiques. Les suspensions cellulaires sont passées une seule fois dans une presse de French avec de faibles forces de cisaillement (5000 psi). Les cellules intactes et les débris cellulaires sont éliminés par une étape de centrifugation à 10 000 g pendant 10 minutes à 4°C, et le surnageant est centrifugé à 120 000 g pendant 2 heures à 4°C afin de sédimenter la fraction membranaire. La fraction supérieure de couleur marron rougeâtre est lavée une fois avec du tampon potassium phosphate 50 mM pH 7,5 MgSO₄ 5 mM. Les vésicules inversées sont finalement resuspendues dans 4 ml de tampon potassium phosphate 50 mM pH 7,5, MgSO₄ 5 mM, dithiothreitol (DTT) 1 mM et glycérol 10% (v/v), et sont stockées à -80°C. La concentration en vésicules inversées est déterminée par la concentration protéique d'après la méthode de Bradford (voir paragraphe 7.2).

9.6.2. Mesures des activités oxidoréductase de la chaîne respiratoire

Les activités NAD(P)H oxidoréductases mesurées sur vésicules inversées sont suivies au spectrophotomètre dans des cuves thermostatées à 25°C (Matsushita *et al.*, 1987). Le mélange réactionnel contient environ 10 µg de vésicules inversées dans 1 ml de tampon potassium phosphate 50 mM pH 7,5, MgSO₄ 5 mM. Les réactions sont initiées par l'ajout de NAD(P)H à 100 µM final. Les activités NAD(P)H oxidase sont mesurées à 340 nm et sont calculées avec un coefficient d'extinction molaire de 6,22 mM⁻¹.cm⁻¹. Les activités ferricyanide réductase sont mesurées à 420 nm dans les mêmes conditions que précédemment avec un ajout de potassium ferricyanide et de sodium cyanide à 1 mM final, et elles sont calculées avec un coefficient d'extinction molaire de 1 mM⁻¹.cm⁻¹. Les tests en conditions anaérobies sont réalisés dans une hotte anaérobie JACOMEX, avec des solutions et des vésicules inversées dégazées au préalable avec un flux léger d'azote.

9.6.3. Détermination de la génération de la force protomotrice par quenching de la fluorescence

La force protomotrice ($\Delta\tilde{\mu}_H^+$) est définie comme la somme du gradient électrique ($\Delta\Psi$) et du gradient pH (ΔpH). La génération du $\Delta\Psi$ et du ΔpH dans les vésicules inversées a été suivie à 25°C par le quenching de la fluorescence de l'oxonol V (Fluka, Schnelldorf, Germany) et de la quinacrine

(Sigma, Schnelldorf, Germany), respectivement (Kim *et al.*, 1991 ; Yamada *et al.*, 1989). Le milieu réactionnel final contenait dans 1 ml de tampon potassium phosphate 50 mM pH 7,5, MgSO₄ 5 mM, oxonol V 1 ou quinacrine 1 µM et 100 ng de vésicules inversés. Le NAD(P)H et le cyanure de potassium (KCN) sont ajoutés à une concentration finale de 0,5 mM et 5 mM, respectivement. L'émission de la fluorescence de l'oxonol V est mesurée à 642 nm avec une excitation à 580 nm, et celle de la quinacrine à 492 nm avec une excitation à 430 nm.

9.7. Modélisation 3D du fragment soluble

Le modèle tridimensionnel de la sous-unité NuoF du fragment soluble (NuoEFG) du complexe I (NADH : ubiquinone oxydoréductase) d'*E. coli* a été élaboré à partir du modèle tridimensionnel de la sous-unité Nqo1 du fragment soluble de *Thermus thermophilus* (PDB, 2fug) réalisé par Sazanov et Hinchliffe (Sazanov & Hinchliffe, 2006). La modélisation de NuoF (et de la protéine mutée NuoF*), qui présente 49 % d'identités avec Nqo1, a été effectuée à l'aide du logiciel MODELLER (package Accelrys, version 9v5). Le cofacteur NAD(P)H a été placé manuellement dans le modèle en respectant les contraintes stériques.

10. Analyse de l'expression des gènes

10.1. Principe

L'expression globale du génome d'*E. coli* a été analysée par une approche transcriptomique qui a pour but de déterminer la quantité d'ARN messagers pour chaque gène connu. Pour cela les ADN complémentaires (ADNc) sont synthétisés par rétrotranscription à partir des ARN messagers extraits et marqués par fluorescence. Ils sont ensuite hybridés sur des sondes spécifiques de chaque gène. L'intensité de chaque spot, issu de l'hybridation, est directement corrélée à la quantité d'ARN de chaque gène.

Dans ce travail, une approche de type microarray a été utilisée avec des lames de verre 3x6K *E. coli* Microarray Slide commercialisées par l'université d'Alberta (Canada). Ces lames contiennent 19086 spots consistant en un triplicat de 5978 oligomères de 70 pb et un jeu de 12 contrôles positifs et 12 contrôles négatifs en 16 répliques. Les 5978 oligomères représentent les séquences codantes des gènes de trois souches d'*E. coli* avec : 4289 séquences codantes pour K-12, 5029 séquences codantes pour O157:H7 (EDL933) et 4836 séquences codantes pour O157:H7 (Sakai).

L'approche microarray repose sur la détection d'échantillons marqués en fluorescence. L'avantage de ce type d'approche par rapport à une approche de type macroarray, basée sur la détection d'échantillons marqués en radioactivité, réside dans la possibilité d'analyser deux échantillons dont l'hybridation sur les oligomères est compétitive. L'approche microarray permet donc d'acquérir une mesure relative du niveau d'expression des gènes dans un échantillon cellulaire (condition test) par rapport à un témoin de référence (condition de référence).

De manière pratique, les ARN messagers (ARNm) sont extraits puis rétrotranscrits. Au cours de la rétrotranscription, les ADNc sont marqués grâce à un fluorochrome (vert ou rouge). Les ADNc de chacune des conditions sont marqués de couleurs différentes et sont ensuite déposés sur la même lame. Ils s'hybrident sur les sondes correspondant aux gènes pour lesquels ils codent. L'intensité, résultant des signaux de la référence et du test, permet de déterminer le rapport de la quantité de transcrits entre la référence et le test pour chacun des ORFs.

Afin de s'affranchir d'artefacts pouvant être liés à l'incorporation des fluorochromes lors de la rétrotranscription, une approche de type « dye switch » à deux répétitions a été utilisée (par opposition au « dye swap ») (Figure 27). Cette approche a été dupliquée amenant à quatre le nombre séries de cultures réalisées de façon indépendante pour la souche de référence et la souche test. Pour les cellules issues de la première série de cultures, les ADNc de la souche de référence sont marqués par Cy[®]5 dCTP (fluorochrome rouge), et ceux de la souche test sont marqués par Cy[®]3 dCTP (fluorochrome vert). Pour les cellules issues de la deuxième série de cultures, le marquage des ADNc par les fluorochromes est inverse. Cette approche est refait à l'identique sur deux autres séries de cultures. Par conséquent, l'analyse de l'expression globale du génome repose sur le traitement des informations contenues sur quatre lames de verres indépendantes.

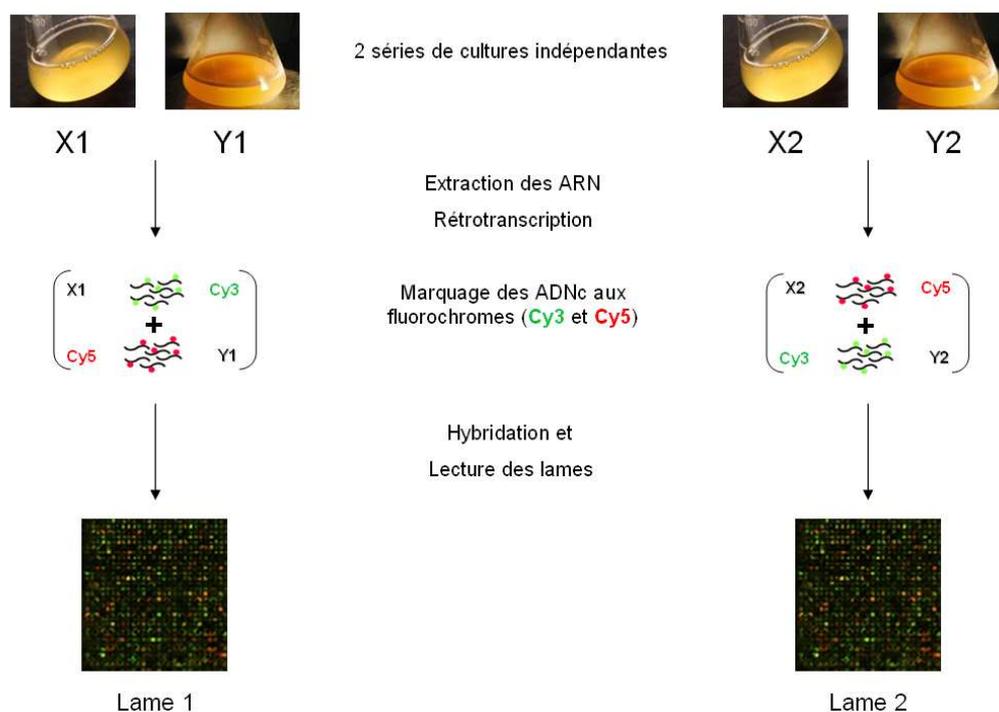


Figure 27 : Schéma du principe du « Dye switch » à deux répétitions.

L'analyse du transcriptome des souches NA 124E *E. coli* MG1655 Δ *pgi* Δ *dudhA* Δ *qor* Δ *edd* *nuoF** *rpoA** et NA 142 *E. coli* MG1655 Δ *pgi* Δ *dudhA* Δ *qor* Δ *edd* *nuoF** a été réalisée par des puces à ADN. Quatre cultures indépendantes ont été réalisées par souche, conduisant ainsi à quatre pools d'ARNm indépendants par génotype (*rpoA** ou *rpoA* sauvage). Ces ARNm ont été retranscrits en ADNc et hybridés sur les puces à ADN. La méthode utilisée pour la stratégie d'hybridation a été le « dye switch » (ou « dye swap » biologique), qui permet d'obtenir des résultats significatifs en un

nombre de lames divisé par deux (quatre lames pour 4 séries d'échantillons) par rapport au « dye swap » (Figure 28).

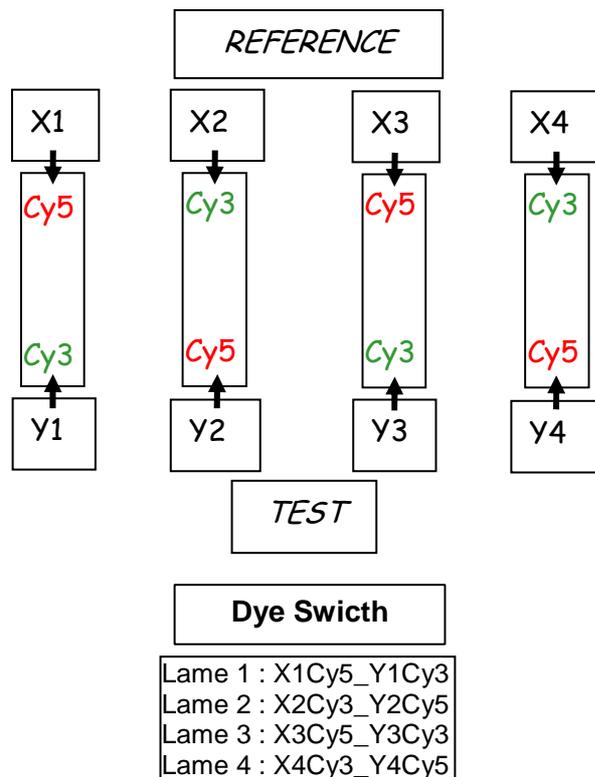


Figure 28 : Principe de l'analyse transcriptomique sur lames à ADN en mode « Dye Switch » à partir de 4 échantillons d'ARN indépendants par souche.

Les différentes étapes permettant de réaliser l'analyse de l'expression globale du génome vont être détaillées dans les paragraphes suivants. Il s'agit de la prise d'échantillon, l'extraction des ARN, la concentration des ARN, la vérification de leur qualité, le marquage des ADNc par rétrotranscription, l'hybridation des ADNc aux oligomères, la révélation des lames de verre, le traitement et l'analyse des données obtenues. Les étapes de marquage, d'hybridation et de révélation ont été réalisées par la Plate-forme Biopuces (Toulouse Genopole®).

Ces analyses transcriptomiques ont été validées ultérieurement par des analyses de PCR quantitatives en temps réel (RT-qPCR) sur le choix de 9 gènes candidats. Ces analyses sont réalisées sur deux lots d'ARN indépendants pour chaque souche et ont été réalisées par Cogenics (Meylan) en utilisant la chimie SYBR Green et un thermocycleur ABI 7500 Fast.

10.2. Préparation des ARN totaux

10.2.1. Prise d'échantillons

Pour l'extraction des ARN cellulaires, 5 ml de culture à $DO_{600nm} = 1$ (milieu de phase exponentielle de croissance) sont prélevés et immédiatement mélangés avec 10 ml de RNAprotect (Qiagen®, RNAprotect® Bacteria Reagent). Après une étape de centrifugation (10 min à 5000 g), le culot bactérien est conservé à $-80^{\circ}C$ jusqu'à l'extraction des ARN. Pour chaque souche, les analyses sont effectuées sur quatre échantillons issus de quatre cultures indépendantes.

10.2.2. Extraction des ARN totaux

Les échantillons cellulaires sont décongelés lentement à $4^{\circ}C$. L'extraction des ARN est réalisée à l'aide du kit d'extraction Qiagen® RNeasy Midi en suivant le protocole adapté aux bactéries avec traitement à la protéinase K et à la DNase. La lyse chimique des bactéries est réalisée enzymatiquement grâce à un tampon TE avec 1 mg/ml de lysozymes.

10.2.3. Concentration des ARN par SpeedVac

Si besoin est (concentrations d'ARN requises de $0,4 \mu g/\mu l$ pour les analyses sur lame et de $0,2 \mu g/\mu l$ pour les analyses de RT-qPCR), les ARN sont concentrés par évaporation au SpeedVac. Une fois secs, les culots d'ARN sont resuspendus dans le volume approprié d'eau stérilisée à l'autoclave (21 min à $120^{\circ}C$) pour éviter la présence de protéines de dégradation de l'ARN (RNase), et stockés à $-20^{\circ}C$.

10.2.4. Quantification et pureté des ARN

La qualité et la quantité des ARN extraits sont évaluées à partir du profil en ARNs ribosomiaux, obtenu par électrophorèse capillaire (Bioanalyzer, Agilent Technologies), en suivant le protocole fourni par Agilent Technologies. La qualité des ARN est estimée par calcul du rapport $[ARN\ 23S]/[ARN\ 16S]$. Ce rapport doit être supérieur à 1 dans le cas d'ARN issus de cellules procaryotes. La quantité d'ARN totaux est déterminée grâce à la présence d'un marqueur ; la concentration des ARNs totaux est aussi évaluée en parallèle par mesures spectrophotométriques à DO_{260nm} (Nanodrop™, Thermo Scientific). Les rapports DO_{260nm}/DO_{280nm} et DO_{260nm}/DO_{230nm} sont aussi calculés et doivent être supérieurs ou égaux à 2, indiquant respectivement que la quantité de protéines résiduelles et la présence de solvant issu de l'extraction sont négligeables.

10.3. Marquage des ADNc

Les ARN sont utilisés comme matrice de la réaction de rétro-transcription. Cette étape permet le marquage des ADNc par incorporation des fluorochromes (Cy®3 dCTP ou Cy®5 dCTP) dans le brin d'ADN complémentaire neosynthétisé. Elle est réalisée à l'aide du kit Cyscribe First-Strand cDNA Labeling (GE healthcare, Amersham Pharmacia Biotech).

Un volume correspondant à $2 \mu g$ d'ARN est ajouté à $1 \mu l$ d'une solution d'amorces aléatoires ($3 \mu g.\mu l^{-1}$) et à $1 \mu l$ d'une solution d'amorces composée d'oligomères d'acides deoxythymidylques (2

$\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$). Le volume est ajusté à 20 μl avec de l'eau stérile et le mélange est incubé 10 minutes à 70 °C pour dénaturer les structures secondaires des ARN. Le mélange est rapidement plongé dans de la glace fondante et refroidi pendant 1 minutes.

La solution de marquage, réalisée indépendamment pour les deux fluorochromes, est obtenue en mélangeant 2 μl d'une solution contenant du dATP, du dGTP et du dTTP (fournis dans le kit), 8 μl de tampon pour la reverse transcriptase (5X), 1 μl de Cy[®]3 dCTP ou Cy[®]5 dCTP (1 mM), 4,8 μl de MgCl₂ (25 mM), 3,2 μl d'enzyme reverse transcriptase (fournie dans le kit) et 1 μl d'eau stérile. Le mélange précédent est incubé à 25 °C pendant 10 minutes, puis à 42 °C pendant 2 heures à l'obscurité. Pour favoriser la dégradation des ARN ayant servi de matrice, 1 μl de RNase H et 0,35 μl de RNase A (fournies dans le kit) sont ajoutés. Le mélange ainsi obtenu est incubé à 37 °C pendant 15 minutes à l'obscurité. Les ADNc marqués par les fluorochromes sont ensuite purifiés par chromatographie d'affinité. Pour cela 4 μl d'acétate de sodium (3 M, pH 5,2) et 225 μl de solution de fixation (fournie avec le kit) sont ajoutés. Le mélange est placé sur une colonne d'affinité (fournie avec le kit) pendant 5 minutes. Après centrifugation (1 min à 10000 g), le filtrat est soutiré. La colonne est ensuite lavée 3 fois avec 500 μl d'éthanol 80 % et centrifugée (1 min à 10000 g). L'élution est réalisée dans un tube propre, en ajoutant 60 μl de tampon d'élution (fourni avec le kit) et en centrifugeant (1 min à 10000 g). Les 60 μl sont de nouveau déposés sur la colonne pour assurer une élution optimale. Un séchage au SpeedVac est ensuite réalisé.

10.4. Hybridation des ARN sur les lames de verre 3x6K *E coli* Microarray Slide

L'hybridation des ARN totaux est réalisée dans une chambre d'hybridation en suivant le protocole fourni par le constructeur (Ventana Discovery). Une étape de préhybridation est nécessaire pour éviter des hybridations non spécifiques entre les oligomères présents sur les lames de verre. Pour cela, une solution composée d'un tampon salin citrate de sodium (SSC) (2 X), de sodium dodécylsulfate (SDS) (0,2 %) et de sérum d'albumine bovine (BSA) (1 %), le tout filtré sur filtre 0,2 μm , est déposée sur la membrane avant une incubation à 42 °C pendant 30 minutes dans la chambre d'hybridation.

L'hybridation est réalisée pendant 8 heures à 42 °C après avoir ajouté 2 ml de tampon de réaction (fourni par Ventana Discovery) et les ADNc (préparés séparément) repris par 200 μl de tampon d'hybridation (fourni par Ventana Discovery).

Les lames sont ensuite lavées 2 fois par incubation sous agitation pendant 30 secondes avec un mélange de SSC 2 X et de SDS 0,2 %. Un dernier lavage est réalisé sous agitation pendant 30 secondes à l'aide de SSC 0,1 X. Les lames sont ensuite séchées à la centrifugeuse de pailleasse.

10.5. Détection des signaux

La détection de la fluorescence est réalisée à l'aide d'un scanner (Genepix 4000A, Axon Instrument). Une fois scannées, les images sont analysées à l'aide du logiciel Genepix Pro 6.0 qui permet de positionner une grille sur les spots et de quantifier l'intensité de chacun d'eux. Les données sont ensuite normalisées puis traitées.

10.6. Quantification de l'expression des gènes et traitement des données obtenues

Les premières étapes de traitement des données sont réalisées à l'aide des logiciels Bioplot et BioClust développés par la Plate-forme Biopuces (Toulouse Genopole®). Les données sont d'abord normalisées. En effet, lors de la comparaison de deux hybridations, des différences d'intensité entre les spots apparaissent systématiquement. Ces différences peuvent être dues à l'influence de paramètres expérimentaux tels que le niveau de bruit de fond ou le rendement de marquage des ADNc. L'étape de normalisation des données permet de s'affranchir de ces variations expérimentales. Dans ce travail, les données ont été normalisées par rapport à l'intensité moyenne des spots.

Les résultats obtenus sont présentés sous forme de rapports d'intensités entre le point expérimental et le point de référence. Ainsi, un gène est considéré comme surexprimé ou sous exprimé quand ce rapport est supérieur à 1,5 ou inférieur à 0,66, respectivement. Pour évaluer la significativité des résultats obtenus, quatre extractions d'ARN issus de quatre cultures indépendantes sont analysées séparément. Le test du T de Student renseigne sur la significativité des résultats obtenus par la valeur de la P-value, qui correspond à la probabilité que le résultat soit dû au hasard ; les résultats sont ainsi retenus suivant le critère d'une P-value inférieure à 0,1.

11. Analyse des flux métaboliques

Dans la présente étude, l'analyse des flux métaboliques des différentes souches est basée sur une stratégie de marquage de la source carbonée au ^{13}C qui est explicitée ci-dessous.

11.1. Principe

Les analyses de flux métaboliques réalisées ont été effectuées à partir d'expériences de marquage isotopique (^{13}C). Dans cette approche, les flux métaboliques sont calculés à partir de l'analyse de la distribution isotopique dans les métabolites intracellulaires. Pour cela, les cellules sont placées en présence de sources de carbone enrichies en ^{13}C , et à l'issue de la période de marquage le contenu isotopique des métabolites est analysé par RMN. Les données de marquage ainsi obtenues sont insérées dans un modèle mathématique du métabolisme d'*Escherichia coli*. Ce modèle contient différentes équations permettant de relier les flux métaboliques aux distributions isotopiques. Le calcul des flux se fait par simulation des données de marquage grâce à des algorithmes permettant de minimiser l'écart entre les données calculées par le modèle et les données expérimentales.

En pratique, les expériences de marquage sont souvent réalisées en conditions d'état stationnaire métabolique et isotopique, conditions vérifiées lors de cultures continues stabilisées ou lors de la phase exponentielle de croissance, et conduisant à des simplifications méthodologiques et mathématiques importantes (Wiechert, 2001). Dans ces conditions particulières, le marquage de produits terminaux du métabolisme reflète directement celui des intermédiaires métaboliques à

partir desquels ils sont formés. L'approche la plus classique dans le domaine microbien est ainsi basée sur l'analyse du marquage des acides aminés contenus dans les protéines (acides aminés protéinogéniques) (Szyperski, 1995), qui reflète celui des principaux intermédiaires du métabolisme central. L'avantage est que les protéines constituent 50% de la biomasse microbienne, et l'analyse isotopique peut ainsi être effectuée avec précision sur des quantités importantes de matériel.

11.2. Expériences de marquage isotopique au ^{13}C

Les précultures et les cultures marquées en fioles sont réalisées dans les mêmes conditions que celles présentées dans le paragraphe 5.2, avec un volume de culture de 100 ml au lieu de 50 ml pour doubler la quantité de biomasse finale. Le milieu MML8b a été préparé avec un mélange de glucose (5 g.l^{-1}) contenant 40 % (mol/mol) de [$1\text{-}^{13}\text{C}$] glucose, 10 % (mol/mol) de [$\text{U-}^{13}\text{C}$] glucose et 50 % (mol/mol) de glucose froid. L'ensemencement est effectué à partir de la préculture et après lavage de l'inoculum avec du milieu MML8b sans glucose, afin d'obtenir une $\text{DO}_{600\text{nm}}$ initiale inférieure ou égale à 0,1. Cette précaution est essentielle afin de limiter à 5 % au maximum la quantité de biomasse non marquée présente au départ. La croissance est suivie jusqu'à $\text{DO}_{600\text{nm}} \approx 2$. Les prélèvements destinés à l'analyse isotopique sont tous réalisés à cette valeur de DO.

11.3. Analyses isotopiques par RMN

La RMN a été utilisée pour mesurer soit des enrichissements spécifiques, soit des isotopomères de position. Les analyses ont été effectuées sur des hydrolysats de biomasse préparés comme décrit ci-dessous. Toutes les analyses RMN ont été effectuées à 300 K ($\approx 27 \text{ }^\circ\text{C}$) sur un spectromètre Bruker Avance opérant à 500 MHz (fréquence de résonance du ^1H), avec une fréquence de résonance du ^{13}C de 125 MHz.

11.3.1. Définitions

L'enrichissement spécifique correspond au pourcentage de ^{13}C incorporé dans une position carbonée particulière d'une molécule. Dans la mesure où les isotopes du carbone autres que le ^{12}C et le ^{13}C sont négligeables, on peut assimiler l'enrichissement spécifique (E.S.) du C1 d'une molécule au rapport :

$$\text{E.S. C1} = 100 \times \frac{^{13}\text{C1}}{(^{12}\text{C1} + ^{13}\text{C1})}$$

La valeur de la somme ($^{12}\text{C1} + ^{13}\text{C1}$) est égale à la quantité de la molécule. A l'abondance naturelle, l'E.S. d'un carbone donné vaut 1,1 %.

Le terme isotopomère vient de la contraction de l'expression 'isomère isotopique'. Dans le domaine de l'analyse des flux par marquage ^{13}C , ce terme désigne toutes les variantes d'une même molécule ne différant que par le contenu en ^{13}C (isotopomères du ^{13}C). Comme chaque position carbonée peut recevoir soit un ^{12}C soit un ^{13}C , une molécule à n carbones aura 2^n isotopomères. Il faut distinguer les isotopomères de position, pour lesquels la position des atomes de ^{13}C incorporés

peut être précisée (étudiés par RMN), des isotopomères de masse, qui se différencient en fonction du nombre d'atomes ^{13}C incorporés (non étudiés ici).

11.3.2. Préparation des échantillons

La préparation des échantillons pour les analyses isotopiques par RMN a été adaptée de la publication de Petersen *et al.* (2000).

Un volume d'échantillon correspondant à 120 mg de cellules est prélevé et centrifugé (7000 g pendant 10 min à 4 °C). Le culot est lavé deux fois, volume à volume, avec du milieu MML8b sans glucose, incubé 15 h à -80 °C puis est lyophilisé (0,06 mbar, à -50 °C).

Les cellules lyophilisées sont hydrolysées dans 10 ml d'HCl 6 N à 107 °C pendant 24 heures. Les hydrolysats sont ensuite refroidis à température ambiante puis sont filtrés à 0,45 μm puis 0,22 μm sur des membranes en PVDF (Ministart, Sartorius). L'acide est éliminé par évaporation sous flux d'azote à 90 °C jusqu'à obtenir un volume résiduel de 200 μl . Le résidu est repris dans 1 ml de D_2O 99,9 %, et le mélange est à nouveau évaporé sous flux d'azote à 90 °C jusqu'à obtenir un volume résiduel de 200 μl qui est par la suite lyophilisé. Le lyophilisat est repris dans 1 ml d'une solution contenant 90 % (v/v) de D_2O 99,97 %, 10 % (v/v) de CD_3OD 99,8 %, 2 mM de sodium trimethylsilylpropionate-2,2,3,3-d4, et 0,5 mM d'EDTA. Le mélange final est à nouveau filtré sur membrane PVDF à 0,22 μm et est utilisé pour les analyses RMN.

11.3.3. Analyse des isotopomères de position par 2D-HSQC

Les différentes séquences RMN exploitables pour l'analyse des isotopomères ont été discutées en détail par Szyperski (1998). La séquence la plus exploitée est la séquence 2D [^1H , ^{13}C] « Heteronuclear Single Quantum Correlation » (2D-HSQC) qui présente deux avantages principaux pour l'analyse d'échantillons complexes tels que des hydrolysats de biomasse:

- les résonances sont réparties sur deux dimensions, ce qui permet d'analyser les signaux d'intérêt à partir de mélanges complexes sans avoir à séparer les molécules.
- le proton est le noyau utilisé pour l'excitation et la détection, ce qui se traduit par un gain important de sensibilité. En effet, dans une expérience RMN le rapport signal/bruit (S/N) dépend, entre autres, des rapports gyromagnétiques du noyau excité (γ_{exc}) et du noyau observé (γ_{obs}) : $S / N = f(\gamma_{\text{exc}} \gamma_{\text{obs}}^{3/2})$. Le proton ayant un rapport gyromagnétique 4 fois plus élevé que celui du ^{13}C , une observation ^1H sera plus sensible qu'une observation ^{13}C . Dans la séquence HSQC ce gain est de 23 par rapport à une analyse 1D ^{13}C .

11.3.4. Détermination des enrichissements spécifiques

L'enrichissement spécifique (E.S.) correspond au pourcentage de ^{13}C sur une position carbonée, soit :

$$E.S. = \frac{^{13}\text{C}}{(^{12}\text{C} + ^{13}\text{C})}$$

La détermination des enrichissements spécifiques est basée sur l'analyse des taches de corrélation ^1H - ^1H et l'observation des figures de couplage hétéronucléaire ^1H - ^{13}C . Un pseudospectre 1D est obtenu par sommation des lignes d'une tache de corrélation. La proportion de l'aire des satellites d'une tache de corrélation ^1H - ^1H , par rapport à la somme des aires des satellites et du

signal central, représente l'enrichissement spécifique ^{13}C de l'atome de carbone auquel est lié le proton observé.

11.4. Calcul des flux métaboliques

Le calcul des flux est réalisé à l'aide du logiciel ^{13}C -Flux développé par W. Wiechert (Wiechert *et al.*, 2001a et 2001b). Le principe de ce calcul est basé sur la simulation des données de marquage à partir d'équations décrivant le réseau métabolique considéré (Figure 29). Le réseau est décrit par deux types d'équations : des équations stœchiométriques décrivant l'ensemble des réactions du réseau et des équations isotopiques décrivant les transitions carbonées entre substrats et produits pour chaque réaction. Les données isotopiques sont simulées à partir d'un premier jeu de flux satisfaisant les équations stœchiométriques, puis l'écart, ou résidu, entre données simulées et données expérimentales est minimisé en suivant le calcul des moindres carrés. Le jeu de flux retenu est celui conduisant au résidu le plus faible, c'est-à-dire, à la meilleure simulation des données isotopiques.

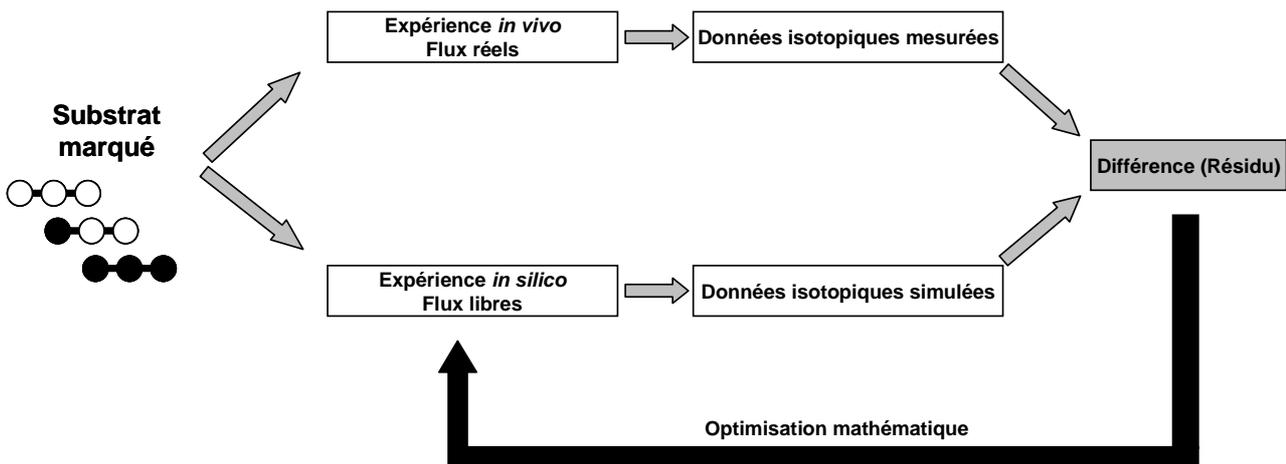


Figure 29 : Schéma de principe de calcul des flux (D'après Cécile Nicolas, 2007)

Chapitre III

Evolution *in vivo* de la souche NA 23 MG1655 Δpgi $\Delta udhA$ Δedd Δqor

La première étape de l'étude de l'évolution *in vivo* de souches possédant un rapport NADPH/NADP⁺ déséquilibré en faveur du NADPH a été la construction de souches d'*E. coli* MG1655 dont le métabolisme a été rationnellement modifié. Les modifications génétiques des souches d'*E. coli* ont été réalisées par la délétion des gènes cibles suivant la technique de biologie moléculaire mise au point par Datsenko et Wanner (2000) reposant sur le principe de remplacement d'un gène par une cassette de résistance à un antibiotique par recombinaison site homologue.

Une fois la « souche accumulatrice de NADPH » construite, cette dernière a subi une évolution *in vivo* forcée en laboratoire. La bactérie a ainsi été soumise à des repiquages successifs en culture discontinue sur milieu minimum synthétique (MML8b) et glucose de façon à prolonger la phase exponentielle de croissance sur l'ensemble des cultures successives. Comme le phénomène d'évolution observé a été très rapide, l'évolution forcée par culture discontinue a été préférée à une évolution forcée par culture continue car elle a permis la prise d'échantillon des populations correspondant à un état d'évolution identifié par chaque culture de repiquage. De plus, ces échantillons ont pu être conservés pour des analyses génotypiques ultérieures, comme cela a été utilisé dans les travaux conséquents de RE Lenski sur l'évolution d'*E. coli*.

1. Construction de la souche NADPH NA 23 par approche rationnelle d'ingénierie métabolique

1.1. Stratégie d'ingénierie métabolique pour déséquilibrer le rapport NADPH/NADP⁺ en faveur du NADPH

La connaissance du métabolisme d'*E. coli* a permis d'établir une stratégie d'ingénierie métabolique basée sur une approche rationnelle pour accumuler du NADPH dans la cellule sans qu'il ne puisse être réoxydé. L'augmentation de la disponibilité du NADPH intracellulaire a été réalisée par une augmentation du flux de carbone dans la voie des pentoses phosphates et par l'inactivation des voies régulatrices de réoxydation du NADPH.

1.1.1. Augmentation du flux de carbone dans la voie des pentoses phosphates

L'augmentation du flux de carbone entrant dans la voie des pentoses phosphates a été réalisée par la délétion des gènes *pgi* et *edd*. La délétion de ces gènes a pour conséquence d'inactiver les activités phosphoglucoisomérase et 6-phosphogluconate déshydratase chez *E. coli* bloquant respectivement les voies de la glycolyse (ou voie d'Embden-Meyerhof-Parnas) et d'Entner-Doudoroff. Le glucose entrant dans la cellule est ainsi phosphorylé par le transporteur PTS en glucose-6-phosphate qui ne pourra être assimilé que par la voie des pentoses phosphates. Le glucose sera ainsi dégradé en 6-P-gluconate par la G6PDH, qui à son tour sera transformé en pentose-5-phosphate, produisant ainsi deux moles de NADPH par mole de glucose consommée (Figure 30).

1.1.2. Suppression des voies de réoxydation du NADPH

Le métabolisme d'*E. coli* est connu pour pouvoir réguler ces pools de cofacteurs NAD(H) et NADP(H) par le biais des transhydrogénases. L'inactivation de la voie de la glycolyse et de la voie d'Entner-Doudoroff va conduire à une production accrue de NADPH, dépassant ainsi les besoins biosynthétiques pour l'anabolisme. Pour éviter la régulation du pool de NADP(H), les capacités de réoxydation du NADPH et d'interconversion du NADPH en NADH doivent être réduites, et c'est pourquoi la quinone oxydoréductase, codée par *qor*, et la transhydrogénase soluble, codée par *udhA*, ont été inactivées (Figure 30).

La souche finale produisant du NADPH sans pouvoir le réoxyder est ainsi appelée la souche NA 23 et son génotype est MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$. Cette souche peut théoriquement produire, pour un rendement molaire maximum, deux moles de NADH et deux moles de NADPH pour l'oxydation complète d'une mole de glucose en acétyl-CoA, contre quatre moles de NADH pour la souche sauvage MG1655, ces deux moles de NADPH ne pouvant être réoxydées par les voies régulatrices connues.



Figure 30 : Réseau métabolique modifié de la souche NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$. Les croix rouges indiquent les délétions de gènes avec les réactions enzymatiques inactivées correspondantes en pointillées.

1.2. Construction de la souche NADPH par délétion de 4 gènes

La souche surproductrice de NADPH a ainsi été construite par délétions des gènes *pgi*, *udhA*, *qor* et *edd*. Les délétions successives de ces 4 gènes ont été pratiquées dans cet ordre, classées par ordre décroissant d'impact négatif sur le métabolisme, i.e. en fonction du taux de croissance des mutants de délétions uniques calculé dans la littérature. En effet, le mutant MG1655 Δpgi a un taux de croissance très affecté de $0,18 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$, contrairement aux autres mutants MG1655 $\Delta udhA$ et MG1655 Δedd ayant un taux de croissance respectif de $0,67 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$ et de $0,67 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$ identique à celui de la souche sauvage (Sauer *et al.*, 2004). La délétion du gène *qor* n'entraîne pas de diminution significative du taux de croissance par rapport à une souche sauvage (résultats non publiés, Soucaille *et al.*, Genencor).

L'obtention de la souche NA 23 a nécessité la construction de 5 souches intermédiaires, toutes issues de la souche MG1655. Les étapes d'inactivation des gènes chromosomiques et d'excision des cassettes de résistance aux antibiotiques se sont succédé pour construire la souche finale NA 23 MG1655 $\Delta pgi::FRT \Delta udhA::FRT \Delta qor::FRT \Delta edd::FRT$ (Figure 31).

Les techniques de délétion de gène par transformation d'ADN linéaire sont réalisées à l'aide du système RED de recombinaisons du phage λ porté par le plasmide pkD46 et par la technique d'excision des cassettes de résistance aux antibiotiques encadrées par les sites FRT à l'aide de la FLP recombinaison de *S. cerevisiae* portée par le plasmide pCP20 (cf. Chapitre II – Matériel & Méthodes).

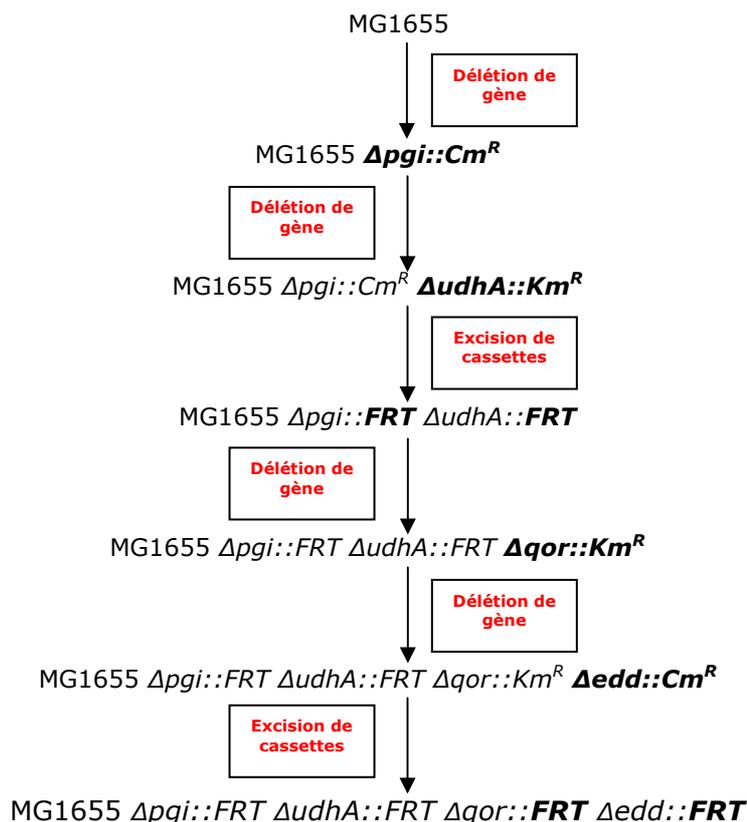


Figure 31 : Filiation de la souche NA 23 MG1655 $\Delta pgi::FRT \Delta udhA::FRT \Delta qor::FRT \Delta edd::FRT$ avec les différentes étapes de construction de biologie moléculaire à partir de la souche MG1655.

FRT (Flp recognition target) symbolise les cicatrices laissées sur l'ADN génomique suite à l'excision des cassettes de résistance.

1.3. Vérification du mutant

1.3.1. PCR

Les différentes transformations effectuées ont donné lieu à l'obtention de clones capables de se développer sur un milieu sélectif contenant de la kanamycine et/ou du chloramphénicol suite au remplacement du gène cible par une cassette de résistance à un de ces deux antibiotiques. Les clones sélectionnés ont été vérifiés sur la base de l'analyse de la taille des fragments PCR correspondant à la région de délétion (c.f. Chapitre II – Matériel & Méthodes). Les clones, dont les cassettes de résistance aux antibiotiques ont été excisées, ont été sélectionnés sur la base de leur sensibilité aux antibiotiques kanamycine et/ou chloramphénicol et sur la base de l'analyse de la taille des fragments PCR correspondant à la région de délétion (c.f. Chapitre II – Matériel & Méthodes). L'amplification des régions de délétion a été effectuée chez la souche transformante et chez la souche de référence MG1655 comme témoin négatif.

Enfin, les fragments PCR des régions génomiques modifiées obtenus à partir des transformants sont purifiés et séquencés. Ce séquençage permet de s'assurer de la conformité des séquences nucléotidiques aux proximités des zones de recombinaison homologue et des zones d'excision des cassettes de résistance aux antibiotiques.

1.3.2. Dosages des activités enzymatiques Pgi et UdhA

Afin de s'assurer de la délétion des gènes *pgi* et *udhA*, les niveaux d'activités enzymatiques *in vitro* Pgi et UdhA ont été mesurés chez la souche NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ et comparés à ceux de la souche MG1655.

L'activité spécifique phosphoglucoisomérase de la souche sauvage est de $750 \pm 10 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}_{\text{protéines}}$. Cette valeur est du même ordre de grandeur que celle trouvée dans la littérature pour des conditions de culture similaires (culture batch sur milieu minimum et glucose) : 500 à 700 $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}_{\text{protéines}}$ pour la souche *E. coli* K12 (Al Zaid Siddiquee *et al.*, 2004).

La souche NA 23 présente une activité résiduelle phosphoglucoisomérase de $6,8 \pm 6 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}_{\text{protéines}}$, ce qui confirme l'efficacité de la délétion du gène *pgi* et l'absence de toute autre enzyme capable de catalyser la même réaction.

L'activité transhydrogénase cyclique de la souche sauvage est de $98,5 \pm 4,2 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}_{\text{protéines}}$, alors que cette activité est seulement de $6,2 \pm 0,2 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}_{\text{protéines}}$ chez la souche NA 23. L'activité PntAB étant supposée négligeable dans un background génétique surproducteur de NADPH (Sauer *et al.*, 2004), cette activité est du même ordre de grandeur que l'activité résiduelle transhydrogénase cyclique dans un double mutant MG1655 $\Delta udhA \Delta pntAB$ qui est de $2,8 \pm 0,2 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}_{\text{protéines}}$ (Fuhrer & Sauer, 2009), validant ainsi l'inactivation de la transhydrogénase soluble chez la souche NA 23.

2. Evolution de la souche NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ par repiquages successifs

2.1. Caractérisation phénotypique des souches NA 23 et MG1655

Une fois la souche NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ construite et validée, sa viabilité a été vérifiée sur milieu minimum synthétique avec $5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ de glucose en culture batch aérobie. La souche de référence MG1655 a été cultivée dans les mêmes conditions de croissance pour évaluer l'impact des quatre délétions dans le génotype sauvage.

Six paramètres physiologiques de croissance en phase exponentielle ont été retenus pour la caractérisation physiologique des souches NA 23 et MG1655 :

- le taux de croissance (μ)
- le rendement biomasse-glucose ($Y_{X/S}$)
- la vitesse spécifique de consommation du glucose (q_S)
- la vitesse spécifique de production d'acétate (v_A)
- le rapport NADPH/NADP⁺
- le rapport NADH/NAD⁺

Les 6 paramètres respectifs de la souche NA 23 et de la souche MG1655 sont comparés dans le Tableau 27.

Tableau 27 : Paramètres de croissance aérobie sur glucose des souches NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd$ et MG1655 durant la phase exponentielle de croissance.

Les écarts-types ont été calculés sur au moins trois cultures indépendantes.

Souche	Taux de croissance	Rendement biomasse	Vitesse spécifique de consommation du glucose	Vitesse spécifique de production d'acétate	rapport NADPH/NADP ⁺	rapport NADH/NAD ⁺
	μ h ⁻¹	$Y_{x/s}$ g.g ⁻¹	q_s mmol.g ⁻¹ .h ⁻¹	v_A mmol.g ⁻¹ .h ⁻¹		
NA 23	0,04 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,9 ± 0,1	0,0 ± 0,0	2,05 ± 0,13	0,11 ± 0,01
MG1655	0,60 ± 0,03	0,34 ± 0,01	10,4 ± 0,7	2,6 ± 0,3	1,05 ± 0,08	0,31 ± 0,04

La croissance de la souche NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ est très affectée comparativement à celle de la souche MG1655 sur milieu minimum et glucose (aussi constaté qualitativement sur milieu riche). La comparaison des paramètres physiologiques de croissance des deux souches révèle un taux de croissance et une vitesse spécifique de consommation du glucose sévèrement réduits chez la souche NA 23. De plus, aucune production d'acétate n'est détectée, probablement due à une vitesse de croissance trop faible pour produire un trop-plein (overflow) de carbone au niveau du cycle de Krebs. Bien qu'il n'y ait pas de fuite de glucose vers l'acétate, le rendement biomasse-glucose n'en demeure pas moins inférieur à celui de la souche MG1655, indice supplémentaire de la forte inhibition métabolique de la souche NA 23.

En ce qui concerne les pools de cofacteurs NAD(H) et NADP(H), le rapport NADH/NAD⁺ de la souche NA 23 est significativement diminué, contrairement au rapport NADPH/NADP⁺ qui lui est fortement augmenté. La forte disponibilité du NADPH chez la souche NA 23, relativement à la souche sauvage MG1655, valide la stratégie rationnelle d'ingénierie métabolique visant à accumuler le NADPH dans la cellule.

Les valeurs pour les rapports NADPH/NADP⁺ et NADH/NAD⁺ calculées pour la souche sauvage sont équivalents à ceux trouvés dans la littérature (Fuhrer & Sauer, 2009), validant ainsi la méthode analytique par dosage enzymatique cyclique (cf. Chapitre II – Matériel & Méthodes).

Pour évaluer les capacités d'*E. coli* à surmonter la contrainte d'accumulation du NADPH, ayant pour conséquence une forte inhibition généralisée du métabolisme central, la souche NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ a été cultivée par repiquages successifs dans du milieu frais de telle sorte à prolonger la phase exponentielle de croissance. Les repiquages ont été réalisés avant que la croissance bactérienne n'entre en phase stationnaire de croissance, c'est-à-dire avant épuisement de la source carbonée.

2.2. Cultures d'évolution sur 20 générations

2.2.1. Evolution du taux de croissance

Pour étudier la reproductibilité de l'évolution *in vivo* de la souche NA 23, deux séries de cultures d'évolution ont été menées en parallèle (A et B). Le suivi des deux populations, issues des deux séries d'évolution, a permis d'établir le taux de croissance de chaque culture successive, établissant ainsi une évolution du taux de croissance au cours du temps.

Les deux évolutions ont été propagées indépendamment sur 5 cultures successives, soit approximativement 20 générations. Une convergence phénotypique en fin d'évolution a été observée avec un taux de croissance des populations évoluées autour de $0,22 \text{ h}^{-1}$, soit une augmentation du taux de croissance d'environ un facteur 6 par rapport à la souche non évoluée (Figure 32).

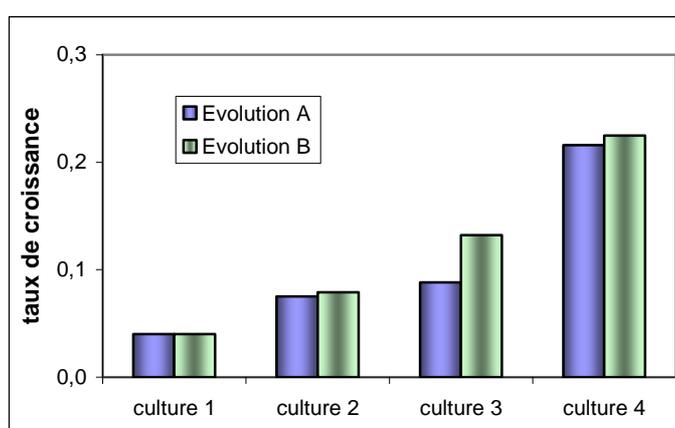


Figure 32 : Evolution du taux de croissance et de la fitness des deux populations NA 23 au cours des cultures de repiquages d'évolution *in vivo*.

L'échelle de temps commence au temps $t = 140$ heures, ce qui correspond à la durée de la première culture de caractérisation de la souche NA 23.

Le suivi des taux de croissance des deux populations évoluées permet d'affirmer que le phénomène d'évolution de la souche NA 23 observé *in vivo* est phénotypiquement reproductible sur les 4 cultures de repiquages. En effet, les écarts de taux de croissance pour chaque culture parallèle et indépendante sont très faibles.

2.2.2. Caractérisation phénotypique de 10 clones purs évolués sur 20 générations

La compréhension du phénomène d'évolution adaptative par l'étude de ses bases génétiques et moléculaires n'est possible que par l'étude de clones génétiquement purs, isolés des populations d'évolution. Ainsi, la caractérisation de l'état de l'évolution sur 20 générations de la souche NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ a nécessité d'isoler et de purifier des clones purs évolués issus des populations évoluées A et B

Dix clones purs, cinq de chaque population ont ainsi été obtenus d'un double isolement sur milieu solide, s'assurant ainsi de la pureté génétique de chaque lignée bactérienne évoluée. Les dix clones MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$, évolués après 20 générations, sont désignés sous les

références NA 23E04 à NA 32E04, et leurs paramètres physiologiques de croissance aérobie sur milieu minimum synthétique et glucose sont présentés dans le Tableau 28.

Tableau 28 : Paramètres de croissance aérobie sur glucose des souches évoluées après 20 générations NA 23E04 à NA 32E04 durant la phase exponentielle de croissance.

Les écarts-types ont été calculés sur deux cultures indépendantes.

Souche	Population	Taux de croissance h ⁻¹	Rendement biomasse g.g ⁻¹	Vitesse spécifique de consommation du glucose mmol.g ⁻¹ .h ⁻¹
NA 23E04	A	0,24 ± 0,02	0,27 ± 0,02	3,1 ± 0,2
NA 24E04	A	0,25 ± 0,03	0,28 ± 0,03	2,8 ± 0,4
NA 25E04	A	0,26 ± 0,05	0,25 ± 0,03	2,7 ± 0,1
NA 26E04	A	0,21 ± 0,01	0,26 ± 0,01	3,0 ± 0,3
NA 27E04	A	0,23 ± 0,04	0,27 ± 0,01	3,0 ± 0,3
NA 28E04	B	0,24 ± 0,03	0,26 ± 0,02	2,9 ± 0,1
NA 29E04	B	0,25 ± 0,04	0,25 ± 0,02	3,2 ± 0,4
NA 30E04	B	0,23 ± 0,02	0,28 ± 0,04	3,3 ± 0,3
NA 31E04	B	0,22 ± 0,03	0,27 ± 0,01	2,9 ± 0,3
NA 32E04	B	0,23 ± 0,02	0,26 ± 0,03	3,1 ± 0,1
Moyenne		0,24 ± 0,02	0,27 ± 0,02	3,0 ± 0,3

Les dix clones évolués présentent des caractéristiques de croissance proches, avec toutefois quelques écarts significatifs entre les taux de croissance mesurés.

2.3. Cultures d'évolution sur 60 générations

2.3.1. Evolution du taux de croissance et de la fitness

L'évolution des populations A et B de la souche NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ a été poursuivie sur sept repiquages supplémentaires, soit une évolution finale sur environ 65 générations. Une convergence phénotypique en fin d'évolution a été observée avec un taux de croissance des populations finales évoluées autour de 0,4 h⁻¹. Le phénomène d'adaptation observé chez la souche NA 23 se traduit par une augmentation du taux de croissance. La fitness d'un organisme permet de quantifier de manière absolue, l'adaptation de ce dernier par rapport à un environnement défini. Ainsi, le suivi de la fitness au cours de l'évolution permettrait d'évaluer l'adaptation de la souche NA 23 au cours des 11 cultures successives. La fitness étant difficilement accessible, car régie par de nombreux paramètres physiologiques, le phénomène d'adaptation survenu lors de l'évolution *in vivo* est mesuré par la fitness relative, qui correspond au rapport du taux de croissance évolué sur celui non évolué. Le suivi de l'augmentation du taux de croissance et de la fitness relative au cours de l'évolution des deux populations est présenté dans la Figure 33.

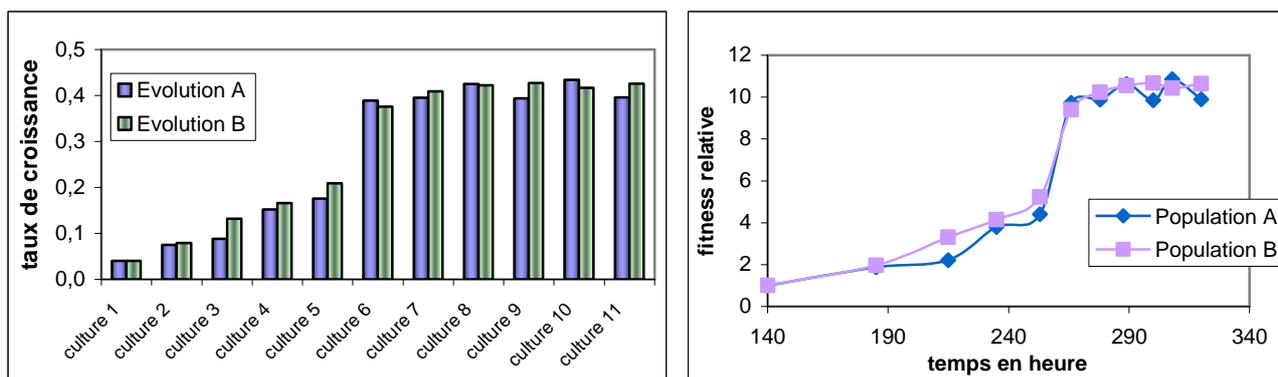


Figure 33 : Evolution au cours du temps du taux de croissance et de la fitness relative des deux populations évoluées NA 23.

L'échelle de temps commence au temps t = 140 heures, ce qui correspond à la durée de la première culture de caractérisation de la souche NA 23.

Le phénomène d'adaptation a suivi une augmentation quasi constante sur les 250 premières heures de culture, puis a eu une évolution exponentielle entre 250 et 265 heures de culture, pour enfin se stabiliser autour d'une fitness relative de 10 jusqu'à la fin de l'évolution après 320 heures de culture.

L'évolution *in vivo* de la souche NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ a conduit à une adaptation significative de cette dernière par rapport à son environnement, ici un milieu minimum synthétique et glucose. Le phénomène d'évolution observé peut donc être qualifié d'évolution adaptative.

2.3.2. Caractérisation phénotypique de 10 clones purs évolués sur 65 générations

Comme précédemment, cinq clones ont été isolés et purifiés à partir des populations A et B, soit dix clones purs évolués au total. Cet isolement a été effectué sur milieu minimum solide supplémenté avec du glucose comme décrit dans le Chapitre II – Matériel & Méthodes. Les dix clones évolués MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ sont désignés sous les références NA 124E à NA 133E, et leurs paramètres physiologiques de croissance aérobie sur milieu minimum synthétique et glucose sont présentés dans le Tableau 29.

Tableau 29 : Paramètres de croissance aérobie sur glucose des souches évoluées après 65 générations NA 124E à NA 133E durant la phase exponentielle de croissance.Les écarts-types ont été calculés sur deux cultures indépendantes.

Souche	Population	Taux de croissance	Rendement biomasse	Vitesse spécifique de consommation du glucose
		h^{-1}	$g.g^{-1}$	$mmol.g^{-1}.h^{-1}$
NA 124E	A	$0,43 \pm 0,01$	$0,4 \pm 0,03$	$5,4 \pm 0,2$
NA 125E	A	$0,36 \pm 0,01$	$0,42 \pm 0,03$	$5,4 \pm 0,1$
NA 126E	A	$0,42 \pm 0,04$	$0,4 \pm 0,01$	$6,3 \pm 0,1$
NA 127E	A	$0,37 \pm 0,01$	$0,42 \pm 0,03$	$5,7 \pm 0,1$
NA 128E	A	$0,4 \pm 0,02$	$0,43 \pm 0,02$	$5,8 \pm 0,1$
NA 129E	B	$0,37 \pm 0,01$	$0,43 \pm 0,04$	$5,2 \pm 0,2$
NA 130E	B	$0,34 \pm 0,01$	$0,41 \pm 0,02$	$4,7 \pm 0,1$
NA 131E	B	$0,39 \pm 0,04$	$0,41 \pm 0,03$	$5,1 \pm 0,1$
NA 132E	B	$0,34 \pm 0,02$	$0,41 \pm 0,02$	$4,6 \pm 0,1$
NA 133E	B	$0,36 \pm 0,01$	$0,4 \pm 0,01$	$5,1 \pm 0,1$
Moyenne		$0,38 \pm 0,02$	$0,41 \pm 0,02$	$5,3 \pm 0,1$

Les dix clones évolués présentent des caractéristiques de croissance proches, avec toutefois quelques écarts significatifs entre les taux de croissance mesurés. Les moyennes du taux de croissance et de la vitesse spécifique de consommation du glucose en fonction de la population d'origine (Tableau 29), indiquent une légère supériorité adaptative pour la population A.

En effet, les moyennes du taux de croissance et des vitesses spécifiques de consommation du glucose sont significativement plus importantes pour la population A ($\mu = 0,4 \pm 0,02 h^{-1}$ et $q_s = 5,7 \pm 0,01 mmol.g^{-1}.h^{-1}$) que pour la population B ($\mu = 0,36 \pm 0,02 h^{-1}$ et $q_s = 4,9 \pm 0,01 mmol.g^{-1}.h^{-1}$). Notamment, les deux clones NA 124E et NA 126E présentent des caractéristiques physiologiques, taux de croissance et vitesse spécifique de consommation du glucose, légèrement supérieurs aux autres clones de la population A.

2.4. Comparaison de la souche non évoluée NA 23, intermédiaire NA 23E04 et évoluée NA 124E

Les clones NA 23E04 et NA 124E ont été choisis pour approfondir les mécanismes responsables de l'évolution adaptative de la souche NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$. Ces souches ont été sélectionnées car elles semblent plus compétitives, et donc mieux adaptées aux conditions d'évolution et de sélection que les autres clones intermédiaires ou évolués.

La caractérisation phénotypique et métabolique des souches NA 23E04 et NA 124E a été approfondie par la détermination de la vitesse de production d'acétate, et par le calcul des ratios intracellulaires de $NAD(P)H/NAD(P)^+$. Les paramètres physiologiques et métaboliques de croissance aérobie sur glucose de la souche non évoluée NA 23, de la souche intermédiaire évoluée NA 23E04, de la souche évoluée NA 124E et de la souche sauvage MG1655 sont comparés dans le Tableau 30.

Tableau 30 : Paramètres de croissance aérobie sur glucose des souches NA 23, NA 124E et MG1655 durant la phase exponentielle de croissance.

Les écarts-types ont été calculés sur au moins trois cultures indépendantes.

Souche	Taux de croissance	Rendement biomasse	Vitesse spécifique de consommation du glucose	Vitesse spécifique de production d'acétate	rapport NADPH/NADP ⁺	rapport NADH/NAD ⁺
	μ h ⁻¹	$Y_{X/S}$ g.g ⁻¹	q_s mmol.g ⁻¹ .h ⁻¹	v_A mmol.g ⁻¹ .h ⁻¹		
NA 23	0,04 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,9 ± 0,1	0,02 ± 0,01	2,05 ± 0,13	0,11 ± 0,01
NA 23E04	0,24 ± 0,02	0,27 ± 0,02	3,1 ± 0,2	0,01 ± 0,01	1,85 ± 0,02	0,14 ± 0,01
NA 124E	0,43 ± 0,03	0,40 ± 0,03	5,2 ± 0,3	0,25 ± 0,06	1,43 ± 0,05	0,81 ± 0,06
MG1655	0,60 ± 0,03	0,34 ± 0,01	10,4 ± 0,7	2,6 ± 0,3	1,05 ± 0,08	0,31 ± 0,04

Chez la souche intermédiaire évoluée NA 23E04, l'évolution adaptative a eu un impact positif sur le taux de croissance μ et la vitesse spécifique de consommation du glucose q_s , avec des augmentations respectives par rapport à la souche non évoluée d'environ un facteur 5 et 3. Le rapport NADPH/NADP⁺ est diminué de 11% par rapport à la souche non évoluée.

Le fort impact positif du phénomène d'évolution est quantifiable sur tous les paramètres physiologiques de la souche évoluée NA 124E, avec des augmentations respectives du taux de croissance μ , rendement biomasse-glucose $Y_{X/S}$, vitesse spécifique de consommation de glucose q_s , et rapport NADH/NAD⁺, d'environ un facteur 11, 2, 6 et 7, respectivement. Le rapport NADPH/NADP⁺ est diminué de 30% par rapport à la souche non évoluée.

Les paramètres physiologiques ont été significativement modifiés au cours de l'évolution adaptative de la souche NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ tendant à se rapprocher de ceux de la souche de référence MG1655, notamment pour le taux de croissance. La faible production d'acétate chez la souche NA 124E, par rapport à la souche MG1655, indique probablement un état métabolique de trop-plein au niveau du cycle de Krebs.

3. Discussion

L'évolution adaptative de la souche NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ a conduit à une forte amélioration de sa croissance, sur un intervalle de temps très court corespondant à 65 générations. La forte pression de sélection pesant sur la souche NA 23, liée à la forte inhibition de son métabolisme par l'inactivation d'enzymes du métabolisme central et par le blocage des voies de réoxydation du NADPH, est sûrement le facteur essentiel permettant de sélectionner si rapidement un clone évolué tel que la souche NA 124E. La souche évoluée intermédiaire NA 23E04, apparue après environ 20 générations, possède aussi un métabolisme moins inhibé que la souche non évoluée NA 23. L'étude approfondie et comparée des deux clones NA 23E04 et NA 124E devrait permettre de mieux comprendre les bases dynamiques du phénomène d'évolution observé.

Pour mieux comprendre la dynamique du phénomène d'évolution adaptative, les causes de l'inhibition métabolique supposées, à l'origine des fortes pressions de sélection, doivent être connues. Même si aucune preuve expérimentale directe n'a été avancée pour expliquer l'inhibition métabolique de la souche NA 23, quelques éléments permettent de proposer quelques hypothèses.

Il a déjà été montré que la perturbation des flux glycolytiques par inactivation d'enzymes de la glycolyse, plus particulièrement l'inactivation de la phosphoglucoisomérase et de la phosphofructokinase, provoque l'accumulation de sucres phosphatés, tels que le glucose-6-P et le fructose-6-P. Cette accumulation engendre une forte inhibition du système PTS d'import du glucose par dégradation accélérée des ARNm *ptsG* (Kimata *et al.*, 2001 ; Morita *et al.*, 2003). Cette inhibition a pour but de limiter l'entrée du glucose et donc l'accumulation de ces sucres, car ces derniers sont connus pour endommager l'ADN, causant ainsi une sévère augmentation de la fréquence des mutations (Lee & Cerami, 1987). La dégradation des ARNm est réalisée par l'ARNase E, dont le mécanisme encore mal connu de régulation et de recrutement pourrait être réalisé par le facteur Hfq (Schumacher *et al.*, 2002).

Le métabolisme de la souche NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ pourrait être fortement affecté par une inhibition du PTS à cause de la délétion du gène *pgi*. La forte limitation de la vitesse initiale de dégradation du glucose diminuerait significativement tous les flux cataboliques, expliquant en partie, le très faible taux de croissance observé.

La régulation de la production des cofacteurs NADPH et NADH est une fonction centrale de la bactérie car elle permet d'équilibrer les besoins anaboliques et cataboliques. La perturbation de cet équilibre par augmentation de la production de NADPH inhibe la croissance bactérienne, notamment car celle-ci a des capacités de réoxydation du NADPH limitées (Canonaco *et al.*, 2001). Dans ces conditions, le génotype $\Delta pgi \Delta udhA$ peut être très handicapant pour le métabolisme bactérien car aucune régulation du pool de NADPH ne pourra avoir lieu par la voie de réoxydation de la transhydrogénase soluble UdhA. Ce génotype est d'ailleurs létal pour *E. coli* MG1655 sur milieu minimum M9 contenant 5 g/l de glucose (Sauer *et al.*, 2004). Le fort rapport NADPH/NADP⁺ de la souche NA 23 comparé à ceux des souches NA 124E et MG1655, semble confirmer cette hypothèse. Enfin, l'inactivation d'UdhA, en plus d'affecter la régulation du pool de NADPH, pourrait aussi avoir un impact négatif sur la régulation du pool de NADH et sur le métabolisme bactérien. Le faible rapport NADH/NAD⁺ de la souche NA 23 comparé à ceux des souches NA 124E et MG1655, semble aussi étayer cette hypothèse.

La souche NA 124E présente des caractéristiques physiologiques proches de la souche sauvage MG1655, avec entre autre un taux de croissance et une vitesse spécifique de consommation du glucose représentant respectivement 72% et 50% de la valeur des paramètres physiologiques de la souche sauvage.

De précédents travaux menés par Fong *et al.* (2006) ont montré qu'une évolution de 800 générations d'un mutant MG1655 Δpgi (milieu M9 + 2 g/l de glucose) conduit à des mutants évolués présentant des taux de croissance et des vitesses spécifiques de consommation du glucose, respectivement, entre 54 - 84% et 64 - 66% de celui de la souche MG1655. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus lors de cette étude et démontrent les capacités plastiques et adaptatives du métabolisme d'*E. coli* qui lui permettent de survenir aux contraintes additionnelles introduites par les délétions supplémentaires $\Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ dans un mutant MG1655 Δpgi .

Enfin, il faut noter que même la souche évoluée NA 124E possède un rapport NADPH/NADP⁺ nettement supérieur à celui de la souche MG1655, preuve que la contrainte engendrée par les modifications génétiques est très forte chez les souches accumulant le NADPH, et qu'elle n'est pas totalement éliminée après une période d'évolution adaptative.

Chapitre IV

Identification et caractérisation des mutations génétiques responsables de l'évolution adaptative

L'évolution de la souche NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ a conduit à l'obtention et la sélection d'un clone intermédiaire évolué NA 23E04 et d'un clone évolué NA 124E, respectivement isolés à partir de la 4^{ème} population d'évolution et de la population finale évoluée. L'étude de ces clones a montré que l'évolution de la souche NA 23 est caractérisée par un phénomène d'adaptation se traduisant par une augmentation de la fitness relative d'un facteur 6 et 11 et cela en seulement 20 et 65 générations, respectivement. Une telle évolution adaptative de la souche NA 23 est le fruit de mutations bénéfiques pour la bactérie, survenues et sélectionnées lors du processus d'évolution.

L'identification et la caractérisation des mutations adaptatives chez les souches NA 23E04 NA 124E va permettre de poser les bases dynamiques, génétiques et moléculaires de l'évolution *in vivo* de la souche NA 23.

L'étude du génome de la souche NA 23E04, clone isolé dans la première partie du phénomène d'évolution, va renseigner sur l'apparition chronologique de ces mutations.

1. Identification et validation des mutations adaptatives

L'identification au niveau génomique des mutations survenues lors de l'évolution *in vivo* de la souche NA 23 nécessite l'utilisation d'un outil capable d'explorer le génome dans sa totalité, avec une très grande précision pouvant détecter une mutation ponctuelle.

L'utilisation de la technique de comparaison de génomes sur puces à ADN a été retenue pour explorer les génomes de la souche intermédiaire évoluée NA 23E04 et de la souche évoluée NA 124E. Cette technique est rapide et relativement peu onéreuse mais nécessite une validation des données voire un retraitement des résultats, afin d'éviter de sélectionner des mutations qui seraient des « faux-positifs » ou d'oublier des « faux-négatifs ».

1.1. Recherche des mutations par comparaison de génomes

1.1.1. Principes généraux

La prestation de comparaison de génomes sur puces à ADN a été fournie par la société Roche – Nimblegen (Madison, USA) selon le procédé déposé de « Comparison Genome Sequencing » (CGS) (c.f. Chapitre II – Matériel & Méthodes). Deux services sont proposés par la société : un service complet allant de la comparaison de génomes sur puces avec la validation par séquençage direct des zones susceptibles d'être modifiées ; ou un service partiel fournissant uniquement les coordonnées des régions nucléotidiques possédant les mutations éventuelles.

Le deuxième service a été choisi lors de cette étude impliquant un séquençage local de toutes les zones du génome dans lesquelles des différences de signaux d'hybridation sur puces reliées à des modifications nucléotidiques, ont été détectées entre les génomes de la souche intermédiaire NA 23E04 et de la souche évoluée NA 124E avec le génome de la souche sauvage MG1655.

Les ADN génomiques analysés sont issus des souches NA 23E04 et NA 124E pour les génomes tests et de la souche *E. coli* MG1655 pour le génome de référence. Le génome de la souche sauvage *E. coli* MG1655 est utilisé comme référence, plutôt que le génome de la souche NA 23, pour permettre la détection d'éventuelles mutations survenues lors de la manipulation et la construction des souches, et qui n'auraient aucun lien avec l'évolution adaptative de la souche NA 23.

1.1.2. Mutations identifiées

Les comparaisons des génomes des souches NA 124E et NA 23E04 avec celui de la souche MG1655 par la technologie CGS de Nimblegen – Roche a mis en évidence huit régions potentiellement mutées pour la souche NA 124E et six pour la souche NA 23E04, dont cinq correspondraient à des délétions nucléotidiques pour les deux souches. Les gènes *pgi*, *udhA*, *qor* et *edd* inactivés chez les souches NA 124E et NA 23E04 ont bien été détectés, donc au final quatre mutations ont été détectées pour la souche NA 124E contre deux pour la souche NA 23E04, dont une délétion d'environ 2,5 kb pour les deux souches (Tableau 31).

Des amorces encadrant les régions potentiellement modifiées ont été dessinées afin de vérifier par séquençage la présence ou non de mutations sur les génomes des souches NA 124E et NA 23E04. Pour chaque position, les souches NA 124E, NA 23E04, NA 23 et MG1655 sont séquencées localement pour s'assurer que la mutation est bien survenue lors de l'évolution de la souche NA 23.

La délétion, située aux positions 571.250 - 573.683 du génome d'*E. coli* K12 et qui correspond à une partie de la séquence d'un prophage lambdaïde DLP12 (Lindsey *et al.*, 1989), a aussi été détectée chez la souche NA 23, et non chez la souche MG1655. Cette délétion est donc survenue lors de la construction et la manipulation de la souche NA 23 et n'a aucune relation avec l'évolution adaptative de la souche NA 23.

Tableau 31 : Régions du génome des souches NA 23E04 et NA 124E détectées par CGS contenant potentiellement des modifications nucléotidiques par rapport au génome de la souche MG1655.

Régions du génome d' <i>E.coli</i> K12 MG1655 potentiellement mutées (bp)	Gène(s) concerné(s)	Protéine(s) associée(s)	Fonction/Rôle/Implication	Souche	
				NA 124E	NA 23E04
571.250 - 573.683	<i>ybcM</i> <i>ylcH</i> <i>ybcN</i> <i>ninE</i> <i>ybcO</i> <i>rus</i> <i>ylcG</i> <i>ybcQ</i>	inconnue inconnue inconnue protéine homologue du phage lamda inconnue « Holliday junction » résolvasse inconnue inconnue	coupure des jonctions "hollidays"	oui	oui
1.930.923 – 1.932.576	<i>edd</i>	phosphogluconate déshydratase	enzyme impliquée dans la voie ED	oui	oui
2.399.006 – 2.399.049	<i>nuoF</i>	NADH déshydrogénase I, sous-unité F	transporteur d'e ⁻ (NADH -> quinone) dans la chaîne respiratoire	oui	oui
3.438.100 – 3.438.129	<i>rpoA</i>	ARN polymérase, sous-unité alpha	transcription de l'ADN	oui	non
4.157.651 – 4.158-674	<i>udhA</i>	transhydrogénase soluble	réoxydation du NADPH	oui	oui
4.160.738 – 4.160.767	<i>trmA</i>	tRNA (uracil-5)-methyltransférase	enzyme impliquée dans la traduction	oui	non
4.231.893 – 4.233.364	<i>pgi</i>	phosphoglucoisomérase	enzyme impliquée dans la voie EMP	oui	oui
4 261.356 - 4 262.162	<i>qor</i>	Quinone oxydoréductase, NADPH dépendante	réoxydation du NADPH, protection contre l'effet cytotoxique des quinones	oui	oui

Les positions correspondant aux gènes *nuoF*, *rpoA* et *trmA* ont été séquencées sur les génomes des souches NA 124E, NA 23 et MG1665, et seuls les gènes *nuoF* et *rpoA* présentaient des mutations absentes chez la souche non évoluée et la souche de référence. Les mutations dans les gènes *nuoF* et *rpoA* sont présents chez la souche NA 124E, alors que seule la mutation dans le gène *nuoF* est présente dans la souche NA 23E04. Les deux gènes évolués dont les caractéristiques sont présentées dans le Tableau 32 seront identifiés par *nuoF** et *rpoA**.

La mutation *nuoF** est la première mutation fixée après 250 heures d'évolution, car elle est déjà présente chez la souche intermédiaire NA 23E04, soit après environ 20 générations, est la première mutation qui est apparue lors du phénomène d'évolution adaptative.

Tableau 32 : Mutations confirmées chez la souche NA 124E apparues lors du processus d'évolution adaptative

Gène	Protéine/Fonction	Mutation	Localisation de la mutation dans l'ORF	Coordonnées du génome	Modifications de la séquence protéique
<i>nuoF</i>	sous-unité du fragment soluble NADH déshydrogénase du complexe I	A -> C	552	2.399.030	E183A
<i>rpoA</i>	sous-unité α de l'ARN polymérase	délétion de 2 bp	942-943	3.438.110-3.438.109	13 AA changés à partir du 315 ^{ème} AA + protéine tronquée de 2 AA

Les deux mutations *nuoF** et *rpoA** survenues lors de l'évolution adaptative de la souche NA 23 sont-elles impliquées dans l'adaptation bactérienne ? Ces mutations sont-elles bénéfiques pour la souche non évoluée, ou sont-elles apparues et fixées de façon aléatoire indépendamment de l'évolution forcée par les constructions génétiques de la souche NA 23 MG1655 Δ *pgi* Δ *dudHA* Δ *edd* Δ *qor* ?

Pour répondre à ces questions, les avantages respectifs de chaque mutation doivent être évalués au sein du génome de la souche NA 23, par remplacement des gènes non évolués *nuoF* et *rpoA* par *nuoF** et *rpoA**, respectivement.

1.2. Impacts phénotypiques des mutations adaptatives

1.2.1. Souches évoluées et non évoluées reconstruites

Pour valider l'impact adaptatif des mutations *nuoF** et *rpoA**, les gènes évolués ont été introduits chez la souche non évoluée NA 23 en remplaçant les gènes sauvages *nuoF* et *rpoA* selon la technique de délétion et remplacement de gène de Datsenko et Wanner (2002)(c.f. Chapitre II – Matériel & Méthodes). En parallèle, les gènes sauvages *nuoF* et *rpoA* sont réintroduits chez la souche évoluée NA 124E en remplacement des gènes évolués *nuoF** et *rpoA**, pour voir si impact négatif il y a.

Six nouvelles souches sont reconstruites à partir des souches évoluées et non évoluées avec l'introduction, unique ou double, des gènes non évolués et évolués. Ces souches sont répertoriées dans le Tableau 33.

Tableau 33 : Souches bactériennes évoluées/non évoluées *rpoA*(*)/*nuoF*(*) reconstruites

Souche	Génotype spécifique/Plasmide	Filiation/Obtention
NA 141E	MG1655 Δ <i>pgi</i> Δ <i>udhA</i> Δ <i>qor</i> Δ <i>edd</i> <i>nuoF</i> - Km <i>rpoA</i> *	Souche construite à partir de NA 124E avec remplacement de <i>nuoF*</i> par <i>nuoF</i>
NA 142	MG1655 Δ <i>pgi</i> Δ <i>udhA</i> Δ <i>qor</i> Δ <i>edd</i> <i>nuoF</i> *- Km	Souche construite à partir de NA 23 avec remplacement de <i>nuoF</i> par <i>nuoF*</i>
NA 173E	MG1655 Δ <i>pgi</i> Δ <i>udhA</i> Δ <i>qor</i> Δ <i>edd</i> <i>nuoF</i> * <i>rpoA</i> - Cm	Souche construite à partir de NA 124E avec remplacement de <i>rpoA*</i> par <i>rpoA</i>
NA 175	MG1655 Δ <i>pgi</i> Δ <i>udhA</i> Δ <i>qor</i> Δ <i>edd</i> <i>rpoA</i> *- Cm	Souche construite à partir de NA 23 avec remplacement de <i>rpoA</i> par <i>rpoA*</i>
NA 176	MG1655 Δ <i>pgi</i> Δ <i>udhA</i> Δ <i>qor</i> Δ <i>edd</i> <i>nuoF</i> *- Km <i>rpoA</i> *- Cm	Souche construite à partir de NA 23 avec remplacement de <i>nuoF</i> et <i>rpoA</i> par <i>nuoF*</i> et <i>rpoA*</i>
NA 177E	MG1655 Δ <i>pgi</i> Δ <i>udhA</i> Δ <i>qor</i> Δ <i>edd</i> <i>nuoF</i> - Km <i>rpoA</i> - Cm	Souche construite à partir de NA 124E avec remplacement de <i>nuoF*</i> et <i>rpoA*</i> par <i>nuoF</i> et <i>rpoA</i>

1.2.2. Validation de l'impact adaptatif des mutations

Ces six souches ont été mises en culture dans du milieu minimum synthétique MML8b en présence de 5 g/l de glucose. Leur taux de croissance respectif a été calculé sur la phase exponentielle de croissance et comparé avec ceux des souches NA 23 et NA 124E (Figure 34).

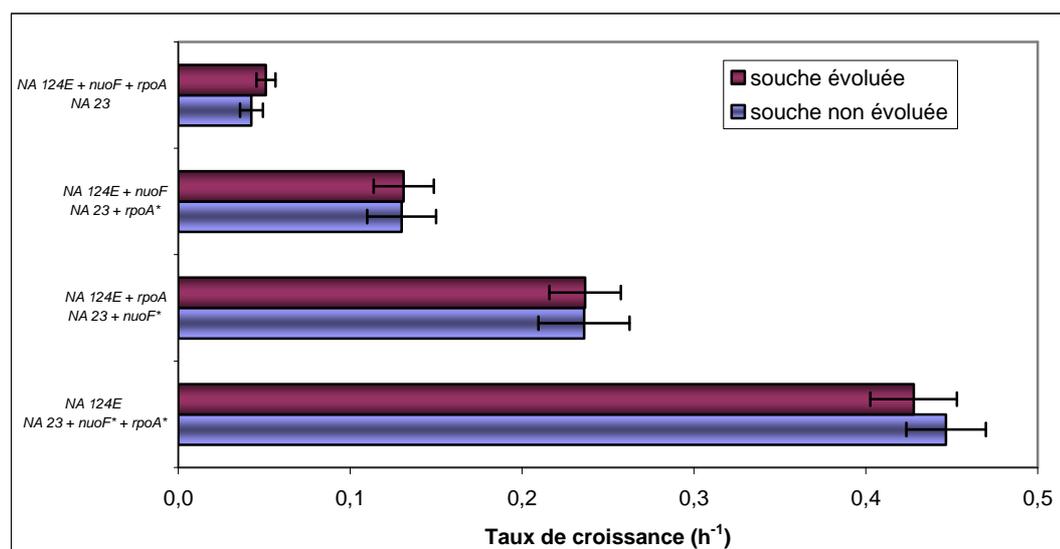


Figure 34 : Taux de croissance des souches accumulant le NADPH évoluées, non évoluées et reconstruites

Le fond génétique, i.e. souche évoluée ou souche non évoluée, indique la filiation de chaque souche reconstruite. Pour plus de clarté, les noms des souches NA 177E, NA 141E, NA 175, NA 173E, NA 142, et NA 176 ont été remplacés respectivement par NA 124E + *nuoF* + *rpoA*, NA 124E + *nuoF*, NA 23 + *rpoA**, NA 124E + *rpoA*, NA 23 + *nuoF** et NA 23 + *nuoF** + *rpoA**. Les moyennes et les écarts-types ont été calculés sur au moins trois cultures indépendantes.

La souche reconstruite NA 176 MG1655 $\Delta pgi \Delta dudHA \Delta edd \Delta qor nuoF^* rpoA^*$ correspondant à la souche non évoluée *nuoF** *rpoA** reconstruite, a un taux de croissance similaire à la souche évoluée NA 124E, $0,45 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$ et $0,43 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$, respectivement. De plus, la souche évoluée reconstruite NA 177E MG1655 $\Delta pgi \Delta dudHA \Delta edd \Delta qor$ qui correspond à la souche évoluée *nuoF* *rpoA* reconstruite, a un taux de croissance similaire à la souche non évoluée NA 23, $0,04 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ et $0,05 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$, respectivement. Cela permet de conclure que les deux seules mutations *nuoF** et *rpoA** sont responsables de l'évolution adaptative de la souche NA 23.

Les souches reconstruites possédant uniquement *rpoA** comme gène évolué (NA 141E et NA 175) ont un taux de croissance semblable proche de $0,13 \text{ h}^{-1}$. *rpoA** est donc responsable d'une augmentation de fitness relative de 3,25, et est responsable à hauteur de 30% de l'adaptation acquise par la souche NA 124E lors de l'évolution *in vivo*.

Les souches reconstruites possédant uniquement *nuoF** comme gène évolué (NA 142 et NA 173E) ont un taux de croissance semblable proche de $0,24 \text{ h}^{-1}$. *nuoF** est donc responsable d'une augmentation de fitness relative de 6, et est responsable à hauteur de 56% de l'adaptation acquise par la souche NA 124E lors de l'évolution *in vivo*. A noter que la souche NA 142 possédant *nuoF** a le même taux de croissance, $0,23 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$, que celui la souche NA 23E04, $0,24 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$.

La combinaison des deux mutations *nuoF** et *rpoA** est responsable d'un effet épistatique positif qui serait à l'origine d'un gain de fitness de 14%.

L'effet de la mutation évoluée semble indépendant de l'origine génétique des souches, évoluée ou non évoluée, ce qui veut dire que les souches NA 23E04, NA 142 et NA 173E sont génétiquement identiques, tout comme les souches NA 175 et NA 141E.

1.2.3. Caractérisation phénotypique des souches non évoluées reconstruites

L'influence des mutations *nuoF** et *rpoA** sur les principaux paramètres physiologiques de croissance aérobie sur glucose a pu être quantifiée et est présentée dans le tableau 34 comparativement à la souche sauvage MG1655

Tableau 34 : Paramètres de croissance aérobie sur glucose des souches NA 23, NA 124E, NA 142, NA 175 et MG1655 durant la phase exponentielle de croissance.

Les écarts-types ont été calculés sur au moins trois cultures indépendantes.

Souche	Taux de croissance	Rendement biomasse	Vitesse spécifique de consommation du glucose	Vitesse spécifique de production d'acétate	rapport NADPH/NADP ⁺	rapport NADH/NAD ⁺
	μ h ⁻¹	$Y_{X/S}$ g.g ⁻¹	q_s mmol.g ⁻¹ .h ⁻¹	V_A mmol.g ⁻¹ .h ⁻¹		
NA 23	0,04 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,9 ± 0,1	0,02 ± 0,01	2,05 ± 0,13	0,11 ± 0,01
NA 124E	0,43 ± 0,03	0,40 ± 0,03	5,2 ± 0,3	0,25 ± 0,06	1,43 ± 0,05	0,81 ± 0,06
NA 142	0,21 ± 0,03	0,29 ± 0,01	3,1 ± 0,3	0,01 ± 0,02	1,81 ± 0,09	0,16 ± 0,02
NA 175	0,13 ± 0,02	0,45 ± 0,01	1,5 ± 0,2	0,01 ± 0,01	1,53 ± 0,11	0,15 ± 0,01
MG1655	0,60 ± 0,03	0,34 ± 0,01	10,4 ± 0,7	2,6 ± 0,3	1,05 ± 0,08	0,31 ± 0,04

Les effets physiologiques des deux mutations dans les mutants NA 142 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ *nuoF** et NA 175 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ *rpoA** sont très distincts.

Réintroduit chez la souche non évoluée, *rpoA** est responsable d'une augmentation d'environ un facteur 2 de la vitesse spécifique de consommation du glucose q_s , et d'un accroissement d'un facteur 3 du taux de croissance μ . *rpoA** est aussi responsable d'une augmentation significative du rendement biomasse-glucose $Y_{X/S}$, et d'une baisse significative du rapport NADPH/NADP⁺.

La mutation *nuoF** est, quant à elle, la cause d'une forte augmentation du taux de croissance μ et de la vitesse spécifique de consommation du glucose q_s , respectivement d'un facteur 6 et presque d'un facteur 2, alors que les autres paramètres physiologiques sont très peu affectés.

A noter que la souche reconstruite NA 142 et la souche intermédiaire évoluée NA 23E04 ont des paramètres de croissance quasiment identiques, confirmant l'impact de *nuoF** dans le phénomène d'évolution observé.

La combinaison des deux mutations *nuoF** et *rpoA** chez la souche évoluée NA 124E a un fort impact positif sur tous les paramètres physiologiques (augmentations d'environ un facteur 11, 2, 6 et 7 du taux de croissance μ , du rendement en biomasse $Y_{X/S}$, de la vitesse spécifique de consommation du glucose q_s , et rapport NADH/NAD⁺), hormis sur le rapport NADPH/NADP⁺ qui est diminué de 30% par rapport à la souche non évoluée.

Enfin, il faut noter que tous les mutants possèdent un rapport NADPH/NADP⁺ nettement supérieur à celui de la souche MG1655, ce qui confirme le choix de la stratégie d'ingénierie métabolique visant à augmenter de façon rationnelle la disponibilité de NADPH dans la cellule.

1.3. Diversité des mutations sur les 10 clones évolués

1.3.1. Recherche des cibles de l'évolution sur les populations évoluées

1.3.1.1. Séquençage du gène *nuoF sur les 10 clones évolués après 20 générations**

La souche NA 23E04 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor \textit{nuoF}^*$ est le résultat de l'évolution adaptative de la souche NA 23 après 20 générations. Son adaptation physiologique est causée par la mutation *nuoF**. Mais cette souche ne correspond qu'à un clone évolué issu d'une des deux populations évoluées, et ce génotype évolué n'est pas obligatoirement représentatif de l'ensemble des évolutions qui ont pu se produire sur l'ensemble des deux populations. Le gène *nuoF* a donc été amplifié et séquencé sur les 9 autres clones NA 24E04 à NA 32E04. Les résultats ont montré que la mutation *nuoF** est présente sur l'ensemble des 10 clones évolués, suggérant que la mutation *nuoF** est majoritaire au sein de la population évoluée. Son apparition, antérieure à sa fixation, a donc eu lieu précocement, estimée après environ 115 heures de culture (1^{ère} culture de repiquage), en supposant que la mutation est apparue à l'origine dans un seul clone.

1.3.1.2. Séquençage des gènes *nuoF et *rpoA** sur les 10 clones évolués après 65 générations**

De même, la souche NA 124E MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor \textit{nuoF}^* \textit{rpoA}^*$ est le résultat de l'évolution adaptative de la souche NA 23 après 65 générations. Son adaptation physiologique est causée par les deux mutations *nuoF** et *rpoA**. Mais cette souche ne correspond qu'à un clone évolué issu d'une des deux populations évoluées, et ce génotype évolué n'est pas obligatoirement représentatif de l'ensemble des évolutions qui ont pu se produire sur l'ensemble des deux populations.

Pour évaluer la diversité génétique de l'évolution *in vivo* de la souche NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$, les neuf autres clones évolués, NA 125E à NA 133E, ont été séquencés sur les positions des deux mutations *nuoF** et *rpoA**.

Le séquençage des clones évolués a révélé que tous les clones évolués possédaient la mutation *nuoF**, c'est-à-dire que cette mutation est apparue de façon indépendante dans les deux populations ayant évolué en parallèle.

Contrairement à *nuoF**, la mutation *rpoA** présente chez la souche NA 124E n'est retrouvée dans aucune autre souche évoluée. Néanmoins, les souches NA 126E, NA 127E et NA 128E, toutes issues de la population A, présentent des mutations dans *rpoA* très proches de *rpoA** avec une délétion de 20 bp aux positions 942-961 de l'ORF, un changement de base à la position 963 de l'ORF et une délétion de 20 bp aux positions 940-959 de l'ORF, respectivement. Les détails de ces mutations et leurs conséquences sur la séquence protéique sont indiqués dans le Tableau 35.

Tableau 35 : Mutations dans le gène *rpoA* présentes chez les souches évoluées NA 124E, NA 126E, NA 127E et NA 128E.

Souche touchée	Gène	Mutation	Localisation de la mutation dans l'ORF	Coordonnées du génome	Modifications de la séquence protéique
NA 124E	<i>rpoA</i> *	délétion de 2 bp	942-943	3438110-3438109	13 AA changés à partir du 315 ^{ème} résidu + protéine tronquée de 2 AA
NA 126E	<i>rpoA</i>	délétion de 20 bp	942-961	3438110-3438091	7 AA changés à partir du 315 ^{ème} résidu + protéine tronquée de 9 AA
NA 127E	<i>rpoA</i>	G -> A	963	3438089	codon stop au résidu 321 - protéine tronquée de 9 AA
NA 128E	<i>rpoA</i>	délétion de 20 bp	940-959	3438112-3438093	7 AA changés à partir du 315 ^{ème} AA + protéine tronquée de 9 AA

Toutes ces mutations sont responsables d'un changement dans la séquence protéique en position C-terminale de RpoA avec des substitutions et/ou délétions touchants de 9 à 16 AA (cf paragraphe 3.1.2.1).

1.3.2. Influences des mutations *rpoA* sur la croissance

Les mutations dans le gène *rpoA* sont exclusivement présentes chez les clones évolués issus de la population A. La population A, représenté par les cinq clones NA 124E à NA 128E, est caractérisée par un taux de croissance et une vitesse spécifique de consommation du glucose légèrement supérieurs à la population B, représentée par les clones NA 129E, NA 130E, NA 131E, NA 132E et NA 133E. Les moyennes respectives du taux de croissance et de la vitesse spécifique de consommation du glucose de l'ensemble des clones possédant une mutation dans *rpoA* ou non sont présentées dans la Figure 6.

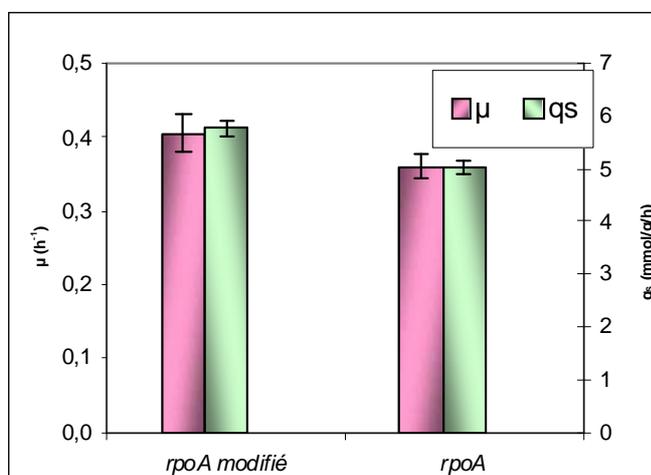


Figure 35 : Taux de croissance et vitesse spécifique de consommation du glucose moyens de l'ensemble des clones possédant ou non un gène *rpoA* modifié.

La présence de mutations dans le gène *rpoA* augmente sensiblement le taux de croissance et le q_s , avec respectivement $0,41 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$ et $5,8 \pm 0,2 \text{ h}^{-1}$ de moyenne pour les clones NA 124E, NA 126E, NA 127E et NA 128E, contre $0,36 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$ et $4,9 \pm 0,1 \text{ h}^{-1}$ pour les 6 autres clones. Par rapport à la population B, le phénomène d'adaptation mesuré pour la population A est certainement dû à la présence de mutations dans le gène *rpoA*.

1.3.3. Recherche de nouvelles mutations au sein de la population B

1.3.3.1. Séquençage du clone NA 131E issu de la population B

La seule mutation identifiée dans les clones de la population B est la mutation *nuoF**. Or, d'après le taux de croissance moyen des 5 clones de la population, il est fort probable qu'ils possèdent d'autres mutations, différentes de celles identifiées dans *rpoA*, leur conférant un avantage sélectif sur milieu minimum et glucose. Ainsi, le clone NA 131E, qui possède un taux de croissance légèrement supérieur à la moyenne de la population B, a été sélectionné pour une analyse de son génome par comparaison sur puces.

Deux nouvelles mutations, qui s'ajoutent aux cinq délétions nucléotidiques et à la mutation *nuoF**, ont ainsi été identifiées dans le génome du clone NA 131E, et sont présentées dans le Tableau 36.

Tableau 36 : Mutations acquises par évolution adaptative chez la souche évoluée NA 131E.

Gène	Protéine/Fonction	Mutation	Localisation de la mutation dans l'ORF	Coordonnées du génome	Modifications de la séquence protéique
<i>nuoF</i>	sous-unité du fragment soluble NADH déshydrogénase du complexe I	A -> C	552	2.399.030	E183A
<i>cyaA</i>	adenylate cyclase	délétion de 9 bp	1928 à-1936	3.991.103-3.991.111	Délétion de 3 AA, S643 Q644 et H645
<i>pntB</i>	sous-unité β de la pyridine nucléotide transhydrogénase	délétion d'une bp	467	1.673.917	6 AA changés à partir du 157 ^{ème} AA + protéine tronquée de 300 AA

L'apparition des mutations *cyaA** et *pntB** au sein de la population B montre la diversité de l'évolution adaptative subie par la souche NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ sur milieu minimum synthétique et glucose. Ces deux mutations ne seront pas étudiées dans les travaux suivants. Toutefois, deux hypothèses peuvent être émises quant à leurs conséquences sur le métabolisme bactérien i) la délétion de trois acides aminés dans la protéine CyaA pourrait avoir des conséquences sur la synthèse de l'AMPc et donc sur la régulation de nombreux gènes, ii) la délétion d'un nucléotide dans le gène *pntB* qui entraîne un décalage de la phase de lecture de la traduction

conduisant à une protéine tronquée de 300 acides aminés est probablement responsable de l'inactivation de l'enzyme PntB.

1.3.3.2. Recherche des mutations *cyaA** et *pntB** dans la population B

Les mutations *cyaA** et *pntB** ont été recherchées chez les clones évolués NA 129E, NA 130E, NA 132E et NA 133E pour évaluer la dispersion de ces mutations au sein de la population B. Les deux mutations se retrouvent ainsi dans le génome des souches NA 130E, NA 132E et NA 133E. Enfin, la souche NA 129E ne possède aucune de ces deux mutations. Il est fort probable que cette dernière possède une ou des nouvelles mutations, autre que *rpoA**, *cyaA** et *pntB**, responsable de l'adaptation de son métabolisme.

Les mutations *cyaA** et *pntB** ont aussi été recherchées dans les clones évolués de la population A (NA 124E à NA 128E), et aucune n'a été détectée.

L'évolution adaptative de la souche NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ sur milieu minimum synthétique et glucose est donc reproductible pour la mutation *nuoF** car celle-ci est présente sur l'ensemble des clones évolués des deux populations évoluées indépendamment. Au contraire, la diversité des mutations *rpoA*, *cyaA* et *pntB* au sein des deux populations montre que cette mutation n'est pas systématique lors de l'évolution adaptative, soulignant ici le caractère aléatoire de l'apparition des mutations.

Les mutations, *nuoF** et *rpoA**, responsables de l'évolution adaptative de la souche NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ ont été identifiés, et leurs effets respectifs sur la souche non évoluée ont été quantifiés au niveau physiologique. Pour approfondir la compréhension de l'évolution *in vivo* de la souche NA 23, les impacts respectifs de ces deux mutations ont été étudiés au niveau moléculaire et biochimique, afin de relier les comportements physiologiques à des modifications moléculaires et/ou biochimiques imputables à chaque mutation.

2. Caractérisation biochimique de la protéine évoluée Nuof*

2.1. Généralités sur la sous-unité protéique Nuof et le complexe I

2.1.1. Complexe I : premier maillon de la chaîne respiratoire

Le complexe respiratoire NADH : ubiquinone oxydoréductase, appelé complexe I, est le premier complexe protéique de la chaîne respiratoire. Par son activité « pompe à protons », il établit un gradient protonique nécessaire pour les procédés consommateurs d'énergie comme la synthèse d'ATP. Ce complexe catalyse le transfert d'électrons du NADH vers l'ubiquinone, transfert couplé avec la translocation de protons au travers de la membrane plasmique. L'équation bilan de la réaction catalysée par le complexe I est la suivante :



où **Q** désigne l'ubiquinone, **H_{in}⁺** et **H_{ext}⁺** respectivement protons à l'intérieur (cytoplasme) et à l'extérieur de la membrane (espace intermembranaire ou périplasma).

Au sein de l'organisme, le complexe I a pour rôle d'initier le transfert d'électrons le long de la chaîne respiratoire. L'énergie redox générée par le déplacement d'électrons est convertie en énergie de translocation de protons avec pour conséquence l'établissement d'un gradient protonique de l'espace périplasmique vers le cytoplasme. Ce gradient protonique va établir une force protomotrice $\Delta\tilde{\mu}_{\text{H}^{+}}$, résultant de la somme du potentiel de membrane $\Delta\Psi$ (intérieur positif) et du gradient de pH acide ΔpH (intérieur acide), qui va permettre la synthèse d'ATP via l'ATP synthétase. L'organisation générale de la chaîne respiratoire bactérienne et du trajet des électrons, couplée avec l'établissement de la force protomotrice, est présentée Figure 36.

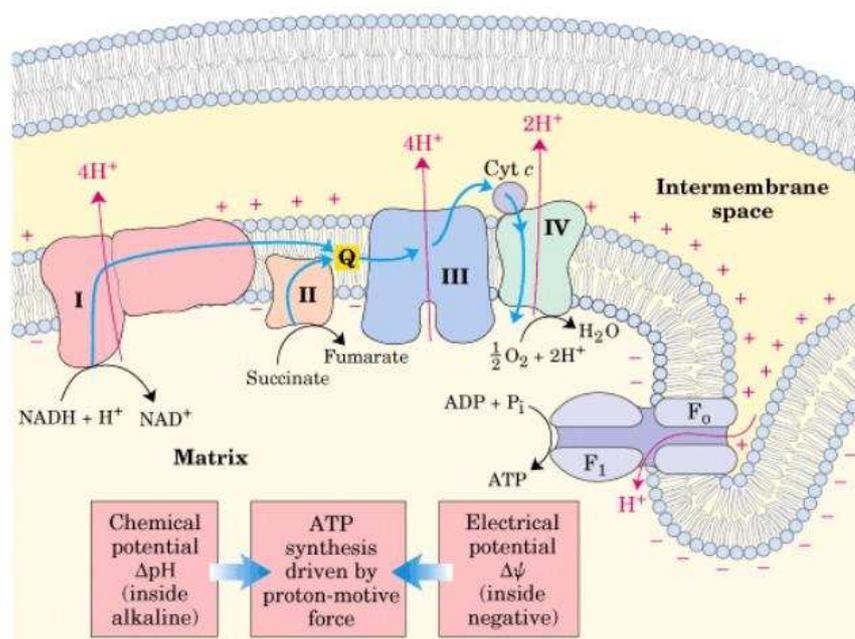


Figure 36: Organisation de la chaîne respiratoire chez les bactéries.

Complexe I : NADH : ubiquinone oxydoréductase ; complexe II : succinate-ubiquinone oxydoréductase ; complexe III : Ubiquinone-cytochrome C réductase ; complexe IV : cytochrome oxydase ; Fo/F1 : ATP synthase.

Chez *E. coli*, ainsi que chez la mitochondrie, le donneur initial d'électrons est le cofacteur NADH fourni essentiellement par le cycle de Krebs. Plus précisément, il a été démontré qu'il pouvait y avoir un transfert direct de NADH entre l'enzyme malate déshydrogénase (MDH) du cycle de Krebs et le complexe I. Ainsi, le cofacteur n'est pas libéré par l'enzyme MDH mais est directement oxydé par le complexe I (Ovádi *et al.*, 1994)(Amarneh and Vik 2005). Ce phénomène de couplage de transfert direct de cofacteur, qui semble être un mécanisme courant au sein de l'organisme, pourrait s'expliquer par le fait qu'*in vivo* les métabolites sont présents en faible concentration contrairement aux enzymes (Srivastava *et al.*, 1989).

2.1.2. Architecture et organisation globale du fragment soluble NuoEFG

2.1.2.1. Origine et évolution moléculaires du complexe respiratoire I

Le complexe I est caractérisé par ses groupements prosthétiques (un FMN et environ neuf centres [Fe-S]) et son grand nombre de sous-unités protéiques (environ 14 chez les bactéries et jusqu'à 45 chez les eucaryotes). Des homologues du complexe I sont présents aussi bien chez les bactéries, les archaea et les eucaryotes. Les analyses de séquences révèlent une structure modulaire de ce complexe, ce qui prouve que le complexe I a évolué à partir de modules préexistants, comme les modules « de translocation de proton » et « de transfert d'électrons ». Ce dernier est homologue aux hydrogénases [NiFe], enzymes qui catalysent la conversion de l'hydrogène en deux protons et deux électrons.

La comparaison des séquences des complexes I homologues a permis d'établir la phylogénie des différents complexes et modules (Figure 37).

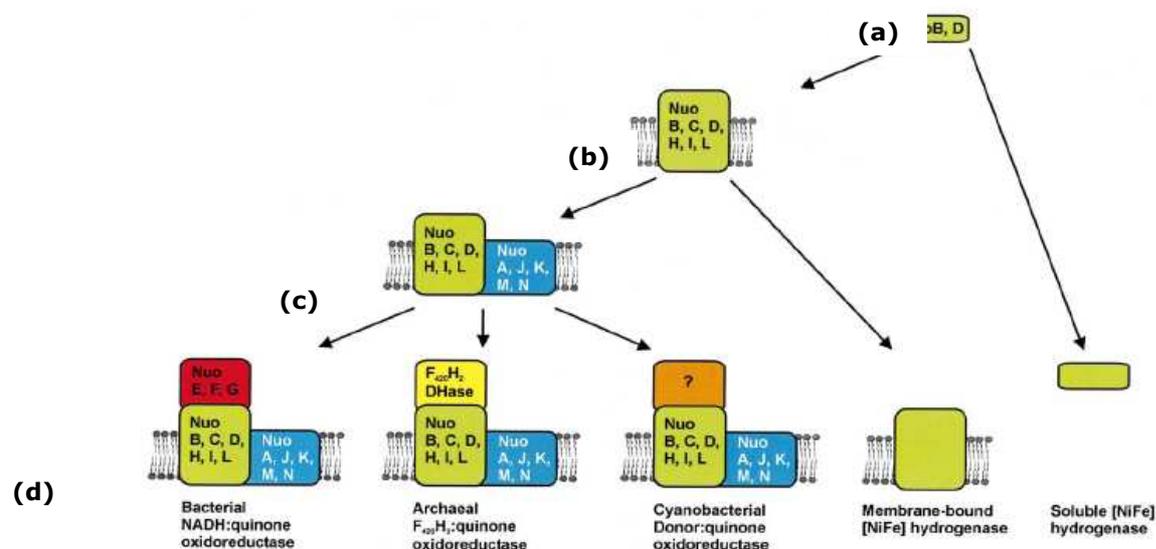


Figure 37 : Schéma hypothétique de l'évolution du complexe I. (D'après Friedrich et Scheide, 2002). Le module hydrogénase est représenté en vert, le module transport d'électrons est en bleu, et les différents modules accepteurs d'électrons initiaux sont respectivement en rouge, jaune et orange.

Ainsi, le complexe respiratoire enzymatique est issu d'un module commun hydrogénase/transfert d'électrons. Ce module se retrouve actuellement dans les hydrogénases

solubles [NiFe] **(a)**. Bien que ces dernières soient capables de réagir directement avec l'hydrogène, le complexe I a perdu le site actif [NiFe] mais gagne un site de fixation de quinone (NuoH), une sous-unité translocatrice d'ions (NuoL) et une ferrédoxine (NuoI) **(b)**. Par la suite, ce complexe ancestral va acquérir diverses protéines de fixation de substrat par différentes sous-unités membranaires **(c)**. Enfin, les différents complexes I vont varier par l'acquisition de différents modules accepteurs d'électrons qui pourront accepter des donneurs spécifiques **(d)**.

Le complexe I bactérien a acquis un module NADH déshydrogénase qui fournit les électrons aux sous-unités translocatrices. Ce module possède le FMN ainsi que quatre centres [FeS]. Ce module NADH déshydrogénase est présent chez les bactéries et les mitochondries et a conduit à la formation du complexe « pompe à protons » NADH : ubiquinone oxydoréductase. Chez les archaea et les cyanobactéries ce module est différent, preuve que le donneur d'électron n'est pas le NADH.

2.1.2.2. Le complexe I est composé de 13 sous-unités

Le complexe I est codé par l'opéron *nuc* qui est constitué de 14 gènes (*nucA,B,C,D,E,F,G,H,I,J,K,L,M,N*). Chez *E. coli*, les gènes *nucC* et *nucD* sont fusionnés et codent pour la sous-unité NuoCD (Figure 38).

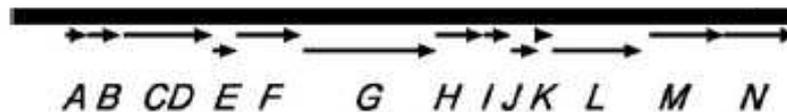


Figure 38 : Organisation de l'opéron *nuc* chez *E. coli*.

Le complexe I peut être décomposé en trois sous-complexes principaux : un fragment soluble NADH déshydrogénase (NuoEFG), une partie membranaire (NuoAHJKLMN) et un fragment connectant les deux autres (NuoBCDI) (Figure 39). La masse combinée de ce complexe est d'environ 550 kDa.

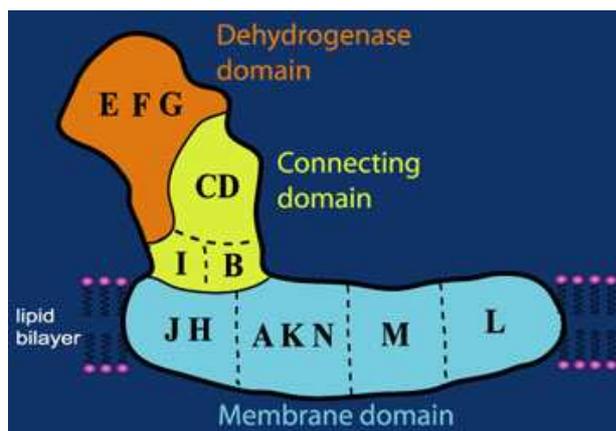


Figure 39 : Représentation schématisique du complexe I avec les 3 sous-complexes principaux ainsi que les sous-unités protéiques qui les constituent.

2.1.2.3. Le domaine NAD-binding commun aux déshydrogénases

Le domaine « NADH binding » classiquement retrouvé chez les déshydrogénases est constitué de 6 feuillets β parallèles (2 motifs β - α - β - α - β), dans l'ordre 6, 5, 4, 1, 2, 3. Une longue boucle entre les feuillets 3 et 4 va créer une cavité naturelle pour l'ancrage du cycle de l'adénine du NADH. De plus, une boucle riche en glycine entre le premier feuillet et l'hélice suivante, va créer des liaisons hydrogènes avec le NADH, notamment avec le motif GXGXXG (Lesk, 1995). De plus, un résidu aspartate est hautement conservé au sein des déshydrogénases, et est situé à environ 20 acides aminés après la position C-terminale du motif GXGXXG. Ce résidu positionné à l'extrémité C-terminale du second feuillet β va former une liaison hydrogène avec le ribose de l'adénosine du NADH.

Le domaine « NADH binding » du complexe I se différencie des autres déshydrogénases car son domaine de fixation du NADH semble avoir évolué pour pouvoir se lier au FMN. Situé sur le fragment soluble NuoEFG, il est constitué par seulement 4 feuillets β parallèles, dans l'ordre 4, 1, 2, 3. De plus, la boucle habituellement riche en glycines n'en contient pas dans le complexe I. Elle est protégée du solvant et semble interagir avec la partie enfouie du cycle isoalloxazine du FMN. Enfin, le résidu aspartate hautement conservé au sein des déshydrogénases est remplacé par un acide glutamique, qui est un résidu diacide tout comme l'aspartate.

2.1.3. Structure 3D du fragment soluble de *T. thermophilus*

2.1.3.1. Organisations des groupements prosthétiques redox

La structure cristalline du fragment soluble de *Thermus thermophilus* (partie périphérique du complexe I) a récemment été obtenue à une résolution de 3,3 Å (Sazanov & Hinchliffe, 2006).

Le trajet des électrons du FMN vers la quinone a aussi pu être résolu par déduction de la position des groupements prosthétiques redox au sein des différentes sous-unités et serait le suivant (Figure 40) : NADH – FMN – N3 – N1b – N4 – N5 – N6a – N6b – N2 – Quinone.

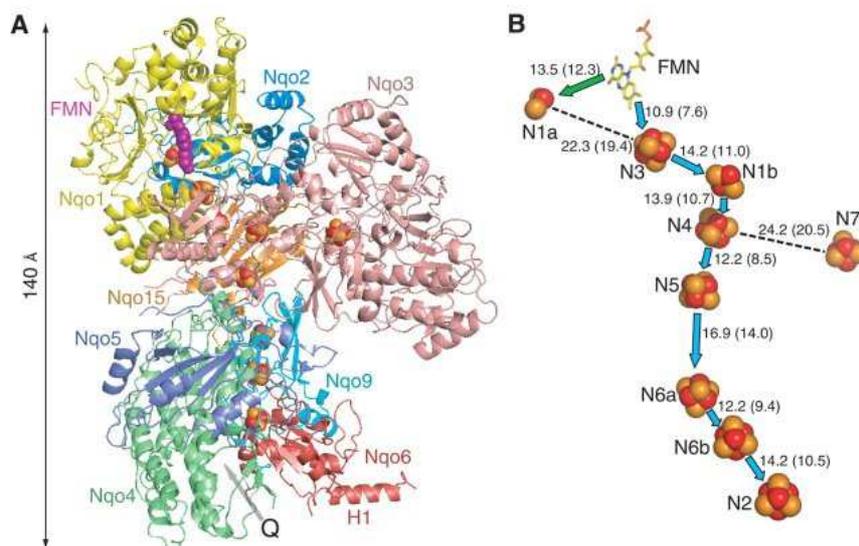


Figure 40 : Architecture et arrangement des centres redox du domaine hydrophile du complexe I de *T. thermophilus*. (D'après Sazanov et Hinchliffe, 2006).

Le trajet des électrons est calculé par la déduction du chemin le plus court entre chaque groupement redox.

Le FMN est situé dans la sous-unité Nqo1 (NuoF chez *E. coli*) au fond d'une cavité exposée au solvant et qui semble aussi contenir un site de fixation du NADH. De plus, le FMN est situé à une distance inférieure à 14 Å (distance physiologique maximale pour un transfert d'électron) du centre [4Fe-4S] N3 et du centre [2Fe-2S] N1a, confirmant les premières hypothèses sur le trajet des électrons (Hinchliffe & Sazanov, 2005 ; Sazanov, 2007).

Le groupement N7 est trop éloigné des autres groupements pour accepter des électrons, mais chez d'autres espèces il semblerait pouvoir accepter des électrons de cofacteurs inconnus. Ce groupement est cependant indispensable pour assurer la stabilité du complexe I (Pohl *et al.*, 2007). Enfin, il est suggéré que le groupement N1a possède une action antioxydante. Il a été démontré que le complexe I était une source importante de superoxydant (Reactive Oxygen Species, ROS), et que des disfonctionnements de celui-ci sont à l'origine de plusieurs maladies neurodégénératives chez l'homme, comme la maladie de Parkinson (Fato *et al.*, 2008 ; Sharma *et al.*, 2009).

Le dernier groupement N2 est situé à proximité de ce qui semble être un site de fixation de la quinone. Ainsi, le long de la chaîne redox, le groupe N3 accepte des électrons de la flavine, et le groupe N2 à haut potentiel redox réduit la quinone à l'interface avec le domaine membranaire.

2.1.3.2. Résidus impliqués dans l'ancrage du FMN et du NADH

L'étude détaillée de la sous-unité protéique Nqo1 de *T. thermophilus* (NuoF chez *E. coli*), sous-unité contenant les sites de fixation du FMN et du NADH, et du centre redox N3, a permis de mettre en évidence que les deux sites de fixation sont situés au fond d'une cavité exposé au solvant (anciennement nommée canal 1). De plus, la cavité du FMN peut accueillir le NADH comme l'ont prouvé des simulations en 3D. Ce domaine, analogue au domaine de Rossman (au minimum trois feuilles β parallèles encadrés par deux hélices alpha), est unique car il semble avoir évolué pour accueillir à la fois le FMN et le NADH (Figure 41)

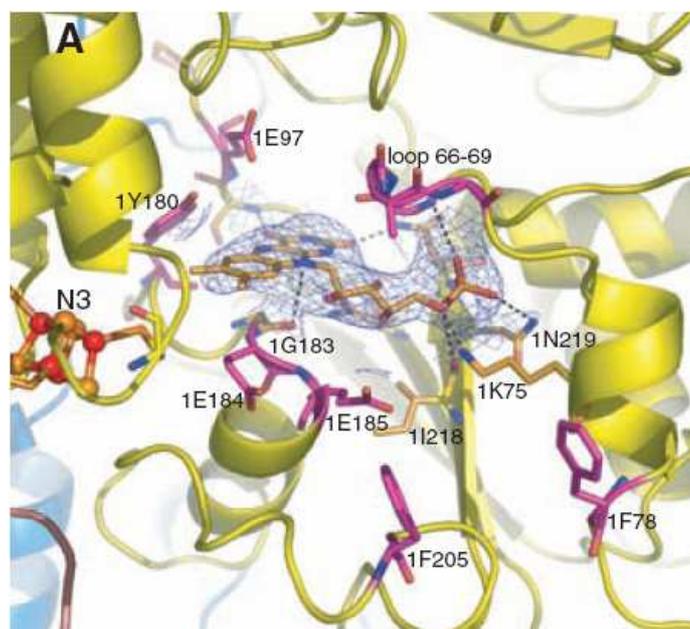


Figure 41 : Conformation du site de fixation du NADH et du FMN de la sous-unité Nqo1. (D'après Sazanov et Hinchliffe, 2006).

Les résidus impliqués dans l'ancrage du FMN sont indiqués en représentation « bâtons » avec les carbones en jaune et les liaisons H en pointillé. Les résidus impliqués dans l'ancrage du NADH sont indiqués en représentation « bâtons » avec les carbones en magenta. Le squelette du FMN présent au centre est représenté en gris.

Le résidu invariant glutamate E185 (et/ou E184) peut établir une liaison hydrogène avec le ribose de l'adénosine du NADH, résidu similaire à l'aspartate dans d'autres déshydrogénases. A noter, le cycle aromatique de la phénylalanine F205 près de l'entrée de la cavité, est parallèle avec celui de la phénylalanine F78 et sont situés à 8,5 Å l'un de l'autre. Leur orientation permettrait le positionnement du cycle adénine du NADH par des interactions d'empilement des trois cycles aromatiques. Cela laisserait supposer que le cycle nicotinamide du NADH serait adjacent au cycle isoalloxazine du FMN, permettant ainsi un transfert hybride.

2.1.4. Modélisation tridimensionnelle *in silico* de la sous-unité évoluée NuoF*

2.1.4.1. Homologies avec le complexe I d'*E. coli*

L'alignement de séquences protéiques des fragments solubles du complexe I de *T. thermophilus* et d'*E. coli* montre de fortes analogies. Ainsi, les sous-unités Nqo1 de *T. thermophilus* et NuoF d'*E. coli* présentent 49% d'identité avec une forte conservation au niveau des domaines d'ancrage du FMN et du NADH. L'alignement des séquences protéiques correspondant à ces deux domaines est présenté Figure 42.

<i>E. coli</i>	21	KQPVW-LDEYRSKNGYEGARKALTGLSPDEIVNQVKDAGLKGR GGAG FSTGLKWSLMPKD	79
		K+ W LD Y GYE A++ L +PDE++ +VK +GL+GR GGAG F TGLKWS MPKD	
<i>T. thermophilus</i>	23	KEGSWTLDYLRHGGYETAKRVLKEKTPDEVIIEVRSGLRGR GGAG FPTGLKWS FM PKD	82
	80	ESMNIRYLLCNADEM EP GTYKDRLLMEQLPHLLVEGMLISAFALKAYRGYIFLRGEYIEA	139
		+ YL+CNADE EPG ++KDR ++E +PHLL+EGM+++ +A++A GYI++RGEY A	
	83	DGKQ-HYLICNADE EP GSFKDRYILEDVPHLLIEGMILAGYAIRATVGYYIYRGEYRRA	141
	140	AVNLRRAIAEATEAGLLGKNIMGTGFDFELFVHTGAGRY ICG EETALINSLEGRRANPRS	199
		A L +AI EA G LGKN+ GT F F+L VH GAG YICG EETAL+NSLEG RANPR	
	142	ADRLEQAIKEARARGYLGNLFGTDFSFDLHVHRGAG YICG EETALMNSLEGLRANPRL	201

Figure 42 : Alignement des séquences protéiques d'*E. coli* et de *T. thermophilus* correspondant aux sous-unités du complexe I possédant les domaines FMN et NADH binding.

Les résidus en gras correspondent au domaine NADH binding, et les résidus soulignés correspondent au domaine FMN binding.

Ces analogies et le fort degré de conservation des séquences des domaines d'ancrages entre les deux espèces laissent supposer que le complexe I d'*E. coli* possède un mécanisme similaire à celui de *T. thermophilus*, notamment en ce qui concerne le transport des électrons du NADH vers l'ubiquinone, via le FMN et les groupements redox.

Ainsi, le résidu E185 de Nqo1 correspondrait au résidu E183 de NuoF d'après l'alignement de séquences protéiques.

2.1.4.2. Structure de la sous-unité protéique NuoF* et conséquences sur le site NADH binding

Un modèle *in silico* de la structure tridimensionnelle de la sous-unité protéique NuoF d'*E. coli* a pu être établi par homologie avec la sous-unité Nqo1 de *T. thermophilus* (cf. Chapitre II – Matériel & Méthodes). Le cofacteur NADH a été placé manuellement au sein de cette structure en respectant les contraintes stériques. La représentation tridimensionnelle de NuoF avec le NADH est présentée Figure 43.

La Figure 44 représente le site d'ancrage du NADH et du FMN des deux sous-unités NuoF et NuoF*, en présence du NADPH superposé au NADH, les deux cofacteurs étant placés par « manual docking » au sein de la cavité protéique.

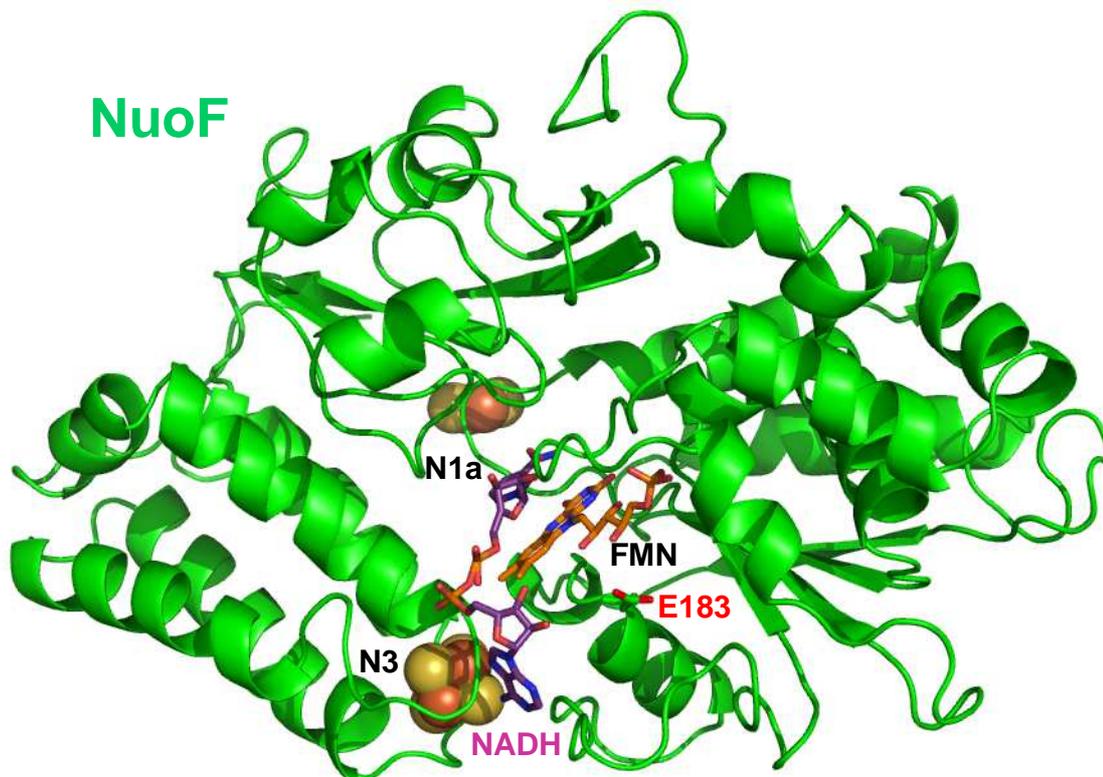


Figure 43 : Structure putative de NuoF d'*E. coli* déduite de la structure de Nqo1 de *T. thermophilus*.

Les deux groupes rédox [4Fe-4S] et [2Fe-2S] sont indiqués en noir sous les noms respectifs de N3 et N1a. Le FMN est aussi écrit en noir. Le cofacteur NADH est placé par ancrage manuel suivant les contraintes stériques imposées par la localisation et l'encombrement des résidus de NuoF et du FMN.

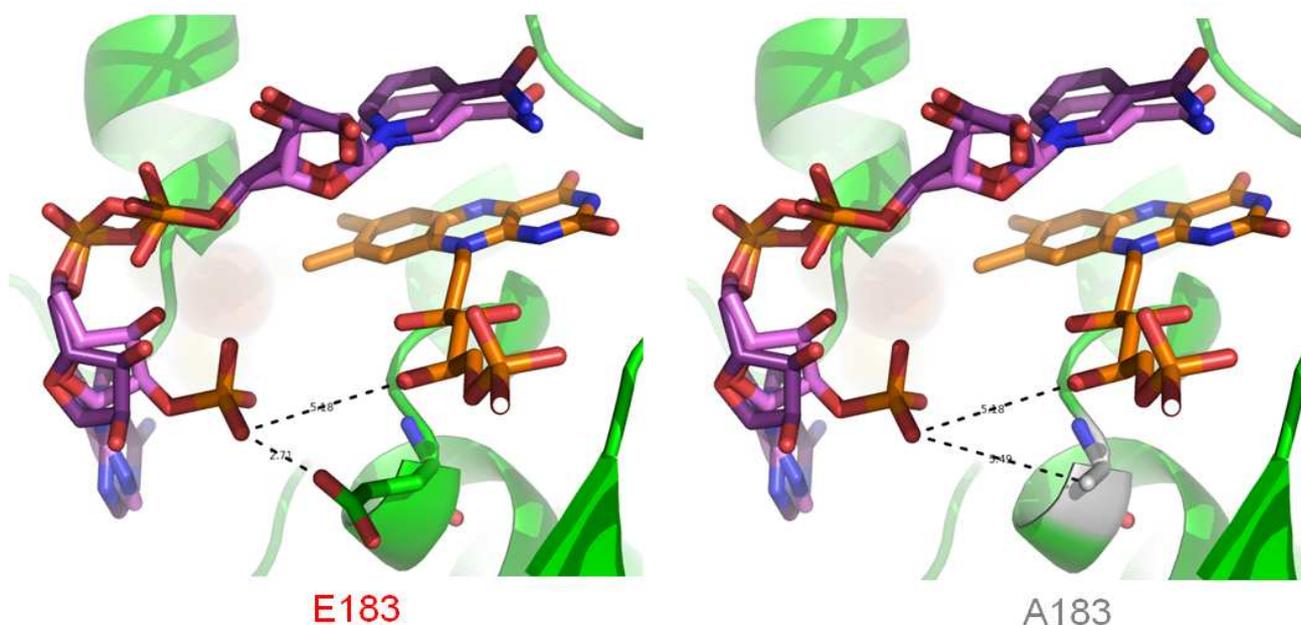


Figure 44 : Les sites d'ancrage du FMN et du NAD(P)H comparés dans les sous-unités NuoF et NuoF*.

Les deux cofacteurs NADH et NADPH sont superposés et placés face au FMN. Les distances entre le phosphate chargé négativement du NADPH, le FMN et le résidu 183 sont données en angströms.

Au sein de la sous-unité protéique NuoF, la distance entre le phosphate du NADPH et le résidu E183 est de 2,71 Å, alors que dans la sous-unité évoluée NuoF*, cette distance est de 5,49 Å. Le résidu A183 dans la sous-unité NuoF* permettrait au NADPH de se loger dans le site actif du fragment soluble NADH déshydrogénase, alors que cela est impossible aux vues des gênes stériques et répulsions négatives entre le résidu E183 et le phosphate du NADPH, dans la sous-unité sauvage NuoF. D'un point de vue structural, la mutation *nuoF** rend possible l'utilisation du NADPH par le complexe I, il faut donc vérifier cette hypothèse par une caractérisation biochimique du fragment soluble NADH déshydrogénase NuoEF*G.

2.2. Caractérisation biochimique de NuoEF*G

2.2.1. Construction du plasmide d'expression

Le fragment soluble est responsable d'une activité déshydrogénase grâce, entre autre, aux sites de fixation du FMN et du NADH. Il a été montré que ces deux sites sont localisés dans la sous-unité NuoF chez *E. coli* (Nqo1 chez *T. thermophilus*) où est aussi présente le groupe redox N3, qui accepte les électrons du FMN. Toutefois, la sous-unité NuoF seule n'a pas d'activité déshydrogénase, car seul le fragment soluble entier, constitué par les sous-unités NuoE, F et G, possède une telle activité. Ainsi, il a été montré que NuoF était stabilisé par les sous-unités NuoE et NuoG, notamment d'un point de vue d'intégrations des cofacteurs et des centres fer soufre. Plus précisément, il a été démontré que les groupes N3 et N1a sont respectivement liés aux sous-unités NuoF et NuoE, par des cystéines qui constituent un motif hautement conservé Cx2Cx2Cx₄₀C (Velazquez *et al.*, 2005).

Bien que le fragment NADH/déshydrogénase soit constitué des 3 sous-unités NuoE, F et G, la surexpression de ces 3 sous-unités ne conduit pas à un fragment actif, mais à une surexpression de 3 apoprotéines non assemblées. Avec une expression simultanée de *nuoE*, *nuoF* et *nuoG* ainsi que des gènes *nuoB* et *nuoCD*, codant pour des sous-unités du fragment connectif, les cofacteurs sont incorporés et le fragment est correctement assemblé (Braun *et al.*, 1998).

Ainsi, l'étude du fragment NADH/déshydrogénase est rendue possible par la coexpression des gènes *nuoBCDEFG*. Il existe des constructions pour l'expression des gènes *nuoBCDEFG* avec une étiquette de purification (Strep-tag) en position C terminale de la sous-unité NuoF, ce qui permet une purification rapide et efficace du fragment. Le plasmide pET11a/*nuoB-G/NuoFc* permet ainsi une surexpression et une purification simple et rapide du fragment soluble NuoEFG (Bungert *et al.*, 1999).

L'expression du fragment NuoEF*G est réalisée par introduction de la mutation NuoF*(E183A) dans le plasmide d'expression (cf. Chapitre II – Matériel & Méthodes), et qui est à son tour introduit chez la souche d'expression *E. coli* BL21 (DE3).

2.2.2. Expression et purification

Les fragments solubles déshydrogénases sauvage et évolué ont été produits et purifiés en parallèle pour pouvoir comparer leurs caractéristiques biochimiques dans des conditions identiques. La production des protéines recombinantes est effectuée comme décrit dans le Chapitre II – Matériel & Méthodes, par le biais des souches *E. coli* BL21 (DE3) portant le plasmide pET11a/*nuoB-G/NuoFc*

Chapitre IV - Caractérisation des mutations responsables de l'évolution adaptative

ou le plasmide pET11a/*nuoB-G/NuoF*(E183A)c* pour exprimer respectivement le fragment soluble déshydrogénase sauvage ou évolué.

La culture d'expression des protéines recombinantes a été effectuée dans du milieu riche type LB complété avec du citrate d'ammonium ferrique (100 µg/ml final, ajout à 20 µg/ml toutes les heures), du sulfide de sodium (2 µg/ml final), de la riboflavine (20 µg/ml final). L'ajout de ces composés est indispensable pour l'obtention d'une enzyme correctement repliée et active. En effet, l'ajout de citrate d'ammonium ferrique et de sulfide de sodium est nécessaire pour une meilleure incorporation des centres Fer-Soufre dans la protéine, et l'ajout de riboflavine va améliorer le pourcentage de cofacteur FMN lié de façon covalente au fragment soluble. L'induction a été effectuée à $DO_{600nm} = 0,8$ avec de l'IPTG à 0,1 mM, ce qui entraîne une chute du taux de croissance, de environ 1 h^{-1} à $0,35 \text{ h}^{-1}$, due à la surproduction de la protéine recombinante.

Le cassage des cellules a été réalisé par sonication, et les fragments solubles sont purifiés par chromatographie d'affinité sur colonne Streptactin. La pureté de la fraction purifiée contenant le fragment soluble du complexe I sous sa forme active, c'est-à-dire des trois sous-unités NuoE, NuoF et NuoG, a été analysée par gel dénaturant SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie (Figure 45).

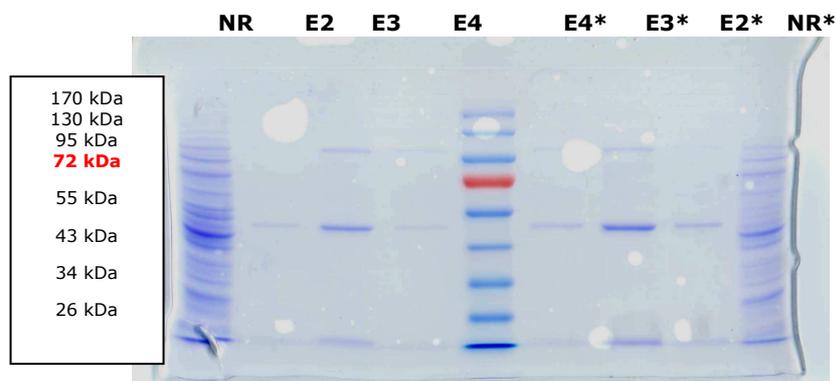


Figure 45 : Gel SDS-Page coloré au bleu de Coomassie des fragments solubles déshydrogénases sauvage et évolué.

25 µL de chaque fraction issue des différentes étapes de purification. NR : extrait non retenu sur la colonne ; E2 : fraction d'élution 2 ; E3 : fraction d'élution 3 ; E4 : fraction d'élution 4 ; L'astérisque signale les fractions issues de la purification du fragment muté.

La présence des 3 sous-unités NuoE, NuoFc et NuoG, de taille respective de 18,59 kDa, 50,29 kDa et 100,54 kDa, est confirmée dans les fractions de purification actives, indiquant que le fragment déshydrogénase soluble a été correctement surexprimé. De plus, un western blot réalisé sur ces mêmes fractions de purification et révélé à l'aide d'anticorps anti-streptactin, de indique que les sous-unités NuoFc et NuoF*c sont exprimées de façon non dégradée (Figure 46).

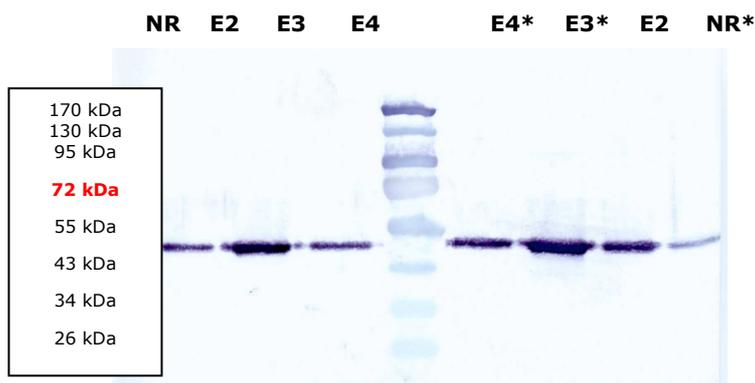


Figure 46 : Western Blot des fragments solubles déshydrogénases sauvage et évolué.

25 µL de chaque fraction issue des différentes étapes de purification. NR : extrait non retenu sur la colonne ; E2 : fraction d'élution 2 ; E3 : fraction d'élution 3 ; E4 : fraction d'élution 4 ; L'astérisque signale les fractions issues de la purification du fragment muté.

2.2.3. Paramètres enzymatiques et cinétiques de NuoEF*G

2.2.3.1. Activité spécifique ferricyanide réductase

L'obtention des fragments solubles déshydrogénases sauvage et évolué, purifiés sous forme active à l'aide du protocole ci-dessus, a permis d'initier leur caractérisation biochimique. Des mesures de l'activité spécifique de l'enzyme sauvage et du mutant NuoEF*(E183A)G ont été réalisées en testant l'activité NAD(P)H déshydrogénase, avec le ferricyanide comme accepteur final d'électrons. L'activité NAD(P)H/ferricyanide réductase des deux fragments solubles déshydrogénases est présentée dans le Tableau 37.

Tableau 37 : Activité spécifique ferricyanide réductase NAD(P)H des fragments solubles déshydrogénases sauvage et évolués.

AS NAD(P)H/ferricyanide réductase (µmol.min⁻¹.mg de P⁻¹)		
	Fragment WT	Fragment muté
NADH	27 ± 2	24 ± 3
NADPH	5 ± 1	19 ± 3

Le fragment soluble déshydrogénase évolué possède une activité spécifique NADPH/ferricyanide réductase du même ordre de grandeur que l'activité spécifique NADH/ferricyanide réductase. Pour le fragment soluble déshydrogénase sauvage, cette dernière est cinq fois supérieure avec le NADH qu'avec le NADPH comme donneur d'électrons.

L'activité spécifique ferricyanide réductase NADH dépendante ne semble pas être significativement diminuée par la mutation *nuoF** ; chez le fragment évolué, l'activité spécifique ferricyanide réductase NADPH dépendante est légèrement inférieure à l'activité spécifique ferricyanide réductase NADH dépendante.

2.2.3.2. Constantes de cinétique michaelienne

Pour approfondir la caractérisation du fragment soluble évolué, les paramètres cinétiques michaeliens, Km et Vmax, ont été déterminés de manière identiques pour les deux fragments par régression non linéaire des données expérimentales de la vitesse initiale de réaction en fonction de la concentration en substrat (Figures 47 et 48). Vmax est ainsi définie comme la vitesse maximale, obtenue lorsque la concentration en substrat est saturante. Km, constante de Michaëlis, est définie comme la concentration en substrat "demi saturante" à laquelle la vitesse de réaction est égale à la moitié de la vitesse maximale. Cette constante peut se traduire par l'affinité de l'enzyme vis-à-vis du

substrat : plus le Km est faible et plus l'affinité sera forte (cf. Chapitre II – Matériel & Méthodes). Ces paramètres cinétiques sont présentés dans le Tableau 38.

Tableau 38 : Paramètres cinétiques Km et Vmax mesurés pour les fragments solubles déshydrogénases sauvage et évolué.

Les valeurs moyennes et les écarts-types ont été déterminés sur au moins trois mesures.

		Fragment WT	Fragment NuoF*(E183A)
Km (µM)	NADH	4,3 ± 0,8	7,9 ± 1,4
	NADPH	1150 ± 80	16,7 ± 2,9
Vmax (µmol.min ⁻¹ .mg de P ⁻¹)	NADH	15,6 ± 0,8	6,7 ± 0,5
	NADPH	4,7 ± 0,1	21,2 ± 2,1

La valeur du Km pour le NADH du fragment soluble déshydrogénase sauvage est en adéquation avec celles de la littérature pour le fragment soluble seul (Braun *et al.*, 1998) et pour le complexe I dans son intégralité (Spehr *et al.*, 1999). La valeur du Km pour le NADPH est inférieure à celle relevée dans la littérature pour le complexe I en entier (Pohl *et al.*, 2008), mais est du même ordre de grandeur du millimolaire. La valeur très élevée du Km pour le NADPH, presque 300 fois supérieure à celle du NADH, n'est pas compatible avec les concentrations de cofacteurs estimées *in vivo*, et se traduit certainement par une activité déshydrogénase *in vivo* exclusivement NADH dépendante, au vue des ordres de préférences de l'enzyme vis-à-vis des cofacteurs.

La vitesse maximale ferricyanide réductase NADH dépendante et l'affinité pour le NADH ont été diminuées d'environ un facteur 2 en présence de la mutation NuoF*(E183A).

En ce qui concerne le fragment soluble évolué, la vitesse maximale ferricyanide réductase NADPH dépendante est 3 fois plus importante qu'en présence du NADH, alors que l'affinité du NADPH est deux fois supérieure à celle du NADH.

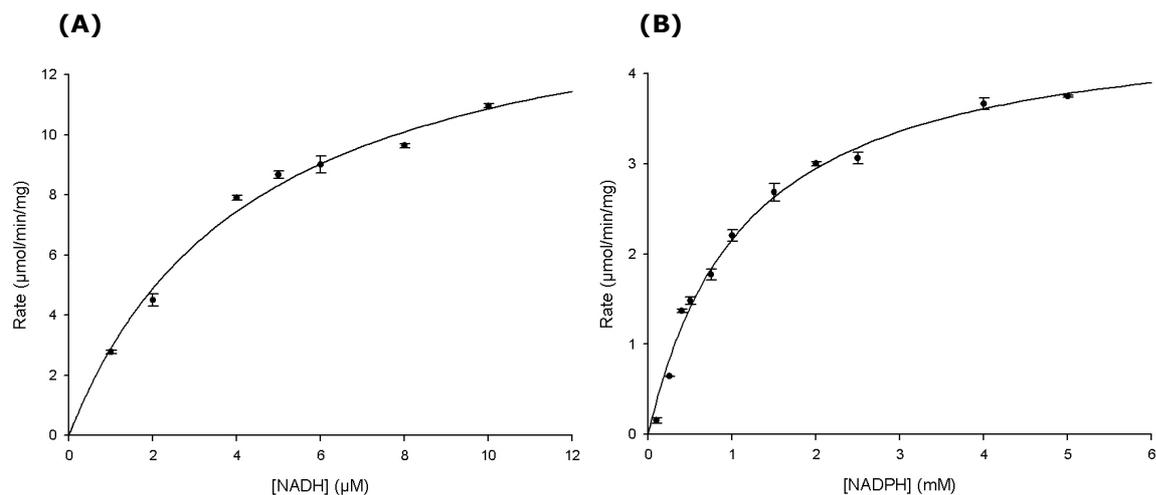


Figure 47: Vitesse initiale de la réaction NAD(P)H/ferricyanide réductase du fragment déshydrogénase soluble sauvage en fonction de la concentration en cofacteur (A) NADH et (B) NADPH.

L'équation de Michaëlis-Menten modélisant la vitesse initiale de la réaction NAD(P)H/ferricyanide réductase en fonction de la concentration en cofacteur est calculée par régression non linéaire, et permet la détermination des paramètres cinétiques K_m et V_{max} .

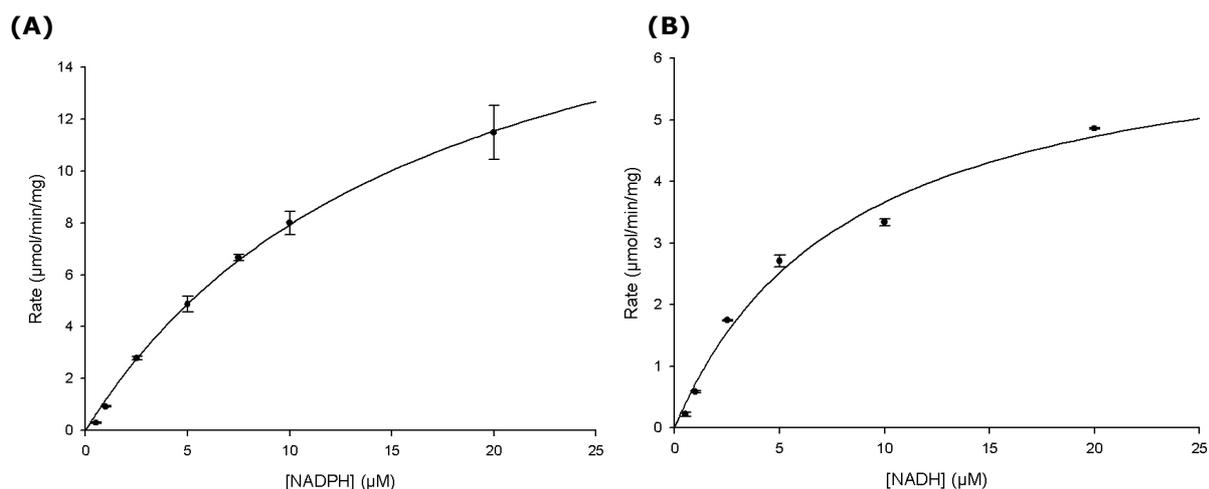


Figure 48: Vitesse initiale de la réaction NAD(P)H/ferricyanide réductase du fragment déshydrogénase soluble évolué en fonction de la concentration en cofacteur (A) NADH et (B) NADPH.

L'équation de Michaëlis-Menten modélisant la vitesse initiale de la réaction NAD(P)H/ferricyanide réductase en fonction de la concentration en cofacteur est calculée par régression non linéaire, et permet la détermination des paramètres cinétiques K_m et V_{max} .

2.2.3.3. Efficacité catalytique

La constante K_{cat} qui désigne le nombre de moles de produit formées par seconde et par mole d'enzyme (ici turnover du ferricyanide réduit) a été calculée à partir de la constante V_{max} dans le but d'évaluer l'efficacité catalytique, K_{cat}/K_m , des deux fragments déshydrogénases pour le NADH et le NADPH (Tableau 39). L'efficacité catalytique est proportionnelle à la vitesse de réaction enzymatique dans des concentrations non saturantes, c'est-à-dire proche des conditions physiologiques (cf. Chapitre II – Matériel & Méthodes).

Tableau 39 : Paramètres cinétiques Kcat (nombre de turnover) et Kcat/Km (efficacité catalytique) calculés pour les fragments solubles déshydrogénases sauvage et évolué.

Les valeurs moyennes et les écarts-types ont été déterminés sur la base des écarts-types des Km et Vmax.

		Fragment WT	Fragment NuoF*(E183A)
Kcat (s⁻¹)	NADH	43,8 ± 2,1	19 ± 1
	NADPH	13 ± 0	60 ± 6
Kcat/Km (s⁻¹.µM⁻¹)	NADH	10,1 ± 2,4	2,4 ± 0,6
	NADPH	0,011 ± 0,001	3,6 ± 1,0

Le fragment soluble déshydrogénase sauvage a ainsi une efficacité catalytique 5 fois supérieure pour le NADH que le fragment évolué, donc la mutation NuoF*(E183A) a un impact significativement négatif sur l'activité ferricyanide réductase NADH dépendante. L'efficacité catalytique du fragment soluble sauvage pour le NADPH est quasi nulle (0,01 s⁻¹.µM⁻¹), confirmant l'incapacité de l'enzyme a utilisé le NADPH dans des conditions *in vivo*.

Enfin, le fragment soluble déshydrogénase évolué a une efficacité catalytique légèrement supérieure pour le NADPH par rapport au NADH.

2.3. Caractérisation *in vivo* du complexe I évolué

La caractérisation biochimique approfondie du fragment soluble déshydrogénase NuoEF*(E183A)G a permis de mettre en évidence une nouvelle activité NADPH/ferricyanide réductase pour cette enzyme. Il faut maintenant démontrer que cette nouvelle activité NADPH dépendante est aussi présente *in vivo* au sein du complexe I et de la chaîne respiratoire.

Pour pouvoir étudier l'activité oxydase et la force protomotrice générées par la chaîne respiratoire, nous avons réalisées des préparations de vésicules inversées des souches parentale (NA 23) et évoluée (NA 23E04). En effet, les travaux d'Owen et Kaback (1978) ont démontrés que la membrane de vésicules inversées d'*E. coli* préparées par lyse osmotique conserve les mêmes propriétés physiologiques que des cellules intactes

2.3.1. Activités oxydases de la chaîne respiratoire « parentale » et « évoluée »

Les activités NAD(P)H oxydase, avec l'O₂ comme accepteur final d'électrons, ont été mesurées sur les préparations de vésicules inversées des souches NA 23 et NA 23E04, avec et sans oxygène (Tableau 40).

Tableau 40 : Activités NAD(P)H oxydases des vésicules inversées.

Les valeurs moyennes et les écarts-types ont été déterminés sur au moins trois mesures indépendantes.

Activité enzymatique ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	NA23		NA23E04	
	NADH	NADPH	NADH	NADPH
Oxydase aérobie	0.47 ± 0.05	0.01 ± 0.00	0.71 ± 0.07	0.28 ± 0.03
Oxydase anaérobie	0.002 ± 0.001	0.006 ± 0.001	0.005 ± 0.001	0.004 ± 0.001

Les mesures d'activités sur les vésicules inversées démontrent que l'activité NADPH oxydase est significativement plus importante chez la souche évoluée que chez la souche parentale. De plus, en absence d'oxygène, toutes les activités se rapprochent de zéro, validant que les activités mesurées sont bien des activités NAD(P)H oxydases O₂-dépendant. Pour les vésicules préparées à partir de la souche NA 23E04 possédant le complexe I évolué, il y a donc bien une activité NADPH oxydase du complexe I avec un transfert d'électron du cofacteur vers l'oxygène le long de la chaîne respiratoire.

La différence entre les activités NADH et NADPH oxydases observée chez la souche évoluée peut être expliquée par la contribution de l'enzyme NADH : dehydrogenase II qui participe à hauteur de 50% dans l'activité NADH oxydase totale (Jaworowski *et al.*, 1981 ; Noguchi *et al.*, 2004).

2.3.2. Génération de la force protomotrice en présence de NADH et NADPH

Pour démontrer que le transfert d'électron du NADPH vers la chaîne respiratoire est capable de transférer des protons au travers de la membrane, nous avons évalué les deux composantes de la force protomotrice ($\Delta\tilde{\mu}_{\text{H}^+}$), le potentiel de membrane ($\Delta\Psi$) et le gradient de pH acide (ΔpH), générée dans les vésicules inversées. La capacité de générer un $\Delta\Psi$ et un ΔpH dans les vésicules inversées a été étudiée en utilisant l'oxonol V et la quinacrine comme sondes de fluorescence, respectivement. L'aptitude du NADH et NADPH à générer un $\Delta\tilde{\mu}_{\text{H}^+}$ a été comparée entre les souches NA 23 et NA 23E04 (Figure 49).

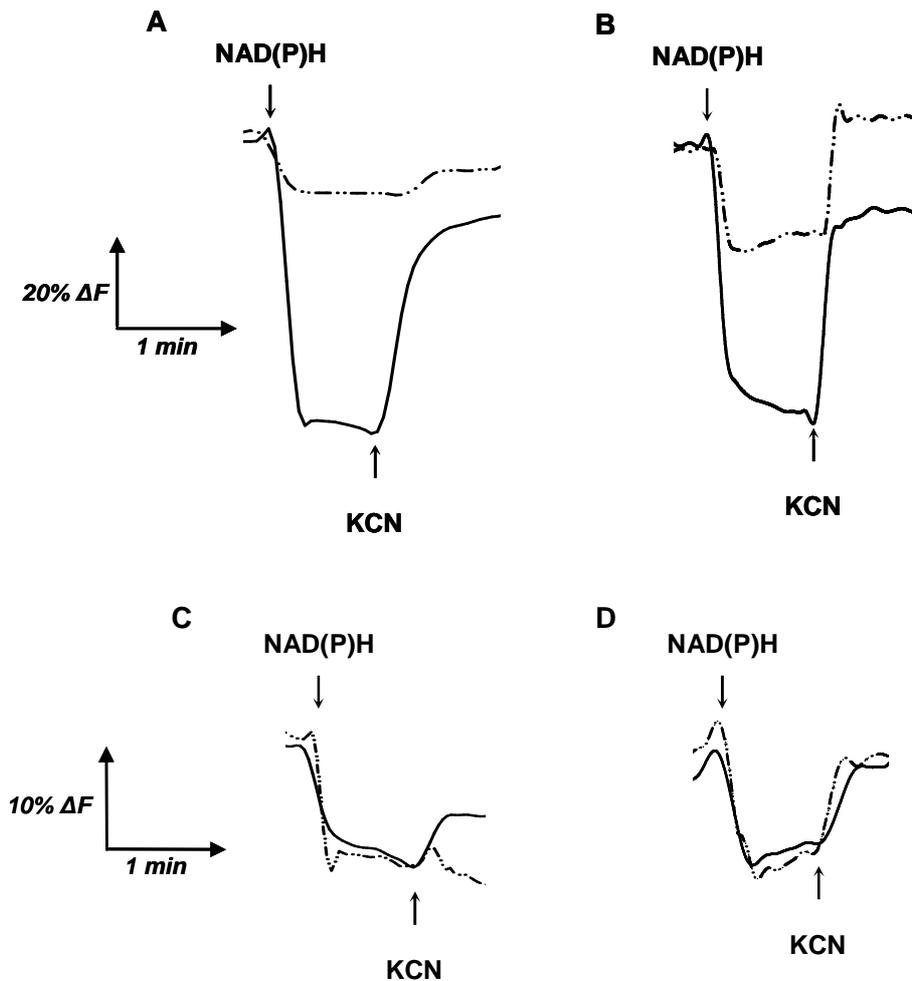


Figure 49 : Génération du $\Delta\Psi$ et un ΔpH par la chaîne respiratoire des vésicules inversées des souches NA 23 et NA 23E04.

Le quenching de la fluorescence de l'oxonol V a été utilisé pour suivre le potentiel de membrane dans les vésicules inversées. Le quenching de la fluorescence de la quinacrine a été utilisé pour suivre le gradient de pH acide dans les vésicules inversées. Les courbes pleines et en pointillées représentent le quenching en présence de NADH et NADPH, respectivement.

L'ajout de NADH et NADPH dans le mélange réactionnel génère un $\Delta\Psi$ et un ΔpH dans les vésicules inversées des deux souches, comme le montre le quenching de fluorescence de l'oxonol V et de la quinacrine. La génération du $\Delta\tilde{\mu}_H^+$ dans la souche non évoluée en présence de NADPH est sûrement provoquée par la protéine membranaire pyridine nucléotide transhydrogénase (PntAB), qui fonctionne comme une pompe à protons (Chang *et al.*, 1992).

L'addition de potassium cyanide (KCN) dans le mélange réactionnel a pour but d'inhiber la cytochrome oxydase terminale de la chaîne respiratoire (Figure 49). La chute de la force motrice à un niveau proche du niveau initial, révélée par la remontée du quenching de la fluorescence, suite à l'addition de KCN démontre le transfert d'électron du cofacteur vers l'oxygène. Ainsi en présence de NADPH et de KCN, seules les vésicules inversées préparées à partir de la souche NA 23E04 présentent une remontée significative de la force protomotrice. Le transfert d'électrons du NADPH vers l'oxygène par la chaîne respiratoire, générant un transfert de protons, est ainsi confirmé dans les souches possédant l'enzyme évoluée Nuof*.

Ainsi en présence de NADPH et de KCN, seules les vésicules inversées de la souche NA 23E04 génèrent une force protomotrice significative, validant ainsi l'activité NADPH dépendante pompe à protons du complexe I évolué.

2.4. Conclusions et discussion

La caractérisation biochimique approfondie du fragment soluble déshydrogénase NuoEF*(E183A)G a permis de mettre en évidence une nouvelle activité NADPH déshydrogénase. Cette activité a été confirmée *in vivo* grâce aux expériences sur vésicules inversées qui permettent de conserver une chaîne respiratoire intacte et fonctionnelle. L'activité NADPH dépendante du complexe I évolué est ainsi associée à la génération d'une force protomotrice par le transfert d'électron à l'oxygène via la chaîne respiratoire.

La présence d'un complexe I évolué dans la souche NA 23E04 capable d'utiliser le NADH et le NADPH comme donneur d'électrons, est corrélée avec la diminution du rapport NADPH/NADP⁺ de 2,05 à 1,85 et l'augmentation du rapport NADH/NAD⁺ de 0,11 à 0,15, par rapport à la souche parentale.

D'après les modélisations tridimensionnelles des sous-unités protéiques NuoF et NuoF*, l'explication moléculaire et structurale implique le glutamate qui empêcherait, par répulsion électrostatique et encombrement stérique du phosphate du NADPH, l'ancrage de ce dernier dans la poche catalytique où est présent le FMN. La neutralité et le faible encombrement stérique de l'alanine comparés à ceux du glutamate permettraient ainsi l'utilisation du NADPH comme donneur d'électrons.

Plus précisément, la mutation NuoF*(E183A) diminue par deux la vitesse maximale de réaction par rapport à la protéine sauvage, et diminue significativement l'efficacité catalytique du fragment muté vis-à-vis du NADH, avec une efficacité catalytique de 10 pour la fragment sauvage contre 2 pour le fragment évolué. Toutefois, l'efficacité catalytique du fragment évolué est sensiblement égale pour le NADH et le NADPH. La baisse de l'efficacité catalytique NADH déshydrogénase engendrée par NuoF*(E183A) peut être expliquée par la diminution de l'affinité du NADH pour le fragment évolué. En effet, l'affinité apparente avec le NADH est diminuée, comme le traduit la diminution du Km.

L'activité déshydrogénase *in vitro* du fragment soluble a été montrée pour être identique à l'activité déshydrogénase *in vitro* du complexe I considéré dans son intégralité (Braun *et al.*, 1998 ; Spehr *et al.*, 1999). L'activité NADPH déshydrogénase *in vitro* du fragment soluble NuoEF*(E183A)G est certainement comparable à celle du complexe I considéré dans son intégralité. L'activité NADPH déshydrogénase du complexe I évoluée a de plus été démontrée *in vivo*, faisant de la chaîne respiratoire une voie de réoxydation du NADPH. Le rôle du complexe I, et de la chaîne respiratoire, est primordial dans la cellule et connaît une forte activité de part la nécessité d'établir un flux de production d'ATP suffisant dans la cellule. Le complexe I évolué constitue donc une voie importante de réoxydation du NADPH dans la souche évoluée possédant la mutation *nuoF**.

L'évolution de la souche NA 23 a donc créé une nouvelle fonction pour le NADPH. D'un cofacteur essentiellement impliqué dans les réactions anaboliques et dans la protection contre le stress oxydatif, le NADPH, par l'oxydation du complexe I évolué, a un rôle catabolique direct. Jusqu'à présent, il s'agit de la première démonstration d'un double rôle direct anabolique et catabolique pour le NADPH dans une cellule bactérienne.

3. Impact de *rpoA** sur l'expression des gènes

3.1. Généralités sur RpoA et l'ARN polymérase

3.1.1. L'ARN polymérase chez *E. coli*

3.1.1.1. Structure et organisation de l'ARNP

L'ARNP est responsable de la synthèse d'ARN à partir d'un brin matrice d'ADN en utilisant des ribonucléotides (ATG, GTP, UTP et CTP). Le cœur de l'enzyme est constitué de 5 sous-unités protéiques : deux sous-unités alpha (α), une sous-unité bêta (β), une sous-unité bêta' (β') et une sous-unité oméga (ω), codées respectivement par les gènes *rpoA*, *rpoB*, *rpoC* et *rpoZ* (Tableau 41). En se liant à un des sept facteurs sigma (σ) (Tableau 42), le cœur de l'ARNP $\alpha_2\beta\beta'\omega$ devient l'holoenzyme $\alpha_2\beta\beta'\omega\sigma$, pouvant ainsi initier la transcription en se fixant à un promoteur situé en amont du gène cible. La transcription se déroule alors jusqu'au site de terminaison de la transcription, situé en aval du même gène.

Tableau 41 : Propriétés des différentes sous-unités de l'ARNP d'*E. coli*

Sous - unité	Taille en AA	Gène	Fonction
alpha (α)	329	<i>rpoA</i>	Requis pour l'assemblage des sous-unités β et β' . Liaison au promoteur
bêta (β)	1342	<i>rpoB</i>	Site catalytique : initiation et élongation
bêta' (β')	1407	<i>rpoC</i>	Liaison à l'ADN matrice
sigma (σ)	613	<i>rpoD</i>	Reconnaissance spécifique de promoteurs en fonction de la nature du facteur σ
omega (ω)	91	<i>rpoZ</i>	Requis pour avoir une enzyme active

Tableau 42 : Les différents facteurs sigma existant chez *E. coli*.

Facteur sigma	Gène	Fonction/Expression régulées (nombre de gènes contrôlés)
σ^{70}	<i>rpoD</i>	Facteur sigma principal de croissance (~ 1000)
σ^{54}	<i>rpoN</i>	Réponse à une régulation/stress par l'azote (~ 15)
σ^{32}	<i>rpoH</i>	Réponse à des chocs thermiques (~ 40)
σ^S	<i>rpoS</i>	Phase stationnaire de croissance (~ 100)
σ^F	<i>rpoF</i>	Impliqué dans l'expression des opérons liés aux flagelles/chimiotactisme (~ 40)
σ^E	<i>rpoE</i>	Impliqué dans les réponses oxydatives/thermiques; régule l'expression des protéines extracytoplasmiques (~ 5)
σ^{FecI}	<i>fecI</i>	Régule les gènes fec pour le transport du composé dicitrate complexé au fer (~ 5)

La structure du cœur de l'enzyme a été résolue par cristallisation de l'ARNP de *Thermus aquaticus*. La structure générale, décrite comme formant un large sillon, donne une allure générale de « pince de crabe » formée par les deux sous-unités β et β' (Geszvain & Landick, 2005) (Figure 50).

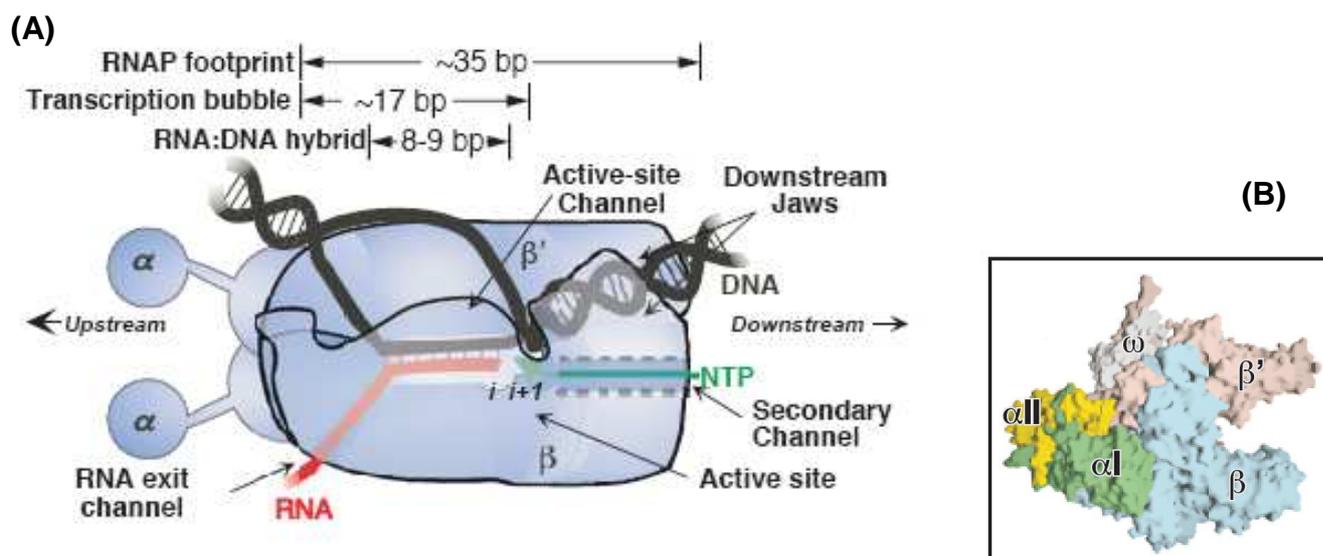


Figure 50 : (A) Modèle de l'ARNP, ici en mode élongation d'après Geszvain & Landick (2005). (B) Structure du cœur ARNP de *T. aquaticus*. (D'après Zhang *et al.*, 1999).

3.1.1.2. Les 3 étapes clés de la transcription : Initiation, Élongation et Terminaison

Trois principales étapes définissent la transcription : l'initiation, l'élongation et la terminaison. Lors de l'initiation, le cœur de l'ARNP se fixe à un des facteurs sigma, différant selon les conditions de croissance de la bactérie (Tableau 43) ; l'holoenzyme résultante est alors capable de se lier à l'ADN par reconnaissance spécifique du promoteur.

L'enzyme subit alors un changement de conformation permettant à l'ADN matrice de s'enrouler autour du complexe et d'accéder au site actif. Toutefois, la véritable élongation est souvent précédée de la formation de courts transcrits car le complexe protéique reste immobile au niveau du promoteur, phénomène appelé transcription abortive.

Ensuite, l'ARNP quitte le promoteur, relâche le facteur, et forme le complexe d'élongation transcriptionnelle (TEC). L'élongation est processive et se fait à une vitesse de 30 à 100 ribonucléotides par seconde pour une dizaine de kilobases d'ADN.

L'élongation se termine lorsque l'ARNP atteint le signal intrinsèque de terminaison de la transcription, caractérisé par une structure en « épingle à cheveux » dans le brin d'ARN néoformé, ou par intervention d'un facteur de terminaison Rho (NusG). L'ARN néoformé et le brin d'ADN matrice sont relâchés, et l'ARNP reprend sa configuration d'enzyme cœur, prête pour un nouveau cycle de transcription (Figure 51).

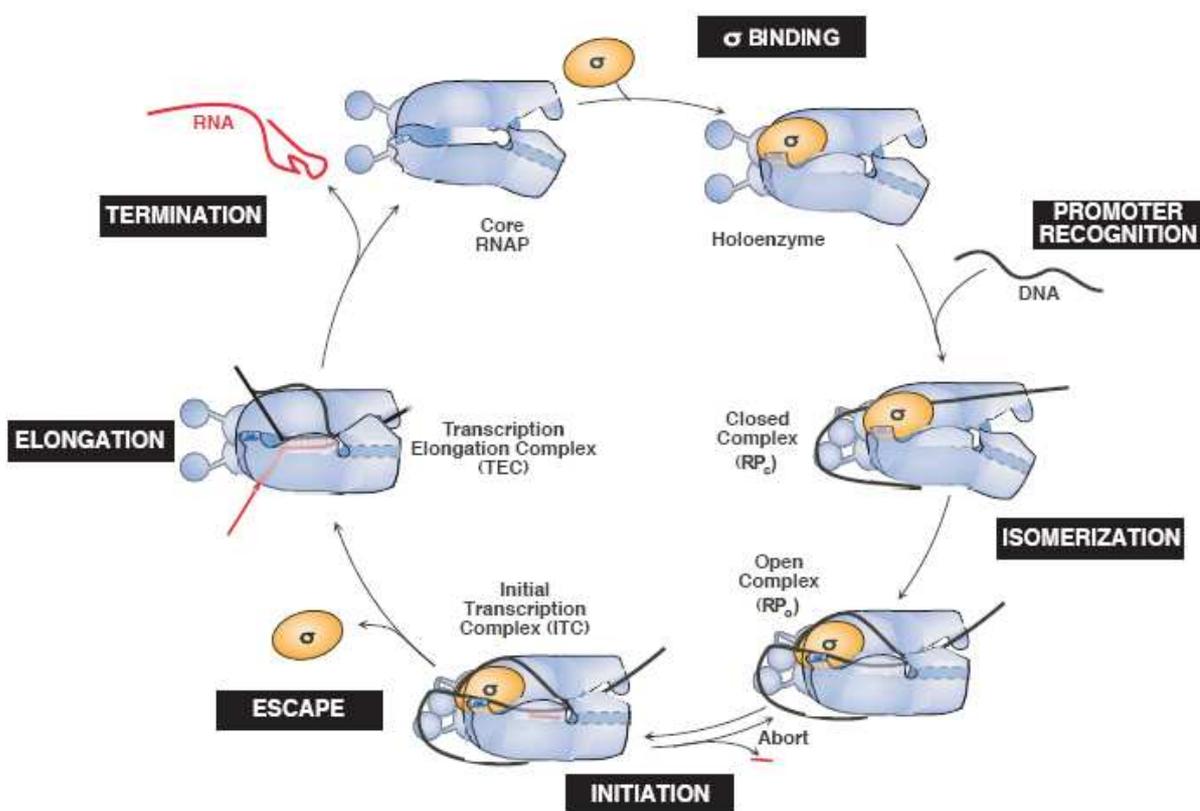


Figure 51 : Le cycle de transcription. (D'après Geszvain & Landick, 2005).

L'enzyme ARNP cœur est en bleue, le facteur sigma en orange, l'ADN matrice en noir et l'ARN néoformé en rouge.

3.1.1.3. Phénomène de pause transcriptionnelle (Landick, 2006)

Le phénomène de pause transcriptionnelle intervient suite à un réarrangement structural du complexe d'élongation transcriptionnelle. Il est provoqué par des interactions entre les acides nucléiques (ADN et/ou ARN) et l'ARNP, ou par des interactions entre des régulateurs et l'ADN/ARN/ARNP. Ainsi, les sous-unités β , β' et α sont impliquées dans la pause transcriptionnelle car elles peuvent être en contact avec l'ADN et l'ARN. La pause transcriptionnelle est caractérisée

par deux paramètres : l'efficacité de reconnaissance des signaux de pause qui va déterminer la proportion du complexe rentrant en pause, et la durée de la pause.

La pause transcriptionnelle joue un rôle fondamental dans le couplage de la transcription avec la traduction, et permet ainsi au ribosome de palier à d'éventuels retards dans l'incorporation des acides aminés. Un second rôle a aussi été identifié dans l'étape de terminaison intrinsèque et/ou Rho-dépendante : la pause transcriptionnelle permettrait d'attendre l'action du facteur Rho et/ou faciliterait la déstabilisation du complexe protéique. Enfin, ce phénomène de pause serait aussi impliqué dans la régulation transcriptionnelle car il permettrait de stopper l'ARNP à des endroits clés de l'ADN facilitant ainsi l'interaction ou le recrutement de régulateurs.

3.1.2. Implication de RpoA dans la transcription

La sous-unité RpoA est indispensable à la structuration de l'ARNP, et à l'initiation de la transcription par la reconnaissance des séquences promotrices ainsi qu'à la régulation de l'expression des gènes. Pour mieux évaluer les fonctions touchées par la mutation *rpoA**, l'implication de la sous-unité α dans trois grandes fonctions est décrite en détail dans les paragraphes suivants.

3.1.2.1. Rôle structural et structure de RpoA

RpoA est présent sous forme de dimère dans l'ARNP, mais les deux sous-unités nommées αI et αII n'ont pas le même rôle dans l'organisation structurale du complexe protéique. En effet, αI est en contact avec la sous-unité β , alors que αII touche la sous-unité β' (Figure 54B). L'ordre d'assemblage des sous-unités est conforme aux interactions décrites précédemment : il y a formation du dimère $\alpha I - \alpha II$, attachement de β et enfin de β' (Ishihama *et al.*, 1987).

En ce qui concerne la structure propre de RpoA, elle est composée de deux domaines fonctionnels, le domaine N-terminal (αNTD) et le domaine C-terminal (αCTD), reliés par un domaine « linker » flexible et non structuré d'environ 14 acides aminés. Le domaine αNTD est impliqué dans l'assemblage de l'ARNP, en contactant les sous-unités β et β' , et interagit aussi avec le facteur sigma. Le domaine αCTD interagit avec les promoteurs et les facteurs activateurs de la transcription. Ce dernier est constitué de cinq hélices alpha (dont une non-standard), avec un domaine « hélice-boucle-hélice » identifié comme se liant à l'ADN et présent chez de nombreuses protéines interagissant avec l'ADN (Ross *et al.*, 2001).

3.1.2.2. Rôle dans l'initiation : Reconnaissance des promoteurs

Le rôle primordial de RpoA au sein de l'ARNP et de la transcription est son implication dans la reconnaissance des régions régulatrices de l'ADN, des séquences supplémentaires aux régions promotrices situées en amont de l'élément -35 (élément UpStream, Figure 52B), et des protéines activatrices liées à l'ADN (Figure 52C). Cette reconnaissance, non systématique (exemple de l'opéron *lacUV5*, Figure 52A), permet l'initiation de la transcription (Figure 52)(Chen *et al.*, 2003).

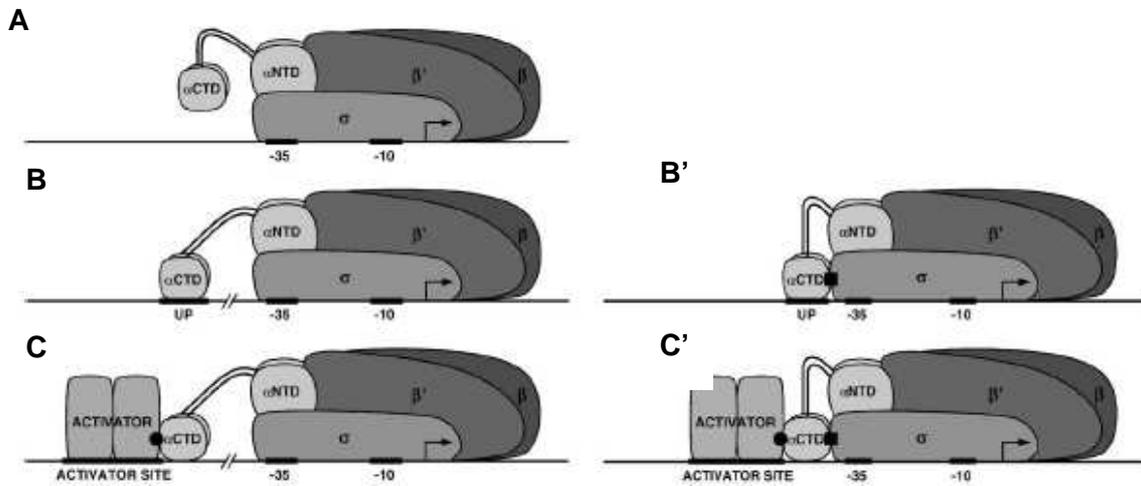


Figure 52 : Schéma des différents mécanismes d'initiation de la transcription. (D'après Chen *et al.*, 2003).

La portion linker permet au domaine α CTD d'occuper différents positionnements relativement au domaine α NTD, donc relativement à l'ARNP. Le domaine α CTD peut donc être en contact avec la sous-unité σ (en position -43), et ces interactions α CTD-ARNP/ σ ont été démontrées pour avoir un fort effet stimulant sur la transcription (Figures 52B' et 52C').

RpoA interagit aussi avec les protéines CAP (catabolite activator protein), ou CRP (CAMP receptor protein), qui participent à l'activation transcriptionnelle de plus d'une centaine de promoteurs (Figure 53).

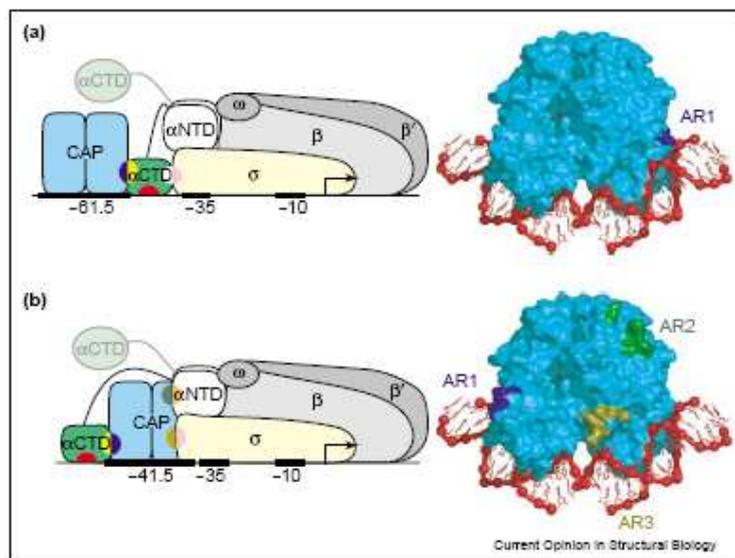


Figure 53 : Activation de la transcription par CAP. (D'après Lawson *et al.*, 2004).

Deux mécanismes d'activation ont été décrits chez *E. coli*. L'activation de la transcription peut être effectuée par des promoteurs CAP-dépendant de classe I (Figure 55a), où le domaine α CTD interagit à la fois avec la protéine CAP, l'ADN et le facteur σ . Le contact α CTD - CAP facilite l'interaction du promoteur avec le domaine α CTD, et donc par conséquent avec l'ARNP. L'activation de la transcription peut être effectuée par des promoteurs CAP-dépendant de classe II (Figure 55b), où le domaine α CTD interagit à la fois avec la protéine CAP et l'ADN. La protéine CAP va mettre en contact l'ADN, le domaine α NTD et le facteur σ . Le contact α CTD - CAP permet l'interaction du domaine α CTD avec l'ADN en amont de la protéine CAP, entraînant le positionnement de l'ARNP au niveau du promoteur. Les interactions CAP - α NTD et CAP - facteur σ ont pour effet d'activer la transcription en facilitant l'ouverture du complexe ANRP (Benoff *et al.*, 2002 ; Chen *et al.*, 2003 ; Lawson *et al.*, 2004).

3.2. Impact de *rpoA** sur le transcriptome de la souche NA 124E

Pour comprendre l'influence du gène muté *rpoA** sur le métabolisme de la souche évoluée NA 124E MG1655 Δ *pgi* Δ *udhA* Δ *qor* Δ *edd* *nuoF** *rpoA**, des analyses transcriptomiques ont été effectuées à partir de cultures en milieu minimum sur glucose des souches NA 124E et NA 142 MG1655 Δ *pgi* Δ *udhA* Δ *qor* Δ *edd* *nuoF**, exprimant respectivement le gène *rpoA* évolué ou sauvage. Les données de transcriptomique permettent en effet d'identifier les processus métaboliques potentiellement induits ou réprimés qui pourraient expliquer les comportements physiologiques en présence de *rpoA**, notamment la baisse du rapport NADPH/NADP⁺.

L'analyse transcriptome des deux souches a été réalisée à l'aide de puces à ADN à partir de quatre cultures indépendantes par souche. Après prélèvement, les ARN messagers de chacune des cultures ont été extraits puis rétrotranscrits. Au cours de la rétrotranscription, les ADN complémentaires (ADNc) ont été marqués grâce à des fluorochromes verts et rouges (Cy3 et Cy5, respectivement). Deux à deux, les ADNc de la souche 124E MG1655 Δ *pgi* Δ *udhA* Δ *qor* Δ *edd* *nuoF** *rpoA**, qui constituent la référence, ont été marqués d'une couleur différente des ADNc de la souche 142 MG1655 Δ *pgi* Δ *udhA* Δ *qor* Δ *edd* *nuoF**. Les ADNc ont ensuite été déposés sur une lame de verre contenant 4289 sondes spécifiques de chacun des gènes d'*E. coli* MG1655. L'intensité des signaux résultant des hybridations compétitives des ADNc des deux souches traduit le rapport entre les quantités de transcrits chez la souche *rpoA** et chez la souche *rpoA* sauvage. L'hybridation deux à deux des ADNc a été répétée quatre fois, une pour chaque culture indépendante des deux souches, soit au total quatre lames de verre analysées (cf. Chapitre II – Matériel & Méthodes).

L'analyse des résultats de transcriptomique étudie la significativité des résultats à l'aide du test statistique de Student. La confiance des résultats a été évaluée par la « p-value », comprise entre 0 et 1, représentant le pourcentage de chance que le changement d'expression du gène donné soit le fait du hasard et non de la condition testée. Pour l'analyse *rpoA**, cette valeur de « p-value » est limitée à 0,1, c'est-à-dire que les changements d'expression relevés ont 90% de chance d'être causés par *rpoA**.

Le changement d'expression des gènes entre les souches NA 124E et NA 142 a été chiffré par le rapport des intensités des spots correspondant à un ADNc donné. Le gène est considéré surexprimé en présence de *rpoA** si ce rapport est supérieur à 1,5, et sous-exprimé pour un rapport inférieur à 0,67, soit respectivement supérieur à 0,18 et inférieur à -0,18 pour les mêmes valeurs en \log_{10} .

Suivant ces critères de sélection, 154 gènes ont vu leur expression significativement modifiée en présence de *rpoA**, avec une grande majorité de gènes sous-exprimés (106) par rapport aux gènes surexprimés (48).

Sur les 154 gènes dont l'expression a été significativement modifiée chez la souche NA 124E MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd nuoF^* rpoA^*$ par rapport à la souche NA 142 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd nuoF^*$, 52 ont été identifiés comme ayant potentiellement des rôles clés dans le métabolisme des souches. Ces gènes ont pu être classés en cinq familles de fonction relativement bien représentées (Tableau 43). Ces cinq familles de fonction sont : i) la synthèse et l'assemblage des flagelles, ii) le chimiotactisme, iii) le transport et la dégradation de sucres, hors glucose, iv) le cycle de Krebs, et v) la biosynthèse des acides aminés.

3.2.1. Gènes surexprimés chez la souche NA 124E

48 gènes ont leur expression augmentée due à la présence de *rpoA** chez la souche NA 124E *E. coli* MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd nuoF^* rpoA^*$. Ces gènes peuvent être regroupés en quatre catégories :

- 19 gènes impliqués dans la réplication/transcription/traduction
- 8 gènes impliqués dans le métabolisme et dans les voies de biosynthèse des acides aminés
- 8 gènes dont la fonction est putative ou inconnue
- 16 gènes impliqués dans des fonctions diverses.

3.2.1.1. Gènes impliqués dans la réplication, transcription, traduction

5 gènes codent pour des protéines impliquées dans la réplication de l'ADN, avec entre autre une hélicase (*dnaB*), une gyrase (*gyrA*), une topoisomérase (*yrdD*) ou encore une protéine constituant le primosome (*priB*, *dnaB*). 2 gènes surexprimés codent pour des protéines chaperonnes (*mopA*) ou protéines qui facilitent le repliement d'autres protéines (*ppiB*). 7 gènes codent pour des régulateurs de la transcription en se fixant sur l'ADN (*pspC*, *hha*) ou l'ARN (*rhIE*, *yiaU*, *yebH*, *hfq*, *nusA*). Enfin, 5 gènes surexprimés codent pour des protéines ribosomiales (*rpmG*, *rpmE*, *rplL*, *rpsD* et *rpsQ*).

3.2.1.2. Gènes codant pour des enzymes du métabolisme du carbone

4 gènes surexprimés codent pour des enzymes du métabolisme : *yibO* (ou *gpmM*) code pour une phosphoglycérate mutase impliquée dans la glycolyse ; *gldA* code pour D-aminopropanol dehydrogenase / glycérol déshydrogénase (voie de biosynthèse de l'aminopropanol et/ou voie de dégradation du méthylglyoxal) ; *epd* code pour une érythrose 4-phosphate déshydrogénase ; *speC* code pour l'ornithine décarboxylase (première étape de la dégradation de l'ornithine en putrescine).

4 gènes surexprimés codent pour des enzymes participant aux voies de biosynthèse des acides aminés suivants : l'histidine (*hisG*, première étape de synthèse de l'histidine), la méthionine (*metE*, *thrA* et *purU*), la glycine (*purU*) et la thréonine (*thrA*).

3.2.2. Gènes sous-exprimés chez la souche NA 124E

106 gènes ont leur expression diminuée due à la présence de *rpoA*. Ces gènes peuvent être regroupés en sept catégories :

- 21 gènes impliqués dans les fonctions de motilité flagellaire
- 4 gènes impliqués dans les fonctions de chimiotactisme
- 14 gènes impliqués dans le transport et l'utilisation de sucres autres que le glucose
- 8 gènes impliqués dans la réplication/transcription/traduction
- 9 gènes impliqués dans le métabolisme central
- 16 gènes dont la fonction est putative ou inconnue
- 34 gènes impliqués dans des fonctions diverses.

3.2.2.1. Gènes associés à la fonction de motilité cellulaire

25 gènes sous-exprimés sont associés à des fonctions de motilité de la cellule, notamment avec des gènes codant pour la synthèse du flagelle, et de chimiotactisme, avec des gènes codant pour des protéines reconnaissant spécifiquement certains substrats (methyl-accepting chemotaxis proteins, MCPs).

Ces gènes font parties de la « cascade » d'expression des gènes impliqués dans la motilité de la bactérie, et sont les suivants (classés par opéron, les gènes « manquants » sont indiqués par un tiret bas) : *flhD*, *flgA_N*, *flgBC_EFG_IJK_*, *flh_A_*, *fli_ZY*, *fliD_*, *fli_HI_*, *fliLM_P_*, *cheAW* et, *tar*.

Les fonctions liées au flagelle et la fonction de chimiotactisme nécessitent l'expression de plus de 50 gènes qui sont divisés en 17 opérons. L'expression de ces gènes est régulée à de multiples niveaux. Il y a ainsi 3 classes de gènes qui peuvent être classées en fonction de la chronologie de leur expression (early, middle and late promoters), qui est directement liée aux étapes d'assemblage du flagelle (Chilcott & Hughes, 2000). La hiérarchie de l'expression des gènes du flagelle couplée à son assemblage est présentée Figure 54.

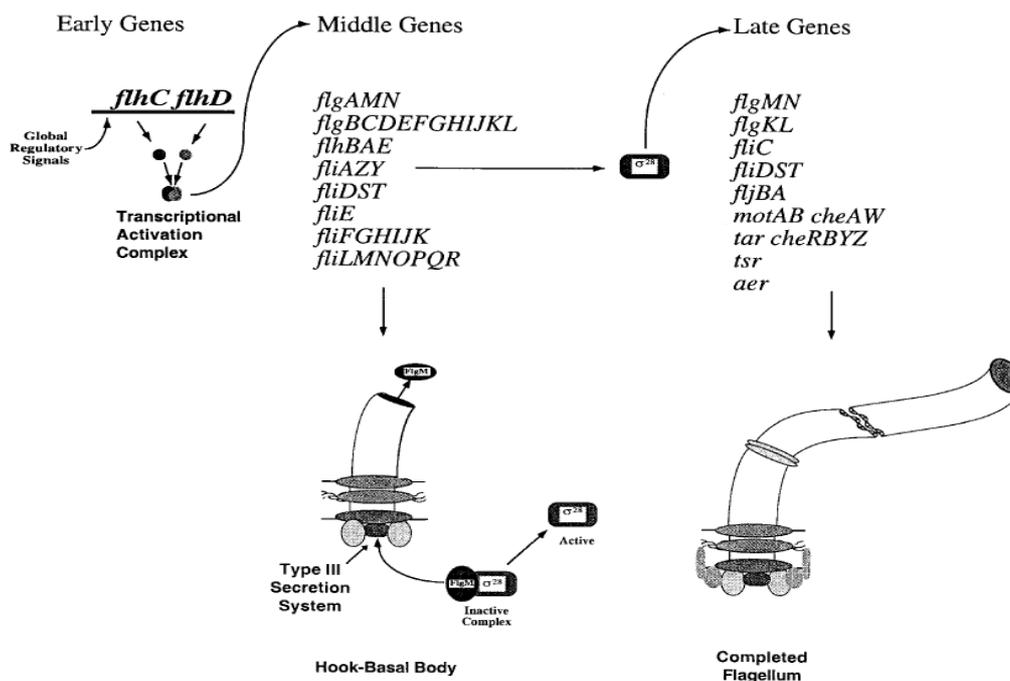


Figure 54 : Chronologie de l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse du flagelle d'*E. coli*. (D'après Chilcott et Hughes, 2000).

3.2.2.2. Gènes impliqués dans le transport et la dégradation de sucres

14 gènes sous-exprimés chez la souche NA 124E sont impliqués dans le transport et l'utilisation de sucres, comme le galactitol (*gatC*, *gatY*, *gatZ*), le maltose (*malE*, *malF*, *malP*, *malT*, *malZ*) et le ribose (*rbsA*, *rbsB*, *rbsD*). Les opérons *gatYZAB* et *malEFG* sont connus pour être induits par le couple de facteurs de transcription FlhD/FlhC.

3.2.2.3. Gènes codant pour des enzymes du cycle de Krebs

9 gènes sous-exprimés chez la souche NA 124E sont impliqués dans le cycle de Krebs : *sdhA*, *sdhB*, *sdhC*, *sucA*, *sucB*, *sucC*, *prpC*, *gltA*, *aceK*. Les gènes sous-exprimés sont essentiellement localisés après l'enzyme isocitrate déshydrogénase dans le cycle de Krebs, avec aussi la sous-expression du gène *aceK*, enzyme responsable de l'activation/inactivation de l'isocitrate déshydrogénase par déphosphorylation/phosphorylation.

3.2.2.4. Gènes impliqués dans la réplication, transcription, traduction

8 gènes sous-exprimés chez la souche NA 124E sont impliqués dans la réplication (*helD*, *cspD*), la transcription (*evgA*, *ycfQ*, *mtfA*, *mhpR*, *tnaL*) et la traduction (*rmF*).

Tableau 43 : Familles des principales fonctions affectées par les modifications d'expression des gènes en présence de *rpoA.**

Le fond gris clair ou gris foncé indique respectivement une sous ou surexpression du gène correspondant en présence de *rpoA**.

Function Family	Gene	Product or Function	log ₁₀ ratio	log ₁₀ error ratio	p-value
Flagellar Synthesis and Assembly	<i>flhD</i>	transcriptional regulator of the flagellar operon	-0,33	0,04	0,002
	<i>flgA</i>	assembly of the flagellar P ring	-0,18	0,04	0,03
	<i>flgN</i>	flagellar chaperone protein	-0,52	0,04	0,001
	<i>flgB</i>	flagellar basal-body rod protein	-0,9	0,09	0,002
	<i>flgC</i>	flagellar basal-body rod protein	-0,43	0,08	0,012
	<i>flgE</i>	flagellar hook protein	-0,86	0,09	0,002
	<i>flgF</i>	flagellar basal-body rod protein	-0,43	0,06	0,005
	<i>flgG</i>	flagellar basal-body rod protein	-0,53	0,04	0,001
	<i>flgI</i>	assembly of the flagellar P ring	-0,25	0,06	0,019
	<i>flgJ</i>	assembly of the flagellar rod	-0,2	0,07	0,05
	<i>flgK</i>	hook-filament junction protein	-0,5	0,04	0,001
	<i>flhA</i>	flagellar export apparatus	-0,18	0,05	0,03
	<i>fliC</i>	flagellin, filament structural protein	-0,67	0,08	0,003
	<i>fliD</i>	assembly of filament	-0,47	0,04	0,002
	<i>fliH</i>	flagellar biosynthesis protein	-0,57	0,08	0,004
	<i>fliI</i>	flagellum-specific ATP synthase	-0,4	0,11	0,034
	<i>fliL</i>	flagellar biosynthesis protein	-0,25	0,09	0,068
	<i>fliM</i>	flagellar motor switch protein	-0,35	0,12	0,055
	<i>fliP</i>	flagellar export apparatus	-0,54	0,20	0,059
	<i>fliY</i>	cell-density responsive regulators of sigma F	-0,42	0,06	0,007
<i>fliZ</i>	cell-density responsive regulators of sigma F	-1,04	0,07	0,001	
Chemotaxis	<i>cheA</i>	histidine kinase component of MCP-II transduction complex	-1,01	0,09	0,002
	<i>cheR</i>	chemotaxis protein methyltransferase	-0,27	0,03	0,002
	<i>cheW</i>	transmission of sensory signals from the MCPs to the flagellar motors	-0,65	0,08	0,005
	<i>tar</i>	MCP-II	-0,76	0,12	0,009
Sugar Transport and Degradation	<i>gatC</i>	galactitol PTS permease	-0,84	0,07	0,001
	<i>gatD</i>	galactitol-1-phosphate dehydrogenase	-0,63	0,03	0
	<i>gatY</i>	tagatose-1,6-bisphosphate aldolase 2	-0,77	0,09	0,004
	<i>gatZ</i>	tagatose-1,6-bisphosphate aldolase 2	-0,82	0,09	0,003
	<i>rbsA</i>	transport of D-ribose (ribose ABC transporter)	-0,31	0,06	0,013
	<i>rbsB</i>	transport of D-ribose (ribose ABC transporter)	-0,42	0,05	0,004
	<i>rbsD</i>	ribose pyranase	-0,73	0,10	0,006
	<i>lamB</i>	maltose porin	-0,95	0,20	0,017
	<i>malE</i>	maltose ABC transporter	-0,45	0,10	0,025
	<i>malF</i>	maltose ABC transporter	-0,32	0,08	0,028
	<i>malP</i>	maltodextrin phosphorylase	-0,47	0,17	0,069
	<i>malT</i>	transcription activator factor of operons involved in maltose catabolism and transport	-0,41	0,03	0,001
	<i>malZ</i>	maltodextrin glucosidase	-0,61	0,03	0
	<i>fucP</i>	L-fucose/proton symporter	-0,24	0,04	0,009
Carbon Metabolism	<i>yibO</i>	phosphoglycerate mutase	0,22	0,06	0,028
	<i>gldA</i>	glycerol dehydrogenase	0,19	0,05	0,029
	<i>aldA</i>	aldehyde dehydrogenase	-0,91	0,1	0,003

Chapitre IV - Caractérisation des mutations responsables de l'évolution adaptative

<i>epd</i>	erythrose-4-phosphate dehydrogenase	0,18	0,057	0,053
<i>speC</i>	ornithine decarboxylase	0,18	0,076	0,097

TCA

<i>sdhA</i>	succinate dehydrogenase	-0,67	0,08	0,003
<i>sdhB</i>	succinate dehydrogenase	-0,32	0,05	0,006
<i>sdhC</i>	succinate dehydrogenase	-0,65	0,07	0,003
<i>sucA</i>	2-oxoglutarate dehydrogenase complex	-0,3	0,06	0,014
<i>sucB</i>	2-oxoglutarate dehydrogenase complex	-0,27	0,09	0,048
<i>sucC</i>	succinyl-CoA synthetase	-0,33	0,05	0,008
<i>prpC</i>	methylcitrate synthase	-0,4	0,04	0,003
<i>gltA</i>	citrate synthase	-0,26	0,09	0,064
<i>aceK</i>	isocitrate dehydrogenase phosphatase / kinase	-0,18	0,02	0,007

AA (and C1) Biosynthesis

<i>purU</i>	formyltetrahydrofolate deformylase	0,66	0,08	0,055
<i>metE</i>	methionine synthase	0,21	0,07	0,058
<i>hisG</i>	ATP phosphoribosyltransferase	0,2	0,07	0,056
<i>thrA</i>	aspartate kinase / homoserine dehydrogenase	0,18	0,06	0,054

Replication, Transcription and Translation

<i>dnaB</i>	subunit of replicative DNA helicase and primosome	0,21	0,04	0,015
<i>gyrA</i>	subunit of DNA gyrase	0,23	0,05	0,021
<i>yrdD</i>	predicted DNA topoisomerase	0,18	0,03	0,009
<i>priB</i>	component of the primosome	0,21	0,09	0,089
<i>helD</i>	DNA helicase IV	-0,26	0,03	0,002
<i>cspD</i>	DNA replication inhibitor	-0,32	0,08	0,033

<i>pspC</i>	transcriptional regulator	0,18	0,07	0,067
<i>hha</i>	haemolysin expression modulating protein	0,19	0,04	0,015
<i>viaU</i>	predicted DNA-binding transcriptional regulator	0,24	0,05	0,015
<i>yebH</i>	methyltransferase	0,22	0,07	0,046
<i>hfq</i>	RNA-binding protein that affects many cellular processes	0,21	0,08	0,099
<i>nusA</i>	transcription termination/antitermination L factor	0,2	0,08	0,087
<i>evgA</i>	transcriptional regulator (transcription activator)	-0,38	0,06	0,01
<i>ycfQ</i>	predicted DNA-binding transcriptional regulator	-0,25	0,09	0,047
<i>mtfA</i>	Mlc titration factor	-0,24	0,07	0,051
<i>mhpR</i>	transcriptional activator	-0,23	0,05	0,026
<i>tnaL</i>	regulation by attenuation of the tnaCAB operon	-0,23	0,06	0,025

<i>rhIE</i>	ATP-dependent RNA helicase (involved in ribosome maturation)	0,2	0,03	0,007
<i>rpmE</i>	50S ribosomal subunit protein L31	0,33	0,13	0,103
<i>rpmG</i>	50S ribosomal subunit protein L33	0,33	0,09	0,027
<i>rplL</i>	50S ribosomal subunit protein L7	0,21	0,09	0,089
<i>rpsD</i>	30S ribosomal subunit protein S4	0,21	0,08	0,068
<i>rpsQ</i>	30S ribosomal subunit protein S17	0,18	0,07	0,088
<i>rmF</i>	ribosome modulation factor	-0,05	0,13	0,036

<i>mopA</i>	chaperone protein	0,22	0,07	0,047
<i>ppiB</i>	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	0,25	0,08	0,041

3.2.3. Validation des analyses transcriptomiques par RT-qPCR

3.2.3.1. Expression relative de 9 gènes candidats

Dans le but de valider les analyses transcriptomiques réalisées chez les deux souches NA 124E MG1655 Δ *pgi* Δ *udhA* Δ *qor* Δ *edd* *nuoF** *rpoA** et NA 142 MG1655 Δ *pgi* Δ *udhA* Δ *qor* Δ *edd* *nuoF**, neuf gènes candidats ont été choisis pour confirmer leur niveau d'expression en fonction de la présence ou non du gène évolué *rpoA** (Tableau 44). L'analyse du niveau d'expression de ces neuf gènes candidats a été réalisée par des expériences de rétrotranscription et amplification de l'ADN avec une quantification en temps réel (RT-qPCR).

Ces analyses ont été étendues à la souche non évoluée NA 23 MG1655 Δ *pgi* Δ *udhA* Δ *qor* Δ *edd* et à la souche reconstruite NA 175 MG1655 Δ *pgi* Δ *udhA* Δ *qor* Δ *edd* *rpoA** afin de voir si l'impact de *rpoA** sur l'expression des gènes est le même en fonction ou non de la présence de *nuoF**.

Tableau 44 : Gènes candidats pour la quantification relative des ARNm par RT-qPCR.

La couleur de fond où sont inscrits les gènes fait référence à des familles de fonction ; blanc : régulation transcriptionnelle ; gris très clair : voie de biosynthèse ; gris clair : cycle de Krebs ; gris : motilité et chimiotactisme ; gris foncé : ribosome ; gris très foncé : gènes de ménage dont l'expression est constante.

Gène	Fonction/produit
<i>nusA</i>	gène codant pour un facteur transcriptionnel régulant la terminaison de la transcription
<i>hfq</i>	gène codant pour une protéine se liant à l'ARN impliquée dans de nombreux processus cellulaires
<i>mtfA</i>	gène codant pour un facteur régulateur de Mlc
<i>purU</i>	gène impliqué dans la voie de synthèse du THF
<i>metE</i>	gène impliqué dans la voie de synthèse de la méthionine
<i>sdhA</i>	gène codant pour la sous-unité de la succinate déshydrogénase
<i>cheA</i>	gène codant pour une histidine kinase impliquée dans le chimiotactisme
<i>flhD</i>	gène codant pour un activateur de la transcription du régulon de la biosynthèse du flagelle
<i>rpmG</i>	gène codant pour une sous-unité protéique de la sous-unité 50S du ribosome
<i>rrsA</i>	gène codant pour l'ARN ribosomal 16S (gène contrôle de ménage)
<i>rpoD</i>	gène codant pour une sous-unité de l'ARN polymérase (gène contrôle de ménage)

Les neuf gènes ont été choisis de façon à ce que les grandes familles de fonctions identifiées comme transcriptionnellement modifiées, lors des analyses sur puces à ADN, soient bien représentées.

L'expression des neuf gènes chez les souches NA 23, NA 175, NA 142 et NA 124E a été quantifiée de façon relative par rapport aux niveaux d'expression des gènes de la souche NA 23 en utilisant alternativement *rpoD* et *rrsA*, gènes de ménage de référence. Chaque mesure a été effectuée en duplicat biologique, c'est-à-dire que deux lots indépendants d'ARN ont été extraits pour chaque souche.

3.2.3.2. Profil d'expression des souches NA 142 et NA 124E

En utilisant le niveau d'expression des gènes de la souche NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd$ comme référence, le profil d'expression de la souche NA 142 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd nuoF^*$, peut être comparé indirectement à celui de NA 124E MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd nuoF^* rpoA^*$. Les conclusions de l'impact de $rpoA^*$ chez la souche NA 124E par rapport à la souche NA 142 sont présentées dans le Tableau 45 où les rapports d'expression des gènes obtenus par RT-qPCR sont comparés avec ceux obtenus par puces à ADN.

Tableau 45 : Expression relative des gènes des souches NA 124E MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd nuoF^* rpoA^*$ par rapport à ceux de la souche NA 142 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd nuoF^*$.

Les gènes surexprimés chez la souche NA 124E sont indiqués sur fond gris foncé. Les gènes réprimés chez la souche NA 124E sont indiqués sur fond gris clair. Les gènes dont l'expression est inchangée sont indiqués sur fond blanc.

Gène	Fonction	Ratio RT-qPCR	Ratio « puces à ADN »
<i>rpmG</i>	sous-unité ribosomale 50S	~ 5	2,13
<i>hfq</i>	Protéine régulatrice interagissant avec l'ARN	~ 1	1,59
<i>metE</i>	methionine synthase	~ 2	1,59
<i>nusA</i>	facteur de terminaison de la transcription	~ 3	1,54
<i>purU</i>	Formyltetrahydrofolate deformylase	~ 2,5	1,47
<i>mtfA</i>	facteur régulateur de Mlc	~ 0,2	0,65
<i>flhD</i>	Régulateur transcriptionnel de l'opéron « flagelle »	~ 0,01	0,57
<i>sdhA</i>	succinate déshydrogénase	~ 0,17	0,25
<i>cheA</i>	Histidine kinase impliquée dans le chimiotactisme	~ 0,005	0,13

Les tendances de sous/sur-expression indiquées par les données transcriptomiques globales sont donc confirmées par les analyses de RT-qPCR sauf pour le gène *hfq*.

3.3. Interprétations et discussion

3.3.1. Exploitation des données transcriptomiques globales et de RT-qPCR

3.3.1.1. Sensibilité comparée des deux méthodes d'analyses

De manière générale, les différences d'expression de gènes relevées par les analyses RT-qPCR sont plus accentuées que celles des données transcriptomiques globales. Par exemple d'après les données transcriptomiques globales, le gène *rpmG* est surexprimé d'un facteur 2 chez la souche NA 124E MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd nuoF^* rpoA^*$, contre un facteur 5 selon les analyses RT-qPCR. De même, le gène *cheA* serait environ 200 fois plus exprimé dans NA 142 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd nuoF^*$ que dans NA 124E MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd nuoF^* rpoA^*$, alors que ce facteur n'est que de 8 selon les analyses de transcriptomique globale.

La comparaison des deux méthodes analytiques a déjà fait l'objet de plusieurs études antérieures qui dénotent aussi une différence de sensibilité entre les deux méthodes d'analyses (Chuaqui *et al.*, 2002). Les analyses sur puces à ADN peuvent faire ressortir un défaut dans la précision des résultats car des hybridations non spécifiques peuvent être responsables d'une augmentation du bruit de fond dans les signaux d'hybridation.

3.3.1.2. Extrapolation aux souches NA 23 et NA 175

La tendance imprimée par *rpoA** chez la souche évoluée NA 124E MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd nuof^* rpoA^*$ est-elle comparable à celle existante chez la souche reconstruite NA 175 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd rpoA^*$? Pour répondre à cette question, les niveaux d'expression relatifs des gènes de la souche non évoluée NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd$ sont comparés avec ceux de la souche NA 175 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd rpoA^*$ (Tableau 46).

Tableau 46 : Expression relative des gènes des souches NA 175 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd rpoA^*$ par rapport à ceux de la souche NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd$.

Les gènes surexprimés chez la souche NA 175 sont indiqués sur fond gris foncé. Les gènes réprimés chez la souche NA 175 sont indiqués sur fond gris clair.

Gène	Fonction	Ratio RT-qPCR
<i>rpmG</i>	sous-unité ribosomale 50S	~ 3,5
<i>hfq</i>	Protéine régulatrice interagissant avec l'ARN	~ 1,5
<i>metE</i>	methionine synthase	~ 4,5
<i>nusA</i>	facteur de terminaison de la transcription	~ 3,5
<i>purU</i>	Formyltetrahydrofolate deformylase	~ 4
<i>mtfA</i>	facteur régulateur de Mlc	~ 0,3
<i>flhD</i>	Régulateur transcriptionnel de l'opéron « flagelle »	~ 0,01
<i>sdhA</i>	succinate déshydrogénase	~ 0,5
<i>cheA</i>	Histidine kinase impliquée dans le chimiotactisme	~ 0,5

L'influence de *rpoA** chez les souches NA 124E MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd nuof^* rpoA^*$ et NA 175 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd rpoA^*$ est similaire pour ces 9 gènes candidats, donc il est possible que cela puisse s'extrapoler à l'ensemble des gènes.

La surexpression de *hfq* chez la souche NA 124E MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd nuof^* rpoA^*$ par rapport à la souche NA 142 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd nuof^*$, révélée par l'analyse transcriptomique, est ici vérifiée entre les souches NA 175 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd rpoA^*$ et NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd$. Ceci laisserait supposer que *rpoA** est bien responsable d'une augmentation de l'expression de *hfq*.

3.3.1.3. Précision et confiance des données transcriptomiques sur lames

Malgré les quatre répétitions sur quatre lots d'échantillons indépendants par souche, la confiance des résultats de transcriptomique n'est pas totale, avec des rapports d'expression de gènes ayant des p-values importantes.

La question de l'état d'expression de certains gènes dont les opérons ont été identifiés comme étant significativement activés ou réprimés, peut être posée. Par exemple, les opérons impliqués dans la synthèse du flagelle (*flgBC_EFG_IJK_*), et codant pour les deux enzymes, la succinate déshydrogénase (*sdhABC_*) et la 2-oxoglutarate déshydrogénase (*sucABC_*), sont largement représentés dans les analyses avec les gènes indiqués significativement réprimés ; il y a donc de forte chance que les autres gènes des opérons respectifs *flgD*, *flgL*, *sdhD* et *sucD* soient aussi soumis aux mêmes répressions que les autres gènes.

Il faut donc être prudent avec les résultats transcriptomiques issus des analyses sur lame car certains gènes dits « faux négatifs » peuvent avoir un rôle important dans le contexte de surproduction de NADPH.

3.3.2. Interprétations des données transcriptomiques

Les analyses transcriptomiques, confirmées par les résultats de quantification relative par RT-qPCR, indiquent que *rpoA** est responsable d'un ajustement transcriptionnel important avec la modification de l'expression de plus de 150 gènes. Connaissant l'impact physiologique de *rpoA**, sur une souche possédant *nuoF* ou *nuoF**, il est intéressant d'étudier s'il existe une corrélation entre les modifications transcriptionnelles et physiologiques.

3.3.2.1. Répression catabolique

RpoA est connue pour jouer un rôle primordial dans l'action du facteur CRP, régulateur catabolique chez *E. coli*. La mutation *rpoA** peut donc avoir des effets sur l'action de CRP et donc sur la régulation de la répression catabolique.

De plus, d'après les analyses transcriptomiques globales, *rpoA** serait responsable de la surexpression significative du gène *hfq*. Le produit de ce gène, le facteur hôte I/Q (Hfq), joue un rôle essentiel dans les mécanismes de régulation générale chez *E. coli* (Vecerek *et al.*, 2008). Il est impliqué dans le contrôle de la stabilité de plusieurs ARNms et de courts ARNs régulateurs non codant (ARNncs), et dans la riborégulation d'ARNms cibles par certains ARNncs. Le facteur Hfq stimule la formation du complexe ribonucléoprotéique formé par l'ARNnc SgrS et la ARNase E conduisant à la dégradation rapide de l'ARNm *ptsG en se fixant* sur la séquence de Shine-Dalgarno de ce dernier (Maki *et al.*, 2008 ; Morita *et al.*, 2005). Comme l'ARNnc SgrS est induit en réponse à l'accumulation de glucose-6-phosphate (Vanderpool, 2007), la surexpression de *hfq* dans une souche MG1655 Δ *pgi* qui accumule ce sucre phosphorylé pourrait conduire à une répression du PTS encore plus importante.

De plus, le gène *mtfA* (*yeeI*) est réprimé par *rpoA** ; le facteur MtfA est connu pour interagir avec le répresseur Mlc, qui réprime l'expression du gène *ptsG* codant pour une sous-unité du complexe transporteur de glucose dans la bactérie (Becker *et al.*, 2006).

Ainsi en présence de *rpoA**, la sous-expression du gène *mtfA*, la surexpression du gène *hfg* et la répression de plusieurs gènes impliqués dans le cycle de Krebs (répression qui pourrait être une conséquence de *rpoA** sur CRP) pourraient aussi avoir des impacts négatifs sur le catabolisme du glucose chez la souche possédant *rpoA**.

L'avantage sélectif de l'inhibition du catabolisme chez une souche accumulant du NADPH est probablement de diminuer les flux cataboliques et par conséquent diminuer les flux de production de NADPH.

3.3.2.2. Augmentation des besoins biosynthétiques

L'augmentation du rendement en biomasse $Y_{X/S}$ et la diminution du rapport NADPH/NADP⁺ chez les souches possédant la mutation *rpoA** sont peut-être une conséquence de réajustements transcriptomiques.

En effet, l'augmentation du rendement biomasse-glucose $Y_{X/S}$ peut être liée à la surexpression de gènes impliqués dans les voies de biosynthèse d'acides aminés, telles que l'histidine, la méthionine et la thréonine. Cela expliquerait un rendement en biomasse sur glucose consommé élevé chez les souches NA 175 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd rpoA*$ NA 124E MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd nuoF* rpoA*$.

L'augmentation des besoins biosynthétiques de la cellule pourrait ainsi conduire à une hausse des besoins en NADPH dans la cellule, ce qui compenserait, tout ou en partie, les fortes productions de NADPH par le catabolisme des souches modifiées.

3.3.2.3. Répression des fonctions de motilité et chimiotactisme

RpoA* est responsable de la forte répression de gènes impliqués dans la synthèse et l'assemblage des flagelles, ainsi que dans la fonction de chimiotactisme cellulaire, fonctions connues pour être grandes consommatrices d'énergie.

Le gène *flhD* sous-exprimé chez la souche NA 124E MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd nuoF* rpoA*$ semble important car il fait partie d'un complexe d'activation de la transcription des autres gènes impliqués dans la synthèse du flagelle.

Le couple FlhD/FlhC est aussi connu pour réguler des gènes impliqués dans le métabolisme, notamment dans le cycle de Krebs et dans la voie d'Entner-Doudoroff (Prüss *et al.*, 2003)

De plus, il a été montré que la région codant pour les gènes *flhDC* est instable dans certaines conditions car les fonctions régulées par ces gènes sont sujettes à de fortes pressions de contre sélection (Hobman *et al.*, 2007). L'énergie économisée par la non opérativité de ces fonctions peut ainsi être destinée à la croissance (Gauger *et al.*, 2007).

D'autres fonctions, à priori inutiles pour la bactérie se développant sur glucose, comme le transport et la dégradation des sucres, tels que le galactitol, le maltose et le ribose, sont aussi fortement inhibées chez les souches possédant *rpoA**.

Un avantage adaptatif de *rpoA** pourrait donc être de faire économiser de l'énergie à la bactérie en réprimant les fonctions inutiles consommatrices d'énergie, lui permettant ainsi de rediriger ce surplus énergétique vers la croissance ou d'autres mécanismes régulateurs.

3.3.3.L'ARNP : cible privilégiée de l'évolution adaptative

3.3.3.1. Ajustements transcriptionnels suite à des mutations dans l'ARNP

Les analyses transcriptomiques ont mis en évidence que *rpoA** affecte l'expression de facteurs de transcription impliqués dans la régulation de nombreux gènes. Ainsi, la surexpression des facteurs NusA et Hfq ainsi que la répression des facteurs FdhC et MtfA peuvent amener à de nombreux effets pléiotropiques, qui ne sont pas causés directement par des interactions de la protéine évoluée RpoA* au niveau de la transcription.

Par exemple, le facteur NusA joue un rôle primordial dans le contrôle de l'élongation et la terminaison des transcrits, en interagissant avec les sous-unité β , β' et avec le domaine α CTD (Eisenmann *et al.*, 2005). Sa surexpression peut donc avoir un impact significatif sur la régulation de la transcription par le biais de la fonction de terminaison.

Herring *et al.* (2006) ont montré que des mutations dans les gènes *rpoB* et *rpoC*, codant respectivement pour les sous-unités β et β' de l'ARNP, ont un fort impact positif sur l'adaptation d'*E. coli* sur glycérol par le biais d'ajustements transcriptomiques. Les fonctions de motilité, de résistance à l'acide, de croissance en phase stationnaire sont significativement représentées par plusieurs gènes réprimés, alors que les fonctions de maturation des protéines et structuration des ribosomes ont plusieurs gènes surexprimés (Fong *et al.*, 2005). Il est intéressant de voir que ce schéma d'ajustements transcriptionnels, avec notamment la sous-régulation de la fonction de motilité et la sur-régulation des protéines ribosomiales, se retrouve aussi en présence de *rpoA**, comme si la régulation de ces fonctions était une cible clef de l'adaptation de la bactérie face à une ou des contraintes métaboliques.

3.3.3.2. Mutagenèse aléatoire dans RpoA : outil d'ingénierie métabolique

Les récents travaux de Klein-Marcusamer *et al.* (2009) ont démontré l'intérêt de réaliser des banques de mutants du gène *rpoA*, générées par mutagenèse aléatoire, pour améliorer des phénotypes d'intérêt. Ces mutations ont rendu possible la sélection de mutants dont les capacités métaboliques sont améliorées respectivement pour la tolérance au butanol, pour l'accumulation d'acide hyaluronique et pour la production de L-tyrosine. Ces phénotypes sont conférés par des mutations dans le gène *rpoA* au niveau de la séquence codante pour le domaine α CTD. La modification des propriétés structurales du domaine α CTD qui est impliqué dans l'initiation de la transcription par contact avec des régions promotrices de l'ADN et des protéines activatrices va ainsi modifier les propriétés régulationnelles de RpoA.

Dans la présente étude, plusieurs mutations dans *rpoA*, survenues aléatoirement lors de l'évolution adaptative de la souche NA 23 MG1655 Δ *pgi* Δ *dudhA* Δ *qor* Δ *edd*, ont été mises en évidence pour être bénéfiques par rapport à la contrainte métabolique d'accumulation du NADPH. Les analyses transcriptionnelles ont permis de mieux appréhender les conséquences de la mutation *rpoA** en révélant des modifications d'expression de gènes significatives.

Les nouveaux phénotypes complexes obtenus par ces différents mutants de *rpoA* posent la question de la potentialité de RpoA à subvenir à diverses contraintes métaboliques par modification de sa séquence protéique. Ainsi, n'existerait-il pas chez *E. coli* des mécanismes régulés par des conditions de stress permettant d'introduire une diversité génétique dans des gènes cibles, comme ceux codant pour l'ARNP, pour conférer un avantage adaptatif à la bactérie ?

Récemment, des théories de l'apparition non aléatoire de mutations, apparition liée au stress, sont mises en avant pour expliquer la diversité génétique apparue après adaptation (Brisson, 2003 ; Wright, 2004).

Chapitre V

Réarrangements métaboliques survenus lors de l'évolution adaptative

1. Analyses de flux métaboliques par expériences de marquage isotopique

Les bases génétiques et moléculaires de l'évolution *in vivo* de la souche NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ ont été établies par l'identification et la caractérisation des mutations adaptatives responsables de l'évolution.

La caractérisation des mutations $nuoF^*$ et de $rpoA^*$ a été effectuée individuellement par une caractérisation *in vitro* et *in vivo* du complexe évolué et par des analyses transcriptomiques sur les conditions $rpoA/rpoA^*$, respectivement. Les impacts des deux mutations seules ou combinées ont été étudiés au niveau des paramètres physiologiques de croissance des souches évoluée, non évoluée et reconstruites, ce qui a permis de mieux comprendre les conséquences de l'apparition de ces deux mutations dans un génotype MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$.

Afin d'approfondir l'étude de l'évolution *in vivo* de la souche NA 23, des études comparées d'analyse de flux par marquage isotopique ont été effectuées chez la souche évoluée NA 124E MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd nuoF^* rpoA^*$, la souche non évoluée NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd$ et les souches reconstruites NA 175 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd rpoA^*$ et NA 142 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd nuoF^*$. L'outil d'analyse fluxomique a ainsi permis de déterminer les mécanismes de compensation métabolique due à l'apparition respective des mutations $nuoF^*$ et $rpoA^*$ en réponse à l'accumulation de NADPH.

Les équilibres des cofacteurs NADP(H) et NAD(H) ont été étudiés en détail grâce à des mesures combinées de flux et de dosages intracellulaires, pour évaluer le degré de perturbation de l'équilibre des pools NAD(H) et NADP(H) dans les différentes souches.

La double approche d'étude du métabolisme central par l'étude des flux métaboliques et par l'étude des cofacteurs NAD(H) et NADP(H) a permis de proposer un modèle métabolique sur les mécanismes d'adaptation mis en place par la bactérie pour compenser la contrainte métabolique d'accumulation de NADPH.

1.1. Principes généraux

Les principes généraux des analyses de flux par expériences de marquage isotopique sont basés sur l'étude des marquages isotopiques des métabolites formés lors de la culture bactérienne sur une source de carbone enrichie en ^{13}C . Les métabolites intermédiaires du catabolisme du glucose sont éphémères à l'échelle de la croissance cellulaire, donc seuls les métabolites finaux présents majoritairement seront étudiés, i.e. les protéines. La distribution isotopique du carbone dans les différents acides aminés protéinogéniques reflète l'activité réelle du métabolisme dans les conditions de l'étude. Les flux sont calculés grâce à un modèle mathématique permettant de relier les informations de marquage aux vitesses réelles des réactions métaboliques.

Le principe général de l'analyse des flux par marquage au ^{13}C a été présenté en détail dans plusieurs revues (Sauer, 2006 ; Wiechert, 2001a et 2001b).

1.1.1. Réseau métabolique étudié

Le réseau métabolique définit le cadre de l'étude des analyses de flux car sa nature va conditionner l'ensemble des réactions métaboliques considérées (Figure 55). Le réseau choisi pour les analyses des flux sur glucose chez *E. coli* contient les voies principalement étudiées, à savoir la glycolyse, la voie des pentoses-phosphates, le cycle de Krebs et les voies anaplérotiques (Al Zaid Siddiquee *et al.*, 2004 ; Emmerling *et al.*, 2002 ; Zhao *et al.*, 2004). Le réseau d'étude inclut aussi les voies secondaires, telles que les voies du glyoxylate et d'Entner-Doudoroff, pouvant s'activer dans les situations physiologiques de souches dont les besoins en NADPH sont inférieurs aux flux de production (Fischer & Sauer, 2003 ; Fong *et al.*, 2006 ; Hua *et al.*, 2003).

1.1.2. Définition et simplification liées à l'état stationnaire

L'état stationnaire métabolique est défini comme un état où la concentration de tous les métabolites intracellulaires reste stable. Il n'y a pas d'accumulation de métabolites intermédiaires, donc la somme des flux entrants est égale à celle des flux sortants. Les équations de conservation de la matière deviennent linéaires aboutissant à des simplifications mathématiques conséquentes. De plus, le flux d'une voie métabolique est constitué de la somme des vitesses des réactions individuelles. Un seul flux global peut alors être considéré pour l'ensemble des réactions métaboliques constituant une séquence linéaire.

L'état stationnaire isotopique est défini comme un état où les marquages isotopiques sont stables pour tous les métabolites intracellulaires. Le marquage isotopique des produits terminaux des voies métaboliques, les acides aminés protéinogéniques, peut être directement corrélé avec le marquage des précurseurs métaboliques correspondants (Szyperski, 1995).

1.1.3. Réduction du réseau d'étude

Le réseau métabolique est défini par la nature et le nombre de flux métaboliques qui le constituent. Des données disponibles sur certains flux permettent de réduire la structure du réseau métabolique. Il a été montré que dans certaines conditions physiologiques, des voies métaboliques sont considérées comme latentes : par exemple la voie du glyoxylate est inactive chez la souche sauvage MG1655 en croissance en excès de glucose (Fischer & Sauer, 2003).

Les souches d'étude, la souche évoluée NA 124E MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd nuof^* rpoA^*$, la souche non évoluée NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd$ et les souches reconstruites NA 175 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd rpoA^*$ et NA 142 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd nuof^*$, ont les deux gènes *pgi* et *edd* inactivés. Les flux de la glycolyse et de la voie d'Entner-Doudoroff correspondants peuvent donc être supposés comme nuls dans ces souches. Des calculs de flux préliminaires ont été effectués sur l'ensemble du réseau métabolique pour évaluer si la présence des différentes voies du réseau est compatible avec les données de marquage. Ces calculs se sont essentiellement concentrés sur la voie d'Entner-Doudoroff, la première étape de la glycolyse, les voies anaplérotiques et la voie du glyoxylate, voies qui pourraient être inactives chez les souches étudiées. Les calculs préliminaires ainsi effectués ont montré qu'à partir des données isotopiques, les flux à travers la voie d'Entner-Doudoroff et la première étape de la glycolyse tendent vers 0 quelle que soit la souche considérée (Tableau 47). Les valeurs de flux dans la voie d'Entner-Doudoroff sont toutefois non négligeables chez les souches NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd$ et NA 175 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd rpoA^*$, mais cela pourrait être un artefact de la modélisation dû aux faibles vitesses de consommation du glucose dans ces deux souches.

Tableau 47 : Analyse d'identifiabilité des flux nets à travers la phosphoglucoisomérase (emp1), la voie d'Entner-Doudoroff, les voies anaplérotiques (ppc, pck et malE), et la voie du glyoxylate (en% du q_s).

Flux \ Souche	NA0124E	NA0023	NA0175	NA0142
emp1	0 ± 3	0 ± 5	0 ± 3	0 ± 3
Voie d'Entner-Doudoroff	2 ± 4	14 ± 5	14 ± 4	0 ± 3
ppc	29 ± inf.	0 ± 3	39 ± 2	8 ± inf.
pck	0 ± inf.	69 ± 7	15 ± 6	0 ± inf.
malE	17 ± inf.	16 ± 5	5 ± 7	31 ± inf.
Voie du glyoxylate	16 ± 2	92 ± 3	14 ± 3	45 ± 1

La première étape de la glycolyse (emp1) et la voie d'Entner-Doudoroff (edp) peuvent donc être retirées du réseau métabolique d'étude en fixant comme contraintes que ces flux soient nuls.

Les voies anaplérotiques sont mal définies d'après les données de marquage, avec des déviations calculées sur les flux très importantes, notamment chez les souches NA 142 et NA 124E. En effet, il est impossible de différencier le pyruvate du phosphoénolpyruvate, et le malate de

l'oxaloacétate par les données isotopiques protéinogéniques. Ceci rend difficile une résolution précise des flux des voies anaplérotiques. Pour les analyses de flux présentées par la suite, les flux ppc et pck ont été laissés libres de telle manière à ne pas introduire de biais dans la modélisation.

1.2. Cohérence des analyses de flux (Cécile Nicolas, 2007)

A l'issue du travail d'identifiabilité, les flux métaboliques intracellulaires (Tableau 48) ont été calculés pour les quatre souches accumulant le NADPH (Figure 56) à partir du réseau métabolique établi dans la Figure 55. La cohérence des résultats a été vérifiée suivant trois critères : la valeur du résidu de minimisation, le contrôle de cohérence de la consommation des différents substrats marqués/non marqué (cohérence du marquage isotopique) et l'analyse de la sensibilité (déviations sur chaque flux).

1.2.1. Résidus de minimisation

Le calcul des flux est réalisé sur la base de la simulation des données isotopiques et de la minimisation des écarts entre valeurs simulées V_i^{calc} et valeurs expérimentales V_i^{exp} (réconciliation de données). La qualité de la simulation est évaluée à partir du résidu de minimisation (R) qui tient compte à la fois de la différence entre données expérimentales et données calculées et des valeurs de déviation sur les données de marquage :

$$R = \sum_i \frac{(V_i^{calc} - V_i^{exp})^2}{deviation_i^2}$$

Les résidus de minimisation obtenus pour l'ensemble des quatre simulations sont présentés dans le Tableau 48. Ce tableau montre à la fois le résidu global (R) sur l'ensemble des données, et le résidu moyen (RM) obtenu en divisant R par le nombre de données de marquage utilisées (soit 149). Hormis pour la souche NA 23 qui présente un résidu de minimisation plus important, probablement à cause de sa faible vitesse de consommation du glucose, les valeurs des résidus sont similaires. Ces valeurs sont proches des valeurs usuellement publiées (Hua *et al.*, 2003).

Tableau 48 : Résidu de minimisation global (R) et résidu de minimisation moyen par donnée isotopique (RM) obtenus sur les quatre différentes souches.

	NA 23	NA 175	NA 142	NA 124E
R	874	536	574	522
RM	5,7	3,6	3,9	3,5

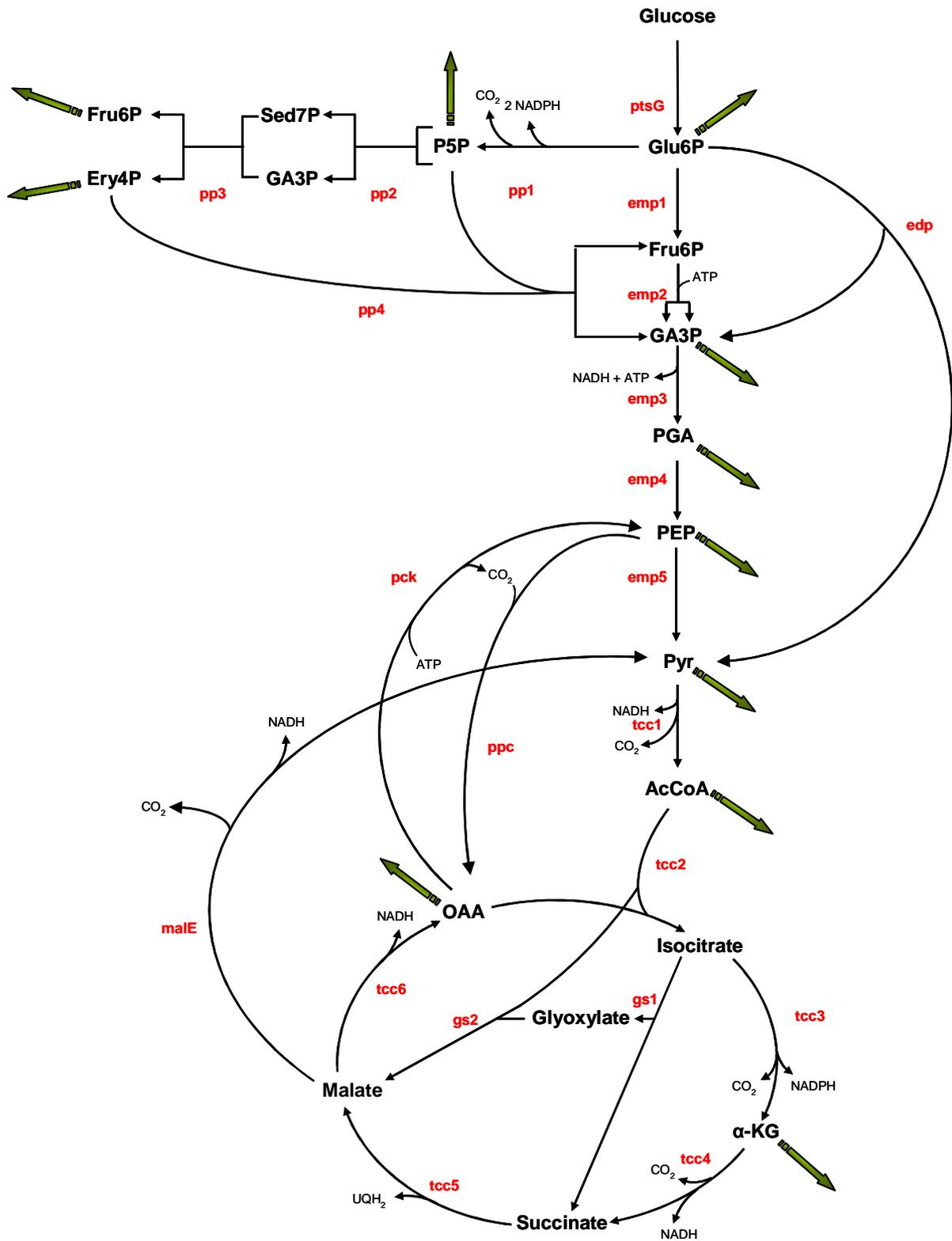


Figure 55 : Réseau métabolique central d'*E. coli* simplifié.

Les abréviations en minuscules correspondent à une réaction métabolique catalysée par une enzyme (abréviation = une enzyme) ou à une succession de réactions (abréviation = un substrat transformé en produit). Les abréviations sont décrites dans le Tableau 49. Les flèches vertes représentent les sorties vers la biomasse (voir Figure 6 du Chapitre I pour les acides aminés correspondants).

Tableau 49 : Abréviations des enzymes et des réactions utilisées dans les schémas du réseau métabolique d'*E. coli*.

Abréviation	Enzymes/réactions correspondantes
ptsG	transporteur du glucose
emp1	phosphoglucoisomérase
emp2	transformation du fructose-6-phosphate en glycéraldéhyde-3-phosphate
emp3	transformation du glycéraldéhyde-3-phosphate en 3-phosphoglycérate
emp4	transformation du 3-phosphoglycérate en phosphoénolpyruvate
emp5	pyruvate kinase
pp1	transformation du glucose-6-phosphate en ribulose-5-phosphate
pp2	transformation du ribulose-5-phosphate en glycéraldéhyde-3-phosphate et en sedoheptulose-7-phosphate
pp3	transaldolase
pp4	transcétolase
edp	voie d'Entner-Doudoroff
tcc1	pyruvate déshydrogénase
tcc2	transformation de l'acétyl-CoA en isocitrate
tcc3	isocitrate déshydrogénase
tcc4	transformation de l'alpha-cétoglutarate en succinate
tcc5	transformation du succinate en malate
tcc6	malate déshydrogénase
gs1	cycle du glyoxylate
gs2	cycle du glyoxylate
ppc	phosphoénolpyruvate carboxylase
pck	phosphoénolpyruvate carboxykinase
malE	enzyme malique

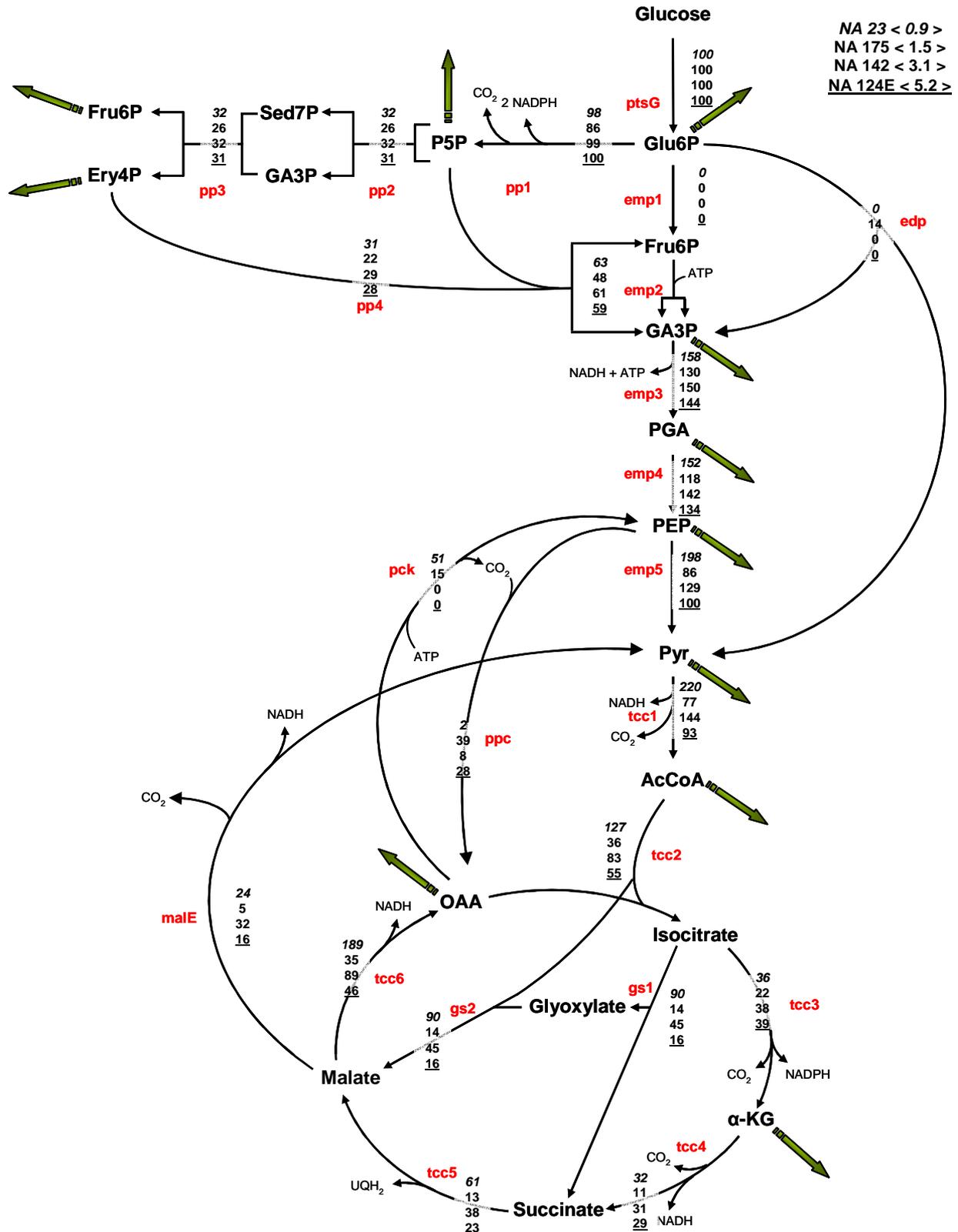


Figure 56 : Distribution des flux nets dans la souche non évoluée NA 23 MG1655 Δ pgi Δ dudhA Δ qor Δ edd, les souches reconstruites NA 175 MG1655 Δ pgi Δ dudhA Δ qor Δ edd rpoA* et NA 142 MG1655 Δ pgi Δ dudhA Δ qor Δ edd nuoF* et la souche évoluée NA 124E MG1655 Δ pgi Δ dudhA Δ qor Δ edd nuoF* rpoA*.

Les flux sont exprimés en pourcentage du flux de consommation de glucose (indiqués entre crochets en haut à droite en $\text{mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Les valeurs sont données pour l'ensemble des 4 souches (de haut en bas): la première valeur en italique correspond à la souche non évoluée NA 23, la deuxième valeur à la souche NA 175, la troisième à la souche NA 142 et la quatrième soulignée correspond à la souche évoluée NA 124E.

1.2.2. Cohérence du marquage isotopique

Lors des simulations à partir des données isotopiques, les proportions du glucose froid, du [U-¹³C]glucose et du [1-¹³C]glucose n'ont pas été fixées. Un flux de consommation issu des données de simulation a été attribué pour les trois différents substrats glucose. Ces flux sont recalculés à partir des données de marquage, ce qui permet de s'assurer que les données isotopiques mesurées sont cohérentes avec la composition des différents glucoses. En effet, si les données sont cohérentes, les proportions de flux calculés de consommation de glucose froid, de [U-¹³C]glucose et de [1-¹³C]glucose doivent être proches de 50%, 40% et 10%, respectivement. Le tableau 50 confirme bien ces proportions pour les quatre souches, les valeurs de ces flux étant très proches de celles attendues.

Tableau 50 : Pourcentage des flux de consommation de chacune des formes marquées ou non du glucose.

	NA 23	NA 175	NA 142	NA 124E
Glucose froid	48,3%	50,1%	49,8%	50,1%
[1-¹³C] glucose	38,4%	39,5%	39,9%	40,1%
[U-¹³C] glucose	13,3%	10,4%	10,3%	9,9%

1.2.3. Analyse de sensibilité

L'analyse de sensibilité permet de déterminer l'intervalle de confiance sur la valeur des flux calculée, en tenant compte des variations expérimentales. Les résultats présentés dans le Tableau 51 montrent que les flux nets sont bien déterminés (la majorité des déviations sur les flux est inférieure ou autour des 10%) pour la glycolyse, la voie des pentoses-phosphates et le cycle de Krebs. Seuls les flux emp5 (pyruvate kinase) et tcc6 (malate déshydrogénase) sont mal déterminés avec des déviations supérieures à 10%.

En accord avec les données d'identifiabilité, les flux associés aux voies anaplérotiques (malE, ppc, pck et emp5), et à la malate déshydrogénase (tcc6), sont moins bien déterminés.

1.2.4. Modélisation propre à la souche NA 175 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd rpoA^*$

La première simulation du réseau métabolique de la souche NA 175 à partir des données de marquage isotopique a été effectuée sans les contraintes de flux $emp1 = 0$ et $edp = 0$, imposées par les délétions des gènes *pgi* et *edd*, respectivement (Tableau 51). L'ensemble des erreurs moyennes est faible comme en témoigne la Figure 57 représentant la répartition des erreurs normalisées. La courbe statistique de Gauss de ces données est bien meilleure que la gaussienne idéale.

Tableau 51 : Déviation calculée sur les flux (en% du flux).

	NA 23	NA 175	NA 142	NA 124E
ppp1	0%	6%	0%	0%
ppp2	0%	6%	0%	0%
ppp3	0%	6%	0%	0%
ppp4	0%	7%	0%	0%
emp1		inf.		
emp2	0%	7%	0%	0%
emp3	0%	3%	0%	0%
emp4	26%	17%	21%	11%
emp5	inf.	inf.	inf.	inf.
edp		30%		
tcc1	1%	3%	1%	2%
tcc2	6%	4%	0%	1%
tcc3	6%	16%	3%	5%
tcc4	7%	32%	3%	7%
tcc5	7%	6%	0%	1%
tcc6	inf.	14%	inf.	inf.
gs1	7%	19%	2%	12%
gs2	7%	19%	2%	12%
Ppc	inf.	6%	inf.	inf.
Pck	inf.	41%	inf.	inf.
MalE	inf.	inf.	inf.	inf.
prod_CO ₂	0%	0%	0%	0%

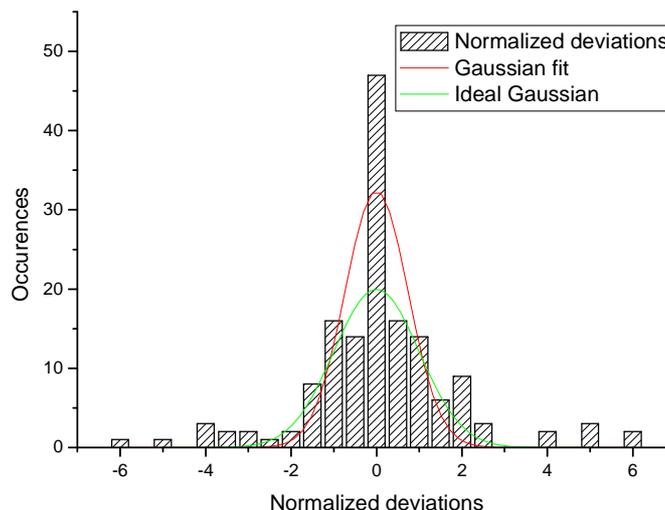


Figure 57 : Qualité statistique de la modélisation de la souche NA 175.

Cependant, la seconde simulation en imposant $emp1=0$ et $edp=0$ n'a pu aboutir. Cette souche semble présenter une différence importante avec les autres, en particulier, une vitesse de consommation du glucose (q_s) faible pour un taux de croissance relativement important. La différence réside probablement dans la composition de la biomasse de cette souche, pour laquelle le rendement biomasse-glucose est différent des autres souches.

La modélisation du flux du métabolisme de la souche NA 175 a donc été effectuée en laissant des degrés de liberté sur les flux $emp1$ et edp . La modélisation indique d'ailleurs que 14% du flux d'entrée de glucose est dirigé vers la voie d'Entner-Doudoroff, preuve supplémentaire que le modèle mathématique ne semble pas être le mieux adapté pour cette souche.

Hormis l'exception de la souche NA 175 et de la résolution des flux des voies anaérobies, l'ensemble des critères analysés pour évaluer la cohérence des données de flux calculés permet de valider les différentes cartes de flux obtenues. Celles-ci ont été exploitées pour comparer le comportement métabolique des différentes souches.

Les impacts individuels ou combinés des deux mutations $nuoF^*$ et $rpoA^*$ ont pu être examinés en détail, notamment sur les voies des pentoses-phosphates, le cycle de Krebs et la voie du glyoxylate.

1.3. Impacts des mutations sur le comportement métabolique des souches NA 23, NA 175, NA 142 et NA 124E

Il a été montré précédemment que les mutations *nuoF** et *rpoA** étaient responsables de l'évolution *in vivo* de la souche NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd$ avec des effets différents sur les paramètres physiologiques de la souche non évoluée. La sous-unité évoluée NuoF* introduit une nouvelle voie de réoxydation du NADPH, rétablissant significativement la croissance bactérienne ; alors que la sous-unité évoluée RpoA* engendre des ajustements transcriptionnels globaux, avec probablement une forte répression catabolique et une augmentation des besoins synthétiques.

Les impacts respectifs et combinés de ces mutations ont été étudiés au niveau du métabolisme central afin de voir si les modifications moléculaires observés pouvaient être reliées à des ajustements métaboliques.

La détermination des flux métaboliques par expériences de marquage isotopique au ^{13}C a donc été effectuée sur les quatre souches, souche non évoluée NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd$, les souches reconstruites NA 175 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd rpoA^*$ et NA 142 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd nuoF^*$ et la souche évoluée NA 124E MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd nuoF^* rpoA^*$, afin d'observer d'éventuels réarrangements fluxomiques imputables à *nuoF** et/ou *rpoA**. L'étude comparée des flux des quatre souches est présentée dans la Figure 59. Les flux métaboliques sont exprimés en pourcentage de la vitesse spécifique de consommation de glucose (q_s) pour permettre une comparaison relative entre les quatre souches qui possèdent des vitesses spécifiques de consommation du glucose très hétérogènes, avec des valeurs moyennes allant de 0,9 à 5,2 $\text{mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

1.3.1. Effets des mutations sur les voies de la glycolyse et d'Entner-Doudoroff

Les analyses de flux par expériences de marquage au ^{13}C valident la stratégie d'ingénierie métabolique visant à détourner la totalité du flux de glucose vers la voie des pentoses phosphates pour augmenter le flux de production de NADPH (sauf artefact de flux dans la voie d'Entner-Doudoroff pour la souche NA 175).

Dans les voies de la glycolyse et d'Entner-Doudoroff, peu de réarrangements majeurs sont à noter. L'adaptation d'*E. coli* face à des perturbations de la structure du réseau se traduit généralement par deux types d'ajustement métabolique : l'activation de voies préexistantes et l'induction de voies latentes, où les flux métaboliques sont respectivement faibles et inexistantes dans les conditions de référence.

Le réseau métabolique des souches MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd$ ne permet pas de réajustement métabolique au sein des voies de la glycolyse, des pentose-phosphates et d'Entner-Doudoroff, car les voies secondaires ou latentes de dégradation du glucose ont été inactivées.

Les modifications les plus significatives de part la présence de ces mutations, sont localisées au niveau du cycle de Krebs et du shunt glyoxylique. Ce comportement est habituel chez *E. coli* et a été fréquemment démontré lors de précédents travaux. En effet, soumise à des contraintes environnementales comme lors de cultures limitées en glucose ou sur acétate, la bactérie réagit par

l'ajustement des flux métaboliques au niveau du cycle de Krebs et des voies anaplérotiques (Fischer & Sauer, 2003 ; Sauer *et al.*, 1999 ; Zhao & Shimizu, 2003).

1.3.2. Effets sur le cycle de Krebs et le shunt glyoxylique

Le détail des modifications métaboliques au sein du cycle de Krebs et de la voie du glyoxylate est explicité dans la Figure 58, où les flux sont exprimés de façon absolue en $\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$.

Les flux métaboliques des souches NA 124E MG1655 $\Delta\text{pgi } \Delta\text{udhA } \Delta\text{qor } \Delta\text{edd } \textit{nuoF}^* \textit{rpoA}^*$ et NA 175 MG1655 $\Delta\text{pgi } \Delta\text{udhA } \Delta\text{qor } \Delta\text{edd } \textit{rpoA}^*$, sont sévèrement réduits à partir du pyruvate comparativement aux souches NA 23 MG1655 $\Delta\text{pgi } \Delta\text{udhA } \Delta\text{qor } \Delta\text{edd}$ et NA 142 MG1655 $\Delta\text{pgi } \Delta\text{udhA } \Delta\text{qor } \Delta\text{edd } \textit{nuoF}^*$, et relativement à leur taux de croissance respectif. Par conséquent, chez les souches NA 124E et NA 175, le flux entrant d'acétyl-CoA dans le cycle de Krebs représente respectivement 40% et 30% du flux de phosphoglycéraldéhyde, contre 85% et 60% pour les souches NA 23 et NA 142, respectivement.

Chez la souche non évoluée NA 23, le flux important de pyruvate est assuré par la contribution des voies anaplérotiques, avec un flux significatif de la phosphoénolpyruvate carboxykinase (pck) et un flux nul de la phosphoénolpyruvate carboxylase (ppc). En comparaison, chez la souche NA 124E, le flux pck est nul contrairement au flux ppc, induisant une fuite du phosphoénolpyruvate vers l'oxaloacétate, et non vers le pyruvate comme chez la souche NA 23.

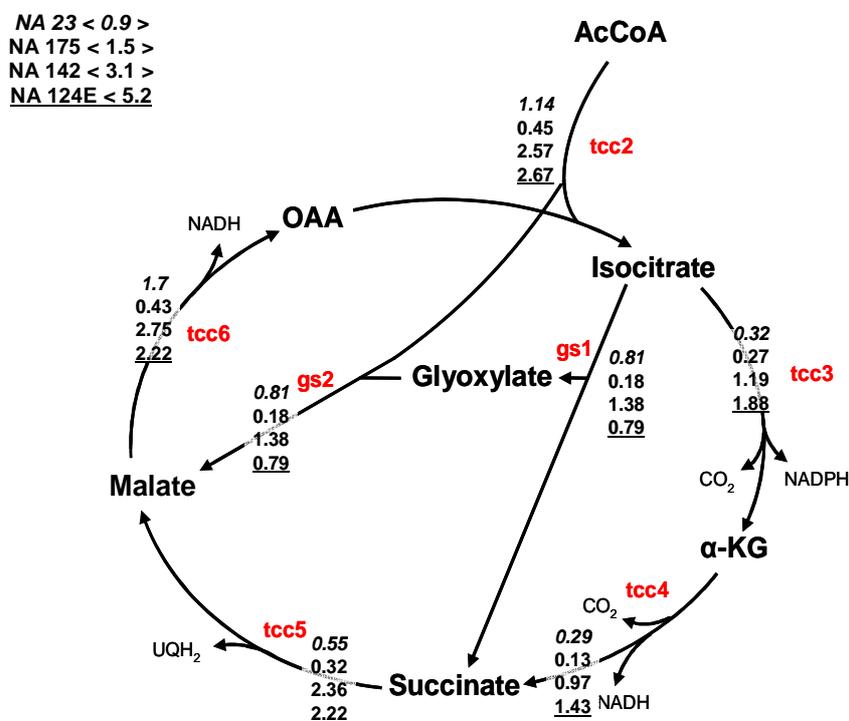


Figure 58 : Distribution des flux au niveau du cycle de Krebs et du shunt glyoxylique chez les mutants du métabolisme du NADPH en croissance exponentielle sur glucose.

Les flux sont exprimés de façon absolue en $\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Les valeurs sont données pour l'ensemble des 4 souches (de haut en bas): la première valeur en italique correspond à la souche non évoluée NA 23, la deuxième valeur à la souche NA 175, la troisième à la souche NA 142 et la quatrième valeur soulignée correspond à la souche évoluée NA 124E. Les valeurs respectives du q_s des différentes souches entre crochets sont exprimées en haut à gauche du schéma.

La comparaison des flux absolus met en évidence une forte inhibition de l'ensemble des flux du cycle de Krebs pour la souche NA 175. Les flux du cycle de Krebs de la souche NA 124E sont aussi relativement faibles par rapport à ceux de la souche NA 23 (plus particulièrement pour les flux à partir du succinate), sachant que cette dernière a une vitesse spécifique de consommation de glucose 5 fois moins importantes que la souche évoluée.

Le comportement du mutant NA 142 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd nuoF^*$ est proche de celui de la souche NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd$ avec des flux comparables au niveau du cycle de Krebs et au niveau du shunt glyoxylique, relativement à leurs vitesses de consommation de glucose respectives. Les flux absolus du shunt glyoxylique sont significativement plus élevés pour ces deux souches par rapport aux souches NA 175 et NA 124E. Le shunt glyoxylique est connu pour se mettre en place dans des conditions de faible disponibilité en substrat, ou de fortes productions de NADPH par rapport aux besoins biosynthétiques (Fischer & Sauer, 2003 ; Hua *et al.*, 2003). Les valeurs des flux relevés dans les 4 souches peuvent être directement reliés avec les ratios NADPH/NADP⁺ mesurés (Figure 59).

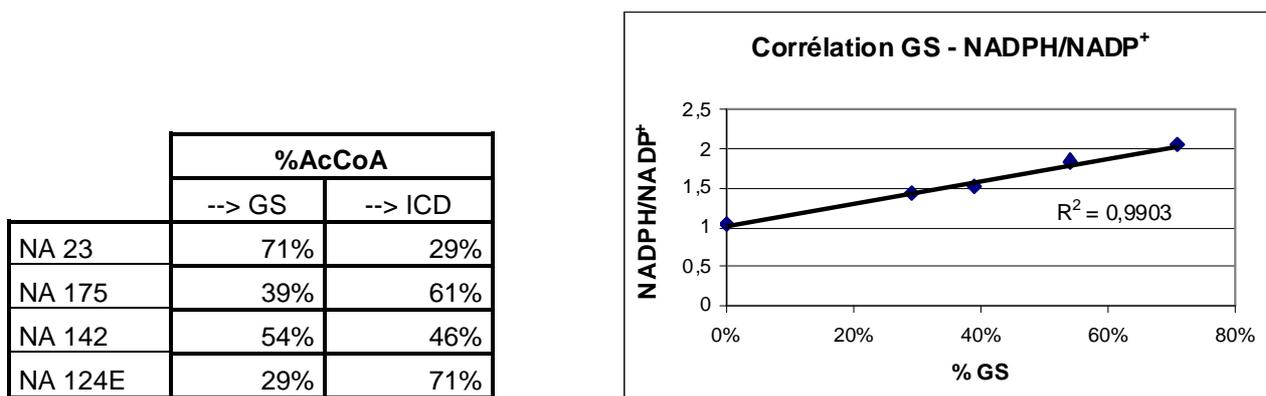


Figure 59 : Proportion du flux entrant dans le cycle de Krebs vers la voie du glyoxylate (GS) et corrélation avec le rapport NADPH/NADP⁺.

La souche sauvage MG1655 possède une voie du glyoxylate inactive (Fischer & Sauer, 2003), ce qui est corrélé avec la valeur du rapport NADPH/NADP⁺ de 1,05 trouvée dans la présente étude.

Les données calculées des flux de la voie du glyoxylate sont bien corrélées avec les valeurs expérimentales du rapport NADPH/NADP⁺ mesurées dans les différentes souches. Les réajustements observés au sein du cycle de Krebs en présence de *rpoA** sont donc liés avec la contrainte du rapport NADPH/NADP⁺, donnant ainsi une explication métabolique supplémentaire sur l'effet bénéfique de *rpoA**.

1.3.3. Discussion : corrélation fluxome-transcriptome

1.3.3.1. Répression catabolique

La mutation *rpoA** est responsable d'une inhibition générale du cycle de Krebs par le biais d'ajustements transcriptomiques. Ainsi, l'expression des gènes et des opérons *sdhABCD*, *gltA*,

sucABCD, *aceBAK* et *prpC* est, significativement ou potentiellement, réprimée en présence du gène évolué *rpoA** chez la souche NA 124E MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor nuoF^* rpoA^*$ (Tableau 52). A noter que l'expression de ces gènes est contrôlée par les facteurs CRP et/ou ArcA. Cette répression catabolique se traduit par des flux de carbone fortement diminués au niveau du cycle de Krebs et a pour conséquence une diminution de la capacité catabolique de ce dernier. Chez la souche NA 124E, ces capacités ne suffisent pas à métaboliser la totalité du flux de carbone, d'où un état métabolique de trop-plein, comme en témoigne la production d'acétate mesurée. Ce détournement du carbone du cycle de Krebs vers la production d'acétate peut être interprété comme un moyen de prévenir l'accumulation de NADH et de NADPH (el-Mansi & Holms, 1989).

Tableau 52 : Expression des gènes du cycle de Krebs modifiée par la mutation *rpoA chez la souche NA 124E MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd nuoF^* rpoA^*$.**

Le fond gris clair indique une surexpression du gène correspondant en présence de *rpoA**. Les gènes non retenus lors de l'analyse (p-value > 0,1) sont indiqués sur fond gris foncé, mais peuvent être potentiellement réprimés d'après l'écart-type des ratios.

Fonction cellulaire	Gène	Enzyme	log ₁₀ ratio	log ₁₀ error ratio	p-value	Activation CRP/ArcA
TCA						
	<i>sdhA</i>	succinate dehydrogenase	-0,67	0,08	0,003	CRP/ArcA
	<i>sdhB</i>	succinate dehydrogenase	-0,32	0,05	0,006	CRP/ArcA
	<i>sdhC</i>	succinate dehydrogenase	-0,65	0,07	0,003	CRP/ArcA
	<i>sdhD</i>	succinate dehydrogenase	-0,11	0,07	0,211	CRP/ArcA
	<i>sucA</i>	2-oxoglutarate dehydrogenase complex	-0,3	0,06	0,014	ArcA
	<i>sucB</i>	2-oxoglutarate dehydrogenase complex	-0,27	0,09	0,048	ArcA
	<i>sucC</i>	succinyl-CoA synthetase	-0,33	0,05	0,008	ArcA
	<i>sucD</i>	succinyl-CoA synthetase	-0,15	0,09	0,204	ArcA
	<i>prpC</i>	methylcitrate synthase	-0,4	0,04	0,003	CRP
	<i>gltA</i>	citrate synthase	-0,26	0,09	0,064	CRP/ArcA
	<i>aceB</i>	malate synthase A	-0,27	0,13	0,126	CRP/ArcA
	<i>aceA</i>	isocitrate lyase	-0,08	0,03	0,042	CRP/ArcA
	<i>aceK</i>	isocitrate dehydrogenase phosphatase / kinase	-0,18	0,02	0,007	CRP/ArcA

Chez la souche NA 124E, les valeurs de flux métaboliques au sein du cycle de Krebs peuvent être corrélées à la répression significative d'une douzaine de gènes codant pour des enzymes de ce cycle. La souche NA 175 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd rpoA^*$ possède aussi des vitesses de flux métaboliques diminuées au niveau du cycle de Krebs, ce qui confirme que *rpoA** est certainement à l'origine de la répression des gènes identifiés ci-dessus.

La sous-unité alpha évoluée RpoA* a probablement un impact sur l'action des facteurs de régulation CRP et ArcA, et donc sur l'initiation de la transcription des gènes contrôlés par ces deux facteurs. En effet, les gènes du cycle de Krebs réprimés chez la souche *rpoA** sont contrôlés, entre autre, par les facteurs ArcA et/ou CRP (cf. Chapitre IV – 3). Les modifications structurales de RpoA* pourraient modifier l'expression ou l'action de ces deux régulateurs, connus pour réguler de nombreux gènes impliqués dans le cycle de Krebs et responsables de la mise en place de la répression catabolique sur glucose chez *E. coli* (Perrenoud & Sauer, 2005).

1.3.3.2. Shunt glyoxylique

Une diminution du shunt glyoxylique est observée entre la souche NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd$ et les souches NA 142 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd nuoF^*$, NA 175 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd rpoA^*$ et NA 124E MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd nuoF^* rpoA^*$. La contribution des deux mutations à l'augmentation du flux de carbone via l'isocitrate déshydrogénase, et non via le shunt glyoxylique, est cumulative, avec une diminution respective de 15% et 32% pour les mutations $nuoF^*$ et $rpoA^*$. Comme démontré plus haut, le rééquilibrage des rapports NADPH/NADP⁺ semble être corrélé avec la diminution de l'activité du shunt glyoxylique.

Les ajustements transcriptionnels provoqués par $rpoA^*$ ont peut-être une influence sur l'activité du shunt glyoxylique. En effet, il a été montré précédemment que le gène évolué $rpoA^*$ est responsable de la répression significative du gène $aceK$, codant pour l'ICD kinase/phosphatase, connue pour participer à la régulation de l'activité de l'enzyme ICDH (Nimmo & Nimmo, 1984). Or AceK est aussi régulée allostériquement par le NADPH (Miller *et al.*, 2000), donc les effets combinés de la baisse du rapport NADPH/NADP⁺ et des ajustements transcriptionnels de la mutation $rpoA^*$ pourraient être responsables de la diminution significative du flux de carbone dans la voie du glyoxylate chez la souche évoluée NA 124E MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd nuoF^* rpoA^*$.

Les analyses des flux métaboliques chez les souches NA 23, NA 142, NA 175 et NA 124E ont permis de mettre en évidence les réarrangements fluxomiques opérés lors de l'évolution de la souche MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ dues aux deux mutations adaptatives $nuoF^*$ et $rpoA^*$.

Les ajustements métaboliques les plus significatifs ont été observés en présence de $rpoA^*$, notamment avec une répression des flux au niveau du cycle de Krebs et une augmentation relative de la proportion des flux via ICDH, par rapport à la voie du glyoxylate. Ces modifications métaboliques ont été corrélées avec des diminutions de l'expression des gènes du cycle de Krebs, probablement suite à un ajustement des schémas régulationnels de la répression catabolique par la sous-unité évoluée RpoA*.

Les données fluxomiques du métabolisme central des souches NA 23, NA 142, NA 175 et NA 124E permettent de déterminer les vitesses de flux métaboliques contrôlés par les enzymes impliquées dans la production des cofacteurs NADH et NADPH.

La partie suivante va étudier les vitesses de production et de consommation des cofacteurs NADH et NADPH, en se basant sur les résultats de mesures de flux et de dosages intracellulaires.

Une meilleure compréhension de la régulation des cofacteurs NAD(H) et NADP(H), chez les souches non évoluée NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd$, et évoluée NA 124E MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd nuoF^* rpoA^*$, a ainsi permis de mieux caractériser l'évolution métabolique contrainte par l'accumulation de NADPH.

2. Etude approfondie de l'équilibre des cofacteurs NAD(H) et NADP(H)

2.1. Etude de l'équilibre du NADPH

2.1.1. Disponibilité des cofacteurs NADP(H)

2.1.1.1. Impacts de *nuoF** et *rpoA** sur les concentrations en NADPH et NADP⁺

Le dosage des cofacteurs intracellulaires NADPH et NADP⁺ a permis de déterminer le rapport NADPH/NADP⁺ (Tableau 34, Chapitre IV) de chaque souche étudiée. La Figure 60 récapitule les rapports NADPH/NADP⁺ et le détail des concentrations intracellulaires des cofacteurs NADPH et NADP⁺ par rapport à la biomasse. Chez la souche non évoluée NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd$, les souches reconstruites NA 175 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd rpoA^*$ et NA 142 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd nuoF^*$, la souche évoluée NA 124E MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd nuoF^* rpoA^*$ et la souche sauvage MG1655.

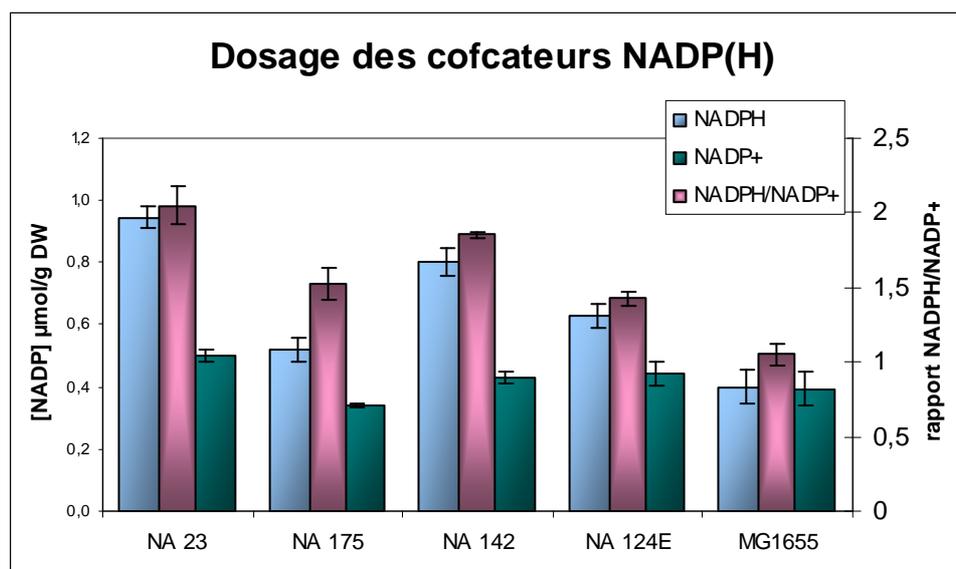


Figure 60 : Concentrations des cofacteurs NADP(H) normalisées par la concentration en biomasse et rapports NADPH/NADP⁺.

Les dosages des cofacteurs intracellulaires NADPH et NADP⁺ ont été effectués sur trois cultures indépendantes par souche, permettant de calculer des moyennes et des écarts-types sur trois répliques biologiques. Ces derniers se sont révélés très satisfaisants et ont permis de révéler des différences significatives de concentrations en NADPH et NADP⁺ parmi les cinq souches.

De manière générale, les cinq souches étudiées possèdent des concentrations en NADP⁺ relativement constantes, avec des valeurs allant de 0,34 à 0,5 μmol/g DW. Au contraire, les concentrations en NADPH montrent des variations importantes, de 0,95 à 0,52 μmol/g DW entre les quatre souches NA 23, NA 175, NA 142 et NA 124E contre 0,4 μmol/g DW pour la souche sauvage

MG1655. L'efficacité de la stratégie d'ingénierie métabolique visant à augmenter la disponibilité en NADPH, déjà validée par la comparaison des rapports NADPH/NADP⁺ (Tableau 27, Chapitre III), est donc confirmée par l'augmentation intracellulaire du NADPH, alors que celle du NADP⁺ reste relativement constante.

L'évolution adaptative de la souche NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd$ par l'apparition des mutations *nuoF** et *rpoA** a eu pour conséquence une baisse significative de 34% de la disponibilité en NADPH, avec 0,95 $\mu\text{mol/g DW}$ chez la souche NA 23 contre 0,63 $\mu\text{mol/g DW}$ chez la souche NA 124E MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd \text{ } nuoF^* rpoA^*$. La diminution de la disponibilité en NADP⁺ a été mineure avec 0,5 $\mu\text{mol/g DW}$ pour NA 23 contre 0,44 $\mu\text{mol/g DW}$ pour la souche NA 124E.

Individuellement, les mutations *nuoF** et *rpoA** contribuent à une diminution respective de la concentration en NADPH de 16 et 45%, comparativement à la souche NA 23. Pour le NADP⁺, *nuoF** et *rpoA** sont respectivement responsables d'une diminution de 14% et 32% par rapport à la souche NA 23, alors que la combinaison des deux participe seulement à une baisse de 12% du NADP⁺ entre les souches NA 124E et NA 23.

2.1.1.2. Impacts des mutations *nuoF** et *rpoA** sur le pool total de NADP(H)

Le pool total de NADP(H), $\text{NADP}_t = \text{NADPH} + \text{NADP}^+$, suit sensiblement la même tendance que le rapport NADPH/NADP⁺, à cause des faibles écarts entre les concentrations en NADP⁺ des différentes souches (Figure 61).

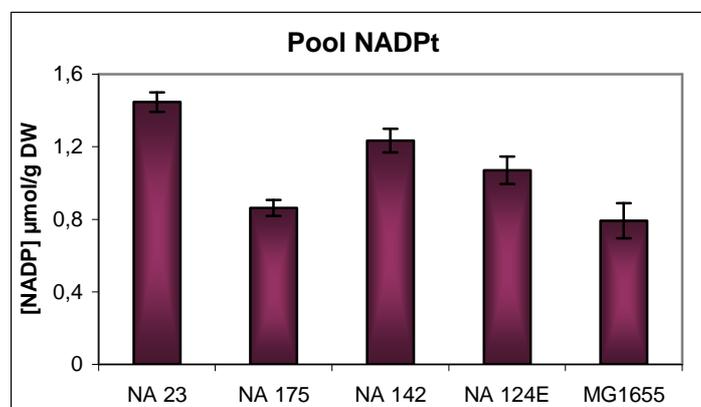


Figure 61 : Concentrations des pools de NADP_t normalisées par la concentration en biomasse.

Le pool NADP_t a diminué de 26% au cours de l'évolution entre les souches NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd$ et NA 124E MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd \text{ } nuoF^* rpoA^*$. Les mutations *nuoF** et *rpoA** sont responsables d'une réduction de ce pool de 15 et 41%, respectivement.

Comparées à la souche sauvage MG1655, les souches NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd$, NA 142 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd \text{ } nuoF^*$ et NA 124E MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd \text{ } nuoF^* rpoA^*$ ont un pool NADP_t significativement supérieur. Les effets pléiotropiques de *rpoA** ont un très fort impact sur la diminution du pool NADP_t avec une baisse significative de la concentration du NADPH et du NADP⁺, visible chez les souches NA 175 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd \text{ } rpoA^*$ et NA 124E MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd \text{ } nuoF^* rpoA^*$.

2.1.2. Flux de production de NADPH

Les données de flux calculées à partir des expériences de marquage isotopique permettent de calculer le flux de production de NADPH pour chaque souche. En effet, les réactions majoritairement responsables de la production du NADPH chez *E. coli* sont :

- la voie des pentoses phosphates
- l'isocitrate déshydrogénase
- la transhydrogénase membranaire PntAB
- dans certains cas, notamment dans des conditions de besoins en NADPH supérieurs à la production, l'enzyme malique, MalE

La surproduction du NADPH mesurée chez les souches NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd$, NA 142 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd nuoF^*$, NA 175 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd rpoA^*$ et NA 124E MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd nuoF^* rpoA^*$, permet d'émettre l'hypothèse que les activités PntAB et MalE peuvent être négligées car, à priori, les rapports NADPH/NADP⁺ élevés vont contribuer à réprimer l'expression de *pntAB* et à limiter l'activité de production de NADPH de l'enzyme malique MalE (Sauer *et al.*, 2004). La production de NADPH dans les 4 souches accumulatrices peut être considérée comme assurée uniquement par la voie des pentoses phosphates et l'isocitrate déshydrogénase.

De plus, les besoins biosynthétiques en NADPH sont évalués à 17,3 en mmol/g DW (Pramanik & Keasling, 1997). Les flux de production et de consommation du NADPH ainsi calculés pour les différentes souches sont présentés dans la Figure 62.

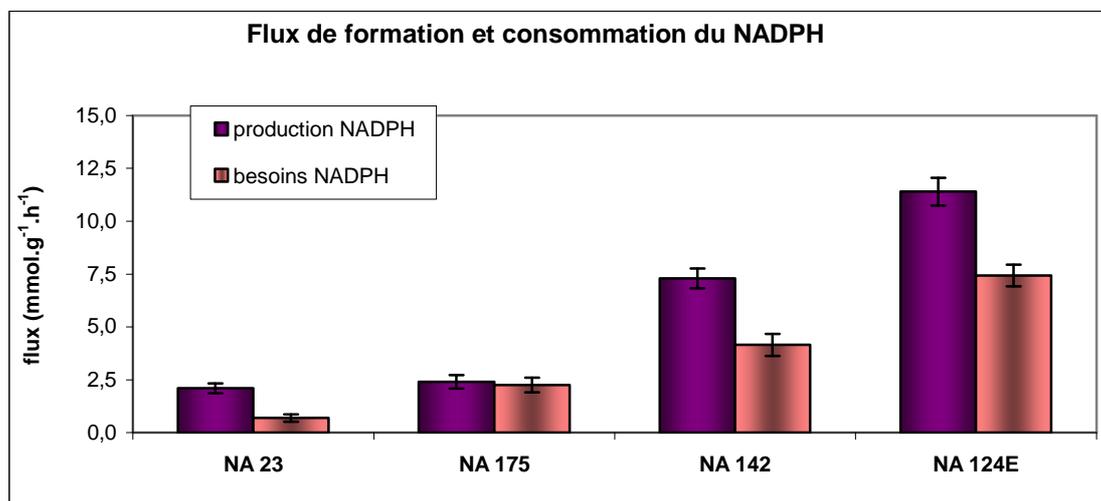


Figure 62 : Flux net de production totale du NADPH et besoins biosynthétiques en NADPH en mmol.g⁻¹.h⁻¹, chez les souches NA 23, NA 142, NA 175 et NA 124E.

Les écarts-types sont calculés relativement au q_s de chaque souche pour les flux de production de NADPH et relativement au μ de croissance de chaque souche pour les besoins en NADPH.

La souche NA 23 présente un fort déséquilibre entre sa production de NADPH et ses besoins biosynthétiques, avec un excès de NADPH de 1,4 mmol.g⁻¹.h⁻¹. Ce déséquilibre biologiquement

incohérent pourrait s'expliquer par la forte inhibition métabolique et le phénotype de croissance extrêmement affecté de cette souche ($\mu = 0,04 \text{ h}^{-1}$ et $q_s = 0,9 \text{ mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

Chez les souches NA 142 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd \text{ nuof}^*$ et NA 124E MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd \text{ nuof}^* rpoA^*$, la différence observée entre production et besoins de NADPH, avec un excès de 2,6 et 4 $\text{mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectivement, peut potentiellement être compensée par l'activité NADPH déshydrogénase du complexe I évolué.

Contrairement aux autres souches accumulant le NADPH, la souche NA 175 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd rpoA^*$ montre une production et des besoins en NADPH équilibrés comme dans une souche sauvage (Fuhrer & Sauer, 2009 ; Sauer *et al.*, 2004). Chez cette souche, l'équilibre entre les flux de production et les besoins biosynthétiques en NADPH s'explique par la baisse du flux de production de NADPH dans la cellule.

2.2. Etude de l'équilibre du NADH

2.2.1. Disponibilité des cofacteurs NAD(H)

2.2.1.1. Impacts des mutations *nuof** et *rpoA** sur les concentrations en NADH et NAD⁺

Le dosage des cofacteurs intracellulaires NADH et NAD⁺ a permis de déterminer le rapport NADH/NAD⁺ (Tableau 34, Chapitre IV) de chaque souche étudiée. La Figure 63 récapitule les rapports NADH/NAD⁺ et le détail des concentrations des cofacteurs NADH et NAD⁺ par rapport à la biomasse des souches NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd$, NA 175 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd rpoA^*$, NA 142 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd \text{ nuof}^*$, NA 124E MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd \text{ nuof}^* rpoA^*$ et de la souche sauvage MG1655.

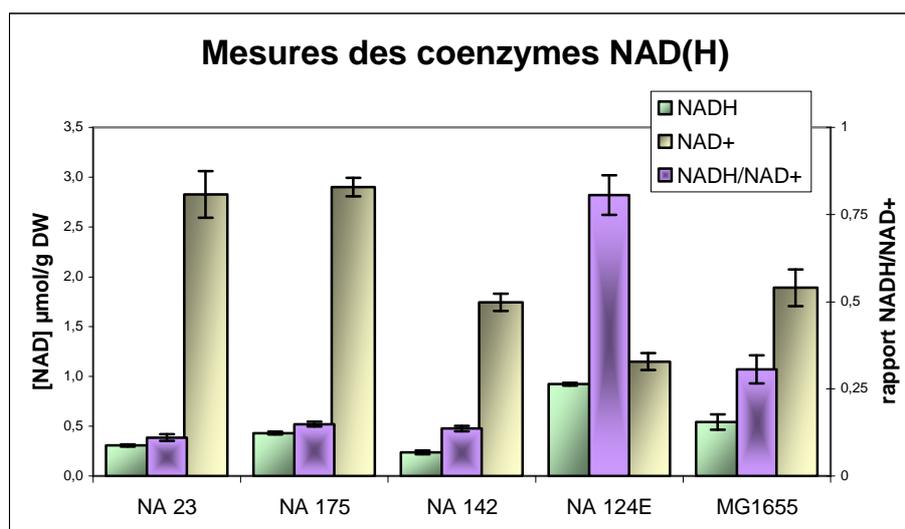


Figure 63 : Concentrations des cofacteurs NAD(H) normalisées par la concentration en biomasse et rapports NADH/NAD⁺.

Le dosage des cofacteurs intracellulaires NADH et NAD⁺ a été effectué sur trois cultures indépendantes par souche, permettant de calculer des moyennes et des écarts-types sur trois répliques biologiques. Ces derniers se sont révélés très satisfaisants et ont permis de révéler des différences significatives de concentrations en NADH et NAD⁺ parmi les cinq souches.

La concentration en NAD⁺ est comprise entre 1,15 et 2,9 $\mu\text{mol/g DW}$ pour les cinq souches, avec 1,89 $\mu\text{mol/g DW}$ pour la souche sauvage MG1655. La concentration en NADH oscille entre 0,92 et 0,23 $\mu\text{mol/g DW}$, avec 0,54 $\mu\text{mol/g DW}$ pour la souche sauvage MG1655.

L'évolution adaptative de la souche NA 23 MG1655 $\Delta\text{pgi } \Delta\text{udhA } \Delta\text{qor } \Delta\text{edd}$ par l'apparition des mutations *nuoF** et *rpoA** a eu pour conséquence une augmentation significative de la disponibilité en NADH, et une diminution de la disponibilité en NAD⁺. La concentration en NADH a ainsi augmenté de 0,31 à 0,92 $\mu\text{mol/g DW}$, et la concentration en NAD⁺ a diminué de 2,83 $\mu\text{mol/g DW}$ à 1,15 $\mu\text{mol/g DW}$, pour la souche NA 23 par rapport à la souche NA 124E.

Les deux mutations *nuoF** et *rpoA** présentes dans le génome non évolué ont deux impacts différents sur les concentrations en NADH et NAD⁺. Alors que la mutation *nuoF** contribue à une diminution significative du NADH et NAD⁺ de 26 et 38%, respectivement, la mutation *rpoA** est responsable d'une augmentation significative du NADH de 39%, alors que la disponibilité en NAD⁺ reste élevée et à une concentration similaire à la souche non évoluée. L'effet combinatoire des deux mutations *nuoF** et *rpoA** est surprenant avec une augmentation d'un facteur 3 de la concentration en NADH, alors que ces deux mutations considérées individuellement ont un effet opposé.

2.2.1.2. Impacts des mutations *nuoF** et *rpoA** sur le pool total de NAD(H)

Le pool total de NAD, NAD_t = NADH + NAD⁺, est présenté dans la Figure 64.

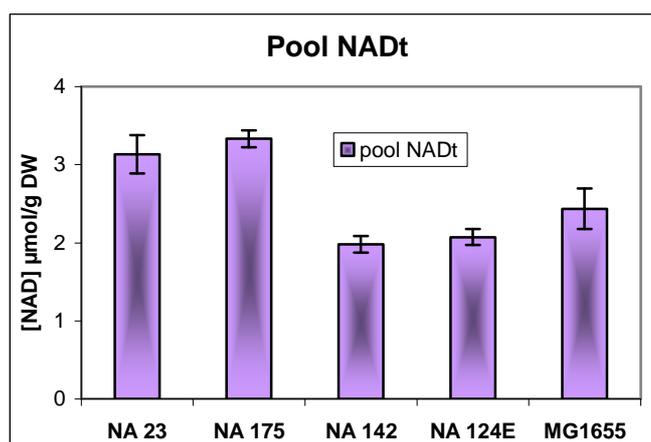


Figure 64 : Concentrations des pools de NAD_t normalisées par la concentration en biomasse.

Le pool NAD_t a diminué de 34% au cours de l'évolution entre les souches NA 23 MG1655 $\Delta\text{pgi } \Delta\text{udhA } \Delta\text{qor } \Delta\text{edd}$ et NA 124E MG1655 $\Delta\text{pgi } \Delta\text{udhA } \Delta\text{qor } \Delta\text{edd } \textit{nuoF}^* \textit{rpoA}^*$. Les effets des deux mutations sont différents sur le pool NAD_t : la mutation *nuoF** est responsable d'une diminution de 51% de ce pool, alors que *rpoA** n'a pas d'influence significative sur ce dernier.

Comparées aux autres souches accumulant le NADPH et à la souche sauvage MG1655, les souches NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd$ et NA 175 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd rpoA^*$ ont un pool NAD_t significativement supérieur. Seule la présence de la mutation *nuoF** semble avoir un fort impact sur la diminution du pool NAD_t avec une baisse significative de la concentration en NAD⁺ chez les souches NA 142 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd nuoF^*$ et NA 124E MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd nuoF^* rpoA^*$. Le pool NAD_t des souches NA 142, NA 124E et MG1655 est du même ordre de grandeur, autour de 2 $\mu\text{mol/g DW}$.

2.2.2. Flux de production de NADH

La production totale de NADH est calculée sur la base des flux métaboliques des enzymes NADH-dépendantes (Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, Pyruvate déshydrogénase, α -Kétoglutarate déshydrogénase et Malate déshydrogénase) et des voies biosynthétiques qui produisent du NADH, production estimée à 1,16 mmol/g DW d'après le modèle stœchiométrique d'*E. coli* (Pramanik & Keasling, 1997).

Amarneh et Vik (2005) ont montré un transfert direct du NADH de la malate déshydrogénase (MDH) vers le complexe I. L'activité MDH au sein du cycle de Krebs pourrait ainsi estimer le niveau d'activité NADH-dépendant du complexe I.

La production totale de NADH chez les souches NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd$, NA 142 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd nuoF^*$, NA 175 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd rpoA^*$ et NA 124E MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd nuoF^* rpoA^*$ et la souche sauvage MG1655 est présentée dans la Figure 65, ainsi que le flux de production de NADH de l'enzyme malate déshydrogénase.

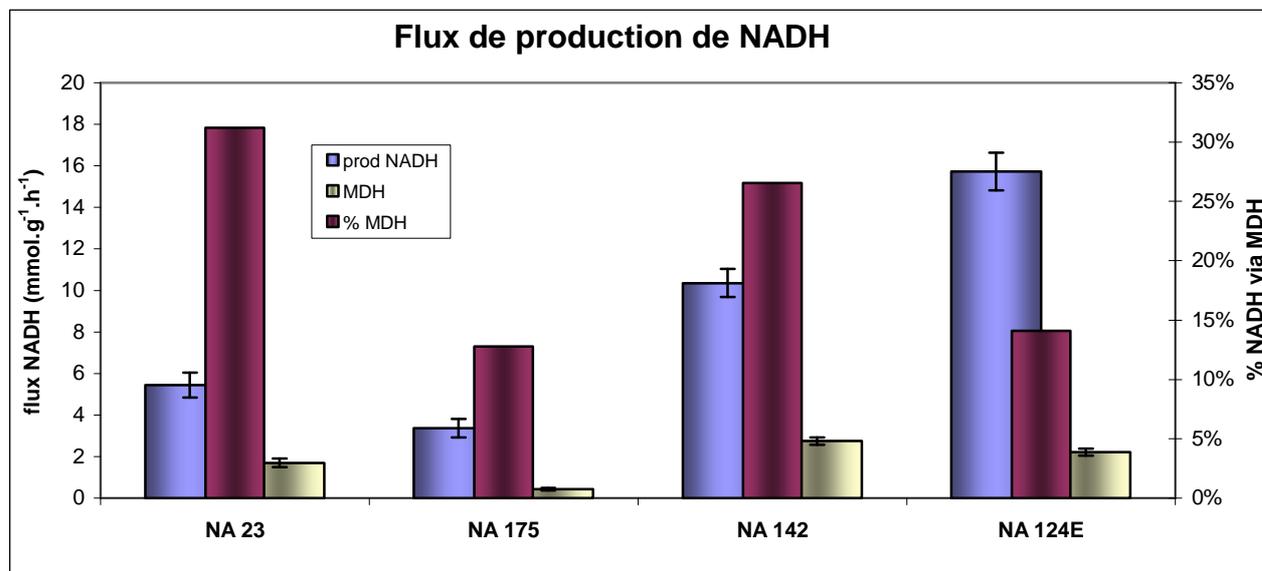


Figure 65 : Flux net de production totale du NADH et de production de NADH via MDH en $\text{mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ chez les souches NA 23, NA 142, NA 175, NA 124E et MG1655.

Les écarts-types sont calculés relativement au q_s de chaque souche.

Relativement à son taux de croissance et à son métabolisme, le flux total de production de NADH de la souche NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd$ est perturbé.

La présence de la mutation $rpoA^*$ chez la souche NA 175 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd rpoA^*$ participe à une baisse significative d'environ 40% de la production de NADH par rapport à la souche NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd$ qui possède un taux de croissance plus faible.

La part de la malate déshydrogénase dans la production de NADH est évaluée autour de 5% chez la souche MG1655 (Sauer *et al.*, 2004)(Fong *et al.*, 2006), alors que cette proportion est comprise entre 15 et 30% pour les souches accumulant du NADPH. De plus, le pourcentage de NADH produit par la malate déshydrogénase est deux fois plus important chez la souche non évoluée et que chez la souche évoluée. En effet, la mutation $rpoA^*$ diminue de plus de moitié la contribution de la malate déshydrogénase chez la souche NA 175 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd rpoA^*$.

Chez la souche NA 175, la faible production de NADH et la faible part de production de la malate déshydrogénase sont cohérentes avec la répression catabolique ciblée sur le cycle de Krebs engendrée par les ajustements transcriptionnels dus à la mutation $rpoA^*$.

Si l'activité de la malate déshydrogénase est assimilable à l'activité NADH déshydrogénase du complexe I, alors cette activité est très forte chez les souches NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd$ et NA 142 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd nuoF^*$. Dans l'ensemble des souches accumulant le NADPH, l'activité NADH déshydrogénase du complexe I serait nettement supérieure à celle estimée chez la souche MG1655.

2.3. Interprétations et discussion

L'étude détaillée des flux de production et de la concentration intracellulaire des cofacteurs NAD(H) et NADP(H) a permis d'approfondir les conséquences respectives des mutations $nuoF^*$ et $rpoA^*$ sur le métabolisme d'un mutant MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$.

Ainsi, la mutation $nuoF^*$ provoque une diminution significative de la disponibilité en NADPH et NAD^+ , et est aussi responsable d'une réduction significative du pool total de NAD_t . La mutation $rpoA^*$ réprime significativement la production de NADPH ainsi que sa disponibilité, diminuant ainsi le pool $NADP_t$. Cette mutation a très peu d'effets significatifs sur la disponibilité en NAD(H), mais réduit significativement le flux de production de NADH dans la cellule ainsi que la part de l'activité malate déshydrogénase dans la production totale.

Les effets combinés des deux mutations chez la souche NA 124E MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd nuoF^* rpoA^*$ sont responsables d'une diminution significative des deux pools NAD_t et $NADP_t$, avec des valeurs proches de la souche MG1655.

2.3.1. Oxydation compétitive du NADH et du NADPH au sein du complexe I évolué

2.3.1.1. Faibles impacts de *nuoF** sur les ratios NAD(P)

A ce jour, seule la transhydrogénase soluble UdhA est connue pour participer à la réoxydation du NADPH dans la cellule et à la régulation des ratios NAD(P)H/NAD(P)⁺ (Sauer et al., 2004). La souche NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd$, dans laquelle le gène *udhA* a été délété, n'a plus la possibilité de réoxyder l'excès de NADPH, ce qui constitue une contrainte métabolique importante pour la croissance cellulaire (Canonaco et al., 2001).

Chez la souche NA 142 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd \text{ } nuoF^*$, la modification biochimique du complexe I par la mutation *nuoF** permet l'établissement d'une nouvelle voie de réoxydation du NADPH, avec des effets fortement bénéfiques sur la croissance bactérienne.

Ces effets positifs sur la croissance bactérienne ne peuvent pas être seulement expliqués par le rapport NADPH/NADP⁺, car celui-ci n'est que très faiblement diminué chez la souche NA 142 par rapport à la souche évoluée. Le rapport élevé serait-il véritablement la cause la plus importante d'inhibition métabolique ?

La différence de rapport NADH/NAD⁺ entre les souches NA 23 et NA 142 est aussi très faible, donc l'inhibition de la croissance chez la souche non évoluée ne semble pas être causée par un faible rapport NADH/NAD⁺.

Toutefois, sur la base de la comparaison des ratios, l'impact de la sous-unité NuoF* est occulté par la diminution de la concentration cellulaire de NADP⁺ en présence de la mutation *nuoF**, contribuant à l'augmentation du rapport NADPH/NADP⁺. En effet, la concentration de NADPH dans la cellule est significativement diminuée chez la souche NA 142. Cela se traduit par une diminution du pool total de NAD(P)H chez la souche NA 142. A noter aussi le fort impact de la sous-unité évoluée NuoF* sur le pool total NAD(P)H, qui abaisse significativement la concentration cellulaire de NAD⁺. Ces deux conséquences sont peut-être responsables de l'impact positif de NuoF* sur le métabolisme, c'est-à-dire que les fortes concentrations cellulaires de NADPH et NAD⁺ chez la souche NA 23 inhiberaient sa croissance. Il est aussi intéressant de se demander si ces fortes concentrations relevées chez la souche NA 23 ne sont pas directement liées avec l'absence d'UdhA (oxydation du NADPH, réduction du NAD⁺).

Toutefois même si NuoF* a un faible impact sur la baisse du rapport NADPH/NADP⁺, la nouvelle voie de réoxydation du NADPH par le complexe I évolué démontrée dans la chapitre précédent a un effet positif sur la croissance par l'établissement d'un nouveau flux de NADP⁺.

2.3.1.2. Effets conjugués de *ropA** et *nuoF**

Alors que l'impact de la mutation *nuoF** sur les rapports NADPH/NADP⁺ et NADH/NAD⁺ est faible, chez la souche évoluée, les deux mutations *nuoF** et *ropA** ont des effets significatifs sur ces rapports, avec respectivement une diminution de 25% et une augmentation d'un facteur supérieur à 7 sur ces rapports. Le complexe I évolué favoriserait la réoxydation du NADPH via la chaîne respiratoire : i) il possède une efficacité catalytique *in vitro* très proche pour les deux coenzymes; ii) dans la souche évoluée, il y a une forte disponibilité de NADPH contrairement au NADH. Le complexe I évolué contribuerait ainsi à une diminution du rapport NADPH/NADP⁺ et à une augmentation du rapport NADH/NAD⁺

La question qui se pose alors est de comprendre pourquoi ce comportement au niveau des ratios ne se retrouve pas chez la souche NA 142 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd nuof^*$ qui possède elle aussi la mutation $nuof^*$? Des effets épistatiques non identifiés de $rpoA^*$ et $nuof^*$ pourraient-ils en être la cause?

Quelques éléments peuvent être avancés au regard des différences de flux de production du NADH dans les deux souches NA 142 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd nuof^*$ et NA 124E MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd nuof^* rpoA^*$ (Figure 68). En effet, le flux de production de NADH de la souche NA 142 est très proche de celui de la souche NA 124E, avec une plus faible contribution de la malate déshydrogénase chez la souche évoluée. Ainsi, la diminution du flux de NADH issu de la malate déshydrogénase pourrait permettre d'augmenter la capacité oxydative NADPH - dépendante du complexe I car moins de NADH serait directement transféré du cycle de Krebs. Finalement, il pourrait y avoir une oxydation compétitive du NADH et du NADPH au niveau du complexe I, compétition arbitrée par le flux de NADH issu de la malate déshydrogénase.

Ainsi, chez la souche NA 142, le flux important de NADH issu de la malate déshydrogénase ne permettrait pas une oxydation suffisante du NADPH pour abaisser de façon significative le rapport NADPH/NADP⁺. Chez la souche évoluée NA 124E en présence de $rpoA^*$, les flux du cycle de Krebs sont fortement diminués, donc il est probable que le flux de NADH vers le complexe I soit lui aussi diminué, favorisant ainsi la réoxydation du NADPH dans la cellule.

2.3.2. Augmentation des besoins biosynthétiques chez les souches $rpoA^*$

La sous-unité évoluée RpoA* est responsable d'une augmentation du rendement biomasse-glucose $Y_{X/S}$ par rapport à la souche NA 23. L'augmentation du rendement en biomasse peut être liée à la répression catabolique observée, limitant le trop-plein métabolique au niveau du cycle Krebs (Vemuri *et al.*, 2006). De plus, l'augmentation du rendement biomasse-glucose $Y_{X/S}$ peut être liée à la surexpression de gènes impliqués dans les voies de biosynthèse d'acide aminés, tels que l'histidine, la méthionine et la thréonine.

2.3.3. Besoins en ATP chez les souches accumulant le NADPH

La sous-unité évoluée RpoA* est aussi responsable de la forte répression de gènes impliqués dans la synthèse et l'assemblage des flagelles, ainsi que dans la fonction de chimiotactisme cellulaire, fonctions connues pour être grandes consommatrices d'énergie. Il convient de se demander si la mutation $rpoA^*$ ne serait pas apparue et fixée au cours de l'évolution adaptative dans le but de diminuer la consommation d'ATP ou d'en augmenter sa disponibilité. Si l'activité respiratoire est réellement importante dans cette souche, aux vues de l'activité de la malate déshydrogénase très importante, cela peut être la conséquence d'une forte consommation/demande d'ATP pour compenser les faibles vitesses de croissance et la forte inhibition du métabolisme.

Chapitre VI

**Evolution *in vivo*
de la souche NA 24
MG1655 $\Delta pfkAB$ $\Delta udhA$ Δedd Δqor**

L'étude de l'évolution *in vivo* de la souche NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ a démontré les capacités surprenantes de plasticité et d'évolution que la bactérie est capable de mettre en œuvre pour surmonter une forte contrainte métabolique, ici l'accumulation de NADPH.

En effet, une période d'évolution relativement courte de 65 générations aura permis l'apparition et la fixation de deux mutations bénéfiques dont l'impact est de diminuer significativement l'accumulation de NADPH par ajustements transcriptionnels, et de créer une nouvelle voie de réoxydation du NADPH via la chaîne respiratoire.

Basée sur une stratégie rationnelle d'ingénierie métabolique similaire à celle appliquée à la souche NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd$, une deuxième souche d'*E. coli* a été construite dont le métabolisme central a été réorienté pour accumuler le NADPH. Cette souche s'est montrée incapable de se développer en milieu liquide sur glucose et a subi une adaptation forcée en milieu solide sur glucose. Cette étape de criblage en milieu solide a ainsi permis d'obtenir des clones évolués avec une croissance restaurée sur glucose.

1. Construction de la souche NADPH par ingénierie métabolique

1.1. Stratégie rationnelle d'ingénierie métabolique

La stratégie d'ingénierie métabolique visant à accumuler le NADPH dans la cellule est basée sur les mêmes hypothèses que pour la souche NA 23. La redirection du flux de carbone vers la voie des pentoses-phosphates et l'inactivation de voies de réoxydation du NADPH devraient augmenter la disponibilité en NADPH chez la souche ainsi modifiée.

La seule modification apportée par rapport à la souche NA 23 est la délétion des gènes *pfkAB* au lieu du gène *pgi* (Figure 66).

La souche finale NA 24 MG1655 $\Delta pfkAB \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ peut théoriquement produire, pour un rendement molaire maximum, une mole de NADH et trois moles de NADPH supplémentaires pour l'oxydation complète d'une mole de glucose en acétyl-CoA, contre quatre moles de NADH pour la souche sauvage MG1655, ces deux moles de NADPH ne pouvant être réoxydées par les voies régulatrices connues. En effet, la délétion des gènes *pfkAB* permet un cycle P5P/Fructose-6P/Glucose-6P/6P-gluconate pouvant produire alternativement six moles de NADPH pour deux moles de glucose consommées.

Cette souche devrait produire une mole supplémentaire de NADPH comparativement à la souche NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd$, accentuant ainsi la contrainte métabolique d'accumulation de NADPH en absence de voie de réoxydation.



Figure 66 : Réseau métabolique modifié de la souche NA 24 MG1655 $\Delta pfkAB \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$.

Les croix rouges indiquent les délétions de gènes avec les réactions enzymatiques inactivées correspondantes en pointillées.

1.2. Construction et vérification de la souche NA 24

1.1.1. Construction de la souche NA 24 par cinq délétions de gènes

La souche d'*E. coli* MG1655 $\Delta pfkAB \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ a été construite par délétion des gènes *pfkA*, *pfkB*, *udhA*, *qor* et *edd*. Les délétions successives de ces 5 gènes ont été pratiquées dans cet ordre, classées par ordre décroissant d'impact négatif sur le métabolisme (i.e. en fonction du taux de croissance des mutants de délétion unique calculé dans la littérature). En effet, la double délétion *pfkAB* chez *E. coli* affecte sévèrement sa croissance sur glucose (Daldal & Fraenkel, 1981).

L'obtention de la souche NA 24 a nécessité la construction de 7 souches intermédiaires toutes issues de la souche MG1655. Les étapes d'inactivation des gènes chromosomiques et d'excision des cassettes de résistance aux antibiotiques se sont succédé pour conduire à la construction de la souche finale NA 24 MG1655 $\Delta pfkAB \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ (Figure 67).

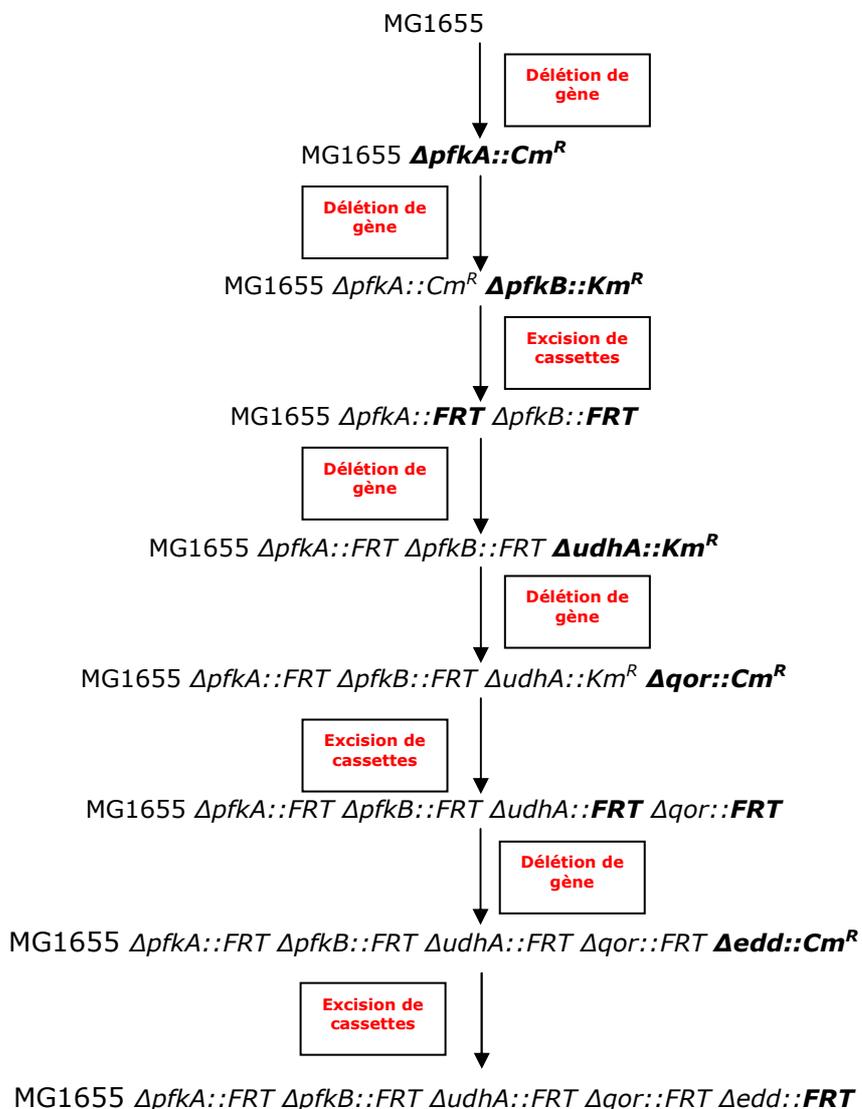


Figure 67 : Filiation de la souche NA 24 MG1655 $\Delta pfkAB \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ avec les différentes étapes de construction de biologie moléculaire à partir de la souche MG1655.

FRT (Flp recognition target) symbolise les cicatrices laissées sur l'ADN génomique suite à l'excision des cassettes de résistance.

Les techniques de délétion de gène par transformation d'ADN linéaire sont réalisées à l'aide du système RED de recombinaisons du phage λ porté par le plasmide pKD46 et à la technique d'excision des cassettes de résistance aux antibiotiques encadrées par les sites FRT à l'aide de la FLP recombinase de *S. cerevisiae* portée par le plasmide pCP20, et sont identiques à celles employées pour la souche NA 23 (cf. Chapitre II – Matériel & Méthodes).

1.1.2. Vérification de la souche

1.1.2.1. PCR

Les différentes transformations effectuées ont donné lieu à l'obtention de clones capables de se développer sur un milieu sélectif contenant de la kanamycine et/ou du chloramphénicol suite au remplacement du gène cible par une cassette de résistance à un de ces deux antibiotiques. Les clones sélectionnés ont été vérifiés sur la base de l'analyse de la taille des fragments PCR correspondant à la région de délétion (c.f. Chapitre II – Matériel & Méthodes).

Les clones, dont les cassettes de résistance aux antibiotiques ont été excisées, ont été sélectionnés sur la base de leur sensibilité aux antibiotiques kanamycine et/ou chloramphénicol et sur la base de l'analyse de la taille des fragments PCR correspondant à la région de délétion (c.f. Chapitre II – Matériel & Méthodes).

L'amplification des régions de délétion a été effectuée chez la souche transformante et chez la souche de référence MG1655 comme témoin négatif.

Enfin, les fragments PCR des régions génomiques modifiées obtenus à partir des transformants sont purifiés et séquencés. Ce séquençage permet de s'assurer de la conformité des séquences nucléotidiques aux proximités des zones de recombinaison homologue et des zones d'excision des cassettes de résistance aux antibiotiques.

1.1.2.2. Dosage de l'activité PfkAB

Afin de s'assurer de la délétion des gènes *pfkA* et *pfkB*, le niveau d'activité phosphofruktokinase a été mesuré *in vitro* chez la souche NA 24 MG1655 $\Delta pfkAB \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ et comparé à celui de la souche sauvage MG1655.

L'activité spécifique phosphofruktokinase de la souche sauvage MG1655 est de 558 ± 39 nmol.min⁻¹.mg⁻¹_{protéines}. Cette valeur est du même ordre de grandeur que celle trouvée dans la littérature pour des conditions de culture similaires (culture batch sur milieu minimum et glucose) : 600 à 1600 nmol.min⁻¹.mg⁻¹_{protéines} pour la souche *E. coli* K12 (Al Zaid Siddiquee *et al.*, 2004).

La souche NA 24 présente une activité résiduelle phosphofruktokinase de 17 ± 3 nmol.min⁻¹.mg⁻¹_{protéines}, ce qui confirme l'efficacité de la délétion des deux gènes *pfkA* et *pfkB* et l'absence de toute autre enzyme capable de catalyser la même réaction.

2. Adaptation de la souche NA 24 MG1655 $\Delta pfkAB \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ sur milieu solide

2.1. Caractérisation de la souche NA 24 sur glucose et galactose

Une fois la souche NA 24 construite et validée, sa viabilité a été évaluée sur milieu minimum synthétique avec 5 g.l⁻¹ de glucose en culture batch aérobie. La souche NA 24 a été incapable de se développer sur ce type de milieu.

Une des hypothèses de la létalité du génotype de la souche NA 24 MG1655 $\Delta pfkAB \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ en croissance sur milieu minimum et glucose est que l'interruption de la voie de la glycolyse par la délétion des gènes *pfkAB* entrainerait une accumulation de Fructose-6-phosphate importante, inhibant ainsi le transport de glucose dans la cellule (Morita *et al.*, 2003).

Pour tester cette hypothèse, la croissance de la souche NA 24 a été testée sur une source de carbone alternative au glucose dont l'import est indépendant du système d'import PTS, le galactose.

Une croissance de la souche NA 24 a été observée en milieu minimum synthétique sur 5 g.l⁻¹ de galactose, mais à des vitesses de croissance extrêmement faibles. Pour vérifier que la croissance observée n'ait pas été causée par une contamination ou par évaporation du milieu, deux cultures indépendantes supplémentaires ont été suivies sur environ 700 heures, dont une a été prélevée une seule fois en fin de culture pour éviter tout problème de contamination (Figure 68).

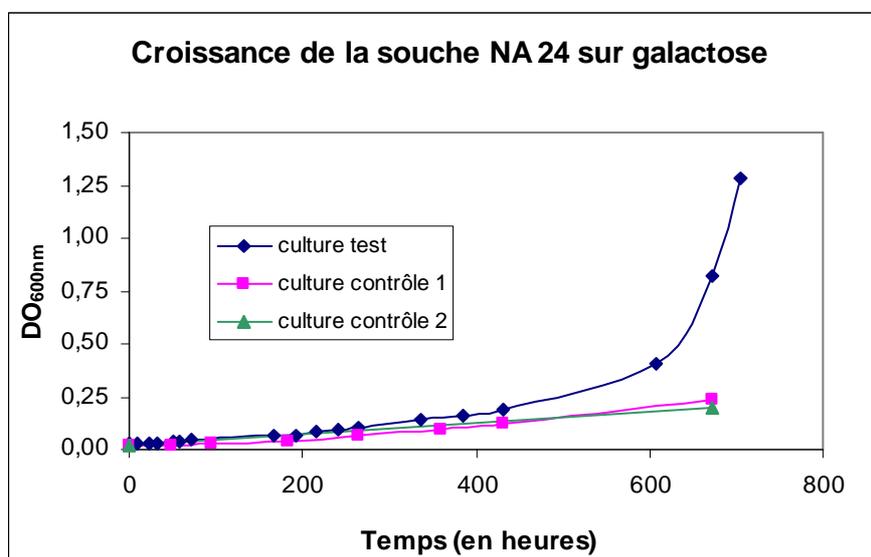


Figure 68 : Croissance de la souche NA 24 MG1655 $\Delta pfkAB \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ sur milieu minimum synthétique et galactose.

Les cultures de contrôle 1 et 2 présentent un taux de croissance de 0,005 h⁻¹, légèrement inférieur à celui de la culture test. Ces deux cultures valident la croissance de la souche NA 24 sur galactose.

Le taux de croissance de la souche NA 24 MG1655 $\Delta pfkAB \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ sur galactose est donc évalué à $0,006 \pm 0,001 \text{ h}^{-1}$, alors que la souche sauvage MG1655, dans les mêmes conditions de culture, a un taux de croissance de $0,40 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$.

La souche NA 24 MG1655 $\Delta pfkAB \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ est donc capable de se développer sur galactose et non sur glucose, confirmant l'hypothèse d'une forte inhibition du système d'import PTS par l'accumulation de sucres phosphatés causée par la délétion $\Delta pfkAB$. Toutefois, son taux de croissance sur galactose est nettement inférieur à celui de la souche NA 23 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ sur glucose, ce qui laisse à penser que sa capacité très limitée à oxyder le NADPH a probablement une influence significative sur l'inhibition de sa croissance.

2.2. Sélection de clone évolué sur milieu minimum solide et glucose

Les modifications génétiques réalisées chez la souche NA 24 MG1655 $\Delta pfkAB \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ ont pour but d'accumuler fortement le NADPH dans la cellule. De plus, les délétions $pfkAB$ sont probablement la cause d'une forte inhibition du métabolisme.

Les résultats précédents sur l'évolution de la souche NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ ont montré que la première mutation adaptative, NuoF*(E183A), est apparue lors de la première culture de repiquage du processus d'évolution *in vivo* laissant supposer que peu de générations sont nécessaires à l'apparition de phénotypes évolués.

Pour évaluer les capacités d'*E. coli* à surmonter rapidement la contrainte métabolique d'accumulation de NADPH, la souche NA 24 a subi une adaptation forcée sur milieu minimum solide et glucose de telle sorte à sélectionner des clones évolués capables de croître sur glucose.

Ainsi, 10^9 cellules de la souche NA 24 cultivées en milieu riche ont été étalées sur milieu minimum synthétique solide et glucose. Après 8 jours d'incubation à 37°C, huit colonies se sont développées sur milieu minimum et glucose.

Ces huit clones ont été réisolés sur milieu riche et leur taux de croissance a été évalué en milieu minimum synthétique solide et glucose à $0,07 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$.

La croissance sur glucose des huit clones évolués NA 24 MG1655 $\Delta pfkAB \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ a donc été restaurée par un phénomène d'adaptation survenu lors d'une étape de criblage en milieu solide, il faut maintenant déterminer la cause génétique de cette adaptation.

3. Identification des mutations survenues lors de l'évolution

3.1. Recherche de mutations dans les clones NA 24 évolués

Contrairement à l'étude de la souche NA 23, la recherche des mutations sur les 8 clones issus de la souche NA 24 capables de se développer sur glucose a été effectuée de manière ciblée en utilisant les résultats précédents. Ainsi, les gènes *nuoF*, *rpoA*, *pntB* et *cyaA*, cibles de l'évolution adaptative de la souche NA 23, ont été séquencés pour les huit clones évolués. Les huit clones possèdent seulement des mutations dans le gène *nuoF*. Ainsi, cinq clones présentent la mutation précédemment caractérisée, NuoF*(E183A), et les trois autres ont une autre mutation mais à la même position : NuoF*(E183G). Les cinq clones possédant la mutation NuoF*(E183A) ont un taux de croissance moyen de $0,08 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$, et de $0,06 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$ pour les trois autres.

3.2. Un nouveau complexe I évolué

3.2.1. Construction du plasmide d'expression

L'expression de l'enzyme NuoEF*(E183G)G a été réalisée par introduction de la mutation NuoF*(E183G) dans le plasmide d'expression pET11a/*nuoB-G/NuoFc*, utilisé précédemment (cf. Chapitre II – Matériel & Méthodes & Chapitre IV), et qui est à son tour introduit dans la souche d'expression *E. coli* BL21 (DE3).

3.2.2. Expression et purification

Le fragment soluble déshydrogénase évolué a été produit et purifié comme décrit précédemment (cf. Chapitre II – Matériel & Méthodes & Chapitre IV). La pureté de la fraction purifiée contenant le fragment soluble du complexe I sous sa forme active, c'est-à-dire les trois sous-unités NuoE, NuoF et NuoG, a été analysée par gel dénaturant SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie (Figure 69).

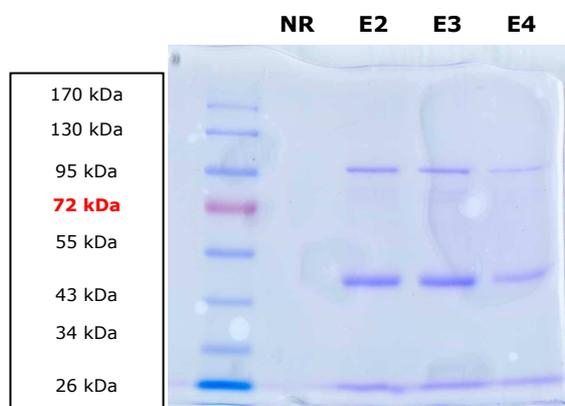


Figure 69 : Gel SDS-Page coloré au bleu de Coomassie du fragment soluble déshydrogénase évolué.

25 μL de chaque fraction issue des différentes étapes de purification. NR : extrait non retenu sur la colonne ; E2 : fraction d'élution 2 ; E3 : fraction d'élution 3 ; E4 : fraction d'élution 4.

La présence des 3 sous-unités NuoE, NuoFc et NuoG, de taille respective de 18,59 kDa, 50,29 kDa et 100,54 kDa, a été confirmée dans les fractions de purification actives, indiquant que le fragment déshydrogénase soluble a été correctement surexprimé. De plus, un western blot, révélé à l'aide d'anticorps anti-streptactin, réalisé sur ces mêmes fractions de purification indique que la sous-unité NuoF*(E183G)c a été exprimée de façon non dégradée (Figure 70).



Figure 70 : Western Blot des fragments solubles déshydrogénases sauvage et évolué.

25 μ L de chaque fraction issue des différentes étapes de purification. NR : extrait non retenu sur la colonne ; L1 : fraction de lavage 1 ; L5 : fraction de lavage 5 ; E2 : fraction d'élution 2 ; E3 : fraction d'élution 3 ; E4 : fraction d'élution 4.

3.2.3. Paramètres enzymatiques et cinétiques de NuoEF*(E183G)G

3.2.3.1. Constantes de cinétique michaelienne

La purification du fragment soluble déshydrogénase évolué sous forme active, a permis d'effectuer sa caractérisation biochimique. Les paramètres cinétiques michaeliens, K_m et V_{max} pour le NADH et le NADPH, ont été déterminés comme précédemment (cf. Chapitre II – Matériel & Méthodes et Chapitre IV) et sont comparées aux paramètres des fragments sauvage et évolué NuoEF*(E183A)G (Tableau 53).

Tableau 53 : Paramètres cinétiques K_m et V_{max} mesurés pour les fragments solubles déshydrogénases sauvage et évolués.

Les valeurs moyennes et les écarts-types ont été déterminés sur au minimum deux mesures.

		Fragment WT	Fragment NuoF*(E183A)	Fragment NuoF*(E183G)
K_m (μM)	NADH	4,3 \pm 0,8	7,9 \pm 1,4	18,3 \pm 2,9
	NADPH	1150 \pm 80	16,7 \pm 2,9	8,4 \pm 1,7
V_{max} (μ mol.min ⁻¹ .mg de P ⁻¹)	NADH	15,6 \pm 0,8	6,7 \pm 0,5	21,9 \pm 1,8
	NADPH	4,7 \pm 0,1	21,2 \pm 2,1	10,4 \pm 0,9

La mutation NuoF*(E183G) permet donc l'oxydation du NADPH, contrairement au fragment sauvage, avec une meilleure affinité pour le NADPH que pour le NADH. Toutefois, l'activité maximale ferricyanide réductase NADH-dépendante est légèrement supérieure en présence de la mutation NuoF*(E183G) par rapport à l'enzyme sauvage, et 3 fois supérieure par rapport au fragment soluble évolué NuoEF*(E183A)G. L'activité maximale ferricyanide réductase NADPH-dépendante est au contraire deux fois plus basse pour le fragment soluble évolué NuoEF*(E183G)G que pour le fragment soluble évolué NuoEF*(E183A)G.

Concernant les K_m pour le NADH et le NADPH, les mutations NuoF*(E183A) et NuoF*(E183G) ont des impacts opposés. La mutation NuoF*(E183G) va conférer à l'enzyme une meilleure affinité pour le NADPH, augmentée d'un facteur 2 par rapport à la mutation NuoF*(E183A). Enfin, l'affinité de l'enzyme NuoEF*(E183G)G pour le NADH, est deux fois plus faible que pour l'enzyme NuoEF*(E183A)G.

3.2.3.2. Efficacité catalytique

La constante K_{cat} désignant le nombre de moles de produit formé par seconde et par mole d'enzyme (ici turnover du ferricyanide réduit) a été calculée à partir de la constante V_{max} dans le but d'évaluer l'efficacité catalytique, K_{cat}/K_m . La constante K_{cat} et l'efficacité catalytique du fragment soluble évolué NuoEF*(E183G)G sont comparées à celles des fragments sauvage et évolué NuoEF*(E183A)G dans le Tableau 54, pour le NADH et le NADPH.

Tableau 54 : Paramètres cinétiques K_{cat} (nombre de turnover) et K_{cat}/K_m (efficacité catalytique) calculés pour les fragments solubles déshydrogénases sauvage et évolués.

Les valeurs moyennes et les écarts-types ont été déterminés sur la base des écarts-types des K_m et V_{max} .

		Fragment WT	Fragment NuoF*(E183A)	Fragment NuoF*(E183G)
K_{cat} (s^{-1})	NADH	43,8 ± 2,1	18,7 ± 1,3	61,3 ± 5,0
	NADPH	13,2 ± 0,3	59,2 ± 6,0	29,2 ± 2,5
K_{cat}/K_m ($s^{-1} \cdot \mu M^{-1}$)	NADH	10,1 ± 2,4	2,4 ± 0,6	3,4 ± 1,4
	NADPH	0,011 ± 0,001	3,6 ± 1,0	3,5 ± 1,0

Les deux fragments solubles déshydrogénases évolués, NuoEF*(E183A)G et NuoEF*(E183G)G, ont des efficacités catalytiques équivalentes, montrant ainsi, que malgré les différences observées pour les constantes michaeliennes, K_m et V_{max} , les impacts conférés par les deux mutations NuoF*(E183A) et NuoF*(E183G) sont similaires en concentration de substrat non saturante, c'est-à-dire dans des conditions proches des conditions physiologiques.

4. Interprétations & discussion

Les mutations NuoF*(E183G) et NuoF*(E183A) n'ont pas pu être validées comme étant responsable de l'adaptation observée pendant l'évolution *in vivo*. En effet, une nouvelle série de mutants MG1655 $\Delta pfkAB \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ exprimant chacun de ces gènes évolués séparément auraient dus être étudiés. Les mutations *nuoF** sont probablement responsables d'une augmentation du taux de croissance de la souche non évoluée NA 24 MG1655 $\Delta pfkAB \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ car cette mutation est similaire à la mutation identifiée chez la souche évoluée NA 124E MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor \text{ } nuoF^* rpoA^*$.

La mutation NuoF*(E183G) du fragment soluble NuoEF*(E183G)G a été caractérisée biochimiquement, selon la même stratégie appliquée précédemment (cf. Chapitre IV).

La mutation NuoF*(E183G) confère au fragment soluble du complexe I la capacité de pouvoir utiliser le NADPH, en complément du NADH, comme donneur initial d'électron. Le fragment soluble évolué NuoEF*(E183G)G a ainsi les mêmes caractéristiques enzymatiques et cinétiques que le fragment soluble évolué NuoEF*(E183A)G. La glycine possède des propriétés physico-chimiques proches de l'alanine, i.e. charge neutre et faible encombrement stérique, ce qui pourrait expliquer que le remplacement du glutamate par la glycine permettrait le positionnement du NADPH dans la poche catalytique (Figure 71).

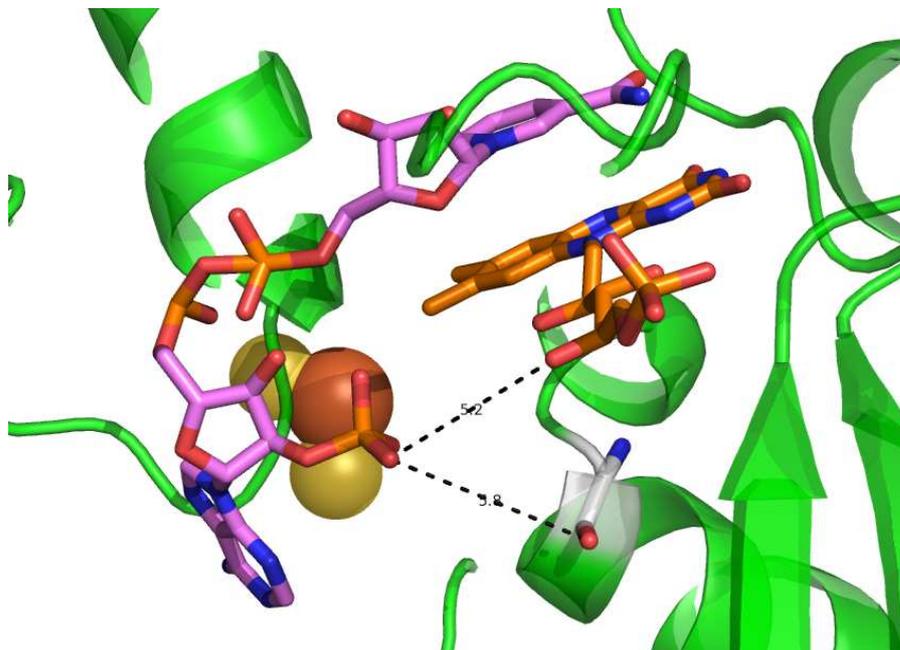


Figure 71 : Les sites d'ancrage du FMN et du NADPH dans NuoF*(E183G).

Le cofacteur NADPH est placé face au FMN. Les distances entre le phosphate chargé négativement du NADPH et le FMN et le résidu 183 sont données en angströms, 5,2 et 5,8 Å, respectivement.

Le complexe I évolué, grâce à la mutation NuoF*(E183G), constituerait ainsi une nouvelle voie de réoxydation du NADPH dans la cellule, cette enzyme étant connue pour avoir une forte activité oxydante fournissant des électrons pour la chaîne respiratoire.

Deux mutations similaires sont donc apparues dans le gène *nuoF*, sur deux évolutions totalement indépendantes de deux souches différentes ayant comme point commun une forte inhibition de leur métabolisme causée par une accumulation de NADPH. Cette similarité d'évolution suggère fortement que cette mutation est indispensable à la bactérie pour contourner la contrainte métabolique qu'elle subit.

La sélection systématique de la mutation *nuoF** dans un métabolisme accumulant du NADPH pose la question de savoir pourquoi l'évolution adaptative est reproductible pour cette mutation. La mutation *nuoF** est présente sur une protéine centrale du métabolisme bactérien, indispensable pour la génération d'énergie dans la cellule sous forme d'ATP. Une mutation chez une enzyme glycolytique NADH ou NADPH-dépendante n'aurait-elle pas été toute aussi efficace ? Par exemple, d'autres microorganismes tels que *Agrobacterium tumefaciens* ou *Sinorhizobium meliloti* possèdent au sein de leur métabolisme central des enzymes, ou isoenzymes, pouvant utiliser les coenzymes NADPH ou NADH, et contribuant ainsi à l'équilibration des ratios respectifs (Fuhrer & Sauer, 2009).

Cette unique solution adaptative que trouve *E. coli* pour surmonter le stress initial lié au manque de voie de réoxydation de NADPH dans la cellule, appuie l'hypothèse que les mutations pourraient être provoquées de façon non aléatoire, et donc dirigées vers des cibles potentielles, sous l'effet de contraintes dans un contexte d'évolution *in vivo* (Brisson, 2003 ; Wright, 2004).

Chapitre VII

Utilisation des souches accumulant le NADPH pour la bioconversion réductive

Le NADPH est un cofacteur intervenant dans de nombreuses réactions de bioconversion réductive, dont le produit final peut posséder de fortes potentialités physico-chimiques pour des applications industrielles dans la chimie.

Dans cette étude, le choix de souches surproduisant et accumulant le NADPH a été retenu pour réaliser des réactions *in vivo* de bioréduction : la souche rationnellement modifiée présente l'avantage de posséder le système apportant et régénérant le cofacteur NADPH de façon non limitante.

L'étude des capacités de bioréduction *in vivo* des souches accumulant le NADPH a été réalisée grâce aux souches NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ et NA 24 MG1655 $\Delta pfkAB \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$, et leurs souches dérivées. Les substrats utilisés pour l'étude ont été l'éthylacétoacétate (EAA) et les aldéhydes (propionaldéhyde et glycolaldéhyde), respectivement transformés par réduction en éthylhydroxybutyrate (EHB) et en alcools (propanol et éthylène glycol). Les stratégies de bioconversion ont été menées sur des cultures bactériennes en batch, fed-batch, et en continue.

Les travaux sur la bioconversion réductive des aldéhydes s'inscrivent dans le projet européen Biocoup (<http://www.biocoup.com/>) qui a pour ambition la mise au point d'un procédé industriel permettant d'incorporer de la biomasse sous forme de biohuile lors du raffinage du pétrole. Des biohuiles issues de la liquéfaction de résidus de biomasse vont ainsi être retraitées pour permettre leur valorisation en raffinerie. Tous les coproduits issus des différents process de transformations (liquéfaction, désoxygénation...), tels que les aldéhydes, vont être convertis pour être valorisés en produits organiques oxygénés présentant des applications industrielles intéressantes.

1. Bioconversions en fioles en culture batch

1.1. Réduction asymétrique d'éthylacétoacétate en éthylhydroxybutyrate

1.1.1. Construction de la souche bioréductrice

Le gène exogène GRE2p de *Saccharomyces cerevisiae* codant pour une méthylglyoxal réductase NADPH-dépendante a été surexprimé chez la souche utilisée pour la bioconversion réductive *in vivo*. L'enzyme Gre2p est impliquée dans la détoxification du méthylglyoxal intracellulaire en le réduisant en lactaldéhyde (Chen *et al.*, 2003). Cette enzyme utilise une large variété de substrats comme le phenylglyoxal, le glyoxal, le 3-méthylbutyraldéhyde et l'isovaléraldéhyde (Hauser *et al.*, 2007). Cette enzyme est aussi capable de catalyser la réaction de réduction asymétrique de l'éthylacétoacétate (EAA) en S-(+)-éthylhydroxybutyrate (EHB) (Kometani *et al.*, 1993). Ce dernier est utilisé dans les industries agroalimentaires et dans la parfumerie en tant que composé aromatique à senteur de fruits rouges, tels que le raisin.

Le gène GRE2p a été cloné chez *E. coli* par l'intermédiaire d'un plasmide type Bluescript pSK sous le contrôle du promoteur du gène *gapA*. Ce promoteur est connu pour permettre une forte

expression d'ARN messager du gène qu'il contrôle dans diverses conditions de croissance (Charpentier & Branlant, 1994 ; Thouvenot *et al.*, 2004). Ce plasmide noté pSK-PgapA-GRE2p a été introduit dans la souche NA 24 MG1655 $\Delta pfkAB \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ pour ainsi permettre la réduction asymétrique NADPH-dépendante d'éthylacétoacétate en éthylhydroxybutyrate, donnant ainsi la souche NA 135 MG1655 $\Delta pfkAB \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ pSK-PgapA-GRE2p.

1.1.2. Bioréduction d'éthylacétoacétate en éthylhydroxybutyrate sur milieu minimum et galactose

La bioréduction d'éthylacétoacétate en éthylhydroxybutyrate a été réalisée en culture batch de la souche NA 135 MG1655 $\Delta pfkAB \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ pSK-PgapA-GRE2p en milieu minimum synthétique, sur 5 g.l⁻¹ de galactose et sur 1,5 g.l⁻¹ d'éthylacétoacétate. Une culture témoin de la même souche dans les mêmes conditions mais sans éthylacétoacétate a été suivie en parallèle (Figure 72).

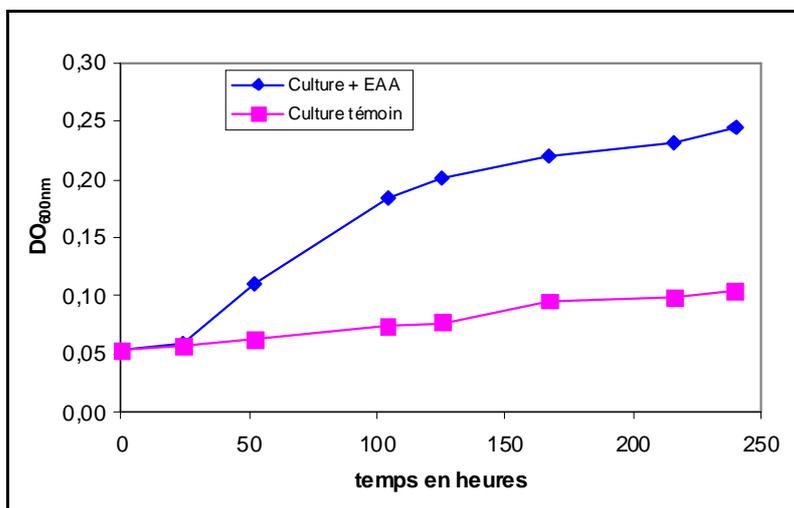


Figure 72 : Croissance de la souche NA 135 MG1655 $\Delta pfkAB \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ pSK-PgapA-GRE2p sur milieu minimum synthétique et galactose avec ou sans EAA.

Une culture test a été réalisée avec 1,5 g.l⁻¹ d'EAA initial, soit environ 12 mM.

La conversion d'éthylacétoacétate en éthylhydroxybutyrate de la souche NA 135 MG1655 $\Delta pfkAB \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ pSK-PgapA-GRE2p a été suivie au cours de la culture test et est présentée Figure 73.

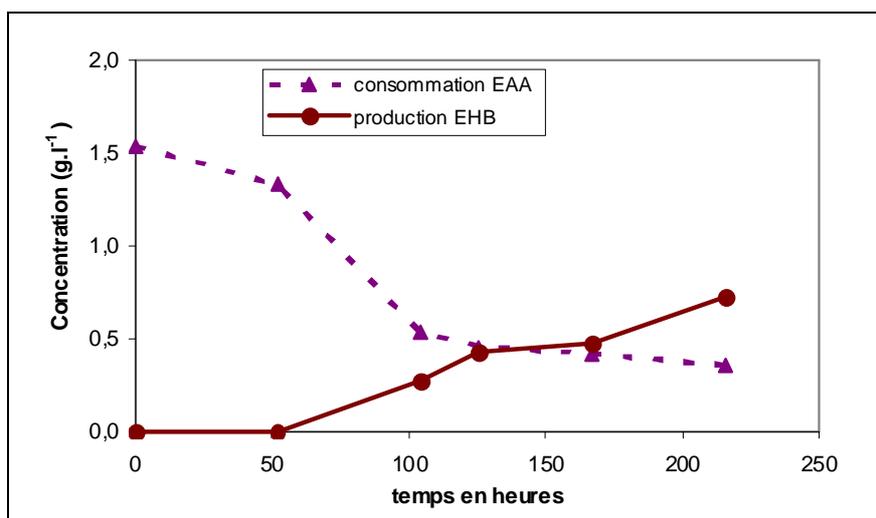


Figure 73 : Concentrations en EAA et EHB (g.l⁻¹) de la culture de bioréduction de la souche NA 135 MG1655 $\Delta pfkAB \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ pSK-PgapA-GRE2p sur milieu minimum synthétique et galactose.

La vitesse spécifique de production d'éthylhydroxybutyrate, calculée sur les 240 heures de culture, est de $0,83 \text{ mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ et la vitesse spécifique de consommation de galactose est de $0,79 \text{ mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Ces deux vitesses très proches laissent supposer que la croissance bactérienne est contrôlée par la vitesse de réaction enzymatique de bioconversion.

1.1.3. Impact de la bioconversion sur la croissance bactérienne

La croissance bactérienne serait contrôlée par la vitesse de réaction enzymatique de bioconversion, c'est-à-dire que la réoxydation du NADPH via la méthylglyoxal réductase Gre2p lèverait partiellement l'inhibition sur la croissance bactérienne due à l'excès de NADPH. Pour étayer cette hypothèse, un ajout d'éthylacétoacétate a été effectué à la 240^{ème} heure de culture, et l'impact sur la croissance bactérienne a été suivi par mesure de la densité optique à 600 nm, avec toujours en parallèle la culture sans éthylacétoacétate (Figure 74).

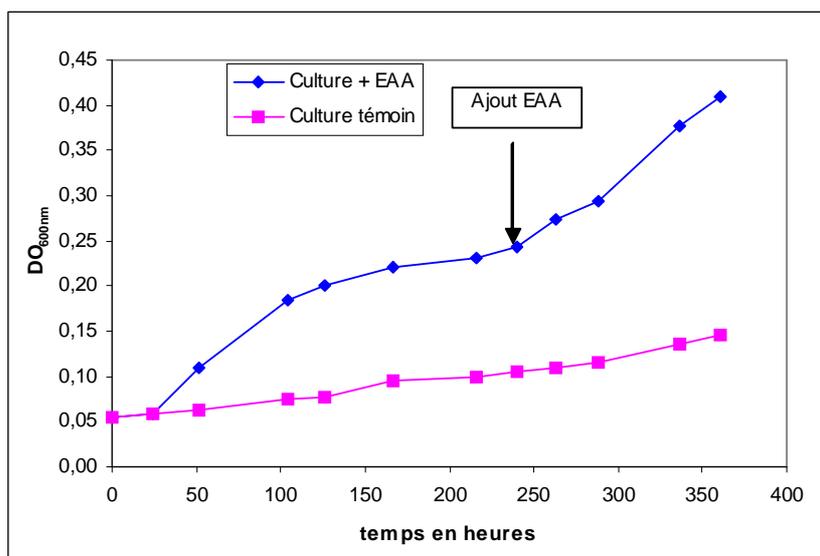


Figure 74 : Croissance de la souche NA 135 MG1655 $\Delta pfkAB \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ pSK-PgapA-GRE2p sur milieu minimum synthétique et galactose après ajout d'EAA.

Une culture a été réalisée avec $1,5 \text{ g.l}^{-1}$ d'EAA initial, soit environ 12 mM, et ajout supplémentaire de $1,5 \text{ g.l}^{-1}$ d'EAA à la 240^{ème} heure de culture, l'autre sans aucun apport d'EAA.

L'ajout d'éthylacétoacétate dans le milieu de culture a provoqué une augmentation significative d'un facteur deux du taux de croissance instantané, et a permis d'atteindre des concentrations en biomasse très supérieures à la culture témoin.

Au final, la vitesse de production spécifique d'éthylhydroxybutyrate est de $0,12 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$, pour un ratio initial de biocatalyseur (biomasse) sur le substrat (EAA) de $0,006 \text{ g.g}^{-1}$. En comparaison, des systèmes en fermenteur (3 litres de milieu) utilisant des cellules en arrêt de croissance ont atteint des vitesses de production de $2 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ pour un ratio biocatalyseur/substrat de $0,37 \text{ g.g}^{-1}$ (Walton & Stewart, 2004). Cela suggère une forte potentialité pour l'utilisation de souches accumulant le NADPH en méthode batch.

Cette expérience de culture de bioréduction d'éthylacétoacétate en éthylhydroxybutyrate a permis de valider la viabilité de souches accumulant le NADPH pour leur utilisation dans des procédés de bioconversion fermentaire.

De plus, l'augmentation significative de la vitesse de croissance en présence d'un système de réoxydation du NADPH, ici la méthylglyoxal réductase et le substrat éthylacétoacétate, a permis de confirmer l'effet inhibiteur dû à l'accumulation de NADPH dans la cellule. L'utilisation de souches accumulant le NADPH pour l'évolution *in vivo* d'enzymes NADPH-dépendantes (cf. Chapitre I) est donc validée, car l'efficacité de l'enzyme pourra être sélectionnée par le gain de croissance de la souche accumulant du NADPH.

1.2. Réduction d'aldéhydes en alcools

1.2.1. Construction et caractérisation de la souche réductrice d'aldéhydes

1.2.1.1. Utilisation de l'aldéhyde réductase YqhD

La réduction des aldéhydes en alcools a été catalysée par l'enzyme aldéhyde réductase YqhD (Sulzenbacher *et al.*, 2004). Cette enzyme utilise une très large variété de substrats et est capable de réduire de nombreux aldéhydes (Pérez *et al.*, 2008). Elle permet la réduction du propionaldéhyde et du glycolaldéhyde en propanol et en éthylène glycol, respectivement. De par ses propriétés physico-chimiques, le propanol est principalement utilisé comme solvant organique, intermédiaire de synthèse, agent dégraissant, cirage, liquide pour freins et antiseptique. L'éthylène glycol a de nombreuses applications dans l'industrie de par ses températures de fusion et de vaporisation basses et de sa grande affinité avec l'eau. Il est ainsi principalement utilisé comme antigel et réfrigérant. Il permet aussi la production de fibres et de résines de polyester. Enfin, il peut être utilisé comme déshydratant lors de la production de gaz naturel ou d'hydrocarbures.

Cette enzyme a été surexprimée chez les souches accumulant le NADPH afin d'optimiser l'efficacité de bioconversion enzymatique. Elle a été clonée dans un plasmide issu de la fusion des plasmides pCL1920 et pTRC99A (gène *lacI* et promoteur P_{trc} inductible à l'IPTG) pour donner le plasmide pME101-*yqhD*.

Ce plasmide a été transféré dans la souche NA 141E MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor nuoF rpoA^*$ pour augmenter son activité aldéhyde réductase. Cette nouvelle souche, MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor rpoA^*$ pME101-*yqhD*, destinée à la bioconversion d'aldéhydes en alcools est désignée sous le nom de NA 172E.

1.2.1.2. Impact de l'induction de la protéine recombinante sur la croissance

Le plasmide pME101-*yqhD* permet une forte surexpression de la protéine recombinante YqhD en présence de son inducteur, l'IPTG. En absence d'induction, le promoteur P_{trc} possède une fuite basale permettant une expression non négligeable du gène contrôlé.

Afin d'évaluer l'impact de la surproduction de l'enzyme YqhD sur la croissance bactérienne, la souche NA 172E MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor rpoA^*$ pME101-*yqhD* a été mise en culture en milieu minimum synthétique sur glucose en présence de différentes concentrations d'IPTG. Les taux de croissance mesurés en fonction de la concentration initiale en IPTG sont présentés dans le Tableau 55.

Tableau 55 : Taux de croissance (h^{-1}) de la souche NA 172E en fonction de la concentration en IPTG.

Les moyennes et les écart-types ont été calculés sur deux mesures indépendantes.

Concentration en ITPG (μM)	0	25	50	100
$\mu (h^{-1})$	0,11 \pm 0,01	0,07 \pm 0,01	0,02 \pm 0,00	0,02 \pm 0,00

La concentration en IPTG et donc la force d'induction de l'expression d'YqhD par le promoteur Ptrc entraîne une inhibition significative de la croissance bactérienne, avec un taux de croissance divisé par cinq à partir de 50 µM d'IPTG.

Comme l'aldéhyde réductase YqhD a la potentialité de restaurer partiellement la croissance en réoxydant le NADPH, sa forte induction peut avoir un effet positif sur la croissance en présence d'aldéhydes. C'est pourquoi des cultures en présence de 0 et 50 µM d'IPTG ont été réalisées pour étudier l'impact de la concentration de différents aldéhydes.

1.2.1.3. Influence des aldéhydes sur la croissance bactérienne

Les effets du propionaldéhyde et du glycolaldéhyde ont été testés sur la croissance de la souche NA 172E MG1655 Δ pgi Δ udhA Δ edd Δ qor rpoA* pME101-yqhD et la souche sauvage MG1655, et cela aux concentrations initiales de 1, 5 et 15 mM. Les aldéhydes ont été ajoutés au milieu de culture dès le début de la croissance, c'est-à-dire pour de faibles concentrations en biomasse.

Les taux de croissance de ces deux souches en fonction de la quantité de chaque aldéhyde sont présentés dans les Tableaux 56 et 57.

Tableau 56 : Taux de croissance (h⁻¹) de la souche NA 172E en fonction de la nature et de la concentration en aldéhyde, en présence ou non d'IPTG.

	NA 172E		NA 172E + 50 µM IPTG	
	Propionaldéhyde	Glycolaldéhyde	Propionaldéhyde	Glycolaldéhyde
0 mM	0,11		0,02	
1 mM	0,16	0,16	0,05	0,06
5 mM	0,17	0,12	0,03	0
15 mM	0,01	0	0	0

Tableau 57 : Taux de croissance (h⁻¹) de la souche MG1655 en fonction de la nature et de la concentration en aldéhyde.

	MG1655	
	Propionaldéhyde	Glycolaldéhyde
0 mM	0,6	
1 mM	0,43	0,38
5 mM	0,34	0,38
15 mM	0,34	0

La présence d'aldéhydes n'a pas le même effet suivant la souche. La souche de bioconversion NA 172E MG1655 Δ pgi Δ udhA Δ edd Δ qor rpoA* pME101-yqhD a sa croissance moins inhibée par les aldéhydes, et pour des concentrations inférieures à 5 mM, les taux de croissance sont supérieurs en présence d'aldéhydes. Le système de réoxydation du NADPH par la réduction d'aldéhyde catalysée par l'enzyme YqhD permet donc de restaurer partiellement la croissance. La souche sauvage MG1655 est quant à elle touchée par la présence d'aldéhyde, avec un effet létal du glycolaldéhyde à 15 mM. De manière générale, le glycolaldéhyde semble plus toxique que le propionaldéhyde.

L'effet positif sur la croissance de la présence d'aldéhydes en faible quantité sur la croissance est aussi significatif en présence ou non d'IPTG. La fuite du promoteur Ptrc sans induction permet donc l'expression du gène *yqhD* en quantité suffisante pour avoir un impact bénéfique sur la croissance bactérienne.

1.2.2. Bioconversion de propionaldéhyde en propanol

1.2.2.1. Effet de la délétion *adhE*

Pour éviter la reconsommation possible du propanol, ou établissement d'une réaction parasite, le gène *adhE* a été inactivé chez la souche de bioconversion. La souche ainsi obtenue MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor \Delta adhE rpoA^*$ pME101-*yqhD* est appelée NA 180E.

Des cultures de bioconversion des souches avec et sans AdhE ont été entreprises avec une concentration initiale de 5 mM (soit 0,29 g.l⁻¹) de propionaldéhyde et 5 g.l⁻¹ de glucose, pour évaluer l'influence de l'inactivation d'AdhE. La comparaison des vitesses spécifiques de production de propanol, de consommation du propionaldéhyde, ainsi que des rendements molaires de propanol produit par rapport au glucose consommé est présentée dans le Tableau 58.

Tableau 58 : Vitesses spécifiques de production du propanol et de consommation du propionaldéhyde, et rendement molaire propanol/glucose des souches accumulant le NADPH de bioconversion.

	NA 172E	NA 180E
	MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ <i>nuoF rpoA*</i> pME101- <i>yqhD</i>	MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor \Delta adhE$ <i>nuoF rpoA*</i> pME101- <i>yqhD</i>
Q _{propanol}	0,14	0,32
Q _{propionaldéhyde}	0,47	0,30
Y _{Propanol/S} (mol/mol)	0,03	0,24

L'inactivation d'AdhE est responsable d'une augmentation de la vitesse spécifique de production du propanol, ainsi que d'une amélioration du rendement de production de propanol en fonction du glucose consommé. Toutefois, le fort écart entre les vitesses de consommation de propionaldéhyde et de production du propanol de la souche NA 172E MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor rpoA^*$ pME101-*yqhD* pourrait être interprété comme une évaporation non négligeable de l'aldéhyde, expliquant le faible rendement de production de propanol par rapport à la souche NA 180E MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor \Delta adhE rpoA^*$ pME101-*yqhD*.

1.2.2.2. Ajout du substrat en cours de culture

Pour améliorer l'efficacité de bioconversion et limiter l'évaporation du propionaldéhyde, des cultures de bioconversions sur 5 g.l⁻¹ de glucose ont été entreprises avec un ajout initial de propionaldéhyde à 10 mM pour une concentration de biomasse supérieure à 0,5 g.l⁻¹. Comme précédemment, les deux souches NA 172E MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor rpoA^*$ pME101-*yqhD* et NA 180E MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor \Delta adhE rpoA^*$ pME101-*yqhD* ont été testées en parallèle. La comparaison des vitesses spécifiques de production de propanol, de consommation du

propionaldéhyde, ainsi que des rendements molaires de propanol produit par rapport au glucose consommé est présentée dans le Tableau 59.

Tableau 59 : Vitesses spécifiques de production du propanol et de consommation du propionaldéhyde, et rendement molaire propanol/glucose des souches accumulant le NADPH de bioconversion.

	NA 172E	NA 180E
	MG1655 Δ <i>pgi</i> Δ <i>udhA</i> Δ <i>edd</i> Δ <i>qor</i> <i>nuoF rpoA*</i> pME101- <i>yqhD</i>	MG1655 Δ <i>pgi</i> Δ <i>udhA</i> Δ <i>edd</i> Δ <i>qor</i> Δ <i>adhE</i> <i>nuoF rpoA*</i> pME101- <i>yqhD</i>
q_{propanol}	0,54	0,94
$q_{\text{propionaldéhyde}}$	0,78	1,48
$Y_{\text{Propanol/S}}$ (mol/mol)	0,15	0,18

L'inactivation d'AdhE chez la souche de bioconversion augmente la vitesse et le rendement de production du propanol, confirmant les résultats précédents.

L'ajout de propionaldéhyde à 10 mM pour une concentration en biomasse supérieure à 0,5 g/L augmente les vitesses spécifiques de consommation du propionaldéhyde et de production du propanol. Cela montre que le facteur limitant dans ces conditions de culture et de bioconversion est la concentration initiale en substrat, ici le propionaldéhyde.

Le rendement de production de propanol par rapport à la consommation de glucose est significativement amélioré pour la souche NA 172E MG1655 Δ *pgi* Δ *udhA* Δ *edd* Δ *qor* *rpoA** pME101-*yqhD*.

Toutefois, le fort écart entre les vitesses de consommation de propionaldéhyde et de production du propanol de la souche NA 180E MG1655 Δ *pgi* Δ *udhA* Δ *edd* Δ *qor* Δ *adhE* *rpoA** pME101-*yqhD* suggère qu'il y a toujours pourrait une évaporation non négligeable de l'aldéhyde.

1.2.2.3. Comparaison avec une souche « sauvage » de référence

Pour évaluer l'impact du génotype surproducteur de NADPH sur l'efficacité de bioconversion de propionaldéhyde en propanol, des souches de bioconversion dites de référence ont été construites. Les souches MG1655 pME101-*yqhD* et MG1655 Δ *adhE* pME101-*yqhD*, appelées respectivement NA 178 et NA 179, ont été testées en suivant les mêmes conditions de culture employées pour les souches accumulant le NADPH. Les vitesses spécifiques de production de propanol, de consommation du propionaldéhyde, et les rendements molaires de propanol produit par rapport au glucose consommé sont présentées dans les Tableaux 60 et 61, correspondant à l'ajout initial de propionaldéhyde à 5 mM et à l'ajout différé de propionaldéhyde à 10 mM, respectivement

Tableau 60 : Vitesses spécifiques de production du propanol et de consommation du propionaldéhyde, et rendement molaire propanol/glucose des souches références de bioconversion.

	NA 178	NA 179
	MG1655 pME101-yqhD	MG1655 $\Delta adhE$ pME101-yqhD
q_{propanol}	1,03	0,73
$q_{\text{propionaldéhyde}}$	1,15	0,71
$Y_{\text{Propanol/S}}$ (mol/mol)	0,18	0,12

Tableau 61 : Vitesses spécifiques de production du propanol et de consommation du propionaldéhyde, et rendement molaire propanol/glucose des souches références de bioconversion.

	NA 178	NA 179
	MG1655 pME101-yqhD	MG1655 $\Delta adhE$ pME101-yqhD
q_{propanol}	3,28	3,82
$q_{\text{propionaldéhyde}}$	2,91	3,07
$Y_{\text{Propanol/S}}$ (mol/mol)	0,3	0,36

Comme précédemment, le facteur limitant de bioconversion est la concentration initiale de propionaldéhyde, car les vitesses de production de propanol sont fortement augmentées en présence de 10 mM de propionaldéhyde.

Globalement, les souches références de bioconversion ont une meilleure efficacité de bioconversion de propionaldéhyde en propanol. Toutefois, les vitesses de croissance significativement plus importantes des souches de références limitent les temps d'incubation, et donc diminuent les risques d'évaporation. Pour remédier à ce problème, la comparaison des souches accumulant le NADPH et de références doivent se faire en conditions de cultures continues où les taux de croissance sont imposés par les paramètres du système de culture (taux de dilution).

Enfin, pour évaluer l'avantage d'un métabolisme surproduisant le NADPH pour la bioconversion, le NADPH doit être le facteur limitant de la réaction bioréductrice, ce qui implique de diminuer le ratio biocatalyseur/substrat.

1.2.3. Bioconversion de glycolaldéhyde en éthylène glycol

Pour la bioconversion du glycolaldéhyde en éthylène glycol en cultures batch, les souches de bioconversion NADPH et de référence ont subi la délétion du gène *aldA* qui code pour une aldéhyde déshydrogénase. Cette enzyme intervient dans la voie de dégradation de l'éthylène glycol et catalyse l'oxydation du glycolaldéhyde en glycolate.

Chapitre VII - Utilisation des souches accumulant le NADPH à la bioconversion réductive

La souche accumulant du NADPH testée pour la production d'éthylène glycol possède la mutation *nuoF** est la souche NA 195E MG1655 *Δpgi ΔudhA Δedd Δqor ΔadhE ΔaldA nuoF* rpoA pME101-yqhD*. Cette souche va être comparée à la souche de référence issue de la souche sauvage, la souche NA 188 MG1655 *ΔadhE ΔaldA pME101-yqhD*.

La comparaison de l'efficacité de bioconversion de ces deux souches en milieu minimum synthétique sur glucose (5 g.l⁻¹) a été effectuée par ajout de glycolaldéhyde 1 mM final pour une concentration de biomasse supérieure à 0,3 g.l⁻¹. Les vitesses spécifiques de production d'éthylène glycol, de consommation du glycolaldéhyde, et les rendements molaires d'éthylène glycol produit par rapport au glucose consommé sont présentées dans le Tableau 62.

Tableau 62 : Vitesses spécifiques de production d'éthylène glycol et de consommation du glycolaldéhyde, et rendement molaire éthylène glycol/glucose des souches accumulant le NADPH et référence de bioconversion.

	NA 195E MG1655 <i>Δpgi ΔudhA Δedd Δqor ΔadhE ΔaldA nuoF* rpoA pME101-yqhD</i>	NA 188 MG1655 <i>ΔadhE ΔaldA pME101-yqhD</i>
q_{EG}	0,26	1,1
$q_{\text{glycolaldéhyde}}$	0,22	0,92
$Y_{EG/S}$ (mol/mol)	0,1	0,09

Bien que la vitesse de production d'éthylène glycol soit inférieure pour la souche accumulant le NADPH du fait de son taux de croissance plus faible (0,14 contre 0,54 h⁻¹ pour la souche NA 188), le rendement molaire de production d'éthylène glycol sur la consommation de glucose est le même que pour la souche NA 195E. Les vitesses de production d'éthylène glycol sont proches des vitesses de consommation du glycolaldéhyde, suggérant que l'évaporation de l'aldéhyde est négligeable. De plus, les rendements de bioconversion calculés comme le rapport de l'éthylène glycol produit sur le glycolaldéhyde apporté sont de 100% pour les deux souches. Enfin, la productivité moyenne en éthylène glycol a été mesurée à 0,35 mM/h et 0,98 mM/h pour les souches NA 195E et NA 188, respectivement.

La faisabilité du procédé de bioconversion du glycolaldéhyde en éthylène glycol a été validée par les tests en fiole en démontrant que des rendements de bioconversion de 100% étaient atteints. L'utilisation du glycolaldéhyde par rapport au propionaldéhyde est donc retenue pour tester le procédé de bioconversion en culture en chemostat (cultures continues et discontinues) avec des souches NADPH. L'utilisation de chemostat doit permettre d'atteindre de plus fortes concentrations en biomasse et donc en éthylène glycol produit. Les différences observées dans les procédés de bioconversion du propionaldéhyde ou du glycolaldéhyde s'expliquent par les propriétés moins volatiles pour ce dernier, avec une température de vaporisation de 131,3 °C et densité de 1,065, contre 49°C et 0,81 pour le propionaldéhyde.

2. Bioconversion de glycolaldéhyde en éthylène glycol en chemostat

Les résultats précédents ont montré que le glycolaldéhyde est un composé toxique pour la bactérie, et cela même à de faibles concentrations à 10 mM. La réduction de ce dernier en éthylène glycol, composé non toxique, permet de valoriser l'aldéhyde en un alcool qui a de nombreuses applications dans l'industrie de part ses températures basses de fusion et de vaporisation, et de sa grande affinité avec l'eau.

Les tests en fiole ont permis de valider le procédé de bioconversion par des souches optimisées en montrant que le rendement de bioréduction du glycolaldéhyde en éthylène glycol est de 100%.

La culture de bioconversion de glycolaldéhyde en éthylène glycol en chemostat a donc pour objectif d'augmenter la quantité de glycolaldéhyde réduit par une augmentation de la concentration en biomasse. Ainsi ces nouvelles conditions de culture ont permis de comparer les souches NA 195E $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor \Delta adhE \Delta aldA nuof^* rpoA$ pME101-*yqhD* et NA 188 MG1655 $\Delta adhE \Delta aldA$ pME101-*yqhD*, et ainsi démontrer l'efficacité de souches accumulant le NADPH pour la bioconversion d'aldéhydes toxiques pour la bactérie, notamment en mettant en évidence les limites de la souche NA 188 à réduire le glycolaldéhyde.

2.1. Particularités du procédé de bioconversion du glycolaldéhyde

2.1.1. Présentation du système chemostat

Pour évaluer l'efficacité de bioconversion des souches accumulant le NADPH par rapport à une souche sauvage MG1655, la réduction du glycolaldéhyde en éthylène glycol a été réalisée lors de cultures continues et discontinues dans un environnement contrôlé (pH, aération...). Le système de chemostat utilisé est un système DasGip Fed-batch Pro[®] piloté par ordinateur, qui permet de suivre jusqu'à quatre chemostats en parallèle. L'apport d'air (mélange air + oxygène), l'ajout de base et la température sont régulés par des modules contrôlés par des sonde pO₂, sonde pH et sonde température, respectivement. Un module de pompes permet de contrôler la vitesse d'apport de la solution de milieu frais et la vitesse de soutirage des cellules en culture (Figure 75). Ces vitesses vont définir la vitesse de dilution du chemostat, vitesse qui va fixer le taux de croissance des bactéries cultivées (cf. Chapitre I). Le taux de croissance fixé pour chaque culture permet ainsi de mieux comparer deux souches n'ayant pas les mêmes taux de croissance, ce qui est le cas pour les souches accumulant le NADPH qui ont un taux de croissance plus faible que celui des souches dites de référence issues de la souche sauvage MG1655.

Les cultures continues et discontinues vont se différencier par la vitesse de soutirage du milieu de culture : à une vitesse nulle, il y aura accumulation du milieu apporté, alors qu'avec une vitesse différente de zéro le système sera placé en mode continu avec un renouvellement du milieu régulier.

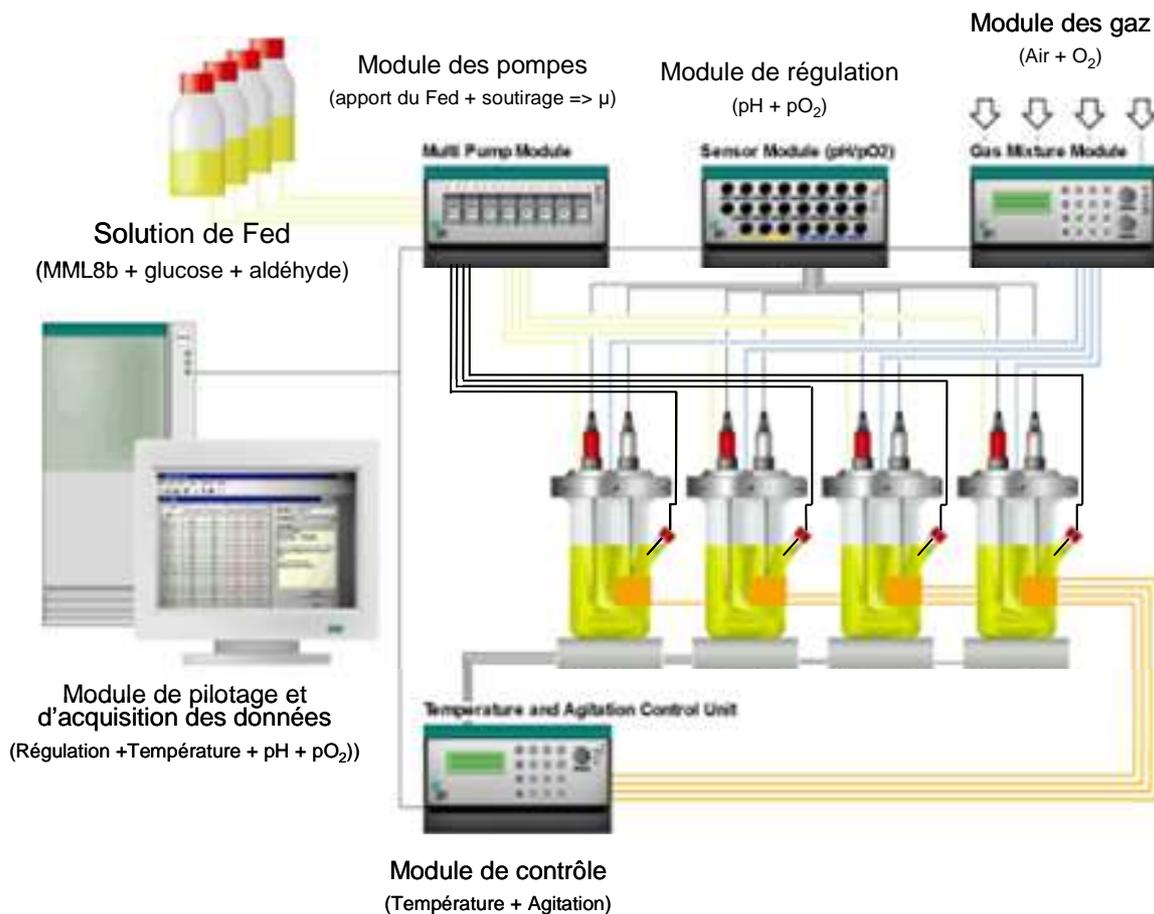


Figure 75 : Schématisation des cultures de bioconversion réalisées en chemostats (système DasGip Fed-batch Pro®)

2.1.2. Instabilité et toxicité du glycolaldéhyde

Des travaux précédents sur le glycolaldéhyde ont montré qu'au contact de l'air, ce dernier s'autoxyde en glyoxal à la suite d'une tautomérisation spontanée en énol favorisée par des pH élevés (Figure 76).

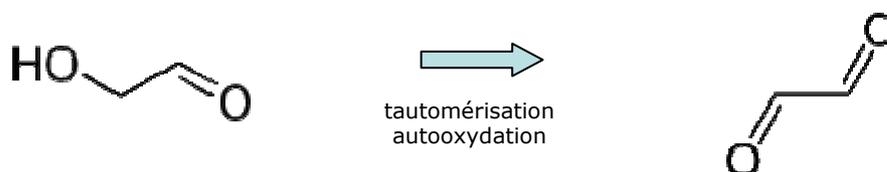


Figure 76 : Réaction simplifiée d'autooxydation du glycolaldéhyde en glyoxal

Cette réaction est à l'origine de la production de radicaux libres oxygénés $O_2^{\cdot -}$, responsable de l'initiation et de la propagation de la réaction. L'autooxydation du glycolaldéhyde en glyoxal est généralisable à l'oxydation des sucres à courtes chaînes carbonées en composés α,β -dicarbonyles (Figure 77) (Okado-Matsumoto & Fridovich, 2000).

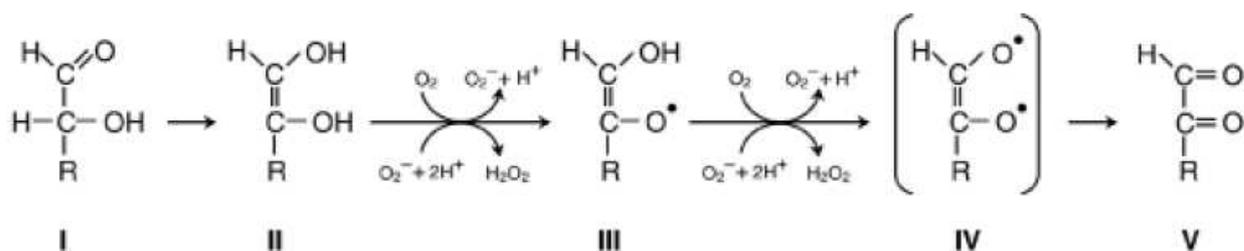


Figure 77 : Oxidation d'un sucre en composé α,β -dicarbonylé (D'après Okado-Matsumoto & Fridovich, 2000).

La tautomérisation de l'aldose (**I**) conduit à un énediol (**II**). L'oxydation O_2 ou $\text{O}_2^{\cdot-}$ dépendante de l'enediol produit des intermédiaires mono (**III**) et biradicaux (**IV**) avec des radicaux libres oxygénés. Le composé biradicalaire est très instable et va rapidement se transformer en composé dicarbonylé (**V**).

Le glycolaldéhyde et le glyoxal provoquent un stress oxydatif dans la cellule, responsable d'une inhibition de la croissance. Plus précisément, le glycolaldéhyde et le glyoxal ont des effets inhibiteurs sur l'activité spécifique de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (Benov & Fridovich, 2002).

Le glycolaldéhyde, et le glyoxal, peut donc avoir un effet fortement inhibiteur sur une souche *E. coli* MG1655 Δpgi dont la dégradation du glucose se fait exclusivement via la glucose-6-phosphate déshydrogénase.

Le procédé de fermentation utilisé pour la bioconversion du glycolaldéhyde devra donc tenir compte des propriétés physico-chimiques de ce dernier pour éviter les effets toxiques sur les cellules et pour permettre un rendement de bioconversion optimal. Les concentrations plus fortes utilisées lors des cultures en chemostat vont probablement accentuer ce phénomène de dégradation du glycolaldéhyde, non démontré en fioles.

2.1.3. Conditions de culture spécifiques pour la bioconversion en chemostat

Plusieurs tests ont été réalisés sur la dégradation du glycolaldéhyde en glyoxal en fonction de différents paramètres physico-chimiques tels que le pH et les composés du milieu de culture, et fonction des conditions de culture (température, agitation, aération...). Ces tests ont ainsi permis d'optimiser le milieu et les conditions de culture pour réduire au maximum la dégradation du glycolaldéhyde en glyoxal.

2.1.3.1. Forte dégradation du glycolaldéhyde en conditions de culture continue

Une culture continue en chemostat a été effectuée sans cellule dans le but d'étudier la dégradation du glycolaldéhyde dans les conditions standards de culture : température de 37°C, agitation à 400 rpm, aération à 2 sl/h et un pH de 6,8.

Le « chemostat blanc » sans biomasse a été alimenté indépendamment par une solution de glycolaldéhyde à 70 mM et par une solution de MML8b à 10 g/l de glucose, avec des débits de 2 ml/h et 3 ml/h, respectivement. Le milieu théorique dans le chemostat est donc à 6,6 g/l en glucose et environ 25 mM en glycolaldéhyde, et le taux de dilution du système est de $0,025 \text{ h}^{-1}$, le chemostat étant réalisé avec un volume de 200 ml de culture. Le milieu de croissance et l'aldéhyde ne sont ainsi en contact que dans le chemostat évitant ainsi des interactions pouvant conduire à une dégradation précoce dans le milieu de culture.

Dans ces conditions très proches des conditions réelles de culture, la vitesse de dégradation du glycolaldéhyde a été évaluée à $0,54 \pm 0,10 \text{ mM/h}$. Cette vitesse de dégradation est du même ordre de grandeur que la vitesse de bioconversion calculée en fioles. Une culture de contrôle a aussi été réalisée avec un chemostat comprenant de l'eau et du glycolaldéhyde à 25 mM à une température de 37°C , une agitation de 400 rpm et une aération de 2 sl/h, dans le but de voir s'il y a évaporation de l'aldéhyde. Le suivi des concentrations du glycolaldéhyde ont montré que la concentration de ce dernier est constante au cours du temps, démontrant que le phénomène d'évaporation du glycolaldéhyde est inexistant ou négligeable. De plus, cette culture de contrôle a permis de démontrer que la dégradation du glycolaldéhyde est nulle en présence d'eau uniquement. La dégradation de l'aldéhyde est donc dépendante du milieu de culture.

La vitesse de dégradation du glycolaldéhyde doit être maîtrisée pour espérer atteindre un rendement de 100% dans ces conditions de culture. Ainsi, l'influence du pH et des différents composés du milieu de culture sur la dégradation du glycolaldéhyde a été étudiée, et les résultats correspondants sont présentés dans les parties suivantes.

2.1.3.2. Influence du pH sur la dégradation du glycolaldéhyde

La vitesse de dégradation du glycolaldéhyde a aussi été testée dans le milieu MML8b à différents pH (5, 6, 6,8 et 8). Les vitesses de dégradation sont calculées en mesurant la concentration du glycolaldéhyde dans le milieu à l'instant $t = 0$ puis à $t = 24$ heures. Le glycolaldéhyde est ajouté au milieu MML8b à une concentration de 10 mM et le mélange est laissé sans agitation à température ambiante. Les vitesses de dégradation du glycolaldéhyde en fonction du pH du milieu sont présentées dans la Figure 78.

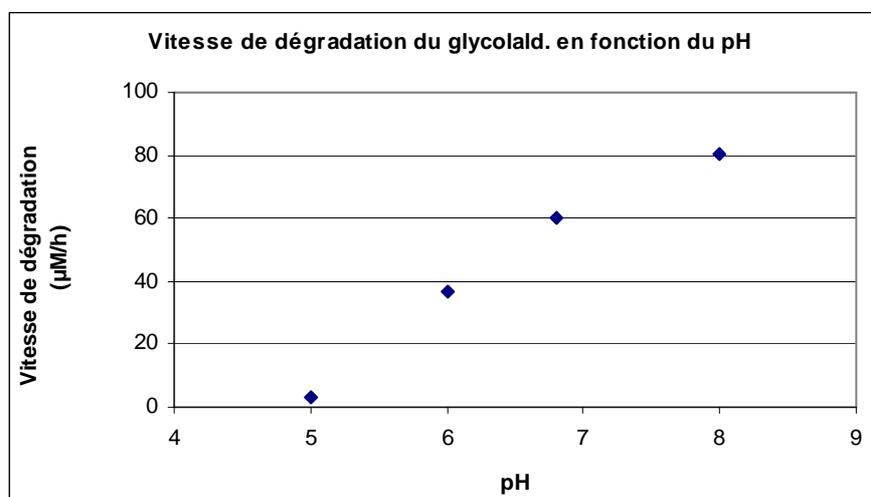


Figure 78 : Vitesse de dégradation du glycolaldéhyde en fonction du pH du milieu MML8b

L'augmentation de la vitesse de dégradation du glycolaldéhyde en présence de milieu MML8b est corrélée avec l'augmentation du pH. Ainsi, le glycolaldéhyde semble instable à des pH supérieurs à 5, et la vitesse de dégradation de ce dernier dans les conditions de culture utilisées à pH = 6,8 peut être estimée proche de 60 $\mu\text{M}/\text{h}$.

Travailler à un pH proche de 6 pourrait permettre de rendre la dégradation du glycolaldéhyde négligeable face à sa transformation en EG par la souche bactérienne.

2.1.3.3. Influence des sels du milieu de culture sur la dégradation du glycolaldéhyde

Pour limiter la toxicité du glycolaldéhyde causée par son autooxydation en glyoxal, la solution de glycolaldéhyde est apportée indépendamment du milieu MML8b contenant la source de carbone, et le pH de la culture est fixé à 6,5. De plus, l'apport du glycolaldéhyde permet d'en augmenter la concentration indépendamment de la solution du glucose.

2.2. Cultures continues de bioconversion

2.2.1. Cultures continues de bioconversion des souches NA 188 et NA 195E

Deux cultures continues de bioconversion en chemostat, FcNA010 et FcNA011, ont été réalisées en parallèle avec les souches NA 195E $\Delta\text{pgi } \Delta\text{udhA } \Delta\text{edd } \Delta\text{qor } \Delta\text{adhE } \Delta\text{aldA } \text{nuoF}^* \text{ rpoA pME101-yqhD}$ et NA 188 MG1655 $\Delta\text{adhE } \Delta\text{aldA pME101-yqhD}$. Le débit du feed (MML8b + 30 g/L de glucose) a été fixé à 3 ml/h et l'apport du glycolaldéhyde (concentration de 125 mM) est fixé à 2 ml/h. Le milieu de culture est donc théoriquement à 18 g/L de glucose et 50 mM de glycolaldéhyde. Le débit total de 5 ml/h fixe le taux de croissance à $0,025 \text{ h}^{-1}$, le volume de culture étant de 200 ml. Ces deux premières cultures ont été réalisées à un pH de 6,8.

Les deux cultures continues des souches NA 188 MG1655 $\Delta\text{adhE } \Delta\text{aldA pME101-yqhD}$ et NA 195E MG1655 $\Delta\text{pgi } \Delta\text{udhA } \Delta\text{edd } \Delta\text{qor } \Delta\text{adhE } \Delta\text{aldA } \text{nuoF}^* \text{ rpoA pME101-yqhD}$ ont permis d'évaluer l'impact d'un génotype « accumulant le NADPH » par rapport à un génotype « sauvage » et sont présentées dans les Figures 79 et 80.

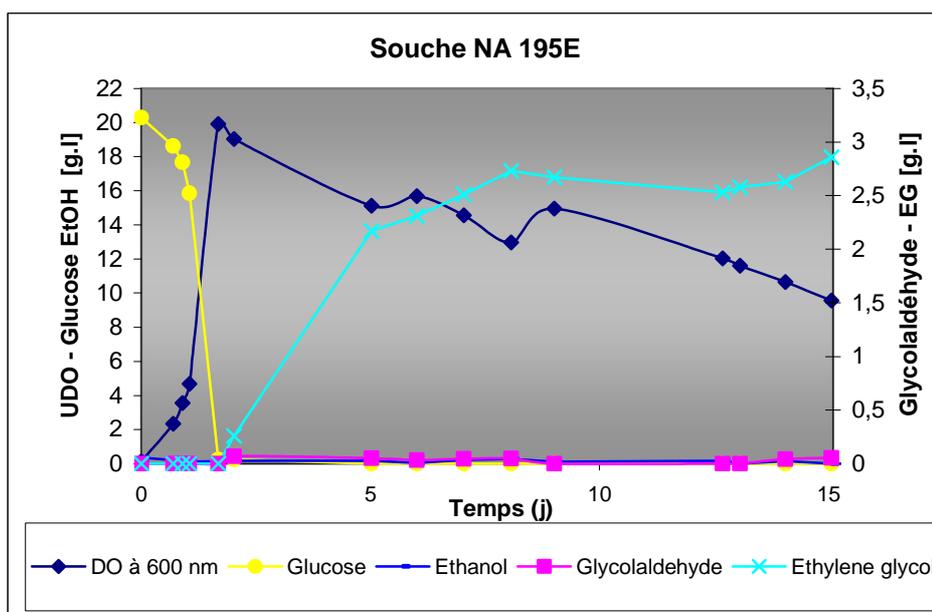


Figure 79 : Suivi du chemostat de la souche NA 195E MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor \Delta adhE \Delta aldA nuof^* rpoA$ pME101-yqhD en milieu MML8b+Glc18+Glyc. 50 mM+Sp100+Cm30 (consignes : 37°C, 400rpm, pH=6,8, débit air=2 sl.h⁻¹, taux de dilution=5 ml.h⁻¹).

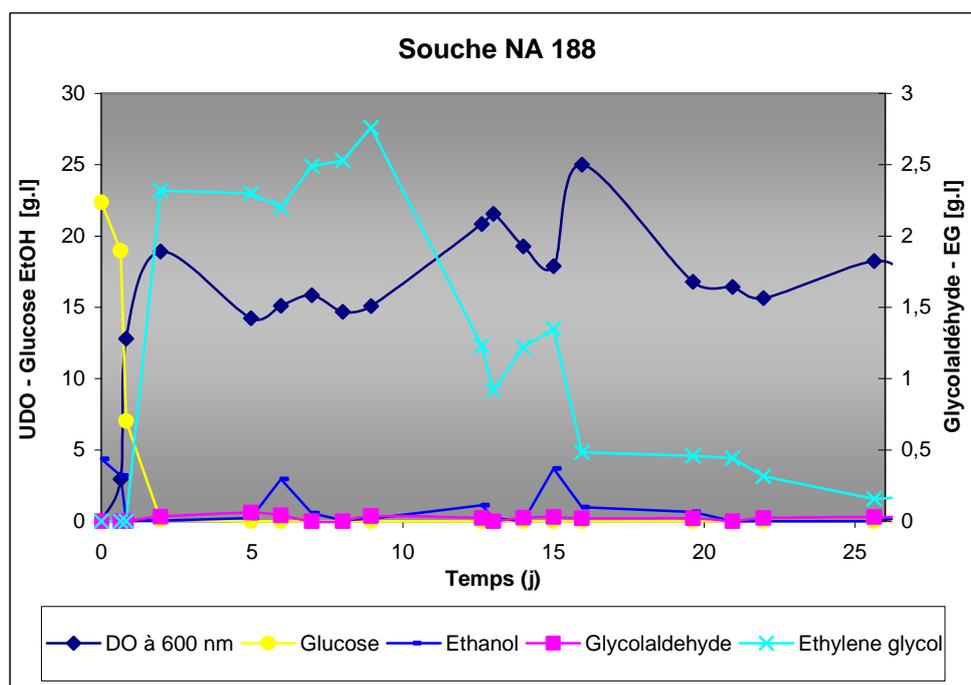


Figure 80 : Suivi du chemostat de la souche NA 188 MG1655 $\Delta adhE \Delta aldA$ pME101-yqhD en milieu MML8b+Glc18+Glyc. 50 mM+Sp100+Cm30 (consignes : 37°C, 400rpm, pH=6,8, débit air=2 sl.h⁻¹, taux de dilution=5 ml.h⁻¹).

L'absence de glucose résiduel dans le milieu de culture confirme que les bactéries se développent à un taux de croissance limité par la source de carbone, évitant ainsi tout processus d'évolution adaptative.

Pour la souche NA 195E, le titre d'éthylène glycol est relativement constant avec un rendement molaire de 93%, malgré une diminution constante de la concentration en biomasse.

Pour la souche NA 188, le titre d'éthylène glycol est relativement constant sur les 10 premiers jours de culture avec un rendement molaire de 81%. Au delà, la concentration d'EG diminue significativement d'un facteur 10 sur environ 12 jours, alors qu'aucune apparition de glycolaldéhyde n'est mesurée, avec un rendement molaire de bioconversion de 22%. L'hypothèse d'activation d'une voie métabolique de consommation du glycolaldéhyde ou de l'EG pourrait expliquer la baisse du titre d'EG dans le réacteur. A ce jour, la seule voie connue de consommation de l'EG chez *E. coli* MG1655 est assurée par l'enzyme FucO, responsable de l'oxydation de l'EG en glycolaldéhyde, et d'AldA, responsable de l'oxydation du glycolaldéhyde en glycolate (Baldomà & Aguilar, 1987). Cette voie métabolique est à priori inactivée chez la souche NA 188 à cause de la délétion du gène *aldA*.

2.2.2. Culture continue de la souche NA 195E à de très fortes concentrations en glycolaldéhyde

Pour évaluer les capacités maximales de la souche NA 195E MG1655 $\Delta pgi \Delta adhA \Delta edd \Delta qor \Delta adhE \Delta aldA nuoF^* rpoA$ pME101-*yqhD*, cette dernière a été testée en culture continue de bioconversion avec de fortes concentrations en glycolaldéhyde de 55 à 100 mM. Les conditions initiales de culture sont identiques à celles utilisées précédemment. Le suivi de cette culture sur plus de 40 jours est présenté dans la Figure 81.

Cette culture peut se décomposer en 4 phases distinctes :

- phase batch sur les premières 24 heures de culture
- phase continue n°2, bioconversion de 55 mM de glycolaldéhyde du 1er au 15ème jour de culture
- phase continue n°3, bioconversion de 75 mM de glycolaldéhyde du 15ème au 30ème jour de culture
- phase continue n°4, bioconversion de 100 mM de glycolaldéhyde à partir du 30ème jour de culture

Ces quatre phases de culture sont décrites en détails dans les paragraphes suivants.

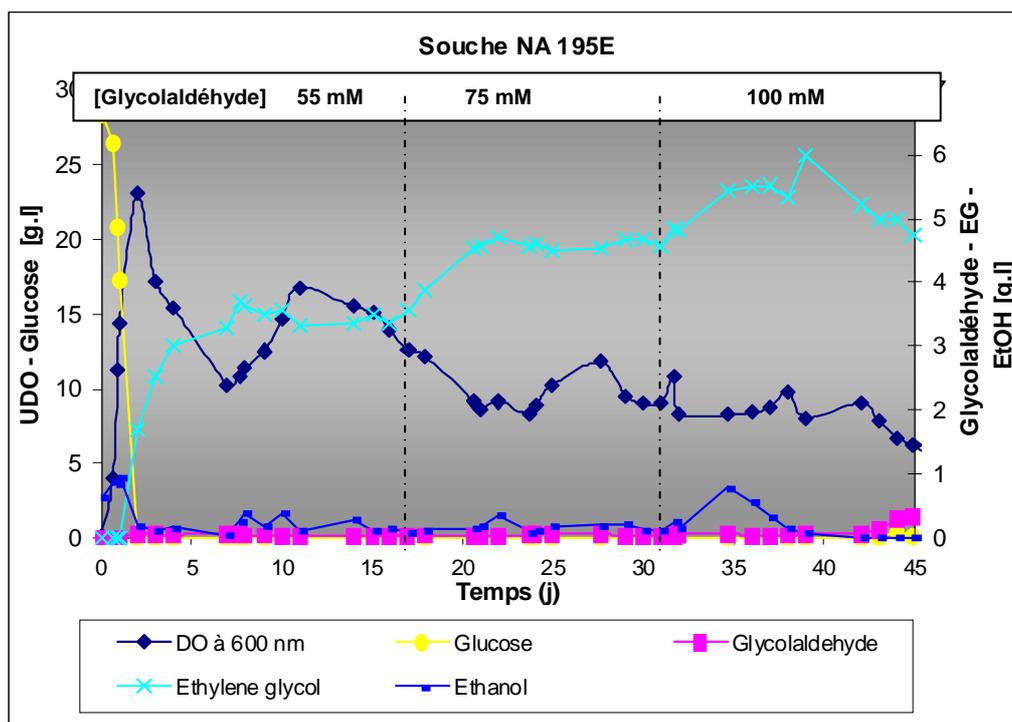


Figure 81 : Suivi du chemostat de la souche NA 195E MG1655 $\Delta adhE \Delta aldA$ pME101-yqhD en milieu MML8b 10% sels A+Glc18+Glyc. 55 - 100 mM+Sp100+Cm30 (consignes : 37°C, 400rpm, pH=6.5, débit air=2 sl.h⁻¹, taux de dilution initial=5 ml.h⁻¹).

La phase batch de la culture continue a été effectuée avec une concentration initiale de 20 g/L de glucose et sans glycolaldéhyde. Après presque un jour de phase batch, la bioconversion est initiée par lancement de la phase continue avec l'apport du glycolaldéhyde.

Le début de la phase 2 de bioconversion avec un apport de 55 mM de glycolaldéhyde se caractérise par une diminution constante de la concentration en biomasse. Ainsi après 7 jours de culture, le taux de dilution est diminué à 4 ml/h (apport du glucose à 2,4 ml/h et du glycolaldéhyde à 1,6 ml/h), soit un taux de croissance de 0,02 h⁻¹. La concentration en biomasse se stabilise alors autour de 15 UDO, avec un titre en EG stable de 3,5 g/l.

Lors du début de la phase 3, le taux de dilution a été de nouveau diminué à 3 ml/h (apport du glucose à 1,8 ml/h et du glycolaldéhyde à 1,2 ml/h, soit un taux de croissance de 0,015 h⁻¹) pour palier à l'augmentation de l'apport de glycolaldéhyde dans le chemostat à 75 mM. Malgré la diminution du taux de dilution, la concentration en biomasse diminue encore à moins de 10 UDO, c'est pourquoi le débit du chemostat est de nouveau abaissé à 2,5 ml/h (apport du glucose à 1,5 ml/h et du glycolaldéhyde à 1 ml/h) à partir du 20ème jour. La concentration en biomasse se stabilise alors autour de 10 UDO, avec un titre en EG stable de 4,5 g/l.

Lors du début de la phase 4, le taux de dilution a été de nouveau diminué à 2 ml/h (apport du glucose à 1,2 ml/h et du glycolaldéhyde à 0,8 ml/h, soit un taux de croissance de 0,01 h⁻¹) pour palier à l'augmentation de l'apport de glycolaldéhyde dans le chemostat à 100 mM. La concentration en biomasse se stabilise alors autour de 8-9 UDO avec un titre d'EG de 5,5 g/l.

Pour valider ce procédé de bioconversion de glycolaldéhyde en éthylène glycol sur une fraction d'aldéhyde obtenue à partir de coproduits de liquéfaction de biomasse, une dernière culture continue en chemostat a été réalisée. La fraction fournie par les partenaires du projet Biocoup

contient 36 g/l de glycolaldéhyde, soit une concentration molaire de 600 mM. Une solution diluée au demi de cette solution a été utilisée pour le test de bioconversion en chemostat en suivant le même procédé que développé précédemment. La concentration maximale théorique de glycolaldéhyde dans le chemostat est donc de 125 mM.

La culture continue a été menée dans les mêmes conditions que précédemment avec un taux de dilution a été fixé à 2ml/h, soit un taux de croissance de 0,01 h⁻¹. Cette culture suivie pendant 17 jours est présentée Figure 82.

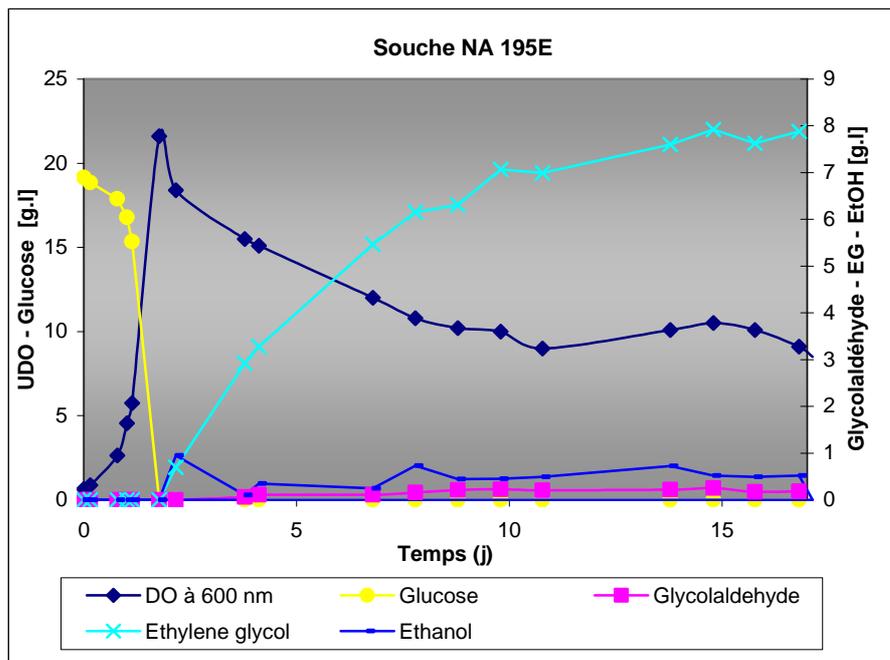


Figure 82 : Suivi du chemostat de la souche NA 195E en milieu MML8b 10% sels A+Glc18+Glycolaldéhyde 125 mM+Sp100+Cm30 (consignes : 37°C, 400rpm, pH=6,5, débit air=2 sL.h⁻¹, débit=2 mL.h⁻¹).

Après environ 10 jours de culture, un équilibre semble être atteint avec un titre en EG autour de 7 g/l, avec un maximum à 8 g/l, et avec une concentration en glycolaldéhyde résiduel inférieure à 0,2 g/l. La concentration en biomasse est quant à elle stabilisée autour de 9-10 UDO, valeur comparable à celle obtenue dans la culture continue précédente à 100 mM de glycolaldéhyde.

2.2.3. Bilans de bioconversion du glycolaldéhyde en éthylène glycol

2.2.3.1. Performances comparées des souches NA 195E et NA 188

Le suivi des deux cultures précédentes des souches NA 188 et NA 195E a permis de comparer les vitesses spécifiques de production, ainsi que les rendements de bioconversion, qui sont présentées dans le Tableau 63. Pour la souche NA 188, seuls les 10 premiers jours de culture ont été pris en compte dans les calculs.

Tableau 63 : Vitesses de production d'EG (spécifiques et normales) et rendement de bioconversion des souches NA 188 et NA 195E lors de cultures continues de bioconversion de 50 mM de glycolaldéhyde

	q_{EG} (mmol/g/h)	Vitesse de production d'EG (mM/h)	Rendement de bioconversion (%)	$Y_{EG/S}$ moyen (mol/mol)	Taux de dilution (h^{-1})
Souche NA 195E	$0,28 \pm 0,03$	$1,05 \pm 0,09$	93%	$0,40 \pm 0,03$	0,025
Souche NA 188	$0,21 \pm 0,06$	$0,94 \pm 0,24$	81%	$0,38 \pm 0,02$	0,025

La souche accumulant le NADPH NA 195E, optimisée pour la bioconversion de glycolaldéhyde, présente des vitesses spécifiques de production d'éthylène glycol sensiblement supérieures à la souche témoin NA 188, avec notamment des écart-types moins importants.

Sur l'ensemble des 25 jours de culture de bioconversion, les performances de la souche NA 188 sont une vitesse spécifique de production d'EG de $0,11 \pm 0,1$ mmol/g/h, une productivité de $0,52 \pm 0,44$ mM/h, un rendement de bioconversion de 48% et un rendement molaire de $0,19 \pm 0,16$ mol/mol.

La souche accumulant le NADPH est donc mieux adaptée qu'une souche de type sauvage pour la bioconversion du glycolaldéhyde à forte concentration. La forte toxicité du glycolaldéhyde et la faible capacité de réduction de ce dernier par la souche NA 188 sont probablement la cause d'une diminution significative du titre d'éthylène glycol lors de la culture continue de cette souche.

2.2.3.2. Performances de la souche NA 195E en cultures continues

Les performances de bioconversion de la souche NA 195E sont supérieures à celles de la souche NA 188, comme cela est démontré dans le précédent paragraphe. La souche NA 195E a par la suite été testée avec des concentrations supérieures en glycolaldéhyde. Ainsi, trois concentrations, 55, 75 et 100 mM, ont été appliquées à la culture continue de bioconversion, et les performances de production d'éthylène glycol mesurées sont présentées dans le Tableau 64.

Tableau 64 : Vitesses de production d'EG (spécifiques et normales) et rendement de bioconversion de la souche NA 195E lors de cultures continues de bioconversion à fortes concentrations de glycolaldéhyde.

	q_{EG} (mmol/g/h)	Vitesse de production d'EG (mM/h)	Rendement de bioconversion (%)	$Y_{EG/S}$ moyen (mol/mol)	Taux de dilution (h^{-1})
55 mM de glycolaldéhyde	$0,29 \pm 0,07$	$1,17 \pm 0,1$	100%	$0,52 \pm 0,04$	0,02
75 mM de glycolaldéhyde	$0,34 \pm 0,06$	$0,97 \pm 0,07$	100%	$0,68 \pm 0,05$	0,015
100 mM de glycolaldéhyde	$0,33 \pm 0,04$	$0,84 \pm 0,06$	98%	$0,84 \pm 0,08$	0,01
125 mM de glycolaldéhyde	$0,41 \pm 0,02$	$1,23 \pm 0,05$	98%	$1,28 \pm 0,04$	0,01

De manière générale, la vitesse spécifique de bioconversion du glycolaldéhyde en d'éthylène glycol est la même quelque soit la concentration en glycolaldéhyde. En ce qui concerne la vitesse de production en éthylène glycol, celle-ci diminue avec l'augmentation d'apport du glycolaldéhyde jusqu'à 100 mM. Cela s'explique par le fait que la diminution du taux de dilution est plus importante que l'augmentation du titre d'éthylène glycol dans le chemostat. L'augmentation d'apport du glycolaldéhyde n'augmente donc pas la productivité en éthylène glycol à cause de la toxicité du glycolaldéhyde. Enfin, les rendements de bioconversion prouvent que la totalité du glycolaldéhyde est transformée en éthylène glycol.

Il semblerait que les conditions optimales pour une meilleure productivité en EG soit une bioconversion de 125 mM de glycolaldéhyde à un taux de croissance imposé à 0,01 h⁻¹. De plus, il est à noter que la culture de bioconversion à pH = 6,5 aboutit à un rendement de bioconversion optimal en EG de 100%, contre 93% à pH = 6,8. L'amélioration du rendement s'explique probablement par le fait que la diminution du pH de culture doit limiter la transformation du glycolaldéhyde en glyoxal.

Le procédé de bioconversion de glycolaldéhyde en éthylène glycol a ainsi été validé sur une fraction pure de glycolaldéhyde issue de coproduits de liquéfaction de biomasse fournie par les partenaires Biocoup.

2.3. Bioconversion de glycolaldéhyde en éthylène glycol en culture discontinue

2.3.1. Principe de la culture discontinue à débit exponentiel

Les résultats précédents de bioconversion du glycolaldéhyde en EG en culture continue ont montré qu'un titre maximal en EG de 125 mM, soit environ 8 g/l, avec un rendement molaire moyen d'EG/glucose de 1,3 peuvent être atteints. La souche NA 195E MG1655 *Δpgi ΔudhA Δedd Δqor ΔadhE ΔaldA nuoF* rpoA pME101-γqhD* peut théoriquement produire 2 moles de NADPH par mole de glucose oxydée en acétyl-CoA, ce qui laisse à penser que le rendement molaire de bioconversion est significativement en deçà de la capacité de la souche.

Ainsi, le mode de culture discontinue type fed-batch a été envisagé pour atteindre des titres en EG et des rendements molaires EG/glucose plus importants par l'accumulation de cellules et de produits dans le fermenteur. L'augmentation de la concentration en biomasse pourrait ainsi permettre de mieux supporter de fortes concentrations en glycolaldéhyde. Le profil de culture fed-batch envisagé est un profil exponentiel dont le débit F est défini au cours du temps par la fonction suivante :

$$F = \mu \times X_0 \times V_0 \times \exp(\mu t) / ([S_{feed}] \times Y_{x/s})$$

Où μ est le taux de dilution imposé à la culture

X_0 est la concentration en biomasse initiale

V_0 le volume initial

$[S_{feed}]$ la concentration en glucose du feed

$Y_{x/s}$ le rendement biomasse/glucose

L'augmentation exponentielle de la concentration cellulaire devrait ainsi permettre un apport exponentiel de glycolaldéhyde avec un rendement molaire EG/glucose fixé et constant.

2.3.2. Cultures de références

Comme pour les cultures continues en chemostat, le système choisi a utilisé un double feed glucose et glycolaldéhyde qui est considéré comme un unique feed théorique, et dont la concentration finale en glucose et glycolaldéhyde dépend des pourcentages appliqués pour les débits de chaque feed. Ainsi, le système fed-batch envisagé a utilisé un feed glucose à 450 g/l à 30% du débit total et un feed glycolaldéhyde à 100 g/l à 70% du débit total, donc le feed unique théorique sera à 135 g/l de glucose (745 mM) et 70 g/l de glycolaldéhyde (1165 mM). Le rendement molaire théorique EG/glucose est donc fixé à 1,6 d'après les paramètres initiaux appliqués au système.

Les débits théoriques ont été calculés suivant la formule précédente avec les paramètres suivants : $\mu = 0,08$, $X_o = 10$ UDO, $V_o = 150$ ml, $[S_{feed}] = 135$ g/l et $Y_{x/s} = 0,3$ g/g. La limite du système est fixée à environ 70 heures de culture, ce qui correspond à une concentration de biomasse max (80 UDO) permettant un échange gazeux suffisant pour la croissance, et à un volume d'environ 300 ml (le fermenteur a un volume max de 500 ml).

Un profil type de culture (DO et concentration en EG), établi sur la moyenne de deux cultures, est ainsi comparé avec le profil théorique obtenu par simulation du débit, et est présenté Figure 83.

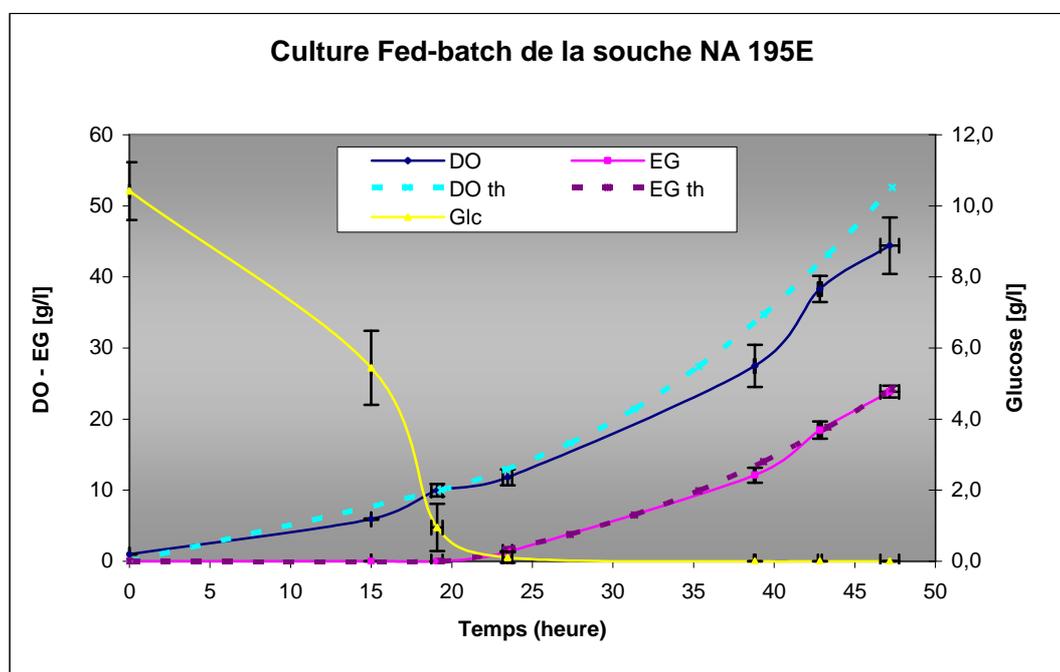


Figure 83 : Culture fed-batch de référence de la souche NA 195E en profil exponentiel
(milieu MML8b + glc 135 g/l + glyc 70 g/l, 37°C, 500 rpm, pH=6,5, débit air=5 sL/h, pO₂ régulée à 30%).

Le profil de culture expérimental observé sur deux cultures indépendantes est très proche du profil théorique obtenu par simulation du débit du feed. La croissance bactérienne est donc bien

imposée par l'apport du glucose, et tout le glycolaldéhyde ajouté au milieu de culture est bien réduit en éthylène glycol. Un titre maximal de 24 g/l en EG a ainsi été atteint après une cinquantaine d'heures de culture, soit une trentaine d'heures de phase fed-batch. Un titre maximal de 33 g/l en EG a été obtenu après 35 heures de phase fed-batch, mais le volume de culture trop important (300 ml) par rapport au volume du fermenteur (500ml) devient ici un facteur limitant pour la bonne oxygénation des cellules.

2.3.3. Performances de la souche NA 195E en cultures discontinues

Les performances des cultures fed-batch précédentes ont été établies sur les 4 paramètres suivants mesurés en fin de phase exponentielle : la productivité instantanée en EG en mmol/l/h, la vitesse spécifique de bioconversion instantanée de l'EG en mmol/g/h, les rendements molaires instantanés EG/glucose et le titre en EG en g/l (Tableau 65).

Tableau 65 : Performances moyennes et maximales en culture fed-batch de bioconversion de glycolaldéhyde en EG de la souche NA 195E.

Les moyennes et les écart-types ont été calculés sur 3 cultures indépendantes.

	Productivité EG (mM/h)	Vitesse spécifique EG (mmol/g/h)	$Y_{EG/S}$ (mol/mol)	[EG] max (g/l)
Performances moyennes	20,5 ± 3,9	1,9 ± 0,4	1,6 ± 0,3	/
Performances maximales	25,4	2,6	1,94	33

Les performances générales de la bioconversion du glycolaldéhyde en mode fed-batch sont très nettement supérieures à celles obtenues en mode continu. Ainsi, le rendement molaire EG produit sur glucose consommé est doublé, avec un rendement maximal instantané mesuré autour de 2, plus proche de la valeur théorique d'accumulation de NADPH dans la souche NA195E. La culture fed-batch permet ainsi d'exploiter au maximum les paramètres physiologiques de production de NADPH de la souche de bioconversion.

3. Perspectives d'applications

3.1. Bioconversion

Les premiers essais de bioconversion grâce à des souches accumulant le NADPH évoluées et/ou reconstruites ont montré la faisabilité du procédé et ont prouvé l'efficacité de ces souches face à des souches de références, issues de la souche sauvage MG1655, notamment lors de cultures continues.

La réduction du glycolaldéhyde en éthylène glycol est rendu possible et efficace par des souches accumulant le NADPH qui permettent une meilleure résistance aux concentrations initiales d'aldéhydes et d'atteindre des titres plus élevés en éthylène glycol.

La bioconversion réductive des couples propionaldéhyde/propanol et éthylacétoacétate/éthylhydroxybutyrate a été testée avec plus au moins de succès, et montre que ces souches, avec quelques optimisations génétiques mineures, peuvent être utilisées pour réduire de nombreux composés chimiques, augmentant ainsi le panel d'application des souches accumulant le NADPH.

Quatre souches accumulant le NADPH, NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$, NA 124E MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor nuoF^* rpoA^*$, NA 142 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor nuoF^*$ et NA 175 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor rpoA^*$, ont été caractérisées et possèdent des paramètres physiologiques différents mais intéressants pour des applications industrielles de bioconversion. En effet, ces quatre souches présentent des taux de croissance des rapports NADPH/NADP⁺ élevés de 1,43 à 2,05, associés avec des taux de croissance allant de 0,04 à 0,43 h⁻¹ ; l'équilibre entre un taux de croissance viable et un rapport NADPH/NADP⁺ élevé semble être la meilleure option pour obtenir une efficacité de bioconversion optimale. Ainsi, la souche NA 142 avec le génotype MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor nuoF^* rpoA$ ($\mu = 0,24 \text{ h}^{-1}$ et [NADPH/NADP⁺] = 1,85) possède des caractéristiques physiologiques intéressantes pour la bioconversion réductive NADPH dépendante.

3.2. Evolution *in vivo* d'enzymes

Un des objectifs appliqués du présent projet de thèse est l'utilisation de souches surproduisant le NADPH comme plate-forme d'évolution *in vivo* d'enzymes NADPH dépendantes (cf. Chapitre I). Le principe repose sur l'hypothèse que le NADPH inhibe la croissance bactérienne, et donc que l'amélioration de l'efficacité catalytique de l'enzyme va contribuer à restaurer la croissance bactérienne en augmentant sa capacité à réoxyder le NADPH. Le phénomène d'adaptation conféré à la souche NADPH par l'enzyme NADPH dépendante évoluée peut ainsi être observé lors de cultures continues d'évolution dont les conditions de culture, excès de glucose et vitesse de dilution élevée, vont augmenter les pressions de sélections chez la souche bactérienne.

Chapitre VII - Utilisation des souches accumulant le NADPH à la bioconversion réductive

Cette hypothèse a été vérifiée à plusieurs reprises chez les souches NA 135 MG1655 $\Delta pfkAB \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ pSK-PgapA-GRE2p et NA 172E MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor nuoF rpoA^*$ pME101-*yqhD* qui possèdent toutes deux une enzyme NADPH déshydrogénase performante. En effet, lors cultures en milieu minimum synthétique sur galactose ou glucose, il a été montré qu'un ajout d'aldéhyde, en deçà d'une concentration toxique, contribuait à une augmentation significative du taux de croissance des deux souches précédentes NA 135 MG1655 $\Delta pfkAB \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ pSK-PgapA-GRE2p et NA 172E MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor rpoA^*$ pME101-*yqhD*.

Deux paramètres propres à la souche « hôte » sont importants pour pouvoir réaliser un chemostat d'évolution *in vivo* d'enzymes NADPH dépendante. Premièrement, la souche doit surproduire le NADPH de telle manière à inhiber significativement la croissance pour instaurer une forte pression de sélection sur l'enzyme NADPH dépendante à évoluer. Deuxièmement, la pression de sélection pesant sur le métabolisme bactérien doit être modérée pour permettre une évolution de l'enzyme avant une évolution adaptative de la souche. C'est-à-dire que la souche doit posséder un taux de croissance relativement viable, ce qui permettra une réplication du gène de l'enzyme cible suffisamment rapide pour pouvoir introduire et sélectionner des mutations adaptatives.

Ainsi, la souche NA 175 avec le génotype MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor rpoA^* nuoF$ ($\mu = 0,15 \text{ h}^{-1}$ et $[\text{NADPH}/\text{NADP}^+] = 1,53$) possède des caractéristiques physiologiques intéressantes pour l'évolution *in vivo* d'enzymes NADPH dépendante.

Conclusion générale

Conclusion Générale

La compréhension des phénomènes d'évolution adaptative chez les bactéries à l'échelle génétique et moléculaire a nettement progressé ces dernières années par l'étude des changements métaboliques et moléculaires développés chez les souches évoluées (Fong *et al.*, 2006 ; Herring *et al.*, 2006 ; Sleight *et al.*, 2008). Ces études sont rendues possibles par les améliorations significatives faites dans le domaine de l'investigation du génome bactérien. Ces nouveaux outils, comme la comparaison de génomes sur puces, permettent ainsi d'identifier des mutations survenues au niveau génomique lors d'une période d'évolution, et cela sur plusieurs clones.

La présente étude a ainsi permis d'établir un modèle d'évolution adaptative d'une souche d'*E. coli* MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ (souche NA 23), chez laquelle le métabolisme central de base a été modifié afin d'accumuler du NADPH (2 moles de NADPH par mole de glucose oxydée en acétyl-CoA), en se basant sur l'identification des mutations responsables de l'adaptation. Cette identification a posé les bases génétiques de l'évolution *in vivo* de la souche NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$, ce qui a permis d'approfondir la compréhension du phénomène en intégrant au modèle d'évolution *in vivo* les bases moléculaires et métaboliques mises en place lors de l'adaptation.

Modélisation de l'évolution *in vivo* de la souche NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$

L'évolution forcée en laboratoire de la souche NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ a été réalisée au cours de 4 et 11 cultures discontinues successives en milieu minimum synthétique sur glucose, soit sur 20 et 65 générations respectivement. Cette évolution très rapide a permis un phénomène d'adaptation de la souche NA 23 en 20 générations par l'apparition de la mutation *nuoF** et entraînant une augmentation du taux de croissance d'un facteur 6. L'évolution adaptative sur 65 générations a permis une restauration de la croissance bactérienne avec l'apparition de la deuxième mutation *rpoA**. Les paramètres physiologiques vitaux de la souche évoluée ont significativement augmentés par rapport à ceux de la souche non évoluée, avec notamment un taux de croissance multiplié par 11 et une vitesse spécifique de consommation de glucose multipliée par 6.

Le rapport NADPH/NADP⁺ particulièrement élevé chez la souche NA 23 qui est responsable de l'inhibition de la croissance cellulaire a ainsi fortement diminué après cette période d'évolution. La compréhension du phénomène d'évolution adaptative passe donc par l'identification des mécanismes cellulaires permettant de surmonter la contrainte métabolique d'accumulation du NADPH.

Cette étude a été poursuivie par l'identification des modifications génétiques responsables de l'évolution adaptative par séquençage ciblé du génome de la souche évoluée.

La comparaison de génomes sur puces par la technologie de Roche – Nimblegen a permis d'identifier deux seules mutations survenues lors de l'évolution adaptative de la souche NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$. De plus, la comparaison du génome de la souche intermédiaire évoluée, la souche NA 23E04 évoluée sur quatre cultures discontinues successives, avec le génome

Conclusion Générale

de la souche évoluée NA 124E MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor nuoF^* rpoA^*$ a permis de déterminer la chronologie d'apparition des mutations. La première mutation apparue, $nuoF^*$, est responsable d'un changement d'acide aminé dans la sous-unité NuoF du complexe I de la chaîne respiratoire (NuoF*(E183A) ; la deuxième mutation, $rpoA^*$, affecte la sous-unité α de l'ARN polymérase par la modification de 13 acides aminés dans le domaine C-terminal de la protéine.

Individuellement ces deux mutations ont des impacts différents sur les paramètres physiologiques de la souche NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$. En effet, lorsque $nuoF^*$ est introduite chez la souche non évoluée, elle est responsable d'une augmentation du taux de croissance d'un facteur 6, et diminue très légèrement le rapport NADPH/NADP⁺. La présence de $rpoA^*$ dans le génome non évolué a pour conséquence une multiplication par 3 du taux de croissance, mais aussi d'une forte baisse du rapport NADPH/NADP⁺.

L'étude approfondie de l'effet de ces mutations a par la suite permis de comprendre les bases moléculaires de l'évolution adaptative de la souche NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$.

La caractérisation *in vitro* et *in vivo* du fragment soluble évolué NuoEF*(E183A)G a mis en évidence une nouvelle activité NADPH déshydrogénase au sein du complexe I de la chaîne respiratoire. Cette voie de réoxydation du NADPH pourrait ainsi expliquer les effets majeurs positifs sur le taux de croissance et la vitesse spécifique de consommation de glucose conférés par $nuoF^*$ à la souche NA 142 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor nuoF^*$.

Des analyses transcriptomiques comparées entre les deux souches, évoluée NA 124E MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor nuoF^* rpoA^*$ et reconstruite NA 142 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor nuoF^*$, exprimant respectivement $rpoA^*$ et $rpoA$, ont démontré la modification de l'expression d'environ 150 gènes en présence du gène évolué. Elles ont mis en évidence les nombreux effets pléiotropiques possibles résultant de la mutation $rpoA^*$, pouvant expliquer les avantages adaptatifs qu'elle procure. RpoA* est entre autre responsable de la forte répression des gènes impliqués dans les fonctions de motilité et chimiotaxie, et des gènes codant pour les enzymes du cycle de Krebs ; $rpoA^*$ provoque aussi la surexpression de quelques gènes impliqués dans les voies de biosynthèse des acides aminées.

Pour compléter le modèle de l'évolution de la souche NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$, des études de mesure de flux par expériences de marquage isotopique ont mis en évidence les arrangements métaboliques causés par les mutations $nuoF^*$ et/ou $rpoA^*$.

Alors que $nuoF^*$ n'entraîne que des réarrangements métaboliques mineurs par rapport à la souche non évoluée, $rpoA^*$ est responsable de la modification significative des flux au sein du cycle de Krebs. En corrélation avec les données transcriptomiques, la mutation $rpoA^*$ est responsable d'une forte diminution de l'ensemble des flux du cycle de Krebs. Elle est aussi responsable d'une diminution du flux du shunt glyoxylique, diminution encore plus marquée en présence de $nuoF^*$ chez la souche évoluée.

L'adaptation de la souche NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ face à une contrainte métabolique d'accumulation de NADPH est la conséquence de deux uniques mutations : i) la mutation $nuoF^*$ a une action ciblée sur une enzyme d'une voie métabolique, ici le complexe I de la chaîne respiratoire, alors que ii) la mutation $rpoA^*$ va engendrer des ajustements transcriptionnels

Conclusion Générale

globaux touchant l'ensemble du métabolisme. Plus précisément, l'inhibition par RpoA* du cycle de Krebs, et donc de l'activité MDH qui fournit le NADH au complexe I, et la non spécificité d'utilisation des cofacteurs NADH et NADPH par NuoF* participeraient à un nouveau système de régulation fine des ratios NAD(H) et NADP(H). Ces ajustements moléculaires et métaboliques compensent ainsi les contraintes génétiques d'accumulation de NADPH, et pallient à l'absence d'activité régulatrice transhydrogénase.

D'autres réajustements métaboliques aux niveaux des voies de biosynthèse des acides aminés et des voies de production et d'assemblage des flagelles ont probablement des impacts positifs sur le métabolisme de la souche évoluée mais sont difficilement quantifiables. Ces changements métaboliques contrôlés par des réajustements transcriptionnels ont sûrement des effets sur le métabolisme du NADPH et sur l'utilisation de l'ATP.

Evolution *in vivo* de la souche NA 24

En complément de la souche NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$, une deuxième souche NA 24 MG1655 $\Delta pfkAB \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ a été construite avec des modifications de son métabolisme central provoquant un fort déséquilibre d'accumulation du NADPH à raison de trois moles de NADPH par mole de glucose consommée. La souche NA 24 est ainsi incapable de se développer sur glucose à cause de, i) la forte répression catabolique pesant sur le système PTS de transport du glucose, et ii) la capacité très limitée de la cellule à réoxyder le NADPH produit en excès.

L'adaptation forcée en milieu solide de la souche NA 24 MG1655 $\Delta pfkAB \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ a permis de sélectionner huit clones capables de se développer sur glucose. L'étude des huit clones purs évolués a révélé la présence des mutations NuoF*(E183A) et NuoF*(E183G). La caractérisation biochimique de cette dernière enzyme évoluée a démontré, comme précédemment, que cette mutation permettait l'oxydation du NADPH par le complexe I.

L'apparition systématique d'une mutation dans *nuoF* qui crée une nouvelle voie de réoxydation du NADPH semble prouver que cette modification est la seule solution pour s'adapter à la contrainte métabolique d'accumulation du NADPH.

La solution originale trouvée par *E. coli* lors de l'évolution adaptative est surprenante car elle modifie l'activité d'une enzyme essentielle pour la croissance en aérobiose. La fonction du complexe I chez les procaryotes et les eucaryotes est d'initier le transport d'électron via la chaîne respiratoire par l'oxydation de NADH, et ainsi de créer un gradient protonique pour la synthèse d'ATP. La mutation *nuoF** présente donc une évolution contre nature car le complexe I évolué va ainsi connecter l'anabolisme et le catabolisme au sein de la chaîne respiratoire par l'utilisation des deux cofacteurs NADH et NADPH, ce dernier n'étant plus restreint à un unique rôle anabolique.

Utilisation des souches accumulant le NADPH pour la bioconversion réductive

Conclusion Générale

L'utilisation des souches NA 135 MG1655 $\Delta pfkAB \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ pSK-PgapA-GRE2p et NA 189E MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor \Delta adhE \Delta aldA nuoF rpoA^*$ pME101-yqhD a été validée pour la bioconversion réductive NADPH dépendante d'éthylacétoacétate en éthylhydroxybutyrate et d'aldéhydes en alcools, respectivement.

Enfin, il a été montré qu'une augmentation de l'activité réductase NADPH dépendante par surexpression d'enzyme NADPH dépendante a un effet positif sur la croissance bactérienne des souches accumulant le NADPH. Ces souches peuvent donc être utilisées comme « usine cellulaire », car la dépendance de la croissance bactérienne vis-à-vis de l'oxydation du NADPH va permettre de sélectionner des enzymes NADPH dépendantes dont l'efficacité catalytique sera améliorée par des processus d'évolution *in vivo* en culture continue.

Au final, cette étude valide la stratégie employée pour modéliser l'évolution *in vivo* d'*E. coli* aux niveaux physiologique, métabolique, génétique et moléculaire. L'identification et la compréhension des cibles de l'évolution ont ainsi permis de comprendre comment la bactérie peut surmonter une forte contrainte métabolique d'accumulation du NADPH par apparition et sélection de seulement deux mutations.

La modélisation de l'évolution et l'étude approfondie des mutations adaptatives a rendu possible la construction de souches viables accumulant le NADPH avec l'intérêt de posséder des rapports NADPH/NADP⁺ et des taux de croissance plus ou moins élevés, offrant ainsi des perspectives d'application dans l'industrie chimique pour la bioconversion et pour l'évolution *in vivo* d'enzymes.

Ce travail illustre que la stratégie de modélisation de l'évolution *in vivo* à plusieurs niveaux d'organisation de la bactérie peut être appliquée de manière générale à d'autres cas d'évolution bactérienne.

Références bibliographiques

A

Al Zaid Siddiquee K, Arauzo-Bravo MJ and Shimizu K (2004) Metabolic flux analysis of pykF gene knockout *Escherichia coli* based on ¹³C-labeling experiments together with measurements of enzyme activities and intracellular metabolite concentrations. *Appl Microbiol Biotechnol* **63** : pp. 407-417.

Amarneh B and Vik SB. Direct transfer of NADH from malate dehydrogenase to complex I in *Escherichia coli*. *Cell Biochem. Biophys.* (2005) **42**: pp. 251-261.

B

Bertani G (1951) Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **62** : pp. 293-300.

Baba T, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M, Datsenko KA, Tomita M, Wanner BL and Mori H (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* **2** : p. 2006.0008.

Baldomà L and Aguilar J (1987) Involvement of lactaldehyde dehydrogenase in several metabolic pathways of *Escherichia coli* K12. *J Biol Chem* **262** : pp. 13991-13996.

Bautista J, Satrústegui J and Machado A (1979) Evidence suggesting that the NADPH/NADP ratio modulates the splitting of the isocitrate flux between the glyoxylic and tricarboxylic acid cycles, in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **105** : pp. 333-336.

Becker A, Zeppenfeld T, Staab A, Seitz S, Boos W, Morita T, Aiba H, Mahr K, Titgemeyer F and Jahreis K (2006) Yeel, a novel protein involved in modulation of the activity of the glucose-phosphotransferase system in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **188** : pp. 5439-5449.

Benoff B, Yang H, Lawson CL, Parkinson G, Liu J, Blatter E, Ebright YW, Berman HM and Ebright RH (2002) Structural basis of transcription activation: the CAP-alpha CTD-DNA complex. *Science* **297** : pp. 1562-1566.

Benov L and Fridovich I (2002) Induction of the soxRS regulon of *Escherichia coli* by glycolaldehyde. *Arch Biochem Biophys* **407** : pp. 45-48.

Blattner FR, Plunkett G3, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B and Shao Y (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277** : pp. 1453-1462.

Références bibliographiques

Boersma YL, Dröge MJ and Quax WJ (2007) Selection strategies for improved biocatalysts. *FEBS J* **274** : pp. 2181-2195.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72** : pp. 248-254.

Braun M, Bungert S and Friedrich T (1998) Characterization of the overproduced NADH dehydrogenase fragment of the NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **37** : pp. 1861-1867.

Brisson D (2003) The directed mutation controversy in an evolutionary context. *Crit Rev Microbiol* **29** : pp. 25-35.

Brumaghim JL, Li Y, Henle E and Linn S (2003) Effects of hydrogen peroxide upon nicotinamide nucleotide metabolism in *Escherichia coli*: changes in enzyme levels and nicotinamide nucleotide pools and studies of the oxidation of NAD(P)H by Fe(III). *J Biol Chem* **278** : pp. 42495-42504.

Bungert S, Krafft B, Schlesinger R and Friedrich T (1999) One-step purification of the NADH dehydrogenase fragment of the *Escherichia coli* complex I by means of Strep-tag affinity chromatography. *FEBS Lett* **460** : pp. 207-211.

C

Cabiscol E, Tamarit J and Ros J (2000) Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int Microbiol* **3** : pp. 3-8.

Canonaco F, Hess TA, Heri S, Wang T, Szyperski T and Sauer U (2001) Metabolic flux response to phosphoglucose isomerase knock-out in *Escherichia coli* and impact of overexpression of the soluble transhydrogenase UdhA. *FEMS Microbiol Lett* **204** : pp. 247-252.

Chang DY, Hou C and Bragg PD (1992) Anomalous effect of uncouplers on respiratory chain-linked transhydrogenation in *Escherichia coli* membranes: evidence for a localized proton pathway?. *Arch Biochem Biophys* **293** : pp. 246-253.

Charpentier B and Branlant C (1994) The *Escherichia coli* gapA gene is transcribed by the vegetative RNA polymerase holoenzyme E sigma 70 and by the heat shock RNA polymerase E sigma 32. *J Bacteriol* **176** : pp. 830-839.

Chen C, Porubleva L, Shearer G, Svrakic M, Holden LG, Dover JL, Johnston M, Chitnis PR and Kohl DH (2003) Associating protein activities with their genes: rapid identification of a gene encoding a methylglyoxal reductase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **20** : pp. 545-554.

Références bibliographiques

Chen C, Porubleva L, Shearer G, Svrakic M, Holden LG, Dover JL, Johnston M, Chitnis PR and Kohl DH (2003) Associating protein activities with their genes: rapid identification of a gene encoding a methylglyoxal reductase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **20** : pp. 545-554.

Cherepanov PP and Wackernagel W (1995) Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* **158** : pp. 9-14.

Chilcott GS and Hughes KT (2000) Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar typhimurium and *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* **64** : pp. 694-708.

Chin JW, Khankal R, Monroe CA, Maranas CD and Cirino PC (2008) Analysis of NADPH supply during xylitol production by engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* : .

Chuaqui RF, Bonner RF, Best CJM, Gillespie JW, Flaig MJ, Hewitt SM, Phillips JL, Krizman DB, Tangrea MA, Ahram M, Linehan WM, Knezevic V and Emmert-Buck MR (2002) Post-analysis follow-up and validation of microarray experiments. *Nat Genet* **32 Suppl** : pp. 509-514.

Cooper VS and Lenski RE (2000) The population genetics of ecological specialization in evolving *Escherichia coli* populations. *Nature* **407** : pp. 736-739.

Cooper TF, Rozen DE and Lenski RE (2003) Parallel changes in gene expression after 20,000 generations of evolution in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100** : pp. 1072-1077.

Covert MW and Palsson BØ (2002) Transcriptional regulation in constraints-based metabolic models of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **277** : pp. 28058-28064.

Covert MW, Knight EM, Reed JL, Herrgard MJ and Palsson BO (2004) Integrating high-throughput and computational data elucidates bacterial networks. *Nature* **429** : pp. 92-96.

Cozzzone AJ and El-Mansi M (2005) Control of isocitrate dehydrogenase catalytic activity by protein phosphorylation in *Escherichia coli*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **9** : pp. 132-146.

Crozat E, Philippe N, Lenski RE, Geiselmann J and Schneider D (2005) Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. XII. DNA topology as a key target of selection. *Genetics* **169** : pp. 523-532.

D

Daldal F and Fraenkel DG (1981) Tn10 insertions in the *pfkB* region of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **147** : pp. 935-943.

Datsenko KA and Wanner BL (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97** : pp. 6640-6645.

Références bibliographiques

Deutscher J (2008) The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria. *Curr Opin Microbiol* **11** : pp. 87-93.

E

Edwards JS and Palsson BO (2000a) Metabolic flux balance analysis and the in silico analysis of *Escherichia coli* K-12 gene deletions. *BMC Bioinformatics* **1** : p. 1.

Edwards JS and Palsson BO (2000b) Metabolic flux balance analysis and the in silico analysis of *Escherichia coli* K-12 gene deletions. *BMC Bioinformatics* **1** : p. 1.

Edwards JS, Ibarra RU and Palsson BO (2001) In silico predictions of *Escherichia coli* metabolic capabilities are consistent with experimental data. *Nat Biotechnol* **19** : pp. 125-130.

Eisenmann A, Schwarz S, Prasch S, Schweimer K and Rösch P (2005) The *E. coli* NusA carboxy-terminal domains are structurally similar and show specific RNAP- and lambdaN interaction. *Protein Sci* **14** : pp. 2018-2029.

Elena SF and Lenski RE (2003) Evolution experiments with microorganisms: the dynamics and genetic bases of adaptation. *Nat Rev Genet* **4** : pp. 457-469.

el Mansi EM and Holms WH (1989) Control of carbon flux to acetate excretion during growth of *Escherichia coli* in batch and continuous cultures. *J Gen Microbiol* **135** : pp. 2875-2883.

Emmerling M, Dauner M, Ponti A, Fiaux J, Hochuli M, Szyperski T, Wüthrich K, Bailey JE and Sauer U (2002) Metabolic flux responses to pyruvate kinase knockout in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184** : pp. 152-164.

F

Fato R, Bergamini C, Leoni S, Strocchi P and Lenaz G (2008) Generation of reactive oxygen species by mitochondrial complex I: implications in neurodegeneration. *Neurochem Res* **33** : pp. 2487-2501.

Feist AM and Palsson BØ (2008) The growing scope of applications of genome-scale metabolic reconstructions using *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* **26** : pp. 659-667.

Fischer E and Sauer U (2003) A novel metabolic cycle catalyzes glucose oxidation and anaplerosis in hungry *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **278** : pp. 46446-46451.

Références bibliographiques

Fischer E and Sauer U (2003b) Metabolic flux profiling of *Escherichia coli* mutants in central carbon metabolism using GC-MS. *Eur J Biochem* **270** : pp. 880-891.

Fong SS, Joyce AR and Palsson BØ (2005) Parallel adaptive evolution cultures of *Escherichia coli* lead to convergent growth phenotypes with different gene expression states. *Genome Res* **15** : pp. 1365-1372.

Fong SS, Nanchen A, Palsson BO and Sauer U (2006) Latent pathway activation and increased pathway capacity enable *Escherichia coli* adaptation to loss of key metabolic enzymes. *J Biol Chem* **281** : pp. 8024-8033.

Friedrich T, Hofhaus G, Ise W, Nehls U, Schmitz B and Weiss H (1989) A small isoform of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) without mitochondrially encoded subunits is made in chloramphenicol-treated *Neurospora crassa*. *Eur J Biochem* **180** : pp. 173-180.

Fuhrer T and Sauer U (2009) Different biochemical mechanisms ensure network-wide balancing of reducing equivalents in microbial metabolism. *J Bacteriol* **191** : pp. 2112-2121.

G

Gauger EJ, Leatham MP, Mercado-Lubo R, Laux DC, Conway T and Cohen PS (2007) Role of motility and the flhDC Operon in *Escherichia coli* MG1655 colonization of the mouse intestine. *Infect Immun* **75** : pp. 3315-3324.

Geszvain K and Landick R (2005) The structure of bacterial RNA polymerase. *Web Site Edition* http://landick.wisc.edu/images/geszvain_landick.pdf.

Giró M, Carrillo N and Krapp AR (2006) Glucose-6-phosphate dehydrogenase and ferredoxin-NADP(H) reductase contribute to damage repair during the soxRS response of *Escherichia coli*. *Microbiology* **152** : pp. 1119-1128.

Gottschalk G. Bacterial Metabolism. Springer-Verlag, New York, NY, 1986.

H

Hauser M, Horn P, Tournu H, Hauser NC, Hoheisel JD, Brown AJP and Dickinson JR (2007) A transcriptome analysis of isoamyl alcohol-induced filamentation in yeast reveals a novel role for Gre2p as isovaleraldehyde reductase. *FEMS Yeast Res* **7** : pp. 84-92.

Références bibliographiques

Hayashi K, Morooka N, Yamamoto Y, Fujita K, Isono K, Choi S, Ohtsubo E, Baba T, Wanner BL, Mori H and Horiuchi T (2006) Highly accurate genome sequences of *Escherichia coli* K-12 strains MG1655 and W3110. *Mol Syst Biol* **2** : p. 2006.0007.

Herrgård MJ and Palsson BØ (2004) Flagellar biosynthesis in silico: building quantitative models of regulatory networks. *Cell* **117** : pp. 689-690.

Herring CD, Raghunathan A, Honisch C, Patel T, Applebee MK, Joyce AR, Albert TJ, Blattner FR, van den Boom D, Cantor CR and Palsson BØ (2006) Comparative genome sequencing of *Escherichia coli* allows observation of bacterial evolution on a laboratory timescale. *Nat Genet* **38** : pp. 1406-1412.

Hinchliffe P and Sazanov LA (2005) Organization of iron-sulfur clusters in respiratory complex I. *Science* **309** : pp. 771-774.

Hobman JL, Patel MD, Hidalgo-Arroyo GA, Cariss SJL, Avison MB, Penn CW and Constantinidou C (2007) Comparative genomic hybridization detects secondary chromosomal deletions in *Escherichia coli* K-12 MG1655 mutants and highlights instability in the flhDC region. *J Bacteriol* **189** : pp. 8786-8792.

Honisch C, Raghunathan A, Cantor CR, Palsson BØ and van den Boom D (2004) High-throughput mutation detection underlying adaptive evolution of *Escherichia coli*-K12. *Genome Res* **14** : pp. 2495-2502.

Hua Q, Yang C, Baba T, Mori H and Shimizu K (2003) Responses of the central metabolism in *Escherichia coli* to phosphoglucose isomerase and glucose-6-phosphate dehydrogenase knockouts. *J Bacteriol* **185** : pp. 7053-7067.

Hummel W (1999) Large-scale applications of NAD(P)-dependent oxidoreductases: recent developments. *Trends Biotechnol* **17** : pp. 487-492.

I

Ibarra RU, Edwards JS and Palsson BO (2002) *Escherichia coli* K-12 undergoes adaptive evolution to achieve in silico predicted optimal growth. *Nature* **420** : pp. 186-189.

Ishihama A, Fujita N and Glass RE (1987) Subunit assembly and metabolic stability of *E. coli* RNA polymerase. *Proteins* **2** : pp. 42-53.

J

Références bibliographiques

Jaworowski A, Mayo G, Shaw DC, Campbell HD and Young IG (1981) Characterization of the respiratory NADH dehydrogenase of *Escherichia coli* and reconstitution of NADH oxidase in ndh mutant membrane vesicles. *Biochemistry* **20** : pp. 3621-3628.

K

Kabir MM and Shimizu K (2004) Metabolic regulation analysis of *icd*-gene knockout *Escherichia coli* based on 2D electrophoresis with MALDI-TOF mass spectrometry and enzyme activity measurements. *Appl Microbiol Biotechnol* **65** : pp. 84-96.

Karp PD, Keseler IM, Shearer A, Latendresse M, Krummenacker M, Paley SM, Paulsen I, Collado-Vides J, Gama-Castro S, Peralta-Gil M, Santos-Zavaleta A, Peñaloza-Spínola MI, Bonavides-Martinez C and Ingraham J (2007) Multidimensional annotation of the *Escherichia coli* K-12 genome. *Nucleic Acids Res* **35** : pp. 7577-7590.

Kaur J and Sharma R (2006) Directed evolution: an approach to engineer enzymes. *Crit Rev Biotechnol* **26** : pp. 165-199.

Keseler IM, Collado-Vides J, Gama-Castro S, Ingraham J, Paley S, Paulsen IT, Peralta-Gil M and Karp PD (2005) EcoCyc: a comprehensive database resource for *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **33** : p. D334-7.

Keseler IM, Bonavides-Martínez C, Collado-Vides J, Gama-Castro S, Gunsalus RP, Johnson DA, Krummenacker M, Nolan LM, Paley S, Paulsen IT, Peralta-Gil M, Santos-Zavaleta A, Shearer AG and Karp PD (2009) EcoCyc: a comprehensive view of *Escherichia coli* biology. *Nucleic Acids Res* **37** : p. D464-70.

Kim KH (1964) Purification and properties of a diamine alpha-ketoglutarate transaminase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **239** : pp. 783-786.

Kim YJ, Mizushima S and Tokuda H (1991) Fluorescence quenching studies on the characterization of energy generated at the NADH:quinone oxidoreductase and quinol oxidase segments of marine bacteria. *J Biochem* **109** : pp. 616-621.

Kim J and Copley SD (2007) Why metabolic enzymes are essential or nonessential for growth of *Escherichia coli* K12 on glucose. *Biochemistry* **46** : pp. 12501-12511.

Kimata K, Takahashi H, Inada T, Postma P and Aiba H (1997) cAMP receptor protein-cAMP plays a crucial role in glucose-lactose diauxie by activating the major glucose transporter gene in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94** : pp. 12914-12919.

Kimata K, Tanaka Y, Inada T and Aiba H (2001) Expression of the glucose transporter gene, *ptsG*, is regulated at the mRNA degradation step in response to glycolytic flux in *Escherichia coli*. *EMBO J* **20** : pp. 3587-3595.

Klein-Marcuschamer D, Santos CNS, Yu H and Stephanopoulos G (2009) Mutagenesis of the bacterial RNA polymerase alpha subunit for improvement of complex phenotypes. *Appl Environ Microbiol* **75** : pp. 2705-2711.

Références bibliographiques

Kometani T, Yoshii H, Kitatsuji E, Nishimura H and Matsuno R (1993) Large-scale preparation of (S)-ethyl 3-hydroxybutanoate with a high enantiomeric excess through Baker's yeast-mediated bioreduction.. *Journal of fermentation and bioengineering* **76** : pp. 33-37.

Krapp AR, Rodriguez RE, Poli HO, Paladini DH, Palatnik JF and Carrillo N (2002) The flavoenzyme ferredoxin (flavodoxin)-NADP(H) reductase modulates NADP(H) homeostasis during the soxRS response of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184** : pp. 1474-1480.

L

Landick R (2006) The regulatory roles and mechanism of transcriptional pausing. *Biochem Soc Trans* **34** : pp. 1062-1066.

Lawson CL, Swigon D, Murakami KS, Darst SA, Berman HM and Ebright RH (2004) Catabolite activator protein: DNA binding and transcription activation. *Curr Opin Struct Biol* **14** : pp. 10-20.

Lee AT and Cerami A (1987) Elevated glucose 6-phosphate levels are associated with plasmid mutations in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84** : pp. 8311-8314.

Lenski RE (1991) Quantifying fitness and gene stability in microorganisms. *Biotechnology* **15** : pp. 173-192.

Lenski RE and Travisano M (1994) Dynamics of adaptation and diversification: a 10,000-generation experiment with bacterial populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91** : pp. 6808-6814.

Lesk AM (1995) NAD-binding domains of dehydrogenases. *Curr Opin Struct Biol* **5** : pp. 775-783.

Li M, Ho PY, Yao S and Shimizu K (2006) Effect of *lpdA* gene knockout on the metabolism in *Escherichia coli* based on enzyme activities, intracellular metabolite concentrations and metabolic flux analysis by ¹³C-labeling experiments. *J Biotechnol* **122** : pp. 254-266.

Lim S, Jung Y, Shin H and Lee Y (2002) Amplification of the NADPH-related genes *zwf* and *gnd* for the oddball biosynthesis of PHB in an *E. coli* transformant harboring a cloned *phbCAB* operon. *J Biosci Bioeng* **93** : pp. 543-549.

Lindsey DF, Mullin DA and Walker JR (1989) Characterization of the cryptic lambdoid prophage DLP12 of *Escherichia coli* and overlap of the DLP12 integrase gene with the tRNA gene *argU*. *J Bacteriol* **171** : pp. 6197-6205.

M

Références bibliographiques

Maki K, Uno K, Morita T and Aiba H (2008) RNA, but not protein partners, is directly responsible for translational silencing by a bacterial Hfq-binding small RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105** : pp. 10332-10337.

Matsushita K, Ohnishi T and Kaback HR (1987) NADH-ubiquinone oxidoreductases of the *Escherichia coli* aerobic respiratory chain. *Biochemistry* **26** : pp. 7732-7737.

Meselson M and Yuan R (1968) DNA restriction enzyme from *E. coli*. *Nature* **217** : pp. 1110-1114.

Meynial Salles I, Forchhammer N, Croux C, Girbal L and Soucaille P (2007) Evolution of a *Saccharomyces cerevisiae* metabolic pathway in *Escherichia coli*. *Metab Eng* **9** : pp. 152-159.

Miller SP, Chen R, Karschnia EJ, Romfo C, Dean A and LaPorte DC (2000) Locations of the regulatory sites for isocitrate dehydrogenase kinase/phosphatase. *J Biol Chem* **275** : pp. 833-839.

Morita T, El-Kazzaz W, Tanaka Y, Inada T and Aiba H (2003) Accumulation of glucose 6-phosphate or fructose 6-phosphate is responsible for destabilization of glucose transporter mRNA in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **278** : pp. 15608-15614.

Morita T, Maki K and Aiba H (2005) RNase E-based ribonucleoprotein complexes: mechanical basis of mRNA destabilization mediated by bacterial noncoding RNAs. *Genes Dev* **19** : pp. 2176-2186.

N

Nakashimada Y, Kubota H, Takayose A, Kakizono T and Nishio N (2001) Asymmetric reduction of ethyl acetoacetate to ethyl (R)-3-hydroxybutyrate coupled with nitrate reduction by *Paracoccus denitrificans*. *J Biosci Bioeng* **91** : pp. 368-372.

Neidhardt FC, Curtiss R, Ingraham JL, Lin ECC, Low KB., Magasanik B, Reznikoff WS, Riley M, Schaechter M, and Umberger HE. *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and molecular biology. eds. American Society for Microbiology, Washington DC, 1987.

Cécile Nicolas. Analyse globale de la réponse adaptative du métabolisme central d'*E. coli* à une modulation contrôlée de la glucose-6-phosphate déshydrogénase : étude par fluxomique et corrélation transcriptome / fluxome. INSAT - LISBP. 2007.

Nicolas C, Kiefer P, Letisse F, Krömer J, Massou S, Soucaille P, Wittmann C, Lindley ND and Portais J (2007) Response of the central metabolism of *Escherichia coli* to modified expression of the gene encoding the glucose-6-phosphate dehydrogenase. *FEBS Lett* **581** : pp. 3771-3776.

Nimmo GA and Nimmo HG (1984) The regulatory properties of isocitrate dehydrogenase kinase and isocitrate dehydrogenase phosphatase from *Escherichia coli* ML308 and the roles of these activities in the control of isocitrate dehydrogenase. *Eur J Biochem* **141** : pp. 409-414.

Références bibliographiques

Noguchi Y, Nakai Y, Shimba N, Toyosaki H, Kawahara Y, Sugimoto S and Suzuki E (2004) The energetic conversion competence of *Escherichia coli* during aerobic respiration studied by ³¹P NMR using a circulating fermentation system. *J Biochem* **136** : pp. 509-515.

O

Okado-Matsumoto A and Fridovich I (2000) The role of alpha,beta -dicarbonyl compounds in the toxicity of short chain sugars. *J Biol Chem* **275** : pp. 34853-34857.

Ouzounis CA and Karp PD (2000) Global properties of the metabolic map of *Escherichia coli*. *Genome Res* **10** : pp. 568-576.

Ovádi J, Huang Y and Spivey HO (1994) Binding of malate dehydrogenase and NADH channelling to complex I. *J Mol Recognit* **7** : pp. 265-272.

Owen P and Kaback HR (1978) Molecular structure of membrane vesicles from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75** : pp. 3148-3152.

P

Park Y, Lee BR, Seok Y and Peterkofsky A (2006) In vitro reconstitution of catabolite repression in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **281** : pp. 6448-6454.

Pelosi L, Kühn L, Guetta D, Garin J, Geiselmann J, Lenski RE and Schneider D (2006) Parallel changes in global protein profiles during long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. *Genetics* **173** : pp. 1851-1869.

Perrenoud A and Sauer U (2005) Impact of global transcriptional regulation by ArcA, ArcB, Cra, Crp, Cya, Fnr, and Mlc on glucose catabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **187** : pp. 3171-3179.

Petersen S, de Graaf AA, Eggeling L, Möllney M, Wiechert W and Sahm H (2000) In vivo quantification of parallel and bidirectional fluxes in the anaplerosis of *Corynebacterium glutamicum*. *J Biol Chem* **275** : pp. 35932-35941.

Philippe N, Crozat E, Lenski RE and Schneider D (2007) Evolution of global regulatory networks during a long-term experiment with *Escherichia coli*. *Bioessays* **29** : pp. 846-860.

Pohl T, Bauer T, Dörner K, Stolpe S, Sell P, Zocher G and Friedrich T (2007) Iron-sulfur cluster N7 of the NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) is essential for stability but not involved in electron transfer. *Biochemistry* **46** : pp. 6588-6596.

Références bibliographiques

Pohl T, Schneider D, Hielscher R, Stolpe S, Dörner K, Kohlstädt M, Böttcher B, Hellwig P and Friedrich T (2008) Nucleotide-induced conformational changes in the *Escherichia coli* NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Biochem Soc Trans* **36** : pp. 971-975.

Pramanik J and Keasling JD (1997) Stoichiometric model of *Escherichia coli* metabolism: incorporation of growth-rate dependent biomass composition and mechanistic energy requirements. *Biotechnol Bioeng* **56** : pp. 398-421.

Prüss BM, Campbell JW, Van Dyk TK, Zhu C, Kogan Y and Matsumura P (2003) FlhD/FlhC is a regulator of anaerobic respiration and the Entner-Doudoroff pathway through induction of the methyl-accepting chemotaxis protein Aer. *J Bacteriol* **185** : pp. 534-543.

Pérez JM, Arenas FA, Pradenas GA, Sandoval JM and Vásquez CC (2008) *Escherichia coli* YqhD exhibits aldehyde reductase activity and protects from the harmful effect of lipid peroxidation-derived aldehydes. *J Biol Chem* **283** : pp. 7346-7353.

R

Raghunathan A and Palsson BO (2003) Scalable method to determine mutations that occur during adaptive evolution of *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett* **25** : pp. 435-441.

Ross W, Ernst A and Gourse RL (2001) Fine structure of *E. coli* RNA polymerase-promoter interactions: alpha subunit binding to the UP element minor groove. *Genes Dev* **15** : pp. 491-506.

S

Sambrook J & Russel DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, 2001.

Sauer U, Lasko DR, Fiaux J, Hochuli M, Glaser R, Szyperski T, Wüthrich K and Bailey JE (1999) Metabolic flux ratio analysis of genetic and environmental modulations of *Escherichia coli* central carbon metabolism. *J Bacteriol* **181** : pp. 6679-6688.

Sauer U, Canonaco F, Heri S, Perrenoud A and Fischer E (2004) The soluble and membrane-bound transhydrogenases UdhA and PntAB have divergent functions in NADPH metabolism of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **279** : pp. 6613-6619.

Sauer U (2006) Metabolic networks in motion: 13C-based flux analysis. *Mol Syst Biol* **2** : p. 62.

Références bibliographiques

Sazanov LA and Hinchliffe P (2006) Structure of the hydrophilic domain of respiratory complex I from *Thermus thermophilus*. *Science* **311** : pp. 1430-1436.

Sazanov LA (2007) Respiratory complex I: mechanistic and structural insights provided by the crystal structure of the hydrophilic domain. *Biochemistry* **46** : pp. 2275-2288.

Schneider D, Duperchy E, Coursange E, Lenski RE and Blot M (2000) Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. IX. Characterization of insertion sequence-mediated mutations and rearrangements. *Genetics* **156** : pp. 477-488.

Schumacher MA, Pearson RF, Møller T, Valentin-Hansen P and Brennan RG (2002) Structures of the pleiotropic translational regulator Hfq and an Hfq-RNA complex: a bacterial Sm-like protein. *EMBO J* **21** : pp. 3546-3556.

Segre D, Vitkup D and Church GM (2002) Analysis of optimality in natural and perturbed metabolic networks. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99** : pp. 15112-15117.

Sharma LK, Lu J and Bai Y (2009) Mitochondrial respiratory complex I: structure, function and implication in human diseases. *Curr Med Chem* **16** : pp. 1266-1277.

Shendure J, Porreca GJ, Reppas NB, Lin X, McCutcheon JP, Rosenbaum AM, Wang MD, Zhang K, Mitra RD and Church GM (2005) Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome. *Science* **309** : pp. 1728-1732.

Siddiquee KAZ, Arauzo-Bravo MJ and Shimizu K (2004) Effect of a pyruvate kinase (pykF-gene) knockout mutation on the control of gene expression and metabolic fluxes in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **235** : pp. 25-33.

Singh R, Mailloux RJ, Puiseux-Dao S and Appanna VD (2007) Oxidative stress evokes a metabolic adaptation that favors increased NADPH synthesis and decreased NADH production in *Pseudomonas fluorescens*. *J Bacteriol* **189** : pp. 6665-6675.

Sleight SC, Orlic C, Schneider D and Lenski RE (2008) Genetic basis of evolutionary adaptation by *Escherichia coli* to stressful cycles of freezing, thawing and growth. *Genetics* **180** : pp. 431-443.

Spehr V, Schlitt A, Scheide D, Guénebaut V and Friedrich T (1999) Overexpression of the *Escherichia coli* nuo-operon and isolation of the overproduced NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Biochemistry* **38** : pp. 16261-16267.

Srivastava DK, Smolen P, Betts GF, Fukushima T, Spivey HO and Bernhard SA (1989) Direct transfer of NADH between alpha-glycerol phosphate dehydrogenase and lactate dehydrogenase: fact or misinterpretation?. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86** : pp. 6464-6468.

Studier FW and Moffatt BA (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189** : pp. 113-130.

Références bibliographiques

Sulzenbacher G, Roig-Zamboni V, Pagot F, Grisel S, Salomoni A, Valencia C, Campanacci V, Vincentelli R, Tegoni M, Eklund H and Cambillau C (2004) Structure of *Escherichia coli* YhdH, a putative quinone oxidoreductase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60** : pp. 1855-1862.

Szyperski T (1995) Biosynthetically directed fractional ¹³C-labeling of proteinogenic amino acids. An efficient analytical tool to investigate intermediary metabolism. *Eur J Biochem* **232** : pp. 433-448.

Szyperski T (1998) ¹³C-NMR, MS and metabolic flux balancing in biotechnology research. *Q Rev Biophys* **31** : pp. 41-106.

T

Jacques Thierie. Théorie et applications des systèmes polyphasiques dispersés aux cultures cellulaires en chémostat. Université de Bruxelles - Faculté des Sciences - Chimie. 2005.

Thouvenot B, Charpentier B and Branlant C (2004) The strong efficiency of the *Escherichia coli* *gapA* P1 promoter depends on a complex combination of functional determinants. *Biochem J* **383** : pp. 371-382.

Tseng CP, Yu CC, Lin HH, Chang CY and Kuo JT (2001) Oxygen- and growth rate-dependent regulation of *Escherichia coli* fumarase (FumA, FumB, and FumC) activity. *J Bacteriol* **183** : pp. 461-467.

V

Vanderpool CK (2007) Physiological consequences of small RNA-mediated regulation of glucose-phosphate stress. *Curr Opin Microbiol* **10** : pp. 146-151.

Vecerek B, Rajkowitsch L, Sonnleitner E, Schroeder R and Bläsi U (2008) The C-terminal domain of *Escherichia coli* Hfq is required for regulation. *Nucleic Acids Res* **36** : pp. 133-143.

Velazquez I, Nakamaru-Ogiso E, Yano T, Ohnishi T and Yagi T (2005) Amino acid residues associated with cluster N3 in the NuoF subunit of the proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase from *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **579** : pp. 3164-3168.

Velicer GJ, Raddatz G, Keller H, Deiss S, Lanz C, Dinkelacker I and Schuster SC (2006) Comprehensive mutation identification in an evolved bacterial cooperator and its cheating ancestor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103** : pp. 8107-8112.

Références bibliographiques

Vemuri GN, Altman E, Sangurdekar DP, Khodursky AB and Eiteman MA (2006) Overflow metabolism in *Escherichia coli* during steady-state growth: transcriptional regulation and effect of the redox ratio. *Appl Environ Microbiol* **72** : pp. 3653-3661.

W

Walton AZ and Stewart JD (2004) Understanding and improving NADPH-dependent reactions by nongrowing *Escherichia coli* cells. *Biotechnol Prog* **20** : pp. 403-411.

Weckbecker A and Hummel W (2004) Improved synthesis of chiral alcohols with *Escherichia coli* cells co-expressing pyridine nucleotide transhydrogenase, NADP⁺-dependent alcohol dehydrogenase and NAD⁺-dependent formate dehydrogenase. *Biotechnol Lett* **26** : pp. 1739-1744.

Wick LM, Qi W, Lacher DW and Whittam TS (2005) Evolution of genomic content in the stepwise emergence of *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol* **187** : pp. 1783-1791.

Widmer F and Kaplan NO (1977) *Pseudomonas aeruginosa* transhydrogenase: affinity of substrates for the regulatory site and possible hysteretic behavior. *Biochem Biophys Res Commun* **76** : pp. 1287-1292.

Wiechert W (2001a) 13C metabolic flux analysis. *Metab Eng* **3** : pp. 195-206.

Wiechert W, Möllney M, Petersen S and de Graaf AA (2001b) A universal framework for 13C metabolic flux analysis. *Metab Eng* **3** : pp. 265-283.

Wright BE (2004) Stress-directed adaptive mutations and evolution. *Mol Microbiol* **52** : pp. 643-650.

Y

Yamada H, Tokuda H and Mizushima S (1989) Proton motive force-dependent and -independent protein translocation revealed by an efficient in vitro assay system of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **264** : pp. 1723-1728.

Yamaguchi M and Stout CD (2003) Essential glycine in the proton channel of *Escherichia coli* transhydrogenase. *J Biol Chem* **278** : pp. 45333-45339.

Z

Références bibliographiques

Zhang J, Witholt B and Li Z (2006) Coupling of permeabilized microorganisms for efficient enantioselective reduction of ketone with cofactor recycling. *Chem Commun (Camb)* : pp. 398-400.

Zhang W, O'Connor K, Wang DIC and Li Z (2009) Bioreduction with efficient recycling of NADPH by coupled permeabilized microorganisms. *Appl Environ Microbiol* **75** : pp. 687-694.

Zhao J and Shimizu K (2003) Metabolic flux analysis of *Escherichia coli* K12 grown on ¹³C-labeled acetate and glucose using GC-MS and powerful flux calculation method. *J Biotechnol* **101** : pp. 101-117.

Zhao J, Baba T, Mori H and Shimizu K (2004) Global metabolic response of *Escherichia coli* to *gnd* or *zwf* gene-knockout, based on ¹³C-labeling experiments and the measurement of enzyme activities. *Appl Microbiol Biotechnol* **64** : pp. 91-98.

Table des illustrations

Liste des figures

Figure 1 : Détails du marché des biotechnologies blanches dans la chimie en milliard d'euros (d'après McKinsey, 2006).....	14
Figure 2 : Principe du couplage des réactions NAD(P)H réductases et régénératrices de NADPH pour la transformation des cétones en alcools. (D'après Zhang <i>et al.</i> , 2006, et Weckbecker & Hummel, 2004).....	15
Figure 3 : Principe d'adaptation d'une enzyme NADPH dépendante à un substrat A dans une souche surproduisant le NADPH en culture continue.....	16
Figure 4 : Les 5 niveaux organisationnels et fonctionnels chez la cellule bactérienne.....	20
Figure 5 : Représentation schématique de toutes les réactions métaboliques connues chez <i>E. coli</i> (http://ecocyc.org)(Neidhardt, 1987).....	22
Figure 6 : Représentation schématique des voies de biosynthèse des acides aminés.....	23
Figure 7 : Flux au travers d'une bifurcation métabolique.	24
Figure 8 : Exemple de l'équilibre métabolique du glucose-6-phosphate.	24
Figure 9 : Principe des modèles <i>in silico</i> sous contraintes intégrant les données du métabolisme et de la régulation transcriptionnelle. (D'après Covert & Palsson, 2002).....	26
Figure 10 : Equations bilans de l'oxydation complète du PEP au cours (A) du cycle de Krebs et (B) du cycle du PEP-glyoxylate. (D'après Fischer & Sauer, 2003).	27
Figure 11 : Paysage de «fitness» et dynamique de l'évolution d'un individu en deux trajectoires adaptatives possibles. (D'après Elena & Lenski, 2003).	31
Figure 12 : Représentation schématique des cultures d'évolution par repiquages successifs en milieu frais. (D'après Fong <i>et al.</i> , 2005).	34
Figure 13 : Schéma simplifié d'un chemostat en mode continu. (D'après Jacques Thierie, 2005).	35
Figure 14 : Schéma du cycle du NADH et NADPH dans le métabolisme bactérien et des principales fonctions impliquées dans leur consommation/production.....	40
Figure 15 : Réseau simplifié du métabolisme central du glucose avec les voies de production des cofacteurs NAD(P)H chez <i>E. coli</i>	41
Figure 16 : Réseau métabolique simplifié de la synthèse des acides gras (A) et des phospholipides (B) chez <i>E. coli</i> (http://ecocyc.org).	45
Figure 17 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie.	46
Figure 18 : Niveaux relatifs des transcrits <i>udhA</i> (A) et <i>pntA</i> (B) déterminés par RT-qPCR. (D'après Sauer <i>et al.</i> , 2004).	50
Figure 19 : Filiation génétique entre les souches <i>E. coli</i> K-12 et <i>E. coli</i> MG1655. (D'après Hayashi <i>et al.</i> , 2006).....	55
Figure 20 : Principe de la délétion de gène par introduction d'un produit PCR	64

Table des illustrations

Figure 21 : Principe du transfert de gène par transduction généralisée	67
Figure 22 : Réaction cyclique de dosage du NADPH et NADP ⁺ par ICDH	75
Figure 23 : Réaction cyclique de dosage du NADH et NAD ⁺ par ADH.....	75
Figure 24 : Principe de la technologie Nimblegen pour la comparaison de génomes	78
Figure 25 : Signaux d'hybridation du génome test (en vert) comparés aux signaux du génome de référence (en bleu).	79
Figure 26 : Equation et représentation graphique de Lineweaver & Burk des constantes cinétiques enzymatiques.....	86
Figure 27 : Schéma du principe du « Dye switch » à deux répétitions.	89
Figure 28 : Principe de l'analyse transcriptomique sur lames à ADN en mode « Dye Switch » à partir de 4 échantillons d'ARN indépendants par souche.....	90
Figure 29 : Schéma de principe de calcul des flux (D'après Cécile Nicolas, 2007).....	96
Figure 30 : Réseau métabolique modifié de la souche NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$	100
Figure 31 : Filiation de la souche NA 23 MG1655 $\Delta pgi::FRT \Delta udhA::FRT \Delta qor::FRT \Delta edd::FRT$ avec les différentes étapes de construction de biologie moléculaire à partir de la souche MG1655.	102
Figure 32 : Evolution du taux de croissance et de la fitness des deux populations NA 23 au cours des cultures de repiquages d'évolution <i>in vivo</i>	105
Figure 33 : Evolution au cours du temps du taux de croissance et de la fitness relative des deux populations évoluées NA 23.....	107
Figure 34 : Taux de croissance des souches accumulant le NADPH évoluées, non évoluées et reconstruites	118
Figure 35 : Taux de croissance et vitesse spécifique de consommation du glucose moyens de l'ensemble des clones possédant ou non un gène <i>rpoA</i> modifié.	121
Figure 36: Organisation de la chaîne respiratoire chez les bactéries.....	124
Figure 37 : Schéma hypothétique de l'évolution du complexe I. (D'après Friedrich et Scheide, 2002).125	
Figure 38 : Organisation de l'opéron <i>nuo</i> chez <i>E. coli</i>	126
Figure 39 : Représentation schématique du complexe I avec les 3 sous complexes principaux ainsi que les sous-unités protéiques qui les constituent.	126
Figure 40 : Architecture et arrangement des centres redox du domaine hydrophile du complexe I de <i>T. thermophilus</i> . (D'après Sazanov et Hinchliffe, 2006).	127
Figure 41 : Conformation du site de fixation du NADH et du FMN de la sous-unité Nqo1. (D'après Sazanov et Hinchliffe, 2006).....	128
Figure 42 : Alignement des séquences protéiques d' <i>E. coli</i> et de <i>T. thermophilus</i> correspondant aux sous-unités du complexe I possédant les domaines FMN et NADH binding.....	129
Figure 43 : Structure putative de NuoF d' <i>E. coli</i> déduite de la structure de Nqo1 de <i>T. thermophilus</i> . 130	
Figure 44 : Les sites d'ancrage du FMN et du NAD(P)H comparés dans les sous-unités NuoF et NuoF*.....	130

Table des illustrations

Figure 45 : Gel SDS-Page coloré au bleu de Coomassie des fragments solubles déshydrogénases sauvage et évolué.	132
Figure 46 : Western Blot des fragments solubles déshydrogénases sauvage et évolué.....	133
Figure 47: Vitesse initiale de la réaction NAD(P)H/ferricyanide réductase du fragment déshydrogénase soluble sauvage en fonction de la concentration en cofacteur (A) NADH et (B) NADPH.....	135
Figure 48 : Vitesse initiale de la réaction NAD(P)H/ferricyanide réductase du fragment déshydrogénase soluble évolué en fonction de la concentration en cofacteur (A) NADH et (B) NADPH.....	135
Figure 49 : Génération du $\Delta\Psi$ et un ΔpH par la chaîne respiratoire des vésicules inversées des souches NA 23 et NA 23E04.....	138
Figure 50 : (A) Modèle de l'ARNP, ici en mode élongation d'après Geszvain & Landick (2005). (B) Structure du cœur ARNP de <i>T. aquaticus</i> . (D'après Zhang <i>et al.</i> , 1999).....	141
Figure 51 : Le cycle de transcription. (D'après Geszvain & Landick, 2005).	142
Figure 52 : Schéma des différents mécanismes d'initiation de la transcription. (D'après Chen <i>et al.</i> , 2003).....	144
Figure 53 : Activation de la transcription par CAP. (D'après Lawson <i>et al.</i> , 2004).	144
Figure 54 : Chronologie de l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse du flagelle d' <i>E. coli</i> . (D'après Chilcott et Hughes, 2000).	148
Figure 55 : Réseau métabolique central d' <i>E. coli</i> simplifié.....	163
Figure 56 : Distribution des flux nets dans la souche non évoluée NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd$, les souches reconstruites NA 175 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd rpoA^*$ et NA 142 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd nuoF^*$ et la souche évoluée NA 124E MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd nuoF^* rpoA^*$	165
Figure 57 : Qualité statistique de la modélisation de la souche NA 175.....	168
Figure 58 : Distribution des flux au niveau du cycle de Krebs et du shunt glyoxylique chez les mutants du métabolisme du NADPH en croissance exponentielle sur glucose.	170
Figure 59 : Proportion du flux entrant dans le cycle de Krebs vers la voie du glyoxylate (GS) et corrélation avec le rapport NADPH/NADP ⁺	171
Figure 60 : Concentrations des cofacteurs NADP(H) normalisées par la concentration en biomasse et rapports NADPH/NADP ⁺	174
Figure 61 : Concentrations des pools de NADP _t normalisées par la concentration en biomasse.....	175
Figure 62 : Flux net de production totale du NADPH et besoins biosynthétiques en NADPH en mmol.g ⁻¹ .h ⁻¹ , chez les souches NA 23, NA 142, NA 175 et NA 124E.....	176
Figure 63 : Concentrations des cofacteurs NAD(H) normalisées par la concentration en biomasse et rapports NADH/NAD ⁺	177
Figure 64 : Concentrations des pools de NAD _t normalisées par la concentration en biomasse.	178
Figure 65 : Flux net de production totale du NADH et de production de NADH via MDH en mmol.g ⁻¹ .h ⁻¹ chez les souches NA 23, NA 142, NA 175, NA 124E et MG1655.	179
Figure 66 : Réseau métabolique modifié de la souche NA 24 MG1655 $\Delta pfkAB \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$	185
Figure 67 : Filiation de la souche NA 24 MG1655 $\Delta pfkAB \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ avec les différentes étapes de construction de biologie moléculaire à partir de la souche MG1655.	186

Table des illustrations

Figure 68 : Croissance de la souche NA 24 MG1655 $\Delta pfkAB \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ sur milieu minimum synthétique et galactose.....	188
Figure 69 : Gel SDS-Page coloré au bleu de Coomassie du fragment soluble déshydrogénase évolué.	190
Figure 70 : Western Blot des fragments solubles déshydrogénases sauvage et évolué.....	191
Figure 71 : Les sites d'ancrage du FMN et du NADPH dans NuoF*(E183G).....	193
Figure 72 : Croissance de la souche NA 135 MG1655 $\Delta pfkAB \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ pSK-PgapA-GRE2p sur milieu minimum synthétique et galactose avec ou sans EAA.	197
Figure 73 : Concentrations en EAA et EHB (g.l ⁻¹) de la culture de bioréduction de la souche NA 135 MG1655 $\Delta pfkAB \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ pSK-PgapA-GRE2p sur milieu minimum synthétique et galactose.	198
Figure 74 : Croissance de la souche NA 135 MG1655 $\Delta pfkAB \Delta udhA \Delta edd \Delta qor$ pSK-PgapA-GRE2p sur milieu minimum synthétique et galactose après ajout d'EAA.....	199
Figure 75 : Schématisation des cultures de bioconversion réalisées en chemostats (système DasGip Fed-batch Pro [®]).....	207
Figure 76 : Réaction simplifiée d'autooxydation du glycolaldéhyde en glyoxal	207
Figure 77 : Oxydation d'un sucre en composé α,β -dicarbone (D'après Okado-Matsumoto & Fridovich, 2000).....	208
Figure 78 : Vitesse de dégradation du glycolaldéhyde en fonction du pH du milieu MML8b	209
Figure 79 : Suivi du chemostat de la souche NA 195E MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta edd \Delta qor \Delta adhE \Delta aldA nuoF^* rpoA$ pME101- <i>yqhD</i> en milieu MML8b+Glc18+Glyc. 50 mM+Sp100+Cm30 (consignes : 37°C, 400rpm, pH=6,8, débit air=2 sl.h ⁻¹ , taux de dilution=5 ml.h ⁻¹).	211
Figure 80 : Suivi du chemostat de la souche NA 188 MG1655 $\Delta adhE \Delta aldA$ pME101- <i>yqhD</i> en milieu MML8b+Glc18+Glyc. 50 mM+Sp100+Cm30 (consignes : 37°C, 400rpm, pH=6,8, débit air=2 sl.h ⁻¹ , taux de dilution=5 ml.h ⁻¹).	211
Figure 81 : Suivi du chemostat de la souche NA 195E MG1655 $\Delta adhE \Delta aldA$ pME101- <i>yqhD</i> en milieu MML8b 10% sels A+Glc18+Glyc. 55 - 100 mM+Sp100+Cm30 (consignes : 37°C, 400rpm, pH=6.5, débit air=2 sl.h ⁻¹ , taux de dilution initial=5 ml.h ⁻¹).	213
Figure 82 : Suivi du chemostat de la souche NA 195E en milieu MML8b 10% sels A+Glc18+Glycolaldéhyde 125 mM+Sp100+Cm30 (consignes : 37°C, 400rpm, pH=6,5, débit air=2 sl.h ⁻¹ , débit=2 mL.h ⁻¹).	214
Figure 83 : Culture fed-batch de référence de la souche NA 195E en profil exponentiel.....	217

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Carrefours métaboliques. (D'après Ouzounis & Karp, 2000).....	21
Tableau 2 : Besoins en précurseurs et en NADPH pour la synthèse des 20 acides aminés chez <i>E. coli</i>	44
Tableau 3 : Taux de croissance sur glucose de mutants d' <i>E. coli</i> dont les voies de production et de consommation du NADPH sont perturbées. (D'après Sauer <i>et al.</i> , 2004).....	51
Tableau 4 : Composition du milieu LB agar en g.l ⁻¹	53
Tableau 5 : Composition du milieu M9 agar g.l ⁻¹	53
Tableau 6 : Composition des milieux LB, SOC et SOB en g.l ⁻¹	54
Tableau 7 : Composition du milieu minimum synthétique de culture dit « MML8b ».....	54
Tableau 8 : Concentrations finales des antibiotiques utilisés en µg.ml ⁻¹	54
Tableau 9 : Souches bactériennes d' <i>Escherichia coli</i> et plasmides utilisés lors de la présente étude... ..	56
Tableau 10 : Composition du tampon de charge (6X).	61
Tableau 11 : Composition du mélange réactionnel pour la PCR en µl (volume final de 50 µl).....	62
Tableau 12 : Conditions de PCR utilisées.....	62
Tableau 13 : Composition du mélange réactionnel pour la PCR en µl.	64
Tableau 14 : Conditions de PCR utilisées.....	64
Tableau 15 : Amorces pour l'obtention par PCR des substrats de recombinaison.....	65
Tableau 16 : Amorces utilisées pour les PCR pour la vérification des mutations.....	69
Tableau 17 : Comparaison de la taille des fragments PCR attendus dans les souches recombinantes et la souche MG1655	70
Tableau 18 : Amorces de vérifications des mutations détectées par CGS.....	80
Tableau 19 : Composition du gel d'alignement SDS-PAGE	82
Tableau 20 : Composition du gel de séparation SDS-PAGE	82
Tableau 21 : Composition du tampon de dénaturation (5 X)	83
Tableau 22 : Composition du tampon de migration 1 X.....	83
Tableau 23 : Composition de la solution de coloration au bleu de Coomassie	83
Tableau 24 : Composition de la solution de décoloration	83
Tableau 25 : Composition du tampon de transfert.....	84

Table des illustrations

Tableau 26 : Composition de la solution de révélation	84
Tableau 27 : Paramètres de croissance aérobie sur glucose des souches NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd$ et MG1655 durant la phase exponentielle de croissance.....	104
Tableau 28 : Paramètres de croissance aérobie sur glucose des souches évoluées après 20 générations NA 23E04 à NA 32E04 durant la phase exponentielle de croissance.	106
Tableau 29 : Paramètres de croissance aérobie sur glucose des souches évoluées après 65 générations NA 124E à NA 133E durant la phase exponentielle de croissance.	108
Tableau 30 : Paramètres de croissance aérobie sur glucose des souches NA 23, NA 124E et MG1655 durant la phase exponentielle de croissance.	109
Tableau 31 : Régions du génome des souches NA 23E04 et NA 124E détectées par CGS contenant potentiellement des modifications nucléotidiques par rapport au génome de la souche MG1655.....	115
Tableau 32 : Mutations confirmées chez la souche NA 124E apparues lors du processus d'évolution adaptative	116
Tableau 33 : Souches bactériennes évoluées/non évoluées $rpoA(*)/nuoF(*)$ reconstruites	117
Tableau 34 : Paramètres de croissance aérobie sur glucose des souches NA 23, NA 124E, NA 142, NA 175 et MG1655 durant la phase exponentielle de croissance.	119
Tableau 35 : Mutations dans le gène $rpoA$ présentes chez les souches évoluées NA 124E, NA 126E, NA 127E et NA 128E.....	121
Tableau 36 : Mutations acquises par évolution adaptative chez la souche évoluée NA 131E.....	122
Tableau 37 : Activité spécifique ferricyanide réductase NAD(P)H des fragments solubles déshydrogénases sauvage et évolués.	133
Tableau 38 : Paramètres cinétiques K_m et V_{max} mesurés pour les fragments solubles déshydrogénases sauvage et évolué.....	134
Tableau 39 : Paramètres cinétiques K_{cat} (nombre de turnover) et K_{cat}/K_m (efficacité catalytique) calculés pour les fragments solubles déshydrogénases sauvage et évolué.	136
Tableau 40 : Activités NAD(P)H oxydases des vésicules inversées.....	137
Tableau 41 : Propriétés des différentes sous-unités de l'ARNP d' <i>E. coli</i>	140
Tableau 42 : Les différents facteurs sigma existant chez <i>E. coli</i>	141
Tableau 43 : Familles des principales fonctions affectées par les modifications d'expression des gènes en présence de $rpoA^*$	149
Tableau 44 : Gènes candidats pour la quantification relative des ARNm par RT-qPCR.....	151
Tableau 45 : Expression relative des gènes des souches NA 124E MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd nuoF^* rpoA^*$ par rapport à ceux de la souche NA 142 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd nuoF^*$	152
Tableau 46 : Expression relative des gènes des souches NA 175 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd rpoA^*$ par rapport à ceux de la souche NA 23 MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd$	153
Tableau 47 : Analyse d'identifiabilité des flux nets à travers la phosphoglucoisomérase ($emp1$), la voie d'Entner-Doudoroff, les voies anapérotyques (ppc , pck et $malE$), et la voie du glyoxylate ($en\%$ du q_s).	161
Tableau 48 : Résidu de minimisation global (R) et résidu de minimisation moyen par donnée isotopique (RM) obtenus sur les quatre différentes souches.....	162

Table des illustrations

Tableau 49 : Abréviations des enzymes et des réactions utilisées dans les schémas du réseau métabolique d' <i>E. coli</i>	164
Tableau 50 : Pourcentage des flux de consommation de chacune des formes marquées ou non du glucose.	166
Tableau 51 : Déviation calculée sur les flux (en% du flux).	167
Tableau 52 : Expression des gènes du cycle de Krebs modifiée par la mutation <i>rpoA*</i> chez la souche NA 124E MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA \Delta qor \Delta edd nuoF^* rpoA^*$	172
Tableau 53 : Paramètres cinétiques K_m et V_{max} mesurés pour les fragments solubles déshydrogénases sauvage et évolués.	191
Tableau 54 : Paramètres cinétiques K_{cat} (nombre de turnover) et K_{cat}/K_m (efficacité catalytique) calculés pour les fragments solubles déshydrogénases sauvage et évolués.....	192
Tableau 55 : Taux de croissance (h^{-1}) de la souche NA 172E en fonction de la concentration en IPTG.	200
Tableau 56 : Taux de croissance (h^{-1}) de la souche NA 172E en fonction de la nature et de la concentration en aldéhyde, en présence ou non d'IPTG.	201
Tableau 57 : Taux de croissance (h^{-1}) de la souche MG1655 en fonction de la nature et de la concentration en aldéhyde.	201
Tableau 58 : Vitesses spécifiques de production du propanol et de consommation du propionaldéhyde, et rendement molaire propanol/glucose des souches accumulant le NADPH de bioconversion.	202
Tableau 59 : Vitesses spécifiques de production du propanol et de consommation du propionaldéhyde, et rendement molaire propanol/glucose des souches accumulant le NADPH de bioconversion.	203
Tableau 60 : Vitesses spécifiques de production du propanol et de consommation du propionaldéhyde, et rendement molaire propanol/glucose des souches références de bioconversion.	204
Tableau 61 : Vitesses spécifiques de production du propanol et de consommation du propionaldéhyde, et rendement molaire propanol/glucose des souches références de bioconversion.	204
Tableau 62 : Vitesses spécifiques de production d'éthylène glycol et de consommation du glycolaldéhyde, et rendement molaire éthylène glycol/glucose des souches accumulant le NADPH et référence de bioconversion.	205
Tableau 63 : Vitesses de production d'EG (spécifiques et normales) et rendement de bioconversion des souches NA 188 et NA 195E lors de cultures continues de bioconversion de 50 mM de glycolaldéhyde	215
Tableau 64 : Vitesses de production d'EG (spécifiques et normales) et rendement de bioconversion de la souche NA 195E lors de cultures continues de bioconversion à fortes concentrations de glycolaldéhyde.....	215
Tableau 65 : Performances moyennes et maximales en culture fed-batch de bioconversion de glycolaldéhyde en EG de la souche NA 195E.....	218

Abréviations

Abréviations

6PGDH : 6-Phosphogluconate déshydrogénase
AA : Acide aminé
ACP : Acyl Carrier Protein
AcPyAD : 3-Acétylpyridine adénine dinucléotide
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADH : Alcool déshydrogénase
AMP : Adénosine-5' monophosphate
AMPc : Adénosine-5' monophosphate cyclique
Ap : Ampicilline
APS : Ammonium persulfate
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : Acide ribonucléique messenger
ARNnc : ARN non codant
ARNP : ARN polymérase
ARNt : Acide ribonucléique de transfert
ADP : Adénosine-5' diphosphate
ATP : Adénosine-5' triphosphate
AS : Activité spécifique
 α CTD : Alpha chain C terminal domain
 α NTD : Alpha chain N terminal domain
BET : Bromure d'éthidium
BSA : Bovin Albumin Serum
CAP : Catabolite activator protein
CDP : Cytidine-5'-diphosphate
Cm : Chloramphénicol
CoA : Coenzyme A
CRP : AMP_c receptor protein
dATP : Acide désoxyadénosine-5'-triphosphate
dCTP : Acide désoxycytidine-5'-triphosphate
dGTP : Acide désoxyguanosine-5'-triphosphate
DHAP : Dihydroxyacétone phosphate
dNTPs : Désoxyribonucléotides-5'-triphosphate
DO : Densité optique
dTTP : Acide désoxythymidine-5'-triphosphate
dUTP : Acide désoxyuridine-5'-triphosphate
DTT : Dithioerythriol
E. coli : *Escherichia coli*
ED : Entner-Doudoroff
EDTA : Acide éthylène diamine tétra-acétate
EAA : Ethylacétoacétate
EHB : Ethylhydroxybutyrate
EMP : Embden-Meyerhof-Parnas
FDH : Formate déshydrogénase

Abréviations

FMN : Flavomononucleotide
FRT : FLP recognition target
FPR : Ferrédoxine (flavodoxine) – NADP⁺ réductase
G6PDH : Glucose-6-phosphate déshydrogénase
Glc : Glucose
GlcN : Glucosamine
GlcNAc : N-acétylglucosamine
GC : Gaz chromatography
GDP : Guanosine-5' diphosphate
GMP : Guanosine-5' monophosphate
GTP : Guanosine-5' triphosphate
GS : Glyoxylate shunt
HABA : Hydroxy-azophenyl-benzoic acid
HCl : Acide chlorydrique
Hepes : *N*-[2-hydroxyéthyl]piperazine-*N'*-[acide 2-éthane sulfonique]
HPLC : High performance liquid chromatography
HSQC : Heteronuclear single quantum correlation
ICDH : Isocitrate déshydrogénase
ICL : Isocitrate lyase
IPTG : Isopropyl β-D-thiogalactopyranoside
ISO : Inside-out
kb : Kilobase
Kcat : Constante catalytique
KCl : Chlorure de potassium
KCN : Potassium cyanide
kDa : Kilodalton
Km : Kanamycine
Km : Constante michaélienne
LB : Lysogeny broth
ln : Logarithme népérien
Log : Logarithme décimal
M : mol.l⁻¹
MALDI-TOF : Matrix-assisted Desorption/Ionisation laser time of flight
MCPs : Methyl-accepting chemotaxis proteins
MDH : Malate déshydrogénase
MES : 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid
mg : milligramme
MM : Milieu minimum
mol, mmol, μmol, nmol : Mole, millimole, micromole, nanomole
MOPS : Acide sulfonique *N*-morpholino propane
MS : Mass spectrometry
MTT : Methyl thiazol tetrazolium
μ : Taux de croissance
μF : Microfaraday

Abréviations

µl : Microlitre

NAD⁺ : Nicotinamide adénine dinucléotide oxydé

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide réduit

NADP⁺ : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydé

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit

nm : Nanomètre

NUO : NADH ubiquinone oxydoréductase

OAA : Oxaloacétate

ORF : Open reading frame = cadre ouvert de lecture

PAGE : Polyacrylamide gel electrophoresis

pb : Paire de bases

PBS : Phosphate buffered saline

PCR : Polymerase chain reaction

PDB : Protein database

PEP : Phosphoénolpyruvate

PES : Phénazine éthosulfate

PFK : Phosphofructokinase

PGI : Phosphoglucoisomérase

PHB : Polyhydroxybutyrate

Pi : Phosphate inorganique

PMS : Phénazine méthosulfate

PNT : Pyridine nucléotide transhydrogénase

PP : Pentoses-phosphate

PRPP : 5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphate

PTS : Phosphotransférase system

q_s : Vitesse spécifique de consommation du glucose

RNase : Ribonucléase

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

ROS : Reactive oxygen species

rpm : Rotations par minute

S. cerevisiae : *Saccharomyces cerevisiae*

SDS : Sodium dodécyl sulfate

SOB : Super optimal broth

SOC : Super optimal broth with catabolite repression

Sp : Spectinomycine

SSC : Sodium chloride sodium citrate

TCA : Acide trichloroacétique

TAE : Tris-acetate-EDTA

T. aquaticus : *Thermus aquaticus*

TE : Tris-EDTA

TEMED : N-N'-N'-N'-tétraméthyléthyldiamine

THF : Tétrahydrofurane

Tris : Tris-(hydroxyméthyl)aminométhane

TPI : Triose phosphate isomérase

Abréviations

T. thermophilus : *Thermus thermophilus*

UDO : Unité de densité optique

UMP : Uridine monophosphate

UQH₂ : Ubiquinol

UV : Ultraviolet

v_{AC} : Vitesse spécifique de production de l'acétate

V_{max} : Vitesse maximale

V, kV : Volt, Kilovolt

v/v : Volume à volume

WT : Wild type

w/v : Poids à volume

Y_{X/S} : Rendement biomasse sur glucose

°C : Degré Celsius