

**DÉVELOPPEMENT D'UNE BIOTECHNOLOGIE VERTE INNOVATRICE PAR
INGÉNIERIE MÉTABOLIQUE POUR LA VALORISATION DES RÉSIDUS
FROMAGERS**

par

Jean-François Rousseau

Mémoire présenté au Département de biologie en vue
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, juin 2021

Le 22 juin 2021

*Le jury a accepté le mémoire de Monsieur Jean-François Rousseau
dans sa version finale.*

Membres du jury

Professeur Sébastien Rodrigue
Directeur de recherche
Département de biologie

Professeur Ryszard Brzezinski
Codirecteur de recherche
Département de biologie

Professeur Benoit Leblanc
Évaluateur interne
Département de biologie

Professeur Vincent Burrus
Président-rapporteur
Département de biologie

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier M. Sébastien Rodrigue, professeur et chercheur au Département de biologie de l'Université de Sherbrooke. En tant que directeur de recherche, il m'a guidé dans mon travail et il m'a aidé à trouver des solutions pour avancer. Il a toujours été très présent, disponible et patient tout au long de mon cheminement.

Je remercie aussi M. Ryszard Brzezinski, professeur et chercheur maintenant retraité du Département de biologie de l'Université de Sherbrooke. Il fut mon codirecteur de recherche lors de ma maîtrise. Il a été présent afin de me guider dans les décisions importantes reliées au projet et a fourni une aide considérable pour mon avancement.

Je remercie M. Benoit Leblanc, chargé de cours à l'Université de Sherbrooke et M. Vincent Burrus, professeur et chercheur au Département de biologie de l'Université de Sherbrooke. Ils ont agi à titre d'évaluateur interne lors de ma maîtrise. Ils ont pris le temps de s'assurer que mes travaux étaient bien structurés du début à la fin.

Je remercie les gens du laboratoire du professeur Rodrigue à savoir Vincent Baby, étudiant au doctorat, Dominick Matteau, étudiant au doctorat, Marie-Eve Pepin, étudiante à la maîtrise, Frédéric Grenier, étudiant à la maîtrise, Kevin Neil, étudiant à la maîtrise et Jean-Christophe Lachance, étudiant à la maîtrise.

Finalement, je voudrais remercier mes parents qui m'ont soutenu et encouragé toutes ces années. Sans vous, cet accomplissement n'aurait pas eu lieu.

SOMMAIRE

De nombreuses recherches sont menées de par le monde pour valoriser la biomasse résiduelle en sources d'énergie alternatives ou en diverses molécules d'intérêt commercial. Au Québec, parmi les secteurs industriels produisant des résidus potentiellement valorisables, l'industrie de la transformation du lait génère des quantités importantes de lactosérum et de perméat. Notre projet vise à évaluer la possibilité de créer par génie métabolique des microorganismes capables de produire des molécules d'intérêt commercial à partir du lactose contenu dans ces substances. Plus spécifiquement, ce projet vise l'obtention de diols, constitués de (2,3)-butanediol (2,3BD) ainsi que d'acétoïne (AC), par l'intermédiaire d'un procédé de fermentation qui met en œuvre une souche génétiquement modifiée de la bactérie *Escherichia coli*. Les diols sont des substances permettant de nombreuses applications industrielles, dont la fabrication de polymères, d'explosifs et de produits pharmaceutiques, pour le 2,3BD, ainsi que la fabrication d'agents de saveur, de parfum, pour l'AC. Puisque les enzymes nécessaires à la production de diols ne se retrouvent pas chez *E. coli*, nous avons d'abord identifié trois produits de gènes permettant successivement de transformer le pyruvate provenant de la glycolyse en 1) acétolactate puis en 2) AC et finalement en 3) 2,3BD. Ces gènes ont été synthétisés puis intégrés au chromosome d'*E. coli*. Nous avons ensuite validé que la souche obtenue permettait la production des molécules attendues avant de créer une série de délétions inactivant les cinq voies de fermentation principales chez *E. coli* pouvant potentiellement compétitionner la production de diols. Nos résultats montrent que l'ajout de la voie métabolique des diols couplé à la délétion de certaines voies de fermentation endogènes à *E. coli* apporte de meilleurs rendements. Nos résultats ont aussi démontré que la surexpression de la voie métabolique des diols via l'utilisation d'un plasmide augmentait la productivité maximale de la souche d'environ 10 fois, pour atteindre $35.3 \text{ mM}\cdot\text{h}^{-1}$ ou encore $3.11 \text{ g/L}\cdot\text{h}^{-1}$.

Mots clés : Acétoïne, AC, 2,3-butanediol, BD, 2,3BD, diols, acétolactate, lactosérum, perméat, lactose, *Escherichia coli*, transformation laitière, ingénierie métabolique, revalorisation, déchet industriel

TABLE DES MATIÈRES

CHAPITRE I.....	1
INTRODUCTION	1
1.1 Procédé de fabrication du fromage	2
1.2 Lactosérum	3
1.3 Perméat de lait	4
1.4 Problématique de l'accumulation des déchets industriels que sont le lactosérum et le perméat de lait	5
1.5 Utilisation d'énergie renouvelable	8
1.6 Utilisation de microorganismes	9
1.7 Avantages liés à l'utilisation de microorganismes	10
1.8 Histoire et caractéristiques du 2,3BD	11
1.9 Utilisation du 2,3BD par les microorganismes	13
1.10 Microorganismes producteurs principaux	14
1.11 Explication de la voie métabolique <i>budABC</i>	16
1.12 Processus basé sur l'ingénierie métabolique	19
1.13 Microorganisme modèle pour utilisation de son opéron <i>budABC</i> pour expression hétérologue	21
1.14 Voie <i>budABC</i> provenant du microorganisme <i>Enterobacter cloacae</i>	22
1.15 Connaissances générales d'<i>E. coli</i>	24
1.16 Techniques d'optimisation de l'opéron <i>budABC</i>	26
1.16.1 Optimisation de codon	26
1.16.2 Optimisation du segment du gène codant pour la partie N-terminale de la protéine	29
CHAPITRE 2.....	33
MATÉRIELS ET MÉTHODES	33
2.1 Souches et vecteurs	33

2.2 Enzymes et produits chimiques.....	35
2.3 Élaboration du système d'expression de l'opéron <i>budABC</i>	36
2.4 Insertion de l'opéron <i>budABC</i> dans la souche <i>E. coli</i> MG1655.....	38
2.5 Interruption des gènes <i>pta</i> , <i>adhE</i> , <i>ldhA</i> , <i>pfl</i> et <i>frd</i> dans la souche <i>E. coli</i> MG1655:: <i>budABC</i>	38
2.6 Fermentation de type « batch » en tube conique de 50 ml	39
2.7 Fermentation de type « batch » en biofermenteur	39
2.8 Méthodes d'analyse	40
CHAPITRE 3.....	41
RÉSULTATS ET DISCUSSION	41
3.1 Conception et construction de l'opéron <i>budABC</i> pour une production de diols à haut rendement.	41
3.1.1 Processus basé sur l'ingénierie métabolique	41
3.2 Ingénierie métabolique de <i>E. coli</i> MG1655 pour la production à haut rendement de diols 43	
3.2.1 Délétion combinatoire des gènes <i>pta</i> , <i>adhE</i> , <i>ldhA</i> , <i>pfl</i> et <i>frd</i> dans la souche <i>E. coli</i> MG1655:: <i>budABC</i>	43
3.2.2 Fermentation en tube des mutants de délétion	45
3.2.2.1 Production de mutants simples.....	45
3.2.2.2 Production de mutants doubles et triples.....	47
3.2.3 Production en biofermenteur de 3.6L.....	48
3.2.3.1 Production de diols en biofermenteur en utilisant le glucose comme seule source de carbone.	48
3.2.3.2 Mutants simples, doubles et triples	51
3.2.3.3 Souche JFR12 : rendements améliorés en augmentant le nombre de copies de <i>budABC</i> .	51
3.2.3.4 Production de diols avec JFR12 en utilisant du perméat de lait comme seule source de carbone.	53
CHAPITRE 4.....	58
CONCLUSION	58
ANNEXES	61
Annexe A : Modification génique de l'opéron <i>budABC</i>	61

BIBLIOGRAPHIE..... 73

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.	Production mondiale de biocarburant de 2004 à 2014.....	8
Tableau 2.	Production microbienne de 2,3BD utilisant différents microorganismes.....	15
Tableau 3.	Usage des codons chez <i>E. coli</i>	29
Tableau 4.	Optimisation des codons aux extrémités N-terminale des protéines de la voie du 2,3BD.....	31
Tableau 5.	Vecteurs, milieux et souches bactériennes utilisés dans ce mémoire	34
Tableau 6.	Croissance cellulaire, consommation de glucose, production de métabolites secondaires et de diols de différentes souches modifiées de <i>E. coli</i> MG1655.....	46
Tableau 7.	Productivité maximale de diols lors de fermentation de différentes souches en utilisant différentes sources de carbone.....	53
Tableau 8.	Vitesses maximales d'utilisation du sucre de JFR12 avec différentes sources de carbone.....	54
Tableau 9.	Composition de l'échantillon obtenu de perméat de lait.....	56

LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Étapes importantes du circuit de fabrication du fromage.....	3
Figure 2.	Composition typique du lactosérum doux et acide.....	4
Figure 3.	Composition du lait, du lactosérum et du perméat.....	5
Figure 4.	Schéma d'utilisation et de valorisation du lactosérum.....	7
Figure 5.	Valeur du marché mondial des biocarburants en 2019 et 2024.....	10
Figure 6.	Stéréoisomères du 2,3BD.....	12
Figure 7.	Voies de production des acides mixtes et du 2,3-butanediol.....	17
Figure 8.	Cycle de Krebs.....	18
Figure 9.	Concept de l'ingénierie métabolique.....	19
Figure 10.	Arbre phylogénétique analysant le gène <i>rpoB</i> de différents producteurs naturels de 2,3BD ainsi que d' <i>E. coli</i>	22
Figure 11.	Réaction d'oxydo-réduction du NAD ⁺	24
Figure 12.	Voie métabolique anaérobique centrale d' <i>E. coli</i> montrant la régénération du NAD ⁺	25
Figure 13.	L'usage relatif en codon synonyme (RSCU) est démontré pour 50 gènes aléatoires pour chacune des 9 espèces différentes.....	27
Figure 14.	L'efficacité de la synthèse protéique peut être influencée par la vitesse d'élongation pour un gène surexprimé.....	30
Figure 15.	L'efficacité de la synthèse protéique peut être influencée par la vitesse d'élongation ainsi que par l'efficacité de l'initiation de la traduction pour un gène surexprimé donné.....	32
Figure 16.	Éléments de régulations des différents gènes de l'opéron <i>budABC</i> pour une expression de diols optimale.....	37
Figure 17.	Conception de la plateforme de production de diols étape par étape....	42
Figure 18.	Voies fermentaires impliquées dans l'utilisation du glucose par les souches modifiées.....	44
Figure 19.	Production de diols, métabolites secondaires et consommation de sucre de différentes souches de <i>E. coli</i> MG1655 ayant différentes combinaisons d'interruptions géniques, en fermentation de type « batch »	50

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AC	Acétoïne
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNt	ARN de transfert
ASPC	Agence de santé publique du Canada
ATE	Analyse techno-économique
BCD	Bicistronic design
2,3BD	(2,3)-butanediol
DBO	Demande biochimique en oxygène
g	Gramme
GFP	Green fluorescent protein
HTST	High Temperature Short Time
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
J	Joule
kg	Kilogramme
l	Litre
MSP	Minimal selling price
ml	Millilitre
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
PCR	Polymerase chain reaction
RFP	Red fluorescent protein
RSCU	Relative Synonymous Codon Usage
RPM	Rotation par minute
VHP	Very high polarity
VVM	Volume d'air par volume de liquide par minute

CHAPITRE I

INTRODUCTION

Plusieurs facteurs, tels l'augmentation croissante de la population mondiale, ont mené à un développement rapide de diverses industries, par exemple dans le secteur alimentaire, afin de combler la demande grandissante. Qui dit augmentation de production alimentaire dit augmentation de production de déchets. Ces déchets doivent être éliminés le mieux possible, mais qu'arrive-t-il lorsqu'il y en a tellement que ce n'est plus possible d'en disposer efficacement ? C'est le cas du lactosérum et du perméat de lait, des déchets de l'industrie laitière (Food and Agriculture Organization of the United Nations).

Afin de trouver des solutions à cette problématique, il est important d'explorer différentes approches de revalorisation, telles que l'utilisation du déchet à des fins de production alimentaire animale ou humaine, pour la conception de produits pharmaceutiques ou industriels, etc.

1.1 Procédé de fabrication du fromage

La fabrication du fromage est une industrie d'ordre mondial. Chaque producteur adopte certaines variations mais le procédé de base demeure toujours semblable (Figure 1). Tout commence avec la cueillette du lait cru chez les différents producteurs par des camions-citernes. Ce lait sera par la suite livré à l'usine où il sera entreposé dans des silos aseptisés jusqu'à son utilisation, généralement entre un et deux jours plus tard. Lorsque l'usine est prête, le lait est tout d'abord pasteurisé. On parle ici d'un traitement dit HTST (*High Temperature Short Time*) qui consiste à chauffer le lait à environ 72°C pendant 15 secondes sans entrer en ébullition, suivi d'un refroidissement brusque (Passion culinaire, 2019). Le but de ce traitement est de tuer les microorganismes présents dans le lait. Le lait est ensuite transféré dans un bassin où une culture bactérienne, le ferment, est ajoutée. Cette étape dure environ entre 40 et 50 minutes (Passion culinaire, 2019). Afin d'augmenter la vitesse de la coagulation du lait, on ajoutera de la présure et la laissera agir durant 30 à 35 minutes. Une fois le traitement terminé créant ainsi le caillé, celui-ci sera coupé en cubes d'environ 7.5mm par de gros couteaux. L'étape de la cuisson dans un bassin à 38°C durant 30 minutes arrive ensuite. C'est une cuisson à vapeur selon le même principe que le bain-marie. L'étape suivante est celle qui nous intéresse, à savoir l'égouttage du caillé. C'est là que la moitié du lactosérum sera séparée du bassin de cailles. Le reste du lactosérum sera brassé avec les cailles durant environ 60 minutes afin d'augmenter leur acidification et finalement le soutirage du reste du lactosérum est fait. Les étapes suivantes dépendent du type de fromage qui est souhaité (Passion culinaire, 2019).

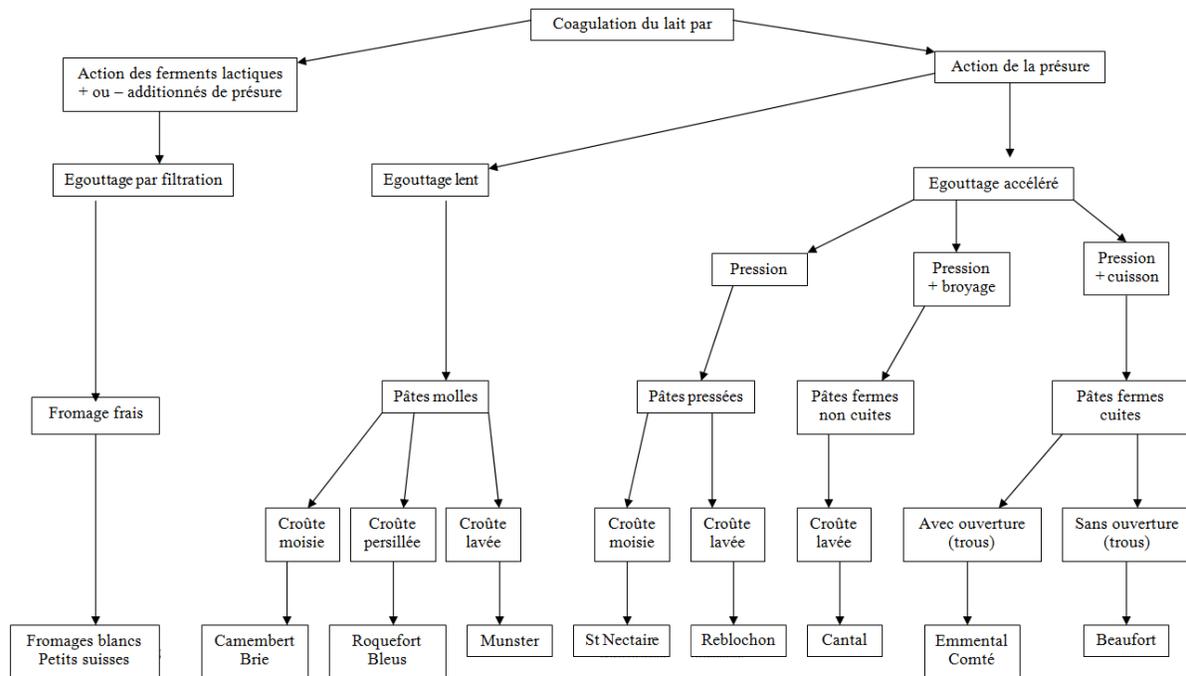


Figure 1. Étapes importantes du circuit de fabrication du fromage

Tiré de Passion culinaire, 2019

1.2 Lactosérum

Le lactosérum, communément appelé petit-lait, est un liquide obtenu lors de la coagulation du lait dans le processus de fabrication du fromage. La quantité obtenue dépend de la méthode de fabrication ainsi que de l'endroit d'où il provient, mais en général, 85-90% du lait utilisé pour la fabrication du fromage deviendra du lactosérum (Guimarães *et al.*, 2010). Il est intéressant aussi de savoir qu'il existe deux types de lactosérum ayant des acidités différentes (Figure 2). Le lactosérum doux (pH 6-7) provient de fromages à pâte pressée cuite ou non cuite (emmental, saint-paulin, etc.) ayant moins de 1.8g d'acide lactique par litre. Le lactosérum

acide ($\text{pH} \leq 5$) résulte de la production des autres types de fromages obtenus par coagulation mixte ou lactique (pâtes molles et pâtes fraîches), ayant plus de 1.8g d'acide lactique par litre (Passion culinaire, 2019) En général, le lactosérum se compose principalement d'eau, de lactose et de protéines diverses.

Composition d'un lactosérum doux et d'un lactosérum acide d'après Sottiez 1990			
		Lactosérum doux (Emmental)	Lactosérum acide (Caséine)
Liquide (%)		93,5	94
Extrait sec (%)		6,5	6,00
pH		6,70	4,60
		Composition en g/l	
Lactose		76,00	74,00
Protéines		13,50	12,00
Cendres		8,00	12,00
Acide lactique		1,80	1,80
Matière grasse		1,00	0,50
		Matière minérale	
Ca (%)		0,60	1,80
P (%)		0,60	1,50
NaCl		2,50	7,50

Figure 2. Composition typique du lactosérum doux et acide

Adapté de www.gastronomiac.com

1.3 Perméat de lait

Si le lactosérum excédentaire est un problème, le perméat excédentaire en est un autre. En effet, le perméat est le produit de l'ultrafiltration du lactosérum. Celui-ci est donc, beaucoup moins concentré en matière solide, mais beaucoup plus concentré en lactose (Smith 2012) (Figure 3).

Composition du lait, du lactosérum et du perméat

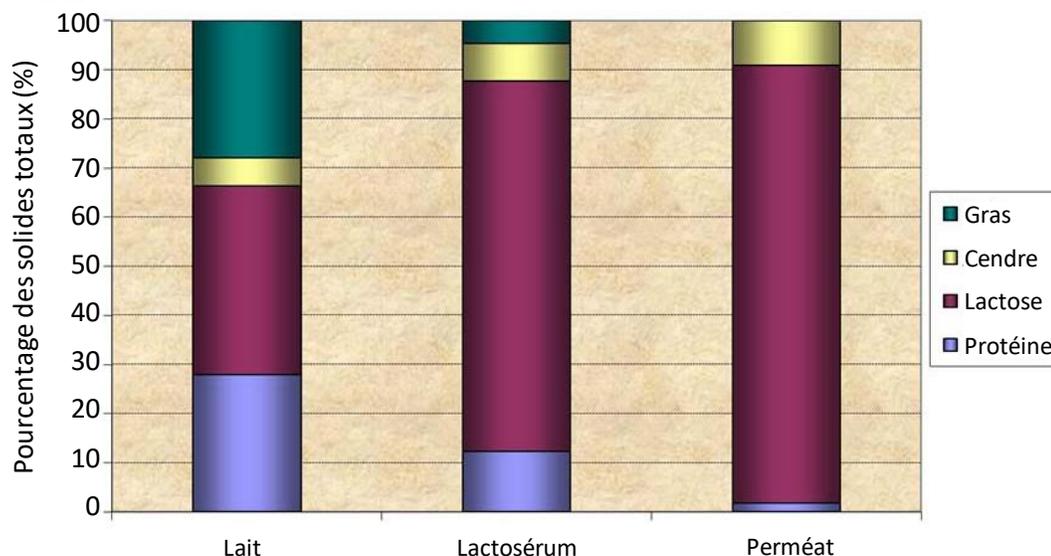


Figure 3. Composition du lait, du lactosérum et du perméat.

La partie des cendres représente les minéraux (phosphate de calcium) (adapté de www.oregondairy.org)

1.4 Problématique de l'accumulation des déchets industriels que sont le lactosérum et le perméat de lait

Le lactosérum représente un problème à cause de son grand volume de production. Comme mentionné plus haut, pour chaque kg de fromage produit, 9L de lactosérum est produit sous forme de déchet. Mondialement, cela représente une production de 160 millions de tonnes par année avec une augmentation de 1-2% annuellement (Food and Agriculture Organization of the United Nations). L'option généralement utilisée par les fabricants de fromage afin de se débarrasser de ce déchet était de le déverser dans les rivières, les lacs ou les océans, affectant

ainsi la flore et la faune. En effet, la fermentation des matières organiques contenues dans le lactosérum dans les cours d'eau fait diminuer la teneur en oxygène dissous au-dessous d'un seuil acceptable. La DBO (demande biochimique en oxygène) du lactosérum est d'environ 40 000 (Food and Agriculture Organization of the United Nations), c'est-à-dire qu'afin que les microorganismes présents dans le cours d'eau oxydent toutes les matières organiques contenues dans 1 litre de lactosérum, 40 g d'oxygène sont nécessaires. En raison des lois environnementales plus strictes et des coûts liés à l'élimination de ces déchets par des méthodes plus appropriées, les entreprises tentent maintenant de revaloriser ce déchet en le transformant en des produits économiquement intéressants (Figure 4). Parmi ces produits, il y a entre autres les poudres de lactosérum, servant à nourrir certains animaux d'élevage. On les retrouve aussi dans des charcuteries, boulangeries, etc. La qualité nutritive du lactosérum dépend de la présence du lactose, des protéines sériques et de sa richesse en acides aminés essentiels. Les protéines contenues dans le lactosérum sont utilisées à cause de leurs caractéristiques diverses comme leur rétention d'eau, leur solubilité à toute échelle de pH et pour leur pouvoir moussant (confiserie) (Food and Agriculture Organization of the United Nations).

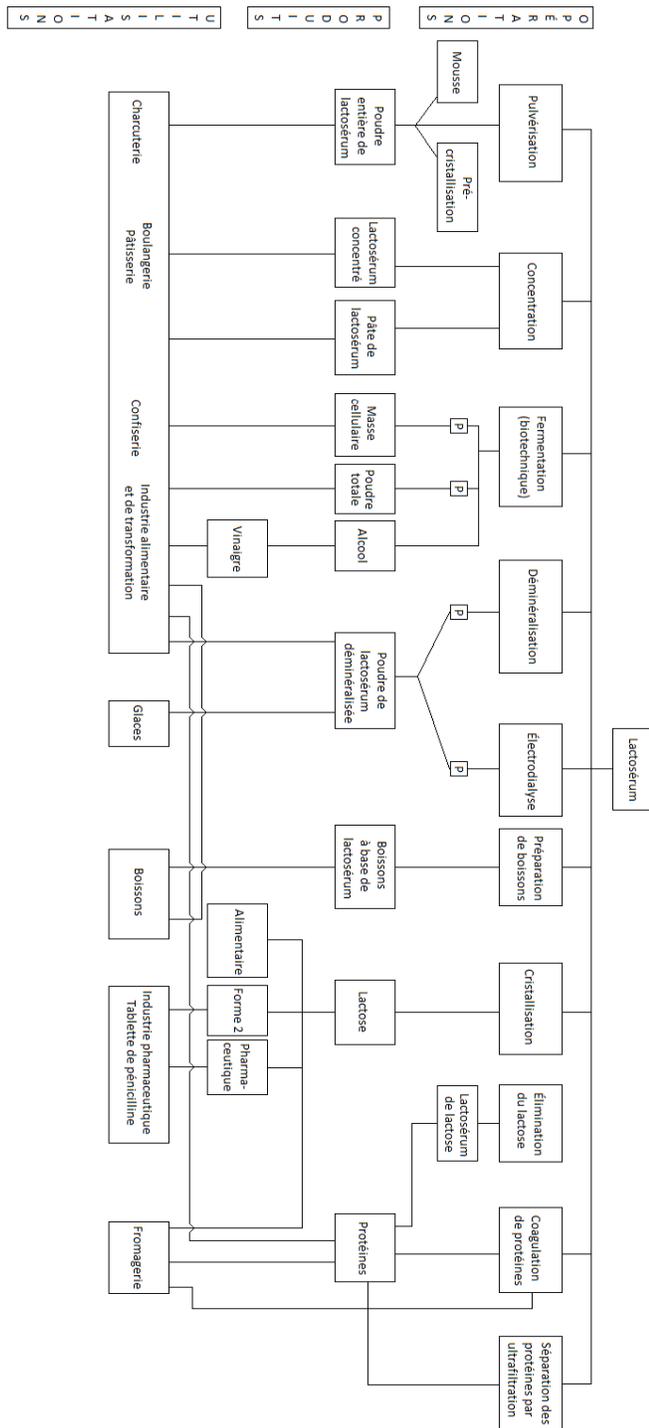


Figure 4. Schéma d'utilisation et de valorisation du lactosérum

Adapté de fao.org

1.5 Utilisation d'énergie renouvelable

Plusieurs compagnies privées développent des procédés liés à la production d'énergies renouvelables, habituellement sous forme de biocarburants, qui pourraient rivaliser avec les prix du pétrole ou du gaz naturel (Celińska and Grajek, 2009). Ces procédés, principalement implantés aux États-Unis et au Brésil dans le cas des biocarburants (Tableau 1) (BP Global, 2020), ont pour but de permettre le développement d'une énergie plus propre et renouvelable et de ce fait, abaisser les besoins en énergies fossiles dont les réserves s'amenuisent de jour en jour. On note donc la mise en place de système utilisant des déchets comme source de carbone.

Tableau 1. Production mondiale de biocarburant de 2004 à 2014.

Biofuels production												2014	Change 2014 over 2013	2014 share of total
Thousand tonnes oil equivalent	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013				
US	6374	7478	9746	13456	19149	21697	25568	28518	27270	28462	30056	5.6%	42.5%	
Canada	114	133	160	461	501	721	741	851	1001	1037	1143	10.2%	1.6%	
Mexico	-	-	-	4	4	4	13	12	14	53	53	-	0.1%	
Total North America	6488	7612	9906	13922	19654	22422	26322	29381	28284	29552	31252	5.8%	44.1%	
Argentina	9	9	29	272	632	1048	1790	2397	2468	1970	2577	30.9%	3.6%	
Brazil	7154	7835	8729	11323	14132	13962	15575	13197	13547	15782	16656	5.5%	23.5%	
Colombia	-	14	131	141	143	295	439	565	612	632	655	3.6%	0.9%	
Other S. & Cent. America	148	235	515	610	787	606	314	457	407	406	406	-	0.6%	
Total S. & Cent. America	7311	8093	9405	12347	15693	15911	18118	16616	17035	18790	20294	8.0%	28.7%	
Austria	48	70	105	220	263	354	375	370	370	354	310	-12.7%	0.4%	
Belgium	-	1	21	140	278	473	582	641	539	524	550	4.9%	0.8%	
Finland	1	6	11	51	96	267	363	206	174	47	47	-	0.1%	
France	387	439	665	1121	2012	2312	2269	1859	2071	2220	2269	2.2%	3.2%	
Germany	890	1525	2488	3181	2727	2728	2888	2825	2888	2632	2684	2.0%	3.8%	
Italy	272	340	585	443	617	758	670	479	292	432	432	-	0.6%	
Netherlands	6	3	22	80	77	241	384	651	1250	1445	1445	-	2.0%	
Poland	6	109	144	96	279	393	421	398	631	674	696	3.3%	1.0%	
Portugal	-	1	70	153	145	202	275	293	338	208	246	18.2%	0.3%	
Spain	210	282	251	352	359	958	1267	809	586	709	938	32.2%	1.3%	
Sweden	43	48	81	139	171	238	274	315	305	305	305	-	0.4%	
United Kingdom	9	39	219	359	276	220	304	251	287	482	482	-	0.7%	
Other Europe & Eurasia	163	296	393	489	931	1170	1249	1314	1223	1241	1280	3.1%	1.8%	
Total Europe & Eurasia	2035	3160	5056	6824	8231	10315	11322	10412	10953	11274	11683	3.6%	16.5%	
Total Middle East	-	-	-	-	-	-	4	4	4	4	4	-	*	
Total Africa	6	6	6	6	11	17	32	25	21	21	21	-	*	
Australia	4	20	54	70	111	165	198	203	176	183	152	-16.8%	0.2%	
China	493	622	846	901	1096	1124	1479	1673	1931	2016	2083	3.3%	2.9%	
India	99	114	134	136	155	70	113	192	208	248	320	29.1%	0.5%	
Indonesia	-	9	44	216	528	464	718	1104	1388	1740	2444	40.4%	3.5%	
South Korea	4	9	39	74	141	343	491	308	272	308	302	-1.8%	0.4%	
Thailand	3	52	80	138	495	618	661	721	994	1251	1402	12.0%	2.0%	
Other Asia Pacific	-	10	106	207	387	435	294	249	392	541	834	54.3%	1.2%	
Total Asia Pacific	604	834	1304	1743	2913	3221	3953	4450	5361	6286	7538	19.9%	10.6%	
Total World	16445	19704	25676	34841	46502	51886	59752	60888	61658	65928	70792	7.4%	100.0%	
of which: OECD	8521	10782	15019	20779	27907	32926	38034	39952	39376	40967	43034	5.0%	60.8%	
Non-OECD	7924	8922	10657	14063	18595	18960	21718	20936	22282	24961	27758	11.2%	39.2%	
European Union	2028	3136	5007	6753	8089	10134	11141	10196	10841	11197	11606	3.6%	16.4%	
Former Soviet Union	11	22	28	50	130	212	181	158	183	194	199	2.6%	0.3%	

*Less than 0.05%.

Note: Consumption of fuel ethanol and biodiesel is included in oil consumption tables.

Source: Includes data from F.O. Lichts; US Energy Information Administration.

Les États-Unis et le Brésil ont été les principaux producteurs de biocarburants (BP Global, 2020)

1.6 Utilisation de microorganismes

Depuis quelque temps, l'utilisation de microorganismes est davantage répandue pour la valorisation de certains déchets. Dans certains cas, l'utilisation de cette méthode sera plus profitable d'un point de vue économique et environnemental. Il suffit d'avoir une source de carbone disponible, un milieu de culture adéquat ainsi qu'une souche ayant la voie de production de la molécule désirée. Plusieurs applications existent à ce jour et celles-ci utilisent des espèces aussi bien eucaryotes (levure, microalgues, autres) que procaryotes (bactéries). On peut penser aux travaux du docteur Christopher Brigham, chercheur au *Wentworth Institute of Technology* qui travaille sur une bactérie qui, via l'ingénierie métabolique, pourra utiliser le CO₂ comme source de carbone afin de produire de l'isobutanol (MIT News, 2018). Ou encore un projet du département de bio-ingénierie de la *Rice University* voulant utiliser une souche génétiquement modifiée de la bactérie *E. coli* afin de produire des acides gras à partir de cellulose, une composante importante des végétaux souvent considérée comme étant un déchet (Rice University, 2013). Un groupe de chimistes de l'université Harvard a créé un microorganisme qui utilise le CO₂ et l'hydrogène, mais cette fois afin de produire différents types de carburants à alcool (PHYS, 2016). Beaucoup d'autres recherches ont été faites ou s'effectuent présentement afin de développer ou améliorer les procédés pour la création d'énergies renouvelables. Selon les estimés de la compagnie Statista (Statista, 2021), la production mondiale de biocarburant pourrait atteindre 154 milliards de dollars américains pour l'année 2024 par rapport à 136 milliards de dollars américains pour l'année 2019 (Figure 5).

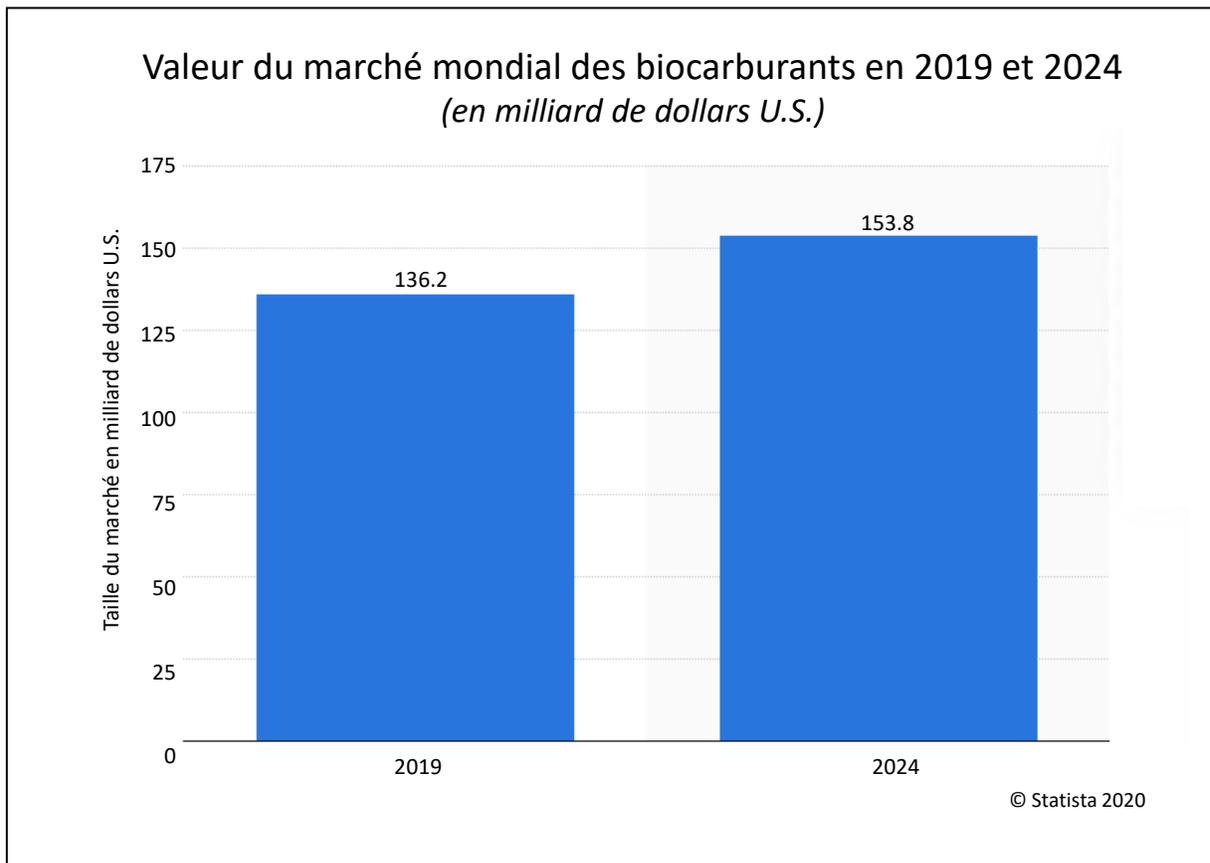


Figure 5. Valeur du marché mondial des biocarburants en 2019 et 2024

Adapté de Statista, 2021

1.7 Avantages liés à l'utilisation de microorganismes

L'utilisation de microorganismes comporte plusieurs avantages par rapport aux autres sources d'énergies renouvelables. En effet, les microorganismes sont habituellement faciles à cultiver en grandes quantités et sont déjà équipés de toute la machinerie nécessaire à leur croissance, à la réplication de l'ADN et à la synthèse protéique. Ils sont incroyablement polyvalents et ont la capacité de pouvoir accepter dans leur génome de l'ADN exogène et de l'exprimer. Cet aspect mène donc souvent les chercheurs à étudier les meilleures approches et les meilleures

stratégies afin de produire certaines molécules. C'est là qu'intervient le concept d'ingénierie métabolique, visant à construire la meilleure souche possible pour la production de molécules données, à partir de gènes codant pour diverses enzymes. De nombreux outils moléculaires utilisés en laboratoire et outils bio-informatiques sont alors exploités afin de diriger les flux de carbone vers la production de la ou des molécules souhaitées. Bien qu'ayant un fort potentiel, l'ingénierie métabolique est une discipline relativement complexe qui demande beaucoup d'optimisation et des équipements dispendieux comme des biofermenteurs. De plus, un aspect à ne pas négliger est de savoir quoi faire de toute la biomasse qui est créée à la suite des fermentations ; cette biomasse doit être éliminée ou réutilisée de manière adéquate. Différentes applications ont été explorées au fil des années. Par exemple, la bactérie *Xanthomonas campestris* a été utilisée pour produire de la gomme de xanthane à partir de résidus de production laitières (Fu et Tseng, 1990). Cependant, une vaste gamme de produits pourrait être obtenue par ce type de procédés, surtout si des approches de génie métabolique et de biologie synthétique sont appliquées.

1.8 Histoire et caractéristiques du 2,3BD

Comme il a été démontré (Celińska et Grajek, 2009), l'histoire de la production du (2,3BD remonte aussi loin qu'en 1906 avec l'utilisation du microorganisme *Klebsiella pneumoniae*. Par la suite, *Bacillus polymyxa*, une bactérie maintenant connue sous le nom de *Paenibacillus polymyxa*, a été utilisée en 1926. Plus tard, la fermentation industrielle à grande échelle a débuté en grande partie à cause de la 2^e guerre mondiale, avec les microorganismes *Klebsiella oxytoca* et *B. polymyxa*. Le but de cette production visait en grande partie la conversion du (2,3BD en (1,3)-butadiène, qui joue un rôle important dans la production de caoutchoucs synthétiques. Par la suite, les recherches ainsi que la production avaient diminué, étant même abandonnées avec l'arrivée de produits pétroliers plus abordables.

Le 2,3BD, diméthylène glycol ou encore butane-2,3-diol selon l'IUPAC, est une molécule de grande valeur normalement produite en utilisant des méthodes pétrochimiques. Elle a un poids

moléculaire de $90.121 \text{ (g mol}^{-1}\text{)}$ et sa formule chimique est $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2$. Il existe 3 formes isomériques de cette molécule à savoir deux stéréo-isomères et un énantiomère que l'on nommera D(-), L(+) et meso- respectivement (Figure 6). Chaque isomère peut servir à produire différents composés économiquement intéressants. Il est possible, par exemple, de produire du caoutchouc synthétique via la transformation du 2,3BD en 1,3-butadiène. Une autre option serait la fabrication d'agent antigel, possible grâce à son bas point de congélation de -60°C . Un traitement de déshydratation du (2,3BD donnera du méthyl éthyl cétone (MEK; butan-2-one) qui sert à la fabrication de solvant, mais aussi d'additif à carburant vu sa température de combustion plus élevée que l'éthanol; le MEK permet d'augmenter l'indice d'octane d'un carburant lui permettant donc d'atteindre des taux de compression beaucoup plus élevé pour une plus grande efficacité et puissance. Il faut noter aussi son pouvoir calorifique intéressant. Certains tests avaient été faits dans le but d'utiliser une mixture équimolaire de 2,3BD (27198 J g^{-1}) avec de l'éthanol (29055 J g^{-1}) qui combinés donnaient un pouvoir calorifique de $27\,660 \text{ J g}^{-1}$. D'autres produits de cette estérification sont présents dans le domaine pharmaceutique et cosmétique. Le produit de la déshydrogénation du 2,3BD, le diacétyl, peut servir dans le domaine alimentaire, à titre d'agent aromatisant. (Celińska et Grajek, 2009)

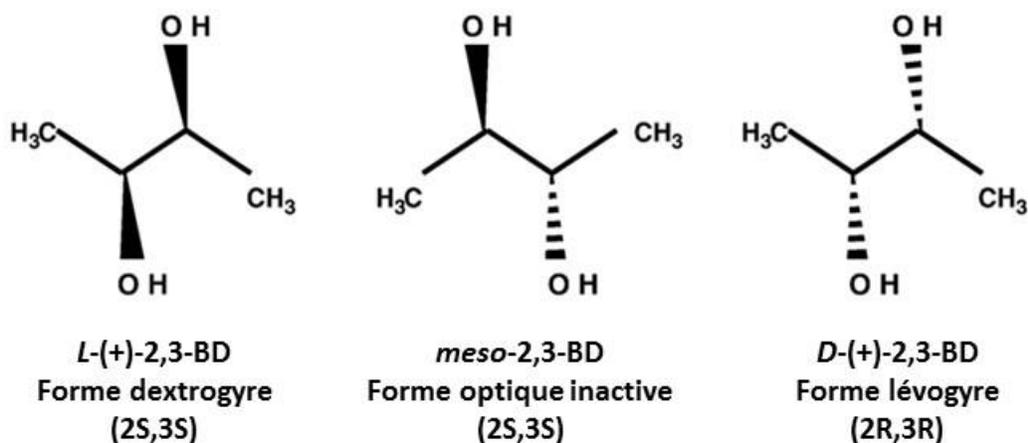


Figure 6. Stéréoisomères du 2,3BD

Adapté de (Celińska et Grajek, 2009)

La demande de 2,3BD est en croissance dans le monde, notamment en raison de l'utilisation de ses différentes formes isomériques, si bien que le marché devrait atteindre près de 300M \$US à la fin de 2030 (Transparency). En effet, le 2,3BD est reconnu pour être non toxique et éco-responsable, pouvant donc être utilisé dans une large gamme d'applications. Par exemple, la raffinerie de pétrole sud-coréenne GS Caltex commercialise du 2,3BD produit par une méthode de fermentation éco-responsable, augmentant ainsi l'intérêt pour cette molécule. De plus cette même compagnie développe une méthode de séparation et de purification afin d'obtenir une pureté optique de 99.5%. D'après les auteurs (Chan *et al.*, 2019), si les résultats sont concluants, une implémentation à plus grande échelle pourrait être envisagée si les projections économiques et commerciales sont bonnes.

Autre fait intéressant, la compagnie Symphony Environmental Technologies Plc., un spécialiste œuvrant dans la conception de plastique comportant différentes caractéristiques telles que des propriétés antimicrobiennes, a récemment diffusé des résultats montrant une réduction de la charge virale de 99.9% en une heure de leur film polyoléfinique (Symphony environmental, 2020). Ce type de technologie ayant des effets antiviraux captera certainement l'intérêt des producteurs de plastiques et pourrait contribuer à une utilisation accrue du 2,3BD

1.9 Utilisation du 2,3BD par les microorganismes

Dans le cas qui nous intéresse, à savoir la production de 2,3BD, plusieurs microorganismes sont des producteurs naturels. Cette production vient de la voie de fermentation butanediolique qui débute à partir de deux molécules de pyruvate d'abord converties en une molécule d' α -acétolactate, ensuite en acétoïne puis réduite en 2,3BD. Bien que sa fonction biologique ne soit pas entièrement élucidée, il est principalement utilisé afin de prévenir une trop grande acidification que ce soit intracellulaire (Mazumdar *et al.*, 2013) ou du milieu (Kim *et al.*, 2014) en changeant son métabolisme d'une phase de production d'acide, l'acidogénèse, vers

un métabolisme producteur de molécules neutres, la solvantogénèse. Un second rôle associé au 2,3BD est la régénération du pouvoir réducteur créé par la glycolyse. Cette régénération se fait par la régulation du ratio NADH/NAD⁺ intracellulaire. Finalement, autre rôle important du 2,3BD est qu'il peut être utilisé comme source de carbone. Lorsqu'il n'y a plus assez de sucres facilement assimilables dans son environnement, la cellule peut alors exploiter le 2,3BD retrouvé dans le milieu comme source de carbone et d'énergie. (Mazumdar *et al.*, 2013)

1.10 Microorganismes producteurs principaux

Plusieurs microorganismes sont naturellement dotés de la voie de fermentation butanediolique alors que d'autres ont seulement certaines enzymes de la voie et seront uniquement capables de produire certains intermédiaires. Les espèces productrices répertoriées (Celińska and Grajek, 2009) ou contenant une partie de la voie du 2,3BD sont : *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus subtilis*, *Brevibacillus brevis* S1, *Corynebacterium glutamicum*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* (aussi connu comme *Aerobacter aerogenes*), *Klebsiella oxytoca*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis*, *Leuconostoc lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Oenococcus oeni*, *Pediococcus pentosaceus*, *Raoultella terrigena*, *Serratia marcescens*, *Bacillus polymyxa*, *Klebsiella terrigena*, *Streptococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Aerobacter indologenes*, *Pseudomonas chlororaphis* O6 et *Chlamydomonas perigranulata*.

Parmi les producteurs naturels, certains se démarquent par leur qualité à produire de grandes quantités de 2,3BD. Les espèces *K. pneumoniae*, *B. polymyxa* et *E. aerogenes* sont le sujet de beaucoup de recherches, car elles ont une très grande efficacité de production (Ji *et al.*, 2011) (Tableau 2). Par contre, il est important de noter que la plupart de ces espèces bactériennes peuvent causer des infections et maladies et nécessitent par conséquent des installations de confinement biologique de niveau 2. On parle ici de microorganismes tels que *Klebsiella sp.* et

Enterobacter aerogenes. Bien que ceux-ci soient des producteurs ayant un fort potentiel, l'idée de les utiliser industriellement impose des contraintes importantes pour mitiger les risques de biosécurité.

Tableau 2. Production microbienne de 2,3BD utilisant différents microorganismes

Souche	Stéréoisomères de (2,3)-Butanediol	Production microbienne de (2,3)-Butanediol					
		Substrats	Méthodes	Concentration de diol (g/L)		Productivité de diol [g/(L.H)]	Rendement de diol (g/g)
				(2,3)-Butanediol	Acétoïne		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	meso-, L-(+)-	Glucose	Fed-batch	150.0	10.0	4.21	0.43
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	meso-, L-(+)-	Glucose	Fed-batch	92.4	13.1	2.10	0.49
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	meso-, L-(+)-	Mélasses de maïs	Fed-batch	78.9	3.6	1.35	0.41
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	meso-, L-(+)-	Glycérol	Fed-batch	49.2	-	0.18	0.36
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	meso-, L-(+)-	Glycérol	Fed-batch	70.0	-	0.47	0.39
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	meso-, L-(+)-	Tubercule d' <i>artichauts de Jérusalem</i>	Fed-batch; SSF	84.0	7.6	2.29	0.32
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	meso-, L-(+)-	Tubercule et tige d' <i>artichauts de Jérusalem</i>	Fed-batch; SSF	67.4	13.1	1.18	1.81
<i>Klebsiella oxytoca</i>	meso-(9), L-(+)-(1)	Hydrolysats de maïs	Fed-batch	35.7	-	0.59	0.50
<i>Klebsiella oxytoca</i>	meso-(9), L-(+)-(1)	Glucose	Fed-batch	130.0	1.4	1.64	0.48
<i>Klebsiella oxytoca</i>	meso-(9), L-(+)-(1)	Glucose	Batch	95.5	1.9	1.74	0.49
<i>Klebsiella oxytoca</i>	meso-(9), L-(+)-(1)	Mélasses	Recyclage cellulaire	118.0	2.3	2.40	0.42
<i>Klebsiella oxytoca</i>	meso-(9), L-(+)-(1)	Cellulose de maïs	Fed-batch	25.0	-	0.36	0.31
<i>Klebsiella oxytoca</i>	meso-(9), L-(+)-(1)	Glucose	Fed-batch	85.5	6.4	3.22	0.50
<i>Enterobacter aerogenes</i>	meso-(9), L-(+)-(1)	Glucose	Fed-batch	110.0	-	5.4	0.49
<i>Serratia marscescens</i>	meso-	Sucrose	Fed-batch	152.0	0.0	2.67	0.41
<i>Serratia marscescens</i>	meso-	Sucrose	Fed-batch	139.9	6.7	3.49	0.47
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	D-(-)-	Tubercule d' <i>artichauts de Jérusalem</i>	Batch	36.9	-	0.88	0.50
<i>Bacillus subtilis</i>	D-(-)-(3), meso-(2)	Glucose	Batch	2.5	0.6	0.33	0.38
<i>Bacillus licheniformis</i>	D-(-)-, meso-	Glucose	Fermentation sans agitation	8.7	-	0.47	0.12
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	D-(-)-, meso-	Glucose	Batch	33.0	-	-	0.33

(Adapté de Ji et *al.*, 2011)

1.11 Explication de la voie métabolique *budABC*

La voie de production du 2,3BD débute normalement par la conversion de monosaccharides en pyruvate par le microorganisme producteur via une combinaison des voies de la glycolyse et des pentoses phosphates. La voie de production du 2,3BD, consistant en trois différentes enzymes, est similaire parmi les différents microorganismes producteurs. Cette voie utilise 2

molécules de pyruvate, obtenues via la voie de la glycolyse, afin de les convertir en α -acétolactate, en acétoïne et finalement en 2,3BD. En premier lieu, il y aura complexation d'une molécule de pyruvate avec une thiamine pyrophosphate (TPP) qui formera de l'acétyl-TPP. Par la suite, une autre molécule de pyruvate sera complexée avec cet acétyl-TPP ce qui résultera en la formation d'une molécule d' α -acétolactate. L'enzyme catalysant la formation de cette molécule d' α -acétolactate est l' α -acétolactate synthétase (ALS, EC 4.1.3.18). Il est à noter que cette enzyme a une sélectivité maximale lorsque le milieu est légèrement acide (pH 6) ce qui lui donne une activité anabolique, en comparaison avec sa capacité d'avoir une activité catabolique quand le pH du milieu est légèrement basique (pH 8). Par la suite, la conversion de l' α -acétolactate en acétoïne se fera via l' α -acétolactate décarboxylase (ALDC, EC 4.1.1.5) et finalement, la conversion de l'acétoïne par la butanediol déshydrogénase (BDH, EC 1.1.1.76) aussi appelée acétoïne réductase (AR, EC 1.1.1.4) donnera une molécule de 2,3BD (Figure 7) (Ji *et al.*, 2011).

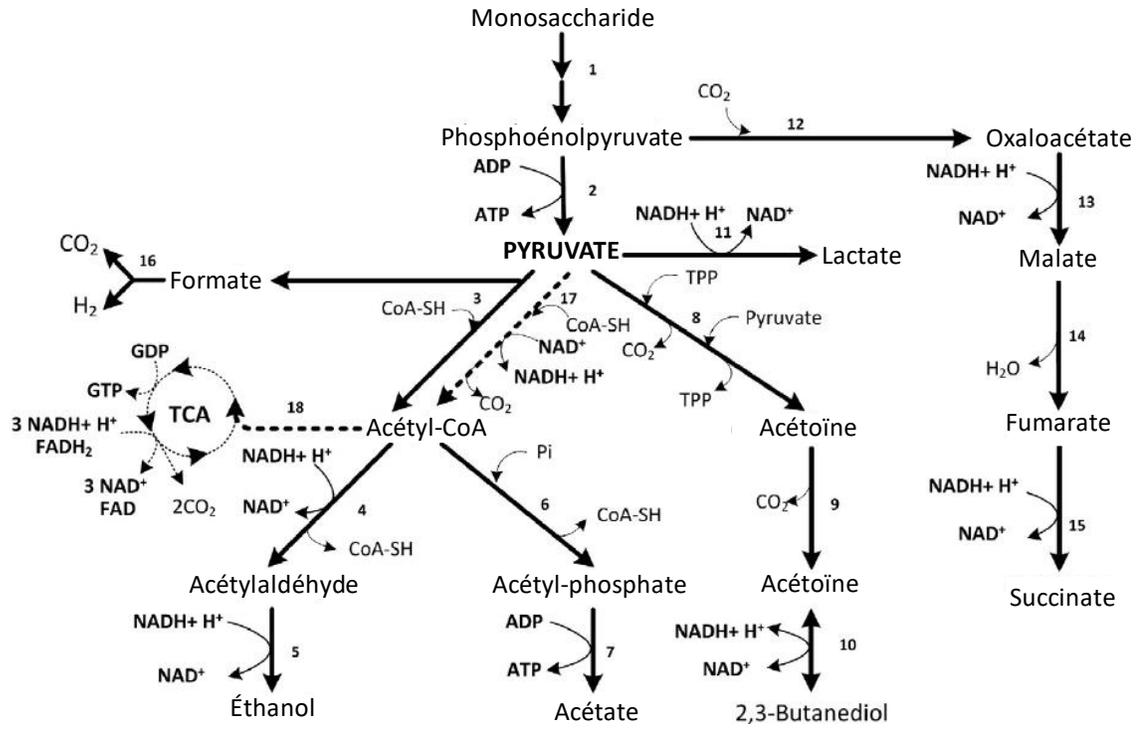


Figure 7. Voies de production des acides mixtes et du 2,3-butanediol.

Les lignes pointillées représentent les voies qui ne sont actives qu'en conditions anaérobies. TCA, cycle des acides tricarboxyliques; 1, la voie Embden-Meyerhof et des pentoses phosphates; 2, la pyruvate kinase; 3, la pyruvate-formate lyase; 4, l'acétaldéhyde déshydrogénase; 5, l'éthanol déshydrogénase; 6, la phospho-transacétylase; 7, l'acétate kinase; 8, α -acétolactate synthétase; 9, α -acétolactate décarboxylase; 10, l'acétoïne-réductase (2,3-butanediol déshydrogénase); 11, la lactate déshydrogénase; 12, la phosphoénolpyruvate décarboxylase; 13, la malate déshydrogénase; 14, la fumarase; 15, la succinate déshydrogénase; 16, le complexe formate-hydrogène lyase; 17, le complexe pyruvate déshydrogénase; et 18, la citrate synthétase. (Adapté de Ji *et al.*, 2011)

Afin de permettre cette réaction, il faut s'assurer de ne pas être en condition aérobie. En effet, dans cette condition, l'enzyme α -acétolactate synthétase est irréversiblement inactivée et donc, par le fait même, la production de diols n'est plus possible. De plus, il est important de noter

que, lorsqu'il y a de l'oxygène dans le milieu, l'enzyme pyruvate déshydrogénase (EC 1.2.4.1) convertira le pyruvate en acétyl-CoA via le processus de décarboxylation du pyruvate. Par la suite, cet acétyl-CoA servira principalement à la respiration cellulaire via le cycle de Krebs (Figure 8) (Microbiology info, 2018)

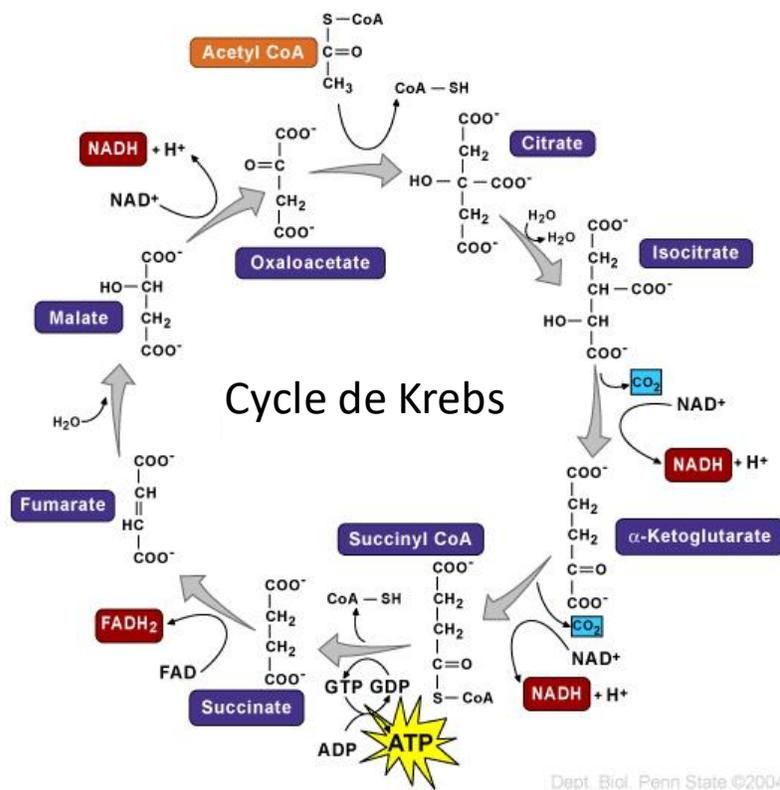


Figure 8. Cycle de Krebs

Adapté de Microbiology info, 2018

1.12 Processus basé sur l'ingénierie métabolique

Comme beaucoup de travaux scientifiques, la création et l'optimisation d'une souche dédiée se font par un processus appelé ingénierie métabolique ou encore biologie de synthèse. Le but

de ce processus est la construction d'organismes pouvant accomplir de façon efficace des tâches répondant à une application désirée. En effet, un cheminement graduel est suivi afin de procéder efficacement au modelage de la souche (Figure 9). Tout débute par la conception, qui est en fait la définition du problème que l'on souhaite traiter. Dans notre cas, il était question de produire des diols via la consommation de déchets de l'industrie laitière. La sélection de la voie métabolique nécessaire et du meilleur hôte s'est donc faite à cette étape. Par la suite, il y a la construction, qui implique plusieurs modifications que ce soit au niveau de l'hôte (mutation, délétion, ajout, etc.) ou au niveau de la voie métabolique (choix des éléments de régulation, site d'insertion, etc.). Lors des tests, des fermentations sont faites dans le but d'effectuer le suivi de différents paramètres tels que la croissance, la production de diols ainsi que des produits secondaires, etc. Finalement, avec les résultats obtenus, l'apprentissage, il était plus facile de changer de direction d'approche, approfondir la direction déjà empruntée ou tout simplement revoir certains aspects de la stratégie. Par la suite, le cycle recommence avec la définition d'un nouveau ou du même problème. En suivant ce processus, il est donc possible de créer une plateforme de production efficace.

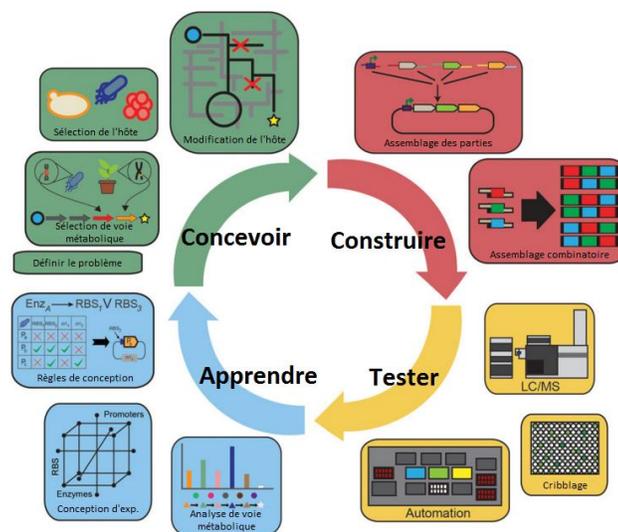


Figure 9. Concept de l'ingénierie métabolique

Adapté de Petzold et *al.* 2015

1.13 Microorganisme modèle pour utilisation de son opéron *budABC* pour expression hétérologue

À ce jour, plusieurs exemples d'utilisation d'un microorganisme à des fins de productions industrielles existent. Parmi ces cas, on y retrouve l'utilisation du microorganisme *E. coli* auquel on a ajouté une voie de production synthétique du prénil et de l'isoprénol afin de produire de nouveaux biocarburants et cela, en utilisant une source de sucre renouvelable(Zheng et al., 2013). Un autre cas de bioproduction a été fait en utilisant encore une fois la bactérie *E. coli* ainsi qu'une voie de production synthétique faite à partir de gènes de *Clostridium acetobutylicum* afin de produire efficacement de l'acétone(May et al., 2013). Les exemples avec la bactérie *E. coli* sont très nombreux; production d'alpha-pinene(Yang et al., 2013), production de 1-butanol(Atsumi et al., 2008), production d'éthanol(Yomano et al., 1998), production d'isobutanol(Baez et al., 2011) et plusieurs autres.

Certaines caractéristiques d'*E. coli* nous amenaient à penser qu'il pouvait être un producteur intéressant de 2,3BD. Premièrement, dans le domaine de la biologie synthétique, il est important de connaître le mieux possible l'organisme utilisé afin de pouvoir prédire le comportement adopté par celui-ci lors de l'expression de certaines voies métaboliques. En effet, si une grande partie du génome n'est pas encore caractérisée, il sera difficile de prévoir les réactions de l'organisme dans certaines situations, ce qui rendra la tâche beaucoup plus difficile lors de la création d'une souche modifiée. *E. coli* K-12 MG1655 est très bien étudiée et son génome a été complètement séquencé en 1997(Blattner et al., 2010) et c'est ce qui a incité plusieurs autres chercheurs de pouvoir utiliser ce microorganisme à des fins de bioproduction. Deuxièmement, du fait que cette souche est bien connue, elle a été beaucoup utilisée dans la recherche en général et donc, une panoplie de techniques de manipulation génétique ont été utilisées et optimisées pour ce microorganisme. Parmi ces techniques, on retrouve la transformation bactérienne(Wang et al., 2014), l'intégration d'ADN dans un chromosome(Cui et al., 2013) et l'inactivation de gène(Datsenko and Wanner, 2000). Troisièmement, la physiologie de la bactérie *E. coli* fait en sorte qu'elle est très facile

d'utilisation. En effet, son temps de doublement d'environ 20 minutes en milieu Luria-Bertani (Sezonov et al., 2007) rend les expérimentations moins longues et donc, beaucoup plus efficaces. De plus, un point très important est la grande reproductibilité de son état physiologique lors de sa croissance dans un milieu donné. Quatrièmement, le choix du microorganisme utilisé afin de produire le 2,3BD, a été fait en considérant le fait qu'industriellement, avec les normes en vigueur, il est impossible d'utiliser un microorganisme pathogène. De ce fait, en nous fiant aux lignes directrices en matière de biosécurité en laboratoire de l'ASPC (Agence de santé publique du Canada (Soma et al., 2014)) nous avons dû écarter les bactéries de type *Klebsiella sp.* ou *Enterobacter sp.* Pour toutes ces raisons, la bactérie *E. coli* représentait un choix intéressant.

1.14 Voie *budABC* provenant du microorganisme *Enterobacter cloacae*

Bien que des contraintes ne permettent pas d'utiliser certains microorganismes, il était par contre possible de s'inspirer de leurs voies métaboliques. En effet, l'expression hétérologue est une approche fréquemment utilisée pour la production efficace d'une molécule d'intérêt. Le défi est de trouver de quels microorganismes proviendront ces gènes. Un arbre phylogénétique a été préparé avec les plus grandes espèces productrices naturelles de 2,3BD ainsi que notre microorganisme producteur *E. coli*, afin d'évaluer les distances phylogéniques entre eux (Figure 10). En effet, il est préférable d'utiliser les gènes provenant d'un microorganisme plus près phylogéniquement de notre hôte, car plus ceux-ci sont apparentés, plus leur fonctionnement cellulaire est semblable. Il y a donc moins de chance que les produits des gènes intégrés dans l'hôte aient des problèmes d'expression ou d'interaction avec d'autres protéines de l'hôte. Habituellement, afin d'observer les divergences génétiques reliées à l'évolution, qui est généralement relativement lente, la comparaison de la séquence du gène de l'ARN ribosomique 16S (ARN 16S) est utilisée. Cependant, la résolution offerte par ce gène est très faible pour des espèces évolutivement rapprochées. Dans ce cas, un autre gène, considéré lui aussi comme un marqueur moléculaire de l'évolution, entre en jeu. Ce gène, *rpoB*, encode la sous-unité β de l'ARN polymérase bactérienne. Ce gène, retrouvé en simple

copie dans le génome est plus variable que l'ARN 16S, ce qui permet d'augmenter la résolution de l'analyse phylogénétique(Case et al., 2007).

L'analyse montre la distance évolutive entre différents microorganismes producteurs de 2,3BD via l'analyse du gène *rpoB*. Les microorganismes de type *Bacillus* sp. sont d'excellents producteurs, mais sont plus éloignés phylogénétiquement d'*E. coli* augmentant donc les risques d'une mauvaise expression génique ou d'une mauvaise interaction avec certaines enzymes.

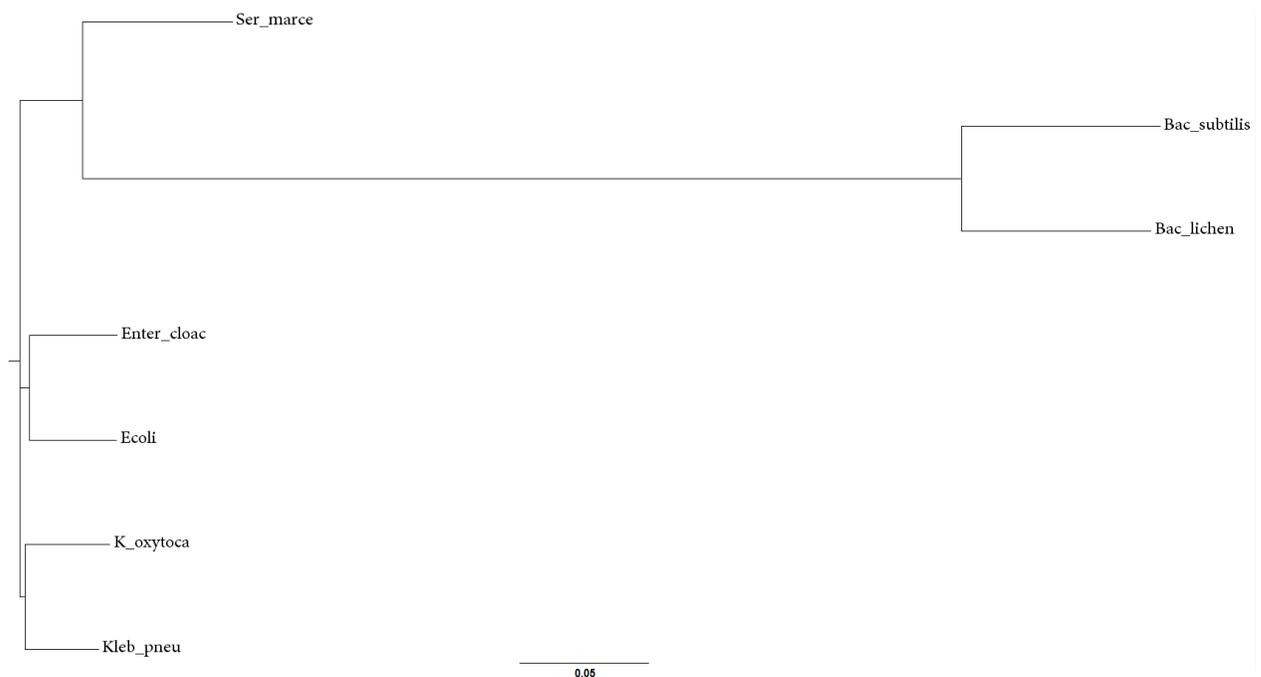


Figure 10. Arbre phylogénétique analysant le gène *rpoB* de différents producteurs naturels de 2,3BD ainsi que d'*E. coli*.

(*Ser_marce*, *Serratia marcescens*; *Bac_subtilis*, *Bacillus subtilis*; *Bac_lichen*, *Bacillus licheniformis*; *Enter_cloac*, *Enterobacter cloacae*; *Ecoli*, *Escherichia coli*; *K_oxytoca*, *Klebsiella oxytoca*; *Kleb_pneu*, *Klebsiella pneumoniae*)

Le microorganisme *Enterobacter cloacae* est assez près phylogénétiquement d'*E. coli*, en plus d'être un excellent producteur naturel (Li et al., 2015). C'est donc pour ces raisons que nous avons opté pour ce microorganisme comme source des gènes de la voie du 2,3BD.

1.15 Connaissances générales d'*E. coli*

E. coli est un microorganisme ayant un bon potentiel pour la production de diols. Lorsque celui-ci entre en condition de fermentation, ses voies de fermentation des acides mixtes sont sollicitées et il y a une production de produits de fermentation tels que le succinate, le lactate, le formate, l'acétate et l'éthanol principalement. Pour la plupart de ces produits, cette production utilisera le pyruvate produit par la glycolyse. Dans certains cas, afin de faire un transfert d'électron lors des réactions de conversion, il y aura une utilisation d'une coenzyme d'oxydoréduction (Figure 11 et 12). Cette coenzyme, le NAD (nicotinamide adénine dinucléotide), existe sous 2 formes d'oxydoréductions ; sa forme oxydée (NAD^+) et sa forme réduite (NADH).

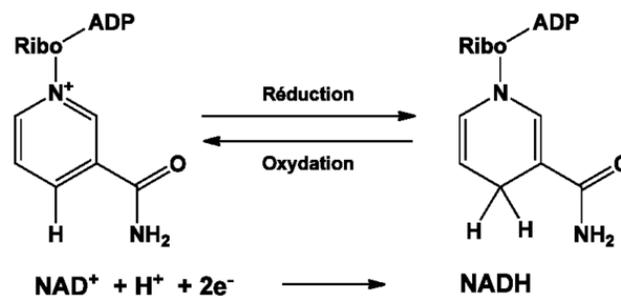


Figure 11. Réaction d'oxydo-réduction du NAD^+

Tiré de Curezone, 2012

La connaissance de cette réaction est très importante, car, afin de produire les produits de fermentation mentionnés plus haut, la cellule doit garder un équilibre de coenzymes NAD^+/NADH . Autrement dit, si la quantité de NADH disponible n'est pas suffisante, les enzymes produisant les produits de fermentation ne pourront plus avoir une activité maximale. C'est souvent cet équilibre qui détermine quelles molécules seront converties en priorité. Dans le cas d'*E. coli*, les molécules produites dépendantes de la présence du coenzyme NADH sont le succinate, le lactate et l'éthanol (Figure 12) (Tuwien).

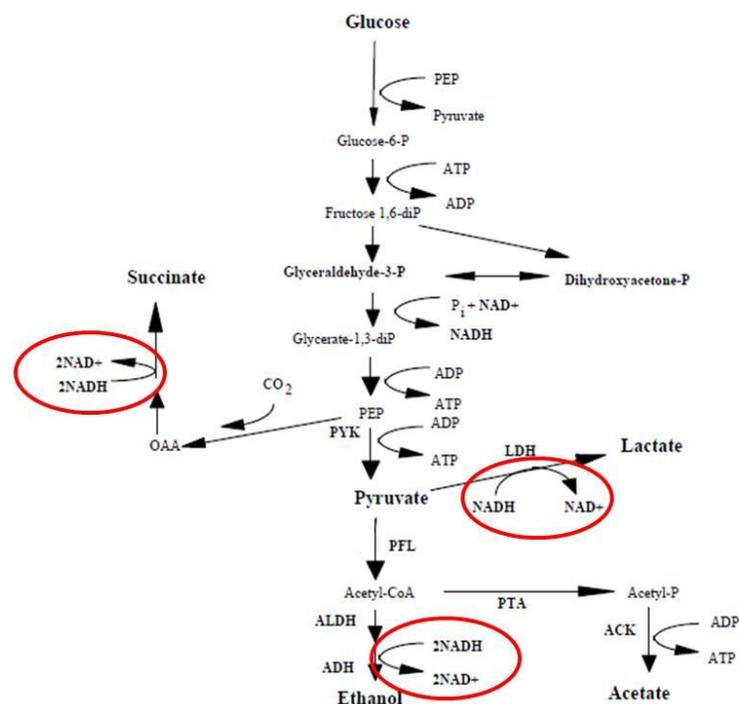


Figure 12. Voie métabolique anaérobie centrale d'*E. coli* montrant la régénération du NAD^+

Tiré de Tuwien

1.16 Techniques d'optimisation de l'opéron *budABC*

1.16.1 Optimisation de codon

Dans plusieurs cas, lorsque l'on veut surexprimer efficacement les protéines impliquées dans une voie métabolique, ces enzymes sont sélectionnées d'un premier organisme avant d'être introduites dans un microorganisme choisi. Pour ce faire, une PCR (*polymerase chain reaction*) des gènes d'intérêts est faite et un clonage dans un plasmide à haut nombre de copies est effectué. Ensuite, ce plasmide est transformé dans le microorganisme producteur ; c'est ce que nous appelons une expression hétérologue. Plusieurs recherches ont été faites afin d'identifier certaines approches qui permettraient d'améliorer l'expression d'une quelconque façon (Celińska and Grajek, 2009; Goodman et al., 2013; Ji et al., 2011; Park et al., 2014). Une composante affectant l'expression des gènes est l'utilisation de certains codons dans la séquence d'un ARN messenger.

Entre les génomes de différentes espèces, l'usage relatif en codons synonymes (RSCU) peut différer drastiquement, même si ces espèces sont phylogénétiquement apparentées (Plotkin and Kudla, 2011). Comme le montre la Figure 13, certaines espèces, par exemple *Thermus thermophilus*, éviteront complètement l'usage de certains codons. Cette préférence dans le choix de codons rencontre deux explications possibles ; la sélection naturelle, influençant donc son *fitness*, ainsi que la dérive génétique, qui est plutôt neutre, car aucun avantage ou désavantage n'est octroyé à l'organisme.

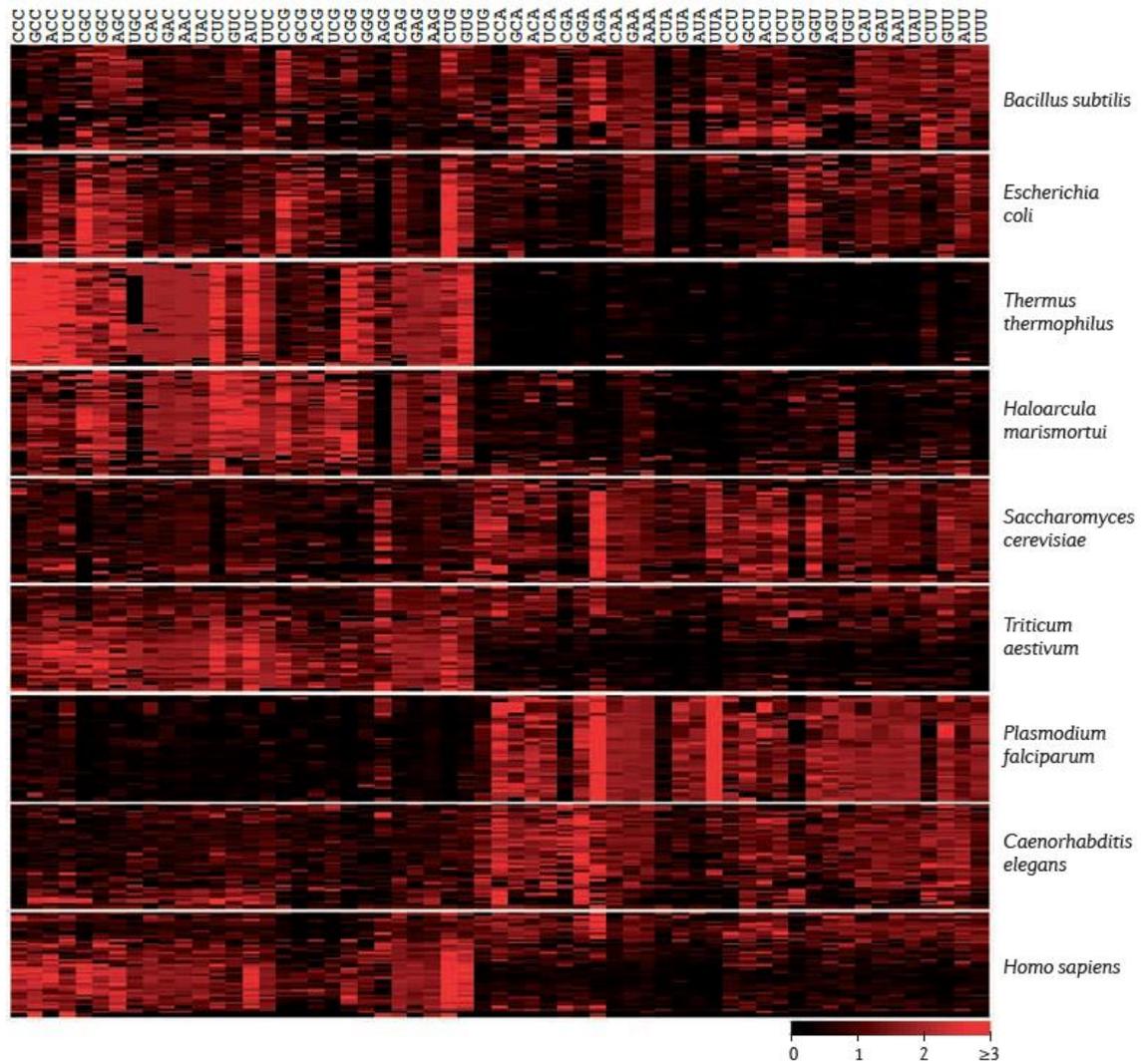


Figure 13. L’usage relatif en codon synonyme (RSCU) est démontré pour 50 gènes aléatoires pour chacune des 9 espèces différentes.

Le RSCU passe de 0 (quand le codon est absent) à 1 (quand il n’y a pas de biais) jusqu’à 6 (quand un seul codon est utilisé dans une famille de 6 codons). Les codons méthionine, tryptophane et les codons stop sont omis. Les gènes sont en rangées et les codons sont en colonnes, avec les codons terminant par C et G à gauche et ceux terminant par A et T à droite

Tiré de Plotkin and Kudla, 2011

Généralement, plus le RSCU d'un codon est élevé, plus le niveau de l'ARNt (ARN de transfert) associé à ce codon devrait être élevé justement dans le but de pouvoir fournir efficacement l'anticodon demandé afin d'avoir une traduction efficace, surtout chez les gènes fortement exprimés. Dans certains cas, l'optimisation de codons a pu augmenter le niveau d'expression de 1000 fois (Plotkin and Kudla, 2011). Cette technique est maintenant reconnue comme étant cruciale dans l'expression génique, que ce soit par rapport au traitement de l'ARN, à la traduction et finalement au repliement protéique (Plotkin and Kudla, 2011).

C'est donc dans cette optique qu'une analyse de la composition en codons des gènes de la voie métabolique du 2,3BD avait été faite. Comme mentionné plus haut, les trois gènes composant l'opéron *budABC* viennent du microorganisme *Enterobacter cloacae* et donc, ont une composition en codons qui n'est pas optimale si on veut faire exprimer ces gènes efficacement chez *E. coli*. En se basant sur la table d'usage relative des codons chez *E. coli* (Tableau 3), les séquences de nucléotides menant à des codons avec un faible RSCU ont été adaptées afin qu'ils aient le plus haut RSCU possible et donc, qu'ils utilisent les ARNt qui sont les plus disponibles.

Tableau 3. Usage des codons chez *E. coli*

Usage en codon des gènes de *E. coli*

	Codon	Acide aminé ²	% ³	Ratio ⁴	Codon	Acide aminé	%	Ratio	Codon	Acide aminé	%	Ratio	Codon	Acide aminé	%	Ratio		
U	UUU	Phe (F)	1.9	0.51	UCU	Ser (S)	1.1	0.19	UAU	Tyr (Y)	1.6	0.53	UGU	Cys (C)	0.4	0.43	U	
	UUC	Phe (F)	1.8	0.49	UCC	Ser (S)	1.0	0.17	UAC	Tyr (Y)	1.4	0.47	UGC	Cys (C)	0.6	0.57		C
	UUA	Leu (L)	1.0	0.11	UCA	Ser (S)	0.7	0.12	UAA	STOP	0.2	0.62	UGA	STOP	0.1	0.30		
	UUG	Leu (L)	1.1	0.11	UCG	Ser (S)	0.8	0.13	UAG	STOP	0.03	0.09	UGG	Trp (W)	1.4	1.00		G
C	CUU	Leu (L)	1.0	0.10	CCU	Pro (P)	0.7	0.16	CAU	His (H)	1.2	0.52	CGU	Arg (R)	2.4	0.42	U	
	CUC	Leu (L)	0.9	0.10	CCC	Pro (P)	0.4	0.10	CAC	His (H)	1.1	0.48	CGC	Arg (R)	2.2	0.37		C
	CUA	Leu (L)	0.3	0.03	CCA	Pro (P)	0.8	0.20	CAA	Gln (Q)	1.3	0.31	CGA	Arg (R)	0.3	0.05		
	CUG	Leu (L)	5.2	0.55	CCG	Pro (P)	2.4	0.55	CAG	Gln (Q)	2.9	0.69	CGG	Arg (R)	0.5	0.08		G
A	AUU	Ile (I)	2.7	0.47	ACU	Thr (T)	1.2	0.21	AAU	Asn (N)	1.6	0.39	AGU	Ser (S)	0.7	0.13	U	
	AUC	Ile (I)	2.7	0.46	ACC	Thr (T)	2.4	0.43	AAC	Asn (N)	2.6	0.61	AGC	Ser (S)	1.5	0.27		C
	AUA	Ile (I)	0.4	0.07	ACA	Thr (T)	0.1	0.30	AAA	Lys (K)	3.8	0.76	AGA	Arg (R)	0.2	0.04		
	AUG	Met (M)	2.6	1.00	ACG	Thr (T)	1.3	0.23	AAG	Lys (K)	1.2	0.24	AGG	Arg (R)	0.2	0.03		G
G	GUU	Val (V)	2.0	0.29	GCU	Ala (A)	1.8	0.19	GAU	Asp (D)	3.3	0.59	GGU	Gly (G)	2.8	0.38	U	
	GUC	Val (V)	1.4	0.20	GCC	Ala (A)	2.3	0.25	GAC	Asp (D)	2.3	0.41	GGC	Gly (G)	3.0	0.40		C
	GUA	Val (V)	1.2	0.17	GCA	Ala (A)	2.1	0.22	GAA	Glu (E)	4.4	0.70	GGA	Gly (G)	0.7	0.09		
	GUG	Val (V)	2.4	0.34	GCG	Ala (A)	3.2	0.34	GAG	Glu (E)	1.9	0.30	GGG	Gly (G)	0.9	0.13		G
	U				C				A				G					

¹ La lettre entre parenthèses représente le code à une lettre de l'acide aminé.

² % représente la fréquence moyenne d'utilisation de ce codon sur 100 codons.

³ Le ratio représente l'abondance du codon relativement à tous les codons pour cet acide aminé.

(Adapté de SDSU, 2002)

1.16.2 Optimisation du segment du gène codant pour la partie N-terminale de la protéine

Un autre aspect important de l'adaptation de gènes exogènes chez un hôte dans le but d'augmenter l'efficacité de son expression est l'optimisation du segment du gène codant pour la partie N-terminale des protéines. En effet, une fois que l'adaptation des codons a été faite, la synthèse protéique, qui a lieu lors de la traduction, devrait être beaucoup plus rapide et plus efficace, mais il est aussi possible d'ajouter un autre type d'adaptation. C'est d'ailleurs ce qu'une étude a révélé (Goodman et al., 2013). Le ralentissement de l'initiation de la traduction lors du remplacement de certains codons par des codons synonymes ayant un RSCU plus

faible, dans l'extrémité N-terminale constituée des premiers 11 codons des gènes, pourrait résulter en une augmentation d'environ 14 fois du niveau protéique des gènes surexprimés.(Goodman et al., 2013)

Rappelons que lorsque l'on parle d'efficacité de la synthèse protéique, il y a deux facteurs à considérer(Plotkin and Kudla, 2011). La vitesse d'élongation, qui peut être optimisée par l'adaptation des codons aux ARNt les plus abondants, ainsi que la vitesse de l'initiation de la traduction. Lorsque l'élongation est l'étape limitante de la synthèse protéique, l'ARNm sera couvert par une plus grande densité de ribosome et une certaine quantité de protéines sera synthétisée. Plus l'élongation est rapide, plus la synthèse protéique sera rapide. D'un autre côté, le fait que la densité de ribosome soit élevée fait en sorte que ceux-ci se trouvent à se bousculer et il arrive parfois qu'ils décrochent complètement de l'ARNm menant donc à une traduction protéique incomplète (Figure 14).

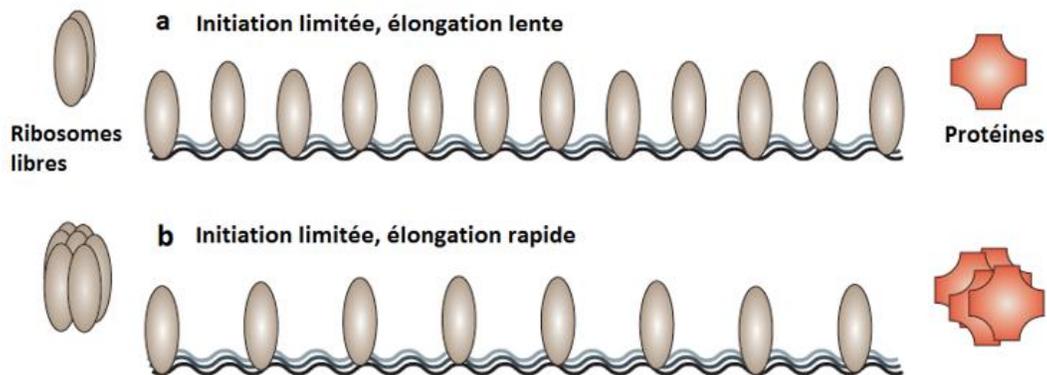


Figure 14. L'efficacité de la synthèse protéique peut être influencée par la vitesse d'élongation pour un gène surexprimé

Adapté de Plotkin and Kudla, 2011

Un profilage de l'occupation des ribosomes (ribosome occupancy profiling)(Plotkin and Kudla, 2011) aurait aussi démontré que certains codons spécifiques peuvent créer un motif semblable à la séquence Shine-Delgarno ce qui pourrait altérer l'efficacité de la traduction. De plus, tous ces ribosomes engagés ne sont pas libres pour une future initiation de la traduction sur un nouvel ARNm. C'est pourquoi il est impératif de ralentir l'initiation de la traduction afin de réduire la densité de ribosomes sur les ARNm et de permettre aux ribosomes déjà engagés de compléter leur traduction efficacement. Pour ce faire, il suffit simplement de changer quelques codons qui se situent aux extrémités N-terminale des protéines (Tableau 4). En effet, cette adaptation, basée sur l'analyse RSCU des différents codons pour l'organisme donné, a pour but de changer certains codons situés aux extrémités N-terminale des protéines avec des codons synonymes possédant un RSCU beaucoup plus bas. Les modifications des séquences nucléotidiques ainsi que la séquence en acides aminés des trois gènes sont montrées dans l'annexe A.

Tableau 4. Optimisation des codons aux extrémités N-terminale des protéines de la voie du 2,3BD.

Voie du (2,3)-Butanediol	Codon rare #1	Abondance relative (%)	Acide aminé associé	Codon rare #2	Abondance relative (%)	Acide aminé associé
α -acétolactate synthétase (<i>budB</i>)	TCA ¹	12	Ser (S)	GCT	19	Ala (A)
acétolactate décarboxylase (<i>budA</i>)	TCA	12	Ser (S)	AAG	24	Lys (K)
acétoïne réductase (<i>budC</i>)	AAG	24	Lys (K)	CTA	3	Leu (L)

¹La séquence nucléotidique du codon TCA pour le gène *budB* n'a pas été optimisé car elle présentait déjà une abondance relative faible.

Deux codons se trouvant dans la partie N-terminale des 3 gènes surexprimés ont été remplacés par des codons synonymes ayant une abondance relative (RSCU) plus faible (codons rares dans le tableau). Les valeurs d'abondance relative des codons sont tirées du Tableau 3.

Pour résumer, lorsque nous augmentons la vitesse d'élongation, via l'adaptation des codons aux ARNt les plus abondants et que nous limitons l'initiation de la traduction, par une

incorporation de codons rares en N-terminal du gène, nous augmentons de beaucoup la production protéique (Figure 15).

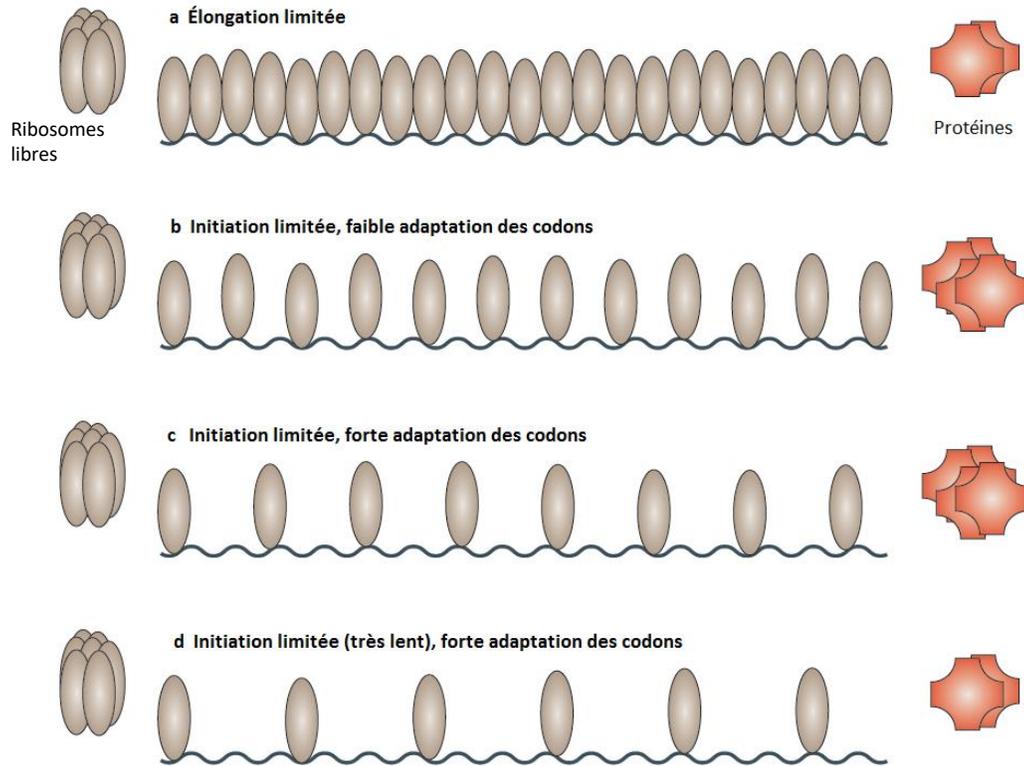


Figure 15. L'efficacité de la synthèse protéique peut être influencée par la vitesse d'élongation ainsi que par l'efficacité de l'initiation de la traduction pour un gène surexprimé donné

Adapté de Plotkin and Kudla, 2011

CHAPITRE 2

MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Souches et vecteurs

Les souches et les plasmides utilisés dans ce mémoire sont listés dans le tableau 5. Les cultures bactériennes ont étéensemencées, à partir d'un stock congelé, dans des tubes de verre contenant 5ml de milieu Luria-Bertani (LB) supplémenté de 4g/ml d'acide nalidixique puis placés à 37°C avec agitation de 400RPM pour une période d'environ 16 heures avant expérimentation. Les expériences de caractérisation des souches ont été faites en milieu M9 modifié #1(Xu et al., 2014) afin d'assurer la reproductibilité des expériences.

Tableau 5. Vecteurs, milieux et souches bactériennes utilisés dans ce mémoire

Nom	Génotype	Référence
<u>Souches</u>		
<i>E. coli</i> MG1655		
WT	<i>F- lambda- ilvG- rfb-50 rph-1</i>	Blattner et al.
JFR01	<i>E. coli</i> MG1655:: <i>budABC</i>	Ce mémoire
JFR02	<i>E. coli</i> MG1655:: <i>budABC Δpta</i>	Ce mémoire
JFR03	<i>E. coli</i> MG1655:: <i>budABC ΔadhE</i>	Ce mémoire
JFR04	<i>E. coli</i> MG1655:: <i>budABC ΔldhA</i>	Ce mémoire
JFR05	<i>E. coli</i> MG1655:: <i>budABC Δpfl</i>	Ce mémoire
JFR06	<i>E. coli</i> MG1655:: <i>budABC Δfrd</i>	Ce mémoire
JFR07	<i>E. coli</i> MG1655:: <i>budABC ΔldhAΔpfl</i>	Ce mémoire
JFR08	<i>E. coli</i> MG1655:: <i>budABC ΔldhAΔpta</i>	Ce mémoire
JFR09	<i>E. coli</i> MG1655:: <i>budABC ΔldhAΔadhE</i>	Ce mémoire
JFR10	<i>E. coli</i> MG1655:: <i>budABC ΔldhAΔfrd</i>	Ce mémoire
JFR11	<i>E. coli</i> MG1655:: <i>budABC ΔptaΔldhAΔfrd</i>	Ce mémoire
JFR12	<i>E. coli</i> MG1655:: <i>pir⁺::budABC ΔptaΔldhAΔfrd</i> + pOSIP-TT:: <i>budABC</i>	Ce mémoire
<u>Plasmides</u>		
pOSIP-TT	Plasmide intégratif contenant l'intégrase du phage φ21 ainsi qu'un gène de résistance à la tétracycline	Addgene #45989
pOSIP-TT:: <i>budABC</i>	pOSIP-TT contenant l'intégrase du phage φ21, un gène de résistance à la tétracycline et l'opéron <i>budABC</i> provenant de <i>Enterobacter cloacae</i>	Ce mémoire

Tableau 5. Vecteurs, milieux et souches bactériennes utilisés dans ce mémoire (suite)

Nom	Génotype	Référence
<u>Plasmides</u>		
pKD3	Plasmide contenant la cassette de résistance au chloramphénicol entourée de deux sites FRT, un promoteur R6K et une cassette de résistance à l'ampicilline	Datsenko et <i>al.</i>
<u>Milieux</u>		
Milieu modifié #1	M9 Milieu minimal M9 + glucose 50g/L + extrait de levure 5g/L	Xu et <i>al.</i>
Milieu modifié #2	M9 Milieu minimal M9 + lactose 50g/L + extrait de levure 5g/L	Ce mémoire
Milieu modifié #3	M9 Milieu minimal M9 + perméat 25g/L + extrait de levure 5g/L	Ce mémoire

2.2 Enzymes et produits chimiques

Les enzymes de restriction ainsi que la phosphatase thermolabile ont été obtenues de la compagnie New England Biolabs (NEB). La T4 DNA ligase ainsi que la T4 polynucléotide kinase proviennent de la compagnie Enzymatics. Les trousse de purification d'ADN et de purification de plasmide utilisés ont été obtenues de Zymo Research et Bio Basic Inc. respectivement. L'opéron *budABC* a été complètement synthétisé par Bio Basic Inc. Finalement, le perméat de lait a été obtenu de la compagnie Parmalat.

2.3 Élaboration du système d'expression de l'opéron *budABC*

Inspiré par les travaux de Mutalik et *al.*(Mutalik et al., 2013), un système d'expression très fiable a été utilisé pour l'expression de l'opéron *budABC*. Le promoteur Ptrc(P14) couplé avec l'élément de contrôle de la traduction BCD2 (*bicistronique design 2*) a été placé en avant de l'opéron (Figure 16). L'élément BCD2 a été choisi dû à sa forte expression des différents gènes rapporteurs comme le soutient la figure 16 b.

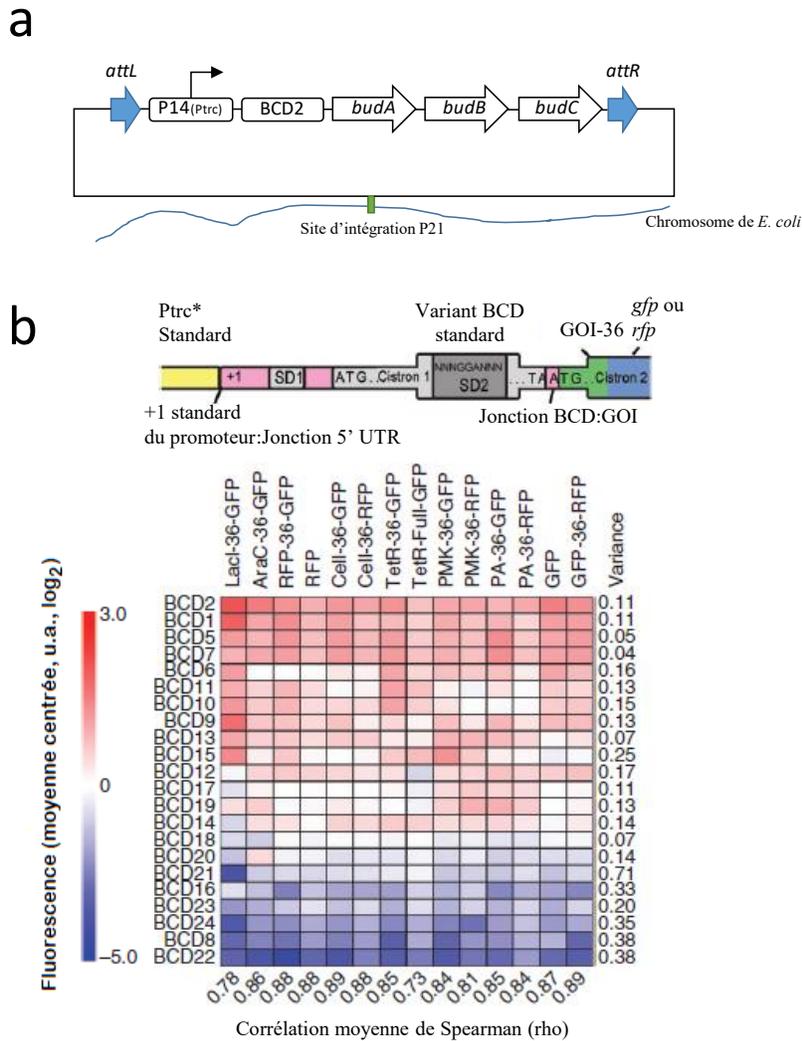


Figure 16. Éléments de régulations des différents gènes de l'opéron *budABC* pour une expression de diols optimale.

(a) Opéron *budABC* assemblé dans le plasmide pOSIP-TT. (b) Comparaison de force d'expression de différentes constructions d'éléments de régulation comprenant un promoteur P_{trc} de force moyenne suivi de 22 différents BCDs (*bicistronic design*) de 5' UTR. À ces constructions, 8 gènes d'intérêt couplés à la GFP (*green fluorescent protein*) ou à la RFP (*red fluorescent protein*) ont été fusionnés afin d'obtenir 14 gènes rapporteurs chimériques. La variance (droite) ainsi que la corrélation moyenne de Spearman (bas) sont présentées. u.a., unités arbitraires (Mutalik et al., 2013).

2.4 Insertion de l'opéron *budABC* dans la souche *E. coli* MG1655

L'insertion de la voie métabolique synthétique codée par l'opéron *budABC* dans le chromosome de la souche *E. coli* MG1655 a été exécutée suivant la technique de St-Pierre et al. (St-Pierre et al., 2013). L'assemblage du plasmide d'intégration pOSIP-TT::*budABC* a été fait en utilisant la technique d'assemblage de Gibson (Gibson et al., 2009). L'étape suivante a été la transformation du plasmide dans la souche dédiée via un choc thermique. Après une incubation d'environ 12 heures, l'expression de l'intégrase du phage $\phi 21$ se trouvant sur le plasmide a eu lieu et une vérification de l'intégration du plasmide au locus d'intégration dans la souche a été faite via PCR. Les amorces utilisées pour faire le PCR sont uniques au site d'intégration du plasmide utilisé. Grâce à cette technique, il est possible avec des amorces spécifiques de vérifier si l'évènement d'intégration dans le chromosome s'est fait en une seule ou en plusieurs copies. Dans le cas présent, l'intégration chromosomique était d'une seule copie de l'opéron *budABC*. Il n'y a pas eu d'analyse de la séquence pour y détecter la présence de palindrome ou de structures potentielles dans l'ARNm résultant.

2.5 Interruption des gènes *pta*, *adhE*, *ldhA*, *pfl* et *frd* dans la souche *E. coli* MG1655::*budABC*

Afin de rediriger le flux de carbone vers la voie métabolique qui nous intéresse, plusieurs mutants de délétion ont été produits à partir de la souche *E. coli* MG1655::*budABC* en utilisant la méthode de Datsenko et al. (Datsenko and Wanner, 2000). Cette méthode est basée sur la recombinaison d'une cassette de résistance à un antibiotique, soit un gène de résistance au chloramphénicol amplifié du plasmide pKD3 portant à chaque extrémité une homologie de 40 nt avec la région du gène à interrompre. Afin que la recombinaison soit possible, la souche *E. coli* MG1655::*budABC* avait préalablement été transformée avec le plasmide thermosensible pSIM6, qui a pour fonction d'exprimer le système de recombinaison lambda red. Une fois la recombinaison effectuée, les clones résistants au chloramphénicol ont été sélectionnés sur milieu gélosé Luria-Bertani (LB) puis les profils de restrictions attendus ont été validés. La

dernière étape consistait à éliminer le gène de résistance à l'antibiotique à la souche en utilisant l'enzyme de la flippase codé par le plasmide d'expression FLP, afin de retirer le gène de résistance au chloramphénicol pour ne laisser qu'une courte séquence FRT de 34 nt.

2.6 Fermentation de type « batch » en tube conique de 50 ml

Afin de caractériser la production de diols des différentes souches bactériennes produites, des fermentations de type « batch » ont été effectuées. Préalablement, une culture a été préparée en milieu (LB) et placée à une température de 37°C jusqu'au lendemain. De cette culture dense, un certain volume a été prélevé et placé dans un autre tube en verre contenant le même milieu afin d'obtenir une densité optique à 600nm (DO_{600}) d'environ 0.1. Cette culture a été suivie jusqu'à ce qu'elle atteigne une DO_{600} de 0.8, afin de s'assurer qu'elle demeure en phase exponentielle de croissance.

Les fermentations de type « batch » ont été faites dans des tubes à centrifugation coniques de 50ml de type Falcon (FISHER) contenant 22.5ml de milieu M9 modifié #1. Une quantité de 2.5ml a été prélevée de la culture en phase exponentielle préparée préalablement et placée dans le tube conique (inoculum de 10% v/v). La fermentation s'est produite dans un incubateur à 37°C avec rotation à 400RPM(Xu et al., 2014).

2.7 Fermentation de type « batch » en biofermenteur

Les différentes fermentations ont eu lieu en cuve de 3.6L contenant 2L de milieu M9 modifié #1, #2 et #3. Le pH initial était de 7.0 et était contrôlé via l'ajout automatique de H_2SO_4 2M ou de NaOH 2M. L'inoculum de départ était de 10% v/v et la température de fermentation était maintenue à 37°C avec une aération constante de 1.5vvm et une agitation de 400RPM(Xu et al., 2014).

2.8 Méthodes d'analyse

Les échantillons ont été divisés en deux parties. Une partie a été utilisée pour mesurer la DO_{600} en utilisant un spectrophotomètre. La seconde partie a été filtrée sur filtre 0.22 μ M et analysée par HPLC pour déterminer la composition en produits de fermentation à l'aide d'une colonne HPX-87H à 60°C avec un détecteur à indice de réfraction. Une phase mobile de 5mM H_2SO_4 avec un débit de 0.6ml/min a été utilisée pour l'analyse. Afin de déterminer la concentration de chaque métabolite, une courbe standard a été faite pour l'éthanol, le succinate, l'acétate, le lactate, le formate, le 2,3-BD et l'acétoïne.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1 Conception et construction de l'opéron *budABC* pour une production de diols à haut rendement.

3.1.1 Processus basé sur l'ingénierie métabolique

Comme expliqué plus haut, la création et l'optimisation d'une souche dédiée se font par un processus appelé ingénierie métabolique en utilisant des approches de biologie de synthèse (figure 9) Afin de respecter les étapes d'ingénierie métabolique, un plan a été défini selon les étapes importantes à suivre (Figure 17).

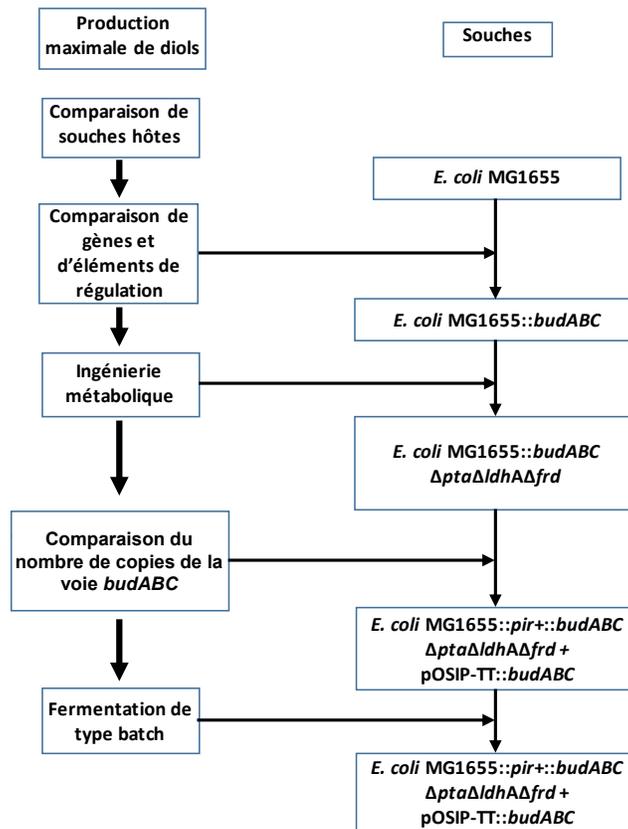


Figure 17. Conception de la plateforme de production de diols étape par étape

Une voie synthétique de production des diols a été intégrée dans le chromosome du microorganisme hôte (*E. coli*). Cette voie a été élaborée en s’inspirant des gènes d’*Enterobacter cloacae*, en utilisant les résultats de l’analyse phylogénétique de différents producteurs naturels (Figure 10). Par la suite, des éléments de contrôle des différents gènes de l’opéron ont été ajoutés (Figure 16). La séquence d’éléments de contrôle utilisé s’est inspiré des travaux de Mutalik et al. (Mutalik et al., 2013) Celui-ci avait créé plus de 1200 différentes combinaisons d’élément de régulation de l’initiation de la transcription et de la traduction et il les avait tous noté avec un score afin de les classer par ordre d’efficacité d’expression.

Finalement, certaines zones des gènes ont été optimisées afin d’améliorer l’efficacité de production théorique (Figures 13, 14 et 15) (Tableau 4).

3.2 Ingénierie métabolique de *E. coli* MG1655 pour la production à haut rendement de diols

3.2.1 Délétion combinatoire des gènes *pta*, *adhE*, *ldhA*, *pfl* et *frd* dans la souche *E. coli* MG1655::*budABC*

Dans l'optique d'obtenir une grande production de diols, il est important de s'assurer que la cellule hôte ait le plus grand bassin de précurseurs à rediriger vers cette voie. Une étude de délétion combinatoire visant 5 gènes cibles dont les produits entrent en compétition avec la production de diols au niveau métabolique a donc été entreprise (Figure 18). Les gènes cibles étaient la phosphoacétyltransférase (*pta*), qui est utilisée pour la production d'acétate à partir d'acétyl-CoA; l'éthanol oxydoréductase (*adhE*), qui convertit l'acétyl-CoA en éthanol; la lactate déshydrogénase (*ldhA*), qui convertit le pyruvate en lactate; la pyruvate formate lyase (*pfl*), qui catalyse la conversion du pyruvate en acétyl-CoA et ensuite en formate et finalement la fumarate réductase (*frd*), qui convertit le phosphoénolpyruvate en succinate.

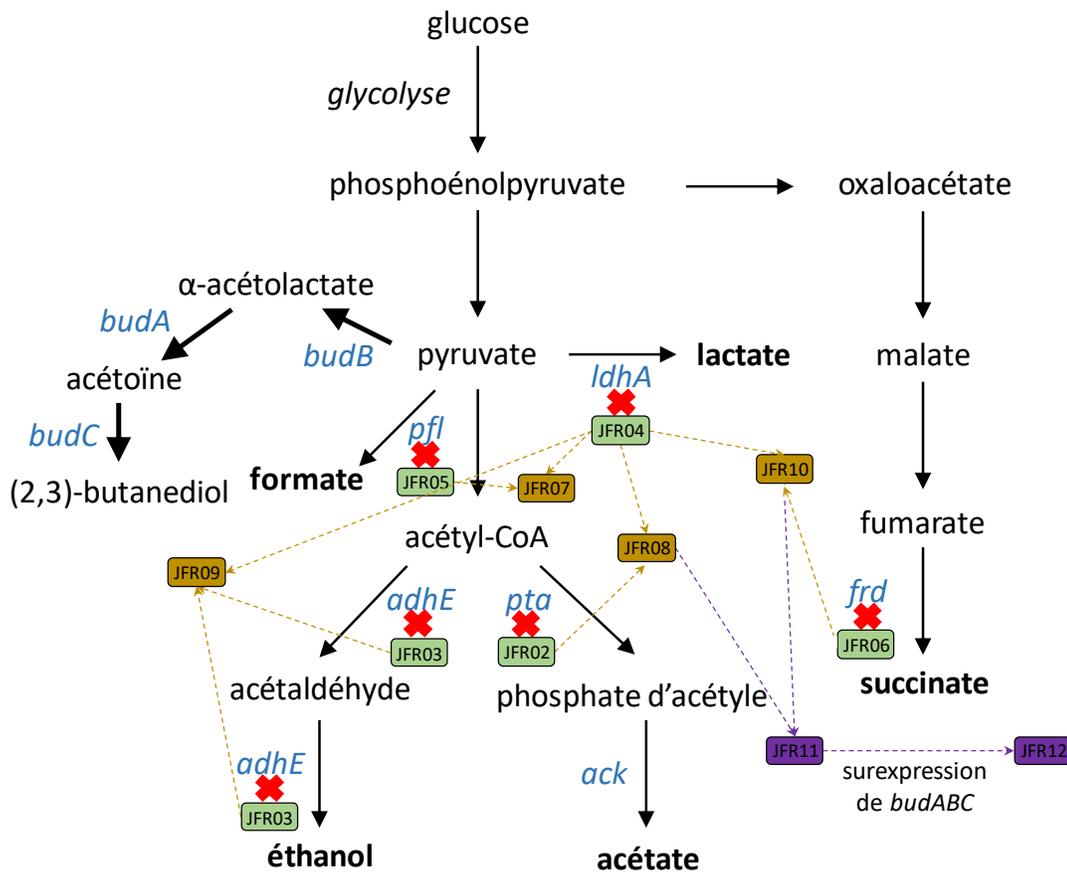


Figure 18. Voies fermentaires impliquées dans l'utilisation du glucose par les souches modifiées.

Les flèches noires plus larges montrent la voie synthétique *budABC* introduite dans la souche. Les croix rouges montrent les gènes cibles pour inactivation. Les rectangles de couleurs montrent les souches ayant différentes combinaisons d'inactivation de gène; l'inactivation d'un seul gène en vert, de deux gènes en jaunes et finalement de trois gènes en mauve. Les flèches de couleur indiquent quelles souches ont été utilisées afin d'obtenir celle à la tête de la flèche. *ldhA*, lactate déshydrogénase; *pfl*, pyruvate formate-lyase; *pta*, phosphate acétyltransférase; *adhE*, acétaldéhyde/alcool déshydrogénase; *ackA*, acétate kinase; *frd*, fumarate réductase and *ack*; acétate kinase.

3.2.2 Fermentation en tube des mutants de délétion

3.2.2.1 Production de mutants simples

Dans le but de comprendre dans quelles voies métaboliques se redistribuait le flux de carbone créé lors de l'utilisation de glucose par la cellule, et par le fait même de tenter de contrôler la quantité de pyruvate libre, différents mutants ont été créés. Ces mutants étaient caractérisés non pas seulement par leur capacité de production de produits de fermentation et de diols, mais aussi par leur facilité de croissance en dépit de ces mutations. Comme mentionné plus haut, les voies métaboliques qui avaient été ciblées étaient les voies de production de l'acétate (*pta*), de l'éthanol (*adhE*), du lactate (*ldhA*), du formate (*pfl*) et du succinate (*frd*).

Pour les mutants de délétion simples JFR02, JFR03, JFR05 et JFR06, les fermentations en tubes ont montré une grande production de lactate au détriment des autres produits de fermentation (Tableau 6). Seul le mutant de la voie de production de l'acide lactique (JFR04) avait une production de lactate très basse, qui en contrepartie, résultait en une plus grande production de diols et d'éthanol. Chez les autres mutants, le lactate produit semble provoquer un ralentissement voire un arrêt de la croissance bactérienne beaucoup plus précoce, résultant donc d'une faible production de diols. La quantité de glucose consommé constitue un autre indicateur intéressant; le mutant JFR04 a été en mesure de consommer significativement plus de glucose du milieu de culture par rapport aux autres mutants dans les mêmes conditions, indiquant donc une croissance beaucoup plus importante. Pour résumer, de toutes les fermentations en tube faites avec les mutants simples, le mutant JFR04 s'est démarqué significativement par sa croissance, sa capacité à créer un environnement peu acide via sa mutation de délétion pour la voie de production du lactate (*ldhA*) et finalement sa production de diols intéressante.

Tableau 6. Croissance cellulaire, consommation de glucose, production de métabolites secondaires et de diols de différentes souches modifiées de *E. coli* MG1655.

Souches	Temps de fermentation (h)	Biomasse (OD ₆₆₀)	Consommation de glucose (mM)	Produits secondaires (mM)					
				Acétate	Formate	Lactate	Succinate	Éthanol	Diols
WT	72	2.08 ± 0.02	67.10 ± 8,22	21.42 ± 0.78	15.92 ± 0.71	49.72 ± 1.66	4.31 ± 0.09	11.27 ± 0.71	ND
JFR01	72	2.47 ± 0.12	57.17 ± 6.44	18.85 ± 1.27	18.32 ± 1.38	51.65 ± 1.31	5.49 ± 0.13	15.29 ± 2.05	3.62 ± 0.14
JFR02	72	1.24 ± 0.17	38.6 ± 13.3	2.0 ± 0.1	0.6 ± 1.1	110.4 ± 7.4	6.0 ± 0.2	5.9 ± 6.4	2.0 ± 0.6
JFR03	72	0.97 ± 0.24	45.4 ± 9.9	7.2 ± 1.7	1.4 ± 1.3	103.2 ± 5.8	4.6 ± 0.5	3.3 ± 4.8	1.8 ± 0.9
JFR04	72	1.61 ± 0.17	187.5 ± 85.2	7.0 ± 3.5	8.1 ± 11.4	16.4 ± 0.9	16.3 ± 6.2	123.8 ± 73.7	70.6 ± 42.9
JFR05	72	1.45 ± 0.28	51.1 ± 10.2	6.8 ± 4.3	ND	111.1 ± 5.2	5.4 ± 0.5	7.7 ± 1.3	2.7 ± 1.6
JFR06	72	1.44 ± 0.06	60.8 ± 14.3	17.1 ± 5.3	18.0 ± 14.9	78.7 ± 15.1	1.2 ± 0.8	24.8 ± 8.2	4.8 ± 3.4
JFR08	41	2.79 ± 0.05	74.2 ± 5.8	3.6 ± 0.1	36.6 ± 0.8	3.2 ± 0.1	9.5 ± 0.2	42.6 ± 1.3	24.2 ± 0.5
JFR10	41	2.59 ± 0.03	79.2 ± 4.2	2.8 ± 0.4	45.4 ± 0.8	7.5 ± 0.2	0.9 ± 0.1	52.8 ± 2.3	32.0 ± 0.4

Les fermentations ont eu lieu dans un volume de 25ml de milieu M9 modifié #1 à 37°C avec une agitation de 180 RPM en tube conique de 50ml durant différents temps. ND: Non détecté. OD660: Densité optique à 660 nm. Les cases grises représentent les produits terminaux des voies de fermentation interrompues suite aux mutations introduites dans les souches respectives.

Mazumdar et al.(Mazumdar et al., 2013) avait expérimenté que le fait de créer une délétion du gène *pfl*, codant pour la C-acétyltransferase du formate, mènerait à des problèmes intracellulaires et donc, un ralentissement significatif de la croissance. Ce phénomène serait dû à la non-disponibilité de l'acétyl-CoA, une molécule qui occupe un rôle central dans la régulation de plusieurs voies métaboliques telles que la glycolyse, le cycle de Krebs, la gluconéogenèse et la synthèse des acides gras. Bien que nos résultats de fermentation du mutant JFR05 ne semblaient pas montrer d'effet négatif sur la croissance après 72h, nous avons décidé qu'il valait mieux ne pas inclure la délétion du gène *pfl* dans la suite de la création de nos mutants de délétion afin de minimiser le risque d'affecter le rendement final en diols. De plus, une autre étude(Baba et al., 2006) avait révélé que la délétion du gène *adhE*, codant pour l'oxydoréductase de l'éthanol, provoquait elle aussi un problème de croissance. Dans notre cas, la biomasse finale semble être la même que les autres souches, suggérant donc qu'il n'y avait pas eu d'effet négatif; une différence importante étant cependant que nous avons fait la fermentation sur une période de 72h et que les résultats de l'étude de référence

avaient une durée de 24h. Pour ce qui est des gènes permettant la production d'acétate et de succinate, il ne semblait pas y avoir de défaut de croissance autre que celui créé par l'accumulation de lactate. Ces observations concordaient bien avec les données de la littérature (Mazumdar et al., 2013) (Krivoruchko et al., 2015).

3.2.2.2 Production de mutants doubles et triples

L'étape suivante dans la création d'une souche efficace pour la production de diols était la génération de mutants de délétions doubles basés sur les résultats obtenus des fermentations des mutants simples (Tableau 6). Ces résultats suggéraient que la délétion du gène *ldh* représentait une étape clé pour améliorer la croissance et les rendements. De plus, la délétion des gènes *adhE* et *pfl* avait été écartée tel qu'expliqué plus haut. Les mutants doubles JFR08 ; délétion des gènes *ldh* et *pta*, et JFR10 ; délétion des gènes *ldh* et *frd* ont donc été créés.

Il est intéressant de constater que les deux mutants ont eu une croissance ainsi qu'une consommation de glucose semblables. Les métabolites produits sont majoritairement du formate, des diols ainsi que de l'éthanol. L'acétate et le succinate semblent avoir une production minimale, démontrant l'impact de leur interruption génique. Un mutant triple (JFR11) contenant à la fois les mutations combinées des mutants JFR08 et JFR10 a également été généré.

Nous avons ensuite entrepris de tester la souche JFR11 dans un environnement contrôlé, plus semblable aux conditions qui pourraient être utilisées dans un contexte industriel. En effet, lors de nos fermentations en tubes, il était difficile de contrôler plusieurs paramètres à la fois, de même que d'effectuer des prélèvements à différents temps; le suivi et la compréhension du comportement de la souche en cours d'expérience étaient plus difficiles. L'utilisation de biofermenteurs facilite le contrôle de la température, du pH, de l'agitation et du niveau d'aération de la culture tout en permettant le prélèvement d'échantillons ou l'ajout de diverses substances, le tout de manière aseptique. De plus, cela permettait de pouvoir comparer plus

fidèlement la fermentation de différentes souches en minimisant la variation de ces paramètres.

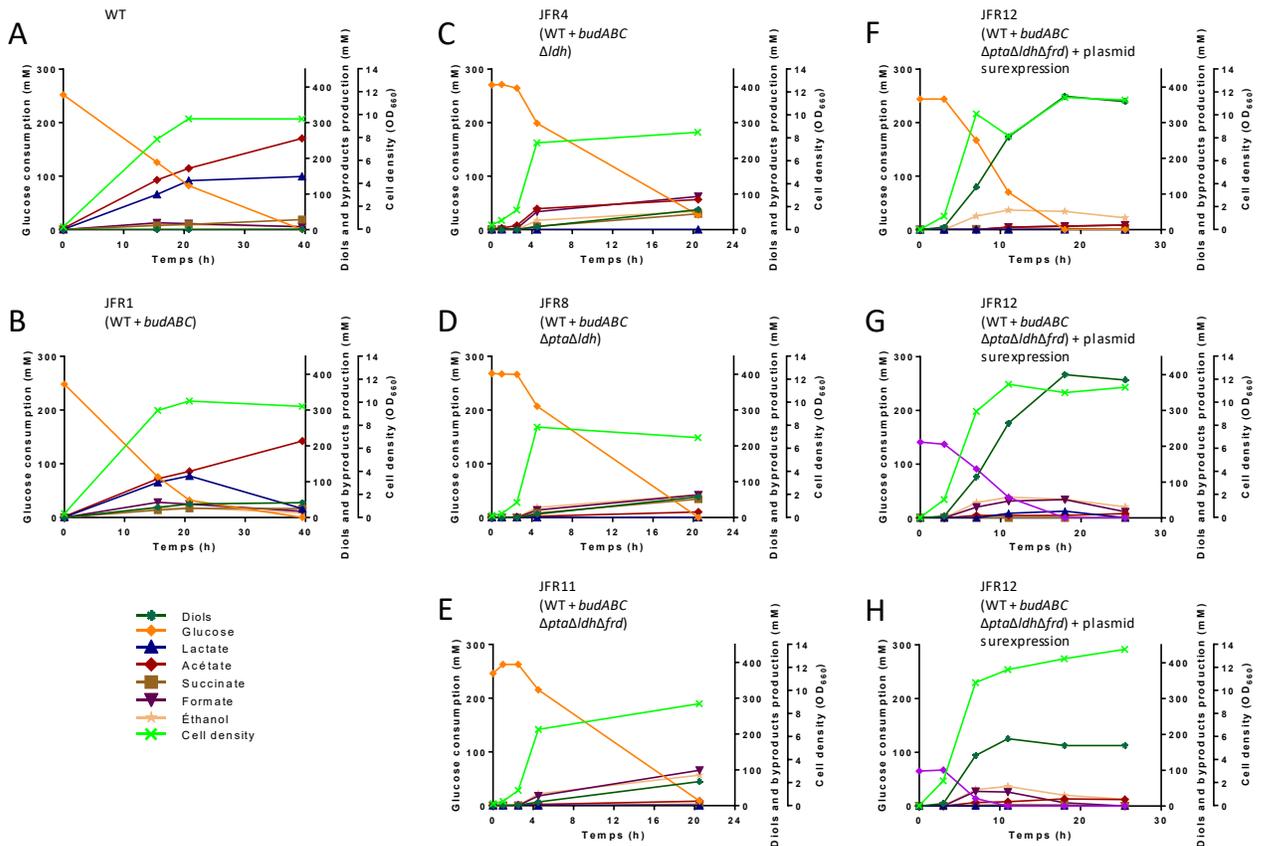
Un facteur particulièrement important à contrôler est l'aération de la culture puisqu'un niveau d'oxygène très bas pourrait favoriser la production de diols. Dans un environnement aérobie, la production d'acide organique entrerait en compétition avec nos molécules d'intérêts tandis que dans un environnement anaérobie strict, la régénération du NAD^+ via la chaîne de transport des électrons ne serait pas faite efficacement. Notre but était donc de créer un environnement microaérobie dans notre milieu de culture (Mazumdar et al., 2013).

3.2.3 Production en biofermenteur de 3.6L

3.2.3.1 Production de diols en biofermenteur en utilisant le glucose comme seule source de carbone.

Une augmentation du volume de fermentation à une plus grande échelle (*scale up*) peut modifier le comportement du microorganisme et la production attendue. Nous avons donc décidé de refaire certaines fermentations en biofermenteur afin de confirmer que le comportement des souches était le même qu'observé en tubes. L'ajout de la voie des diols à la souche hôte (JFR01) résulte dans ce contexte en une consommation de glucose beaucoup plus rapide que la souche de type sauvage mais dans les deux cas, après environ 40 heures, la totalité du glucose est consommée (Figure 19A-B). Pour ce qui est de la souche de type sauvage, l'acétate, le lactate ainsi que le succinate sont les trois métabolites principalement produits; ces résultats vont dans le même sens que nos précédents résultats en tube. Lorsque nous ajoutons l'opéron *budABC* à la souche de type sauvage (JFR01), les produits principaux sont toujours le lactate et l'acétate, mais cette fois-ci, la souche semble avoir converti une partie du pyruvate libre destiné à la production d'autres métabolites en diols. Par exemple, le niveau d'acétate final passe de 256mM pour la souche de type sauvage à 213mM converti pour JFR01. La présence du lactate dans le milieu semble diminuer après 21 heures, possiblement à cause de son utilisation par l'hôte lorsqu'il n'y a plus d'autres sources de

carbone en quantité suffisante. Il est intéressant de noter que dans ces fermentations, la présence d'acétate est beaucoup plus importante que celle du lactate, comportement qui est différent de nos fermentations en tube, ce qui pourrait être dû au niveau d'oxygénation du milieu qui est beaucoup mieux contrôlé. Le formate ainsi que l'éthanol ne sont présents qu'en faibles quantités contrairement à ce qui avait été observé en tube. La concentration bactérienne présente à chaque échantillonnage semble suivre la même augmentation pour les deux souches, suggérant donc que la production de diols n'affecte pas la croissance cellulaire. Finalement, la souche de type sauvage semble se comporter de la même façon que JFR01, mis à part la production de diols par celle-ci à une productivité maximale de $1.2 \text{ mM}\cdot\text{h}^{-1}$.



3.2.3.2 Mutants simples, doubles et triples

Il est intéressant de noter qu'après la fermentation par des mutants de délétions simples (JFR04), doubles (JFR08) et triples (JFR11) en biofermenteur de 3.6L, la concentration bactérienne semblait suivre la même augmentation dans le temps, ce qui suggère encore une fois que les délétions géniques effectuées n'ont pas créé de défaut de croissance (Figure 19C-D-E). Les fermentations par les mutants de délétion JFR04, JFR08 et JFR11 ont atteint une concentration bactérienne maximale beaucoup plus rapidement que la souche de type sauvage ou la souche JFR01. En effet, la production de métabolites secondaires, en particulier le lactate, l'acétate et le succinate, a significativement diminué chez ces souches pour laisser place à une production de diols plus importante mais qui demeure encore relativement faible. Cela suggère donc que la mutation de délétion pour les gènes ciblés est efficace. Il est donc normal de retrouver presque uniquement du formate, de l'éthanol et des diols après la fermentation du mutant JFR11 (Figure 19E). Dans ces conditions de fermentation, le mutant JFR11, ayant une seule copie de l'opéron *budABC* intégrée à son chromosome, atteint un rendement en diols de 67mM sur une période de 21h, soit une productivité de $3.19\text{mM}\cdot\text{h}^{-1}$.

Il est intéressant de remarquer que malgré les différentes combinaisons d'interruptions géniques, les concentrations de diols sont toujours relativement faibles. Une cause possible pourrait être que les enzymes de la voie de production *budABC* sont exprimées en trop faibles quantités. Par conséquent, même si une plus grande quantité de pyruvate est disponible, la conversion en diols demeure modeste.

3.2.3.3 Souche JFR12 : rendements améliorés en augmentant le nombre de copies de *budABC*

Initialement, l'intégration chromosomique de l'opéron *budABC* avait été faite en une seule copie seulement. Nous pouvions donc conclure que les rendements obtenus étaient dus à l'activité d'une seule copie. Nous avons décidé de vérifier si une augmentation du nombre de

copies des gènes encodant la voie métabolique produisant les diols pourrait améliorer les rendements observés. La souche JFR12 ainsi créée contient les mêmes mutations dans les gènes *pta*, *ldhA* et *frd* mais possède en plus le plasmide pOSIP-TT contenant l'opéron *budABC*. Ce plasmide a une origine de répllication R6K nous obligeant donc à rendre notre souche *pir*⁺ afin d'assurer sa répllication et d'augmenter le nombre de copies disponibles (estimé entre 15-20) pour l'expression génique de *budABC*. Une souche produisant un plus grand nombre de copies (environ 100-150) via l'ajout de l'allèle *pir116* a également été générée, mais celle-ci montrait des difficultés de croissance importantes qui nous ont amené à ne pas l'étudier davantage.

En utilisant les mêmes conditions de fermentation, JFR12 semble atteindre une densité supérieure aux autres souches (Figure 19 F-G-H). On remarque aussi qu'à l'exception des diols, les métabolites secondaires ont été faiblement produits au départ pour ensuite disparaître graduellement après que le glucose ait été complètement consommé, aux alentours de 18 heures. Il est à noter que la quantité de diols a aussi subi cette diminution de concentration. Il est bien connu que la cellule, lorsqu'il n'y a plus de source de carbone facilement assimilable, peut utiliser des métabolites secondaires afin d'en retirer le carbone (Mazumdar et al., 2013). Il en est de même pour les diols, qui à la base sont connus pour être utilisés par la cellule comme une réserve de carbone en cas de carence dans le milieu de culture (Mazumdar et al., 2013). Après 18h, le glucose avait été entièrement consommé et la production de diols avait déjà atteint son maximum de concentration, soit 374mM ou encore 32.98g/l, soit environ 5.6 fois plus qu'avec JFR11. Le Tableau 7 nous renseigne sur la vitesse maximale de conversion de la source de carbone en diols, qui est en fait la productivité maximale que la souche a atteinte durant sa fermentation. Cette valeur ne prend pas en compte la quantité de glucose au départ. Comme on peut le constater, la productivité est près de 10 fois plus élevée pour JFR12 que pour JFR11 ($35.3\text{mM}\cdot\text{h}^{-1}$ ($3.11\text{g/L}\cdot\text{h}^{-1}$) versus $3.56\text{mM}\cdot\text{h}^{-1}$ ($0.313\text{g/L}\cdot\text{h}^{-1}$) respectivement), ce qui représente une augmentation significative de la production en diols (Tableau 7).

Tableau 7. Productivité maximale de diols lors de fermentation de différentes souches en utilisant différentes sources de carbone

Souches	Milieux	Productivité maximale en diols (mM.h ⁻¹)	Productivité maximale en diols (g.l ⁻¹ .h ⁻¹)
Wt	Milieu M9 modifié #1 (glucose)	ND	ND
JFR01	Milieu M9 modifié #1 (glucose)	1.82	0.161
JFR04	Milieu M9 modifié #1 (glucose)	2.98	0.262
JFR08	Milieu M9 modifié #1 (glucose)	3.03	0.267
JFR11	Milieu M9 modifié #1 (glucose)	3.56	0.313
JFR12	Milieu M9 modifié #1 (glucose)	35.3	3.11
JFR12	Milieu M9 modifié #1 (lactose)	37.8	3.33
JFR12	Milieu M9 modifié #1 (perméat)	33.5	2.95

ND: Non détecté

3.2.3.4 Production de diols avec JFR12 en utilisant du perméat de lait comme seule source de carbone.

JFR12 s'est avérée être la souche produisant la plus grande quantité de diols en utilisant du glucose comme source de carbone. Suivant ce résultat, des tests en fermenteur ont été faits afin de vérifier si le perméat de lait pouvait également soutenir une production de diols importante. La bactérie *E. coli* utilisée pour la production de diols possède une β -galactosidase (Kalnins et al., 1983) offrant la capacité de dégrader le lactose en glucose et galactose, qui peuvent ensuite être assimilés et fermentés. Cependant, la vitesse de dégradation du lactose pourrait potentiellement être limitante et affecter la production finale de diols.

Le patron général de production pour JFR12 dans un milieu contenant du lactose ne semble pas différent de celui observé en présence de glucose (Figure 19, F-G). La production de métabolites secondaires semble augmenter à partir de 3 heures pour finalement diminuer après

la consommation de la source de carbone principale. La production totale de diols est un peu plus importante pour la fermentation supplémentée en lactose (400mM par rapport à 374mM pour la fermentation supplémentée en glucose), mais cette différence pourrait être due à une plus grande quantité de sucres dans le milieu de culture avec lactose. En effet, on remarque qu'au temps 0h, une concentration de 244mM (44g/L) de glucose était présente dans le milieu de culture comparativement à 137mM (49g/L) dans le milieu supplémenté en lactose. Théoriquement le lactose est dégradé en glucose ainsi qu'en galactose, deux molécules assimilables par le microorganisme (Kalnins et al., 1983); il est donc normal que la fermentation en milieu lactosé ait donné un rendement légèrement plus élevé en diols que dans la fermentation en milieu glucosé. Cependant, il est plus adéquat de comparer l'efficacité d'utilisation de la source de carbone, donc la vitesse maximale d'utilisation de JFR12 pour le lactose ou le glucose, ainsi que la production maximale de diols dans le temps (productivité). JFR12 utilise le glucose à la même vitesse que le lactose dans les mêmes conditions de culture (24.3mM*h⁻¹ par rapport à 26.6mM*h⁻¹ de sucre consommé respectivement).

Tableau 8. Vitesses maximales d'utilisation du sucre de JFR12 avec différentes sources de carbone

Souches	Milieux	Vitesse maximale d'utilisation du sucre (mM.h ⁻¹)	Vitesse maximale d'utilisation du sucre (g.l ⁻¹ .h ⁻¹)
JFR12	Milieu M9 modifié #1 (glucose)	24.3	4.4
JFR12	Milieu M9 modifié #1 (lactose)	13.3	4.8
JFR12	Milieu M9 modifié #1 (perméat)	13.3	4.8

Il est à noter que la vitesse d'utilisation du lactose est en fait de 13.3mM*h⁻¹, mais considérant que la molécule se scinde en 2 molécules (glucose et galactose) et que celles-ci sont utilisées presque instantanément (aucune accumulation n'a été observée), cette vitesse de

consommation doublée a donc été normalisé par molécule de glucose disponible. Ce faisant, les vitesses d'utilisation des différentes sources de carbones disponibles par JFR12 sont semblables et nous pouvons conclure que le temps de dégradation du lactose en glucose et galactose ne ralentit pas l'assimilation des sucres (Tableau 8). Une autre observation intéressante est que l'étape supplémentaire de dégradation du lactose ne semble pas diminuer la production maximale de diols car celle-ci est sensiblement la même après le même temps dans les deux conditions. Il est donc intéressant d'amener ce parallèle possible entre la vitesse de dégradation du lactose et la production de diols. Finalement, vu qu'aucun changement ne semble avoir eu lieu tant au niveau de la croissance qu'au niveau de la production de diols, la disponibilité de la source de carbone ne semble pas avoir été un facteur à considérer dans le calcul de l'efficacité de JFR12 à produire des diols. En effet, tant pour la fermentation en glucose qu'en lactose il ne restait plus de trace de sucre dans le milieu et la production de diols était maximale après 18 heures (Figure 19, F-G).

D'après les résultats obtenus, JFR12 devrait agir de la même façon dans un milieu supplémenté en lactose ou en perméat de lait. Comme mentionné plus haut, le perméat de lait est le produit issu de l'ultrafiltration du lactosérum; il contiendra donc moins de protéine que le lactosérum mais il sera plus riche en lactose et en sels. La composition exacte du perméat dépend généralement de plusieurs facteurs tels que son lieu de production. Dans le cas présent, du perméat de lait avait été fourni par une entreprise laitière québécoise afin de nous permettre de faire des tests. Après analyse du produit (Tableau 9), la quantité relative de lactose retrouvé dans le perméat de lait était environ de 37.57 g/l.

Tableau 9. Composition de l'échantillon obtenu de perméat de lait

	Perméat de lait (g/l)
Lactose	37,57
Glucose	ND
Galactose	1,72
Succinate	ND
Lactate	3,36
Formate	ND
Acétate	ND
Diols	ND
Éthanol	ND

ND = Non détecté

Des fermentations ont été faites afin d'évaluer si l'utilisation de perméat de lait pouvait offrir des rendements intéressants d'un point de vue industriel. Les étapes étaient les mêmes qu'avec du glucose et du lactose ; seule la source de carbone changeait ; un milieu (M9 modifié #3) à base de perméat de lait a été utilisé dans ce but. Afin d'être certain de ne pas altérer le produit, aucune manipulation qui aurait pu altérer le perméat n'a été effectuée. En effet, une stérilisation à l'autoclave ou une filtration aurait pu causer des changements, soit dans la concentration protéique ou dans un autre paramètre et les résultats obtenus auraient pu être biaisés. Le perméat de lait avait donc été ajouté non stérilement dans le milieu, en prenant en compte que l'inoculum bactérien avec la souche JFR12 au départ de l'expérience serait suffisamment concentré (10% v/v) pour rendre négligeable la croissance de tout autre microorganisme présent dans le milieu de culture.

Lors de la fermentation en milieu supplémenté avec le perméat de lait, la souche JFR12 semble avoir eu une croissance relativement semblable à la fermentation utilisant le lactose purifié comme source de carbone. Rappelons que le perméat de lait est constitué en grande

majorité de lactose et d'eau; les différents sels présents ne semblent pas avoir d'impact sur la croissance ou la production de diols. En effet, pour ce qui est de la croissance bactérienne, il est intéressant de noter que la vitesse maximale d'utilisation du lactose semble être la même, soit $13.3\text{mM}\cdot\text{h}^{-1}$ pour les deux types de milieu de culture. De plus, la production des diols semble aussi être la même, que l'on utilise du perméat de lait ou du lactose comme source de carbone. Dans le cas présent, la quantité maximale de diols produite est différente (400mM avec utilisation du lactose et 169mM avec utilisation du perméat de lait), mais quand on regarde la production totale par rapport à la consommation de lactose, on s'aperçoit que celle-ci est quasiment la même (2.84mM de diols/mM de lactose par rapport à 2.60mM de diols/mM de lactose respectivement). Considérant que la quantité de lactose au départ n'était pas la même et que cela a eu un impact sur la production totale de diols, il est quand même possible de constater que la vitesse maximale de production de diols, qui révèle la productivité de la souche JFR12, était pratiquement la même, soit $37.8\text{mM}\cdot\text{h}^{-1}$ par rapport à $33.5\text{mM}\cdot\text{h}^{-1}$ respectivement ou encore $3.33\text{g/l}\cdot\text{h}^{-1}$ par rapport à $2.95\text{mM}\cdot\text{h}^{-1}$ respectivement. Ces résultats nous amènent donc à croire que le fait d'utiliser du perméat de lait au lieu de lactose pur comme source de carbone n'apporterait pas de changement significatif dans la fermentation si les concentrations en lactose étaient les mêmes.

Afin de vérifier la faisabilité d'une production de 2,3BD à un niveau industriel, une analyse techno-économique (ATE) doit être effectuée. En effet, il est important de considérer le coût de toutes les étapes nécessaires à la commercialisation afin de prendre de bonnes décisions. Par exemple, le coût des milieux de culture ainsi que les technologies utilisées sont des étapes importantes à surveiller (Hakizimana et al., 2020). Parmi les quelques rapports ATE sur la production du 2,3BD à partir de biomasse, Koutinas *et al.* ont démontré qu'il était possible de produire du 2,3BD industriellement mais que cette production était associée à un prix minimal de vente (*minimal selling price* (MSP)) très élevé dû aux matériaux de base relativement dispendieux ainsi qu'aux rendements limités (Koutinas et al., 2016). Bien que trois différentes sources de carbone aient été considérées, un MPS de plus de $1\text{\$/kg}$ était toujours obtenu. Une autre simulation a été effectuée en optimisant les conditions de fermentation et en utilisant le

microorganisme *Enterobacter ludwigii*.(Hakizimana et al., 2020) Avec ces conditions de fermentation, un rendement de 0.37 g/g et une productivité de 3.95g/L*h-1 ont été obtenus. Malgré cette optimisation, l'utilisation d'une source de carbone de canne à sucre à très haute polarité (VHP; *very high polarity*) a fait monter le MSP à plus de 2.67\$/kg pour une production annuelle de 50 000 tonnes. Il est intéressant de souligner que nos résultats de fermentation avec nos conditions étaient de 3.11g/L*h-1 en utilisant du glucose comme source de carbone et 2.95g/L*h-1 si nous utilisons du perméat de lait, qui est considéré comme un déchet industriel. Nous pouvons donc supposer qu'une production de 2,3BD en fermenteur ayant une plus grande capacité résulterait en une MSP plus basse considérant l'utilisation d'une source de carbone peu coûteuse.

CHAPITRE 4

CONCLUSION

Le but de ce projet était de démontrer qu'une approche de génie métabolique permettrait de valoriser certains déchets de l'industrie de la transformation laitière québécoise, plus précisément le perméat de lait. Les diols ont été choisis comme molécules d'intérêt, démontrant donc qu'il est possible d'intégrer un ou plusieurs gènes dans le chromosome d'un hôte afin de permettre une expression hétérologue de ceux-ci et de produire une molécule désirée. Nous avons donc décidé d'intégrer une voie synthétique de production des diols en nous inspirant de celle d'*Enterobacter cloacae*, un producteur naturel montrant un risque de pathogénicité, dans un hôte non-pathogène ayant une croissance rapide, une plus grande facilité de manipulation et étant largement utilisé dans plusieurs domaines, à savoir *E. coli*. En utilisant des stratégies d'ingénierie métabolique, les voies endogènes de production de l'acétate, du lactate et du succinate ont été interrompues, menant donc à une réorientation des flux de carbone vers la voie exogène de production des diols. L'interruption du gène *ldhA* s'est montrée particulièrement importante puisque l'accumulation de lactate prévenait une croissance importante de la souche productrice, fort probablement en causant une acidification du milieu. Dans les conditions optimales présentées plus haut dans ce mémoire, en utilisant la souche JFR12 ainsi que du glucose comme source de carbone, nous avons obtenu une productivité maximale de $35.3 \text{ mM}\cdot\text{h}^{-1}$ ($3.11 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) de diols. Si on compare ces résultats avec les différentes souches présentées dans le Tableau 2, nous pouvons constater que nous dépassons largement la plupart des souches naturelles du point de vue de la productivité et en plus, tout en utilisant un hôte non pathogène. Dans le cas où cette même souche était utilisée pour une production mais cette fois-ci avec du perméat de lait comme source de carbone, une productivité maximale de $33.5 \text{ mM}\cdot\text{h}^{-1}$ ($2.95 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) de diols était produite. Il existe probablement des enzymes ayant de propriétés encore plus avantageuses que celles utilisées dans cette étude. Des criblages de séquences représentant toute la diversité de ces enzymes auraient une forte chance d'améliorer la production de diols de manière significative. Des études supplémentaires seront nécessaires pour fournir cette information.

Il aurait pu être intéressant d'observer l'expression de l'opéron *budABC* par une intégration sur le chromosome ou même via un plasmide mais dans les deux cas, sous le contrôle d'un promoteur inductible. Ainsi, l'énergie nécessaire à la production de diols aurait pu être utilisée pour la croissance de la bactérie et donc, une concentration maximale bactérienne aurait été obtenue beaucoup plus rapidement. Par la suite, l'induction aurait redirigé toute l'énergie vers la voie *budABC* car la phase de croissance aurait été avancée. Ce faisant, cette production de diols en deux étapes aurait fait réduire le temps total de fermentation, ce qui est recherché en industrie. Il aurait cependant été nécessaire d'identifier un promoteur inductible performant répondant bien aux conditions retrouvées dans les fermentations. L'utilisation d'un promoteur inductible par le lactose, dont la concentration est importante dans le perméat, aurait représenté une avenue intéressante. L'un des promoteurs qui pourraient remplir ces conditions est celui du gène *lacZ* chez *E. coli* et qui est justement l'un des plus étudiés depuis plusieurs décennies. Les manipulations génétiques qui seraient requises pour modifier le promoteur de l'opéron *budABC* sont relativement simples et une comparaison des résultats avec un promoteur constitutif pourrait être réalisée dans une prochaine étude.

Avec la demande grandissante en produits laitiers, il est aisé de constater qu'il y aura de plus en plus de déchets de cette industrie qui seront disponibles pour être revalorisés. L'utilisation de la biologie synthétique couplée au génie métabolique pourrait amener une avenue intéressante pour la production de molécules d'intérêt commercial. Des recherches plus poussées pourraient mener à une solution peu coûteuse et environnementalement intéressante pour l'industrie laitière, en permettant par exemple des biocarburants ou des molécules biosourcées à la base de divers processus de production. De manière similaire, plusieurs autres résidus industriels pourraient être exploités et une panoplie de molécules pourraient être obtenues. Ce type d'approche promet donc de jouer un rôle important dans l'économie du futur en fournissant des molécules de manière plus socialement et environnementalement responsable.

La production du 2,3BD via l'industrie pétrochimique est importante mais elle n'est pas encore véritablement concurrencée par des procédés biologiques pour plusieurs raisons; le matériel de base demeure dispendieux par rapport au profit potentiel (MPS trop élevé) et les techniques de production, de séparation et de purification ont dans ce contexte une efficacité moindre que dans l'industrie pétrochimique. Il semble toutefois y avoir un potentiel intéressant des procédés biologiques pour la production d'isomères purifiés du 2,3BD. En effet, ces isomères, bien que toujours difficiles à produire efficacement, ont une valeur très différente du produit brut. A titre comparatif, la compagnie Sigma-Aldrich vend le 2,3BD 1820\$/kg, le (2R,3R)BD 64 800\$/kg, le (2S,3S)BD 156 000\$/kg et le (2R,3S)BD 30 100\$/kg. Ces prix exorbitants peuvent freiner l'utilisation de ces isomères dans des procédés industriels et c'est pourquoi des approches biologiques pourraient s'avérer intéressantes d'un point de vue économique. Dans ce sens, la compagnie Gs Caltex, a lancé en 2019 une initiative afin de construire une usine de fabrication de 2,3BD utilisant des procédés biologiques avec une capacité de 300 tonnes par année (GS Caltex).

Seq_Mod 721 TTACAGGCTAATTACATCCCAGCAACCTTGATGCCGCGATTGCAGCGTAGAAAATAA 780

Alignement de séquences en acides aminés du gène *budB* entre le type sauvage (Seq_WT) et la version ayant subi une adaptation de codons (Seq_Mod) incluant l'ajout de codons rares en 5' du gène (en rouge).

Longueur : 780pb

Intervalle: 1 à 780

Pointage	Identité	Positifs	Troué
629 bits(1368)	260/260(100%)	260/260(100%)	0/260(0%)
Seq_WT 1	MMHSSACDCEASLCETLRGFSAKHPDSVIYQTSLSMALLSGVYEGDTTIADLLAHGDFGL	180	
	MMHSSACDCEASLCETLRGFSAKHPDSVIYQTSLSMALLSGVYEGDTTIADLLAHGDFGL		
Seq_Mod 1	MMHSSACDCEASLCETLRGFSAKHPDSVIYQTSLSMALLSGVYEGDTTIADLLAHGDFGL	180	
Seq_WT 181	GTFNELDGEMIAFSSQVYQLRADGSARAAKPEQKTPFAVMTWFQPQYRKTFDAPVSRQQI	360	
	GTFNELDGEMIAFSSQVYQLRADGSARAAKPEQKTPFAVMTWFQPQYRKTFDAPVSRQQI		
Seq_Mod 181	GTFNELDGEMIAFSSQVYQLRADGSARAAKPEQKTPFAVMTWFQPQYRKTFDAPVSRQQI	360	
Seq_WT 361	HDVIDQQIPSDNLFALRIDGNFRHAHTRTVPRQTPPYRAMTDVLDQPVFRFNQREGVL	540	
	HDVIDQQIPSDNLFALRIDGNFRHAHTRTVPRQTPPYRAMTDVLDQPVFRFNQREGVL		
Seq_Mod 361	HDVIDQQIPSDNLFALRIDGNFRHAHTRTVPRQTPPYRAMTDVLDQPVFRFNQREGVL	540	
Seq_WT 541	VGFRTPQHMQGINVAGYHEHFITDDRQGGGHLLDYQLESGVLTFGGEIHKLMIDLPAIDSAF	720	
	VGFRTPQHMQGINVAGYHEHFITDDRQGGGHLLDYQLESGVLTFGGEIHKLMIDLPAIDSAF		
Seq_Mod 541	VGFRTPQHMQGINVAGYHEHFITDDRQGGGHLLDYQLESGVLTFGGEIHKLMIDLPAIDSAF	720	
Seq_WT 721	LQANLHPSNLDAAIRSVEN*	780	
	LQANLHPSNLDAAIRSVEN*		
Seq_Mod 721	LQANLHPSNLDAAIRSVEN*	780	

Gène : α -acétolactate décarboxylase (*budA*)

Alignement de séquences en nucléotides du gène *budA* entre le type sauvage (Seq__WT) et la version ayant subi une adaptation de codons (Seq_Mod) incluant l'ajout de codons rares en 5' du gène (en rouge).

Longueur : 1680pb

Intervalle: 1 à 1680

Pointage	Identité	Troué
1292 bits(1432)	1297/1683(77%)	6/1683(0%)
Seq__WT 1	ATGAACAGTGAGAAACAGTCACGTCAGTGGGCGCATGGCGCCGATATGGTTGTAGGTCAA	60
Seq_Mod 1	ATGAACTCAGAAAGCAGAGTCGTCATGGGCGCACGGTGCCGATATGGTAGTCGGCCAG	60
Seq__WT 61	CTGGAAGCGCAGGGCGTGAAGCAGGTGTTCCGGATCCCGGGGGCGAAAATCGACAAAGTC	120
Seq_Mod 61	CTCGAGGCCCAAGGAGTTAAACAGGTTTTTGGGATTCCGGGTGCGAAAATTGACAAAGTA	120
Seq__WT 121	TTGACTCCCTGCTGGACTCCTCCATTGAGATCATCCCCGTACGCCACGAGGCAAACGCG	180
Seq_Mod 121	TTTGACAGTCTGCTGGATTCAATTTAGATTATCCCGGTCCGTCATGAAGCGAACGCA	180
Seq__WT 181	GCGTTCATGGCGCGGCGGTAGGGCGCCTGACCGCAAAGCCGGGTGGCGCTGGTCACC	240
Seq_Mod 181	GCCTTCATGGCAGCCGCTGTGGGCCGCTGACAGGGAAGCGGGAGTGGCGCTGGTGACG	240
Seq__WT 241	TCCGGCCCGGGTGTTC AACCTGATCACCGGTATCGCCACCGCCAACAGCGAAGGCGAC	300
Seq_Mod 241	AGTGGTCCCGTTGCTCCAACCTAATTACCGGTATTGCAACCGCCAACAGTGAGGGGGAT	300
Seq__WT 301	CCGGTGGTGGCGCTGGGCGGGGCGGTGAAGCGGGCGGATAAAGCCAAGCTGGTGACCAG	360


```

Seq_Mod 1438 GTTGCATCCAGGAAGAGAAAAAATACCAGCGTCTGAGTGGCGTGGCCTTTGGTCTGT 1497

Seq__WT 1498 GACTTCAAAGCCTATGCCGACGCCTTTGGCGCCAGGGGCTTTGCCGTGGAGAGCGCCGAT 1557
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Seq_Mod 1498 GACTTCAAAGCGTACGCCGACGCTTTCGGGGCGCGTGGTTTCGCTGTGGAATCAGCCGAC 1557

Seq__WT 1558 GCCCTTGAATCGACGCTGCGTGCGGCGATGGATGTGAATGGCCCGGCCGTGGTGGCCATT 1617
          || | || ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Seq_Mod 1558 GCATTGGAGTCGACCTTGCGCGCAGCCATGGATGTCAACGGCCCTGCCGTTGTTGCAATT 1617

Seq__WT 1618 CCCGTTGACTACAGCGATAACCCGCTGCTGATGGGCCAGCTCCATCTCAGCCAGATTTTG 1677
          || || || ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Seq_Mod 1618 CCGGTCGATTACAGTGATAACCCTCTGTTGATGGGTCAGCTGCACCTCTCACAAATTTTG 1677

Seq__WT 1678 TGA 1680
          |||
Seq_Mod 1678 TGA 1680

```

Alignement de séquences en acides aminés du gène *budA* entre le type sauvage (Seq_WT) et la version ayant subi une adaptation de codons (Seq_Mod) incluant l'ajout de codons rares en 5' du gène (en rouge).

Longueur: 1680pb

Intervalle: 1 à 1680_____

Pointage	Identité	Positifs	Troué
1262 bits(2750)	560/560(100%)	560/560(100%)	0/560(0%)
Seq__WT 1	MN SEK QSRQWAHGADMVVGQLEAQGVKQVFGIPGAKIDKVFDSLDDSSIEIIPVRHEANA	180	
	MN SEK QSRQWAHGADMVVGQLEAQGVKQVFGIPGAKIDKVFDSLDDSSIEIIPVRHEANA		
Seq_Mod 1	MN SEK QSRQWAHGADMVVGQLEAQGVKQVFGIPGAKIDKVFDSLDDSSIEIIPVRHEANA	180	
Seq__WT 181	AFMAAAVGRLTGKAGVALVTSGPGCNLTGTIATANSEGDPVVALGGAVKRADKAKLVHQ	360	
	AFMAAAVGRLTGKAGVALVTSGPGCNLTGTIATANSEGDPVVALGGAVKRADKAKLVHQ		
Seq_Mod 181	AFMAAAVGRLTGKAGVALVTSGPGCNLTGTIATANSEGDPVVALGGAVKRADKAKLVHQ	360	
Seq__WT 361	SMDTVAMFSPVTKYAVEVSSPDAIAEVVSNAFRAAEHGRPGGAFVSLPQDIVDQPATGAI	540	
	SMDTVAMFSPVTKYAVEVSSPDAIAEVVSNAFRAAEHGRPGGAFVSLPQDIVDQPATGAI		
Seq_Mod 361	SMDTVAMFSPVTKYAVEVSSPDAIAEVVSNAFRAAEHGRPGGAFVSLPQDIVDQPATGAI	540	
Seq__WT 541	LPASGPALMGPAPEASAINDVAKLIDNAKNPVILLGLMASQPANSAALRKLEKSRIPVTS	720	
	LPASGPALMGPAPEASAINDVAKLIDNAKNPVILLGLMASQPANSAALRKLEKSRIPVTS		
Seq_Mod 541	LPASGPALMGPAPEASAINDVAKLIDNAKNPVILLGLMASQPANSAALRKLEKSRIPVTS	720	
Seq__WT 721	TYQAAGAVNQEHFTRFAGRVGLFNNQAGDRLLHLADLIICIGYSPVEYEPSMWNSSGDTL	900	
	TYQAAGAVNQEHFTRFAGRVGLFNNQAGDRLLHLADLIICIGYSPVEYEPSMWNSSGDTL		
Seq_Mod 721	TYQAAGAVNQEHFTRFAGRVGLFNNQAGDRLLHLADLIICIGYSPVEYEPSMWNSSGDTL	900	
Seq__WT 901	VHIDVLPAYEERNYVPDIELVGDIAATLNLLASRIDHKLELSQRASEILVdrqhqrddlld	1080	
	VHIDVLPAYEERNYVPDIELVGDIAATLNLLASRIDHKLELSQRASEILVDRQHQRDILLD		
Seq_Mod 901	VHIDVLPAYEERNYVPDIELVGDIAATLNLLASRIDHKLELSQRASEILVDRQHQRDILLD	1080	
Seq__WT 1081	rrGASLNQFALHPLRIVRAMQDIVNNDVTLTVDMGSFHIWIARYLYSFRARQVMISNGQQ	1260	

		RRGASLNQFALHPLRIVRAMQDIVNNDVTLTVDMGSFHIWIARYLYSFRARQVMISNGQQ	
Seq_Mod	1081	RRGASLNQFALHPLRIVRAMQDIVNNDVTLTVDMGSFHIWIARYLYSFRARQVMISNGQQ	1260
Seq__WT	1261	TMGVALPWAIGAWLVNPNPGRKVVSVSGDGGFLQSSMELETAVRLNANVLHIIWVDNGYNMV	1440
		TMGVALPWAIGAWLVNPNPGRKVVSVSGDGGFLQSSMELETAVRLNANVLHIIWVDNGYNMV	
Seq_Mod	1261	TMGVALPWAIGAWLVNPNPGRKVVSVSGDGGFLQSSMELETAVRLNANVLHIIWVDNGYNMV	1440
Seq__WT	1441	AIQEEKKYQRLSGVAFGPVDFKAYADAFGARGFAVESADALESTLRAAMDVNGPAVVAIP	1620
		AIQEEKKYQRLSGVAFGPVDFKAYADAFGARGFAVESADALESTLRAAMDVNGPAVVAIP	
Seq_Mod	1441	AIQEEKKYQRLSGVAFGPVDFKAYADAFGARGFAVESADALESTLRAAMDVNGPAVVAIP	1620
Seq__WT	1621	VDYSDNPLLMGQLHLSQIL*	1680
		VDYSDNPLLMGQLHLSQIL*	
Seq_Mod	1621	VDYSDNPLLMGQLHLSQIL*	1680

Alignement de séquences en acides aminés du gène *budC* entre le type sauvage (Seq__WT) et la version ayant subi une adaptation de codon (Seq_Mod) incluant l'ajout de codons rare en 5' du gène (en rouge).

Longueur: 771pb

Intervalle: 1 à 257

Pointage	Identité	Positifs	Troué
520 bits(1340)	257/257(100%)	257/257(100%)	0/257(0%)
Seq__WT 1	MQKVALVTGSGQGIGKAIALRLVKDGFVAVAIADYNDETARAVADEIIRNGGNAVAVKVDV	60	
	MQKVALVTGSGQGIGKAIALRLVKDGFVAVAIADYNDETARAVADEIIRNGGNAVAVKVDV		
Seq_Mod 1	MQKVALVTGSGQGIGKAIALRLVKDGFVAVAIADYNDETARAVADEIIRNGGNAVAVKVDV	60	
Seq__WT 61	SDRDQVFAAVEKARTALGGFNIVNNAGIAPSTPIESITPEIVDKVYNINVKGVIWGMQA	120	
	SDRDQVFAAVEKARTALGGFNIVNNAGIAPSTPIESITPEIVDKVYNINVKGVIWGMQA		
Seq_Mod 61	SDRDQVFAAVEKARTALGGFNIVNNAGIAPSTPIESITPEIVDKVYNINVKGVIWGMQA	120	
Seq__WT 121	AIDAFRKEGHGGKIINACSQAGHTGNPELAVYSSSKFAVRGLTQTAARDLAPLGITVNAY	180	
	AIDAFRKEGHGGKIINACSQAGHTGNPELAVYSSSKFAVRGLTQTAARDLAPLGITVNAY		
Seq_Mod 121	AIDAFRKEGHGGKIINACSQAGHTGNPELAVYSSSKFAVRGLTQTAARDLAPLGITVNAY	180	
Seq__WT 181	CPGIVKTPMWAEIDRQVSEAAGKPLGYGTETFAKRITLGRLSEPEDVAACVSYLAGPDS	240	
	CPGIVKTPMWAEIDRQVSEAAGKPLGYGTETFAKRITLGRLSEPEDVAACVSYLAGPDS		
Seq_Mod 181	CPGIVKTPMWAEIDRQVSEAAGKPLGYGTETFAKRITLGRLSEPEDVAACVSYLAGPDS	240	
Seq__WT 241	YMTGQSLIDGGMVFN* 257		
	YMTGQSLIDGGMVFN*		
Seq_Mod 241	YMTGQSLIDGGMVFN* 257		

BIBLIOGRAPHIE

Atsumi, S., Cann, A.F., Connor, M.R., Shen, C.R., Smith, K.M., Brynildsen, M.P., Chou, K.J.Y., Hanai, T., and Liao, J.C. (2008). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol production. *Metab. Eng.* *10*, 305–311.

Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K.A., Tomita, M., Wanner, B.L., and Mori, H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* *2*, 2006.0008.

Baez, A., Cho, K.-M., and Liao, J.C. (2011). High-flux isobutanol production using engineered *Escherichia coli*: a bioreactor study with in situ product removal. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *90*, 1681–1690.

Blattner, F.R., Blattner, F.R., Iii, G.P., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., et al. (2010). The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12. *1453*.

BP Global (2020). Statistical Review of World Energy | Energy economics. *In* BP Global. <http://www.bp.com/en/global/corporate/energy-economics/statistical-review-of-world-energy.html> (Page consultée le 22 mars 2020).

Case, R.J., Boucher, Y., Dahllöf, I., Holmström, C., Doolittle, W.F., and Kjelleberg, S. (2007). Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Appl. Environ. Microbiol.* *73*, 278–288.

Celińska, E., and Grajek, W. (2009). Biotechnological production of 2,3-butanediol-Current state and prospects. *Biotechnol. Adv.* *27*, 715–725.

Cui, L., Priest, D. G., Endy, D., Dodd, I. B. & Shearwin, K. (2013) One-step cloning and chromosomal integration of DNA. *ACS Synthetic Biology* *2(9)* 537-541

Curezone (2012). Acetaldehyde and the NAD⁺/NADH redox state. *In* Curezone. <https://www.curezone.org/blogs/fm.asp?i=2004103> (Page consultée le 19 février 2020).

Datsenko, K. a, and Wanner, B.L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 6640–6645.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (s.d.) Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine - Lactosérum. In FAO, *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. <http://www.fao.org/docrep/t4280f/T4280F0h.htm> (Page consultée le 19 février 2020).

Gastronomiac (s.d.) Lactosérum. In Gastronomiac. https://www.gastronomiac.com/ustensiles_et_vocabu/lactoserum/ (Page consultée le 19 février 2020).

Gibson, D.G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J.C., Hutchison, C.A., and Smith, H.O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat. Methods* 6, 343–345.

Goodman, D.B., Church, G.M., and Kosuri, S. (2013). Causes and effects of N-terminal codon bias in bacterial genes. *Science* 342, 475–479.

GS Caltex (s.d.) Business overview. In GS Caltex *Research and development*. <https://www.gscaltex.com/en/Business/RnD/EcoChemicalsBio> (Page consultée le 15 mai 2021).

Hakizimana, O., Matabaro, E., and Lee, B.H. (2020). The current strategies and parameters for the enhanced microbial production of 2,3-butanediol. *Biotechnol. Reports* 25, e00397.

Ji, X.J., Huang, H., and Ouyang, P.K. (2011). Microbial 2,3-butanediol production: A state-of-the-art review. *Biotechnol. Adv.* 29, 351–364.

Kalnins, A., Otto, K., Rütther, U., and Müller-Hill, B. (1983). Sequence of the lacZ gene of *Escherichia coli*. *EMBO J.* 2, 593–597.

Koutinas, A.A., Yopez, B., Kopsahelis, N., Freire, D.M.G., de Castro, A.M., Papanikolaou, S., and Kookos, I.K. (2016). Techno-economic evaluation of a complete bioprocess for 2,3-butanediol production from renewable resources. *Bioresour. Technol.* 204, 55–64.

Krivoruchko, A., Zhang, Y., Siewers, V., Chen, Y., and Nielsen, J. (2015). Microbial acetyl-CoA metabolism and metabolic engineering. *Metab. Eng.* 28, 28–42.

Li, L., Li, K., Wang, Y., Chen, C., Xu, Y., Zhang, L., Han, B., Gao, C., Tao, F., Ma, C., et al. (2015). Metabolic engineering of *Enterobacter cloacae* for high-yield production of enantiopure (2R,3R)-2,3-butanediol from lignocellulose-derived sugars. *Metab. Eng.* 28, 19–

27.

May, A., Fischer, R.-J., Maria Thum, S., Schaffer, S., Verseck, S., Dürre, P., and Bahl, H. (2013). A modified pathway for the production of acetone in *Escherichia coli*. *Metab. Eng.* *15*, 218–225.

Mazumdar, S., Lee, J., and Oh, M.-K. (2013). Microbial production of 2,3 butanediol from seaweed hydrolysate using metabolically engineered *Escherichia coli*. *Bioresour. Technol.* *136*, 329–336.

Microbiology info (2018). Krebs (Citric Acid) Cycle Steps by Steps Explanation. *In* Microbiology info. <https://microbiologyinfo.com/krebs-citric-acid-cycle-steps-by-steps-explanation/> (Page consultée le 19 février 2020).

MIT News (2012) Teaching a microbe to make fuel. *In* MIT News. <http://news.mit.edu/2012/genetically-modified-organism-can-turn-carbon-dioxide-into-fuel-0821> (Page consultée le 22 mars 2020).

Mutalik, V.K., Guimaraes, J.C., Cambray, G., Lam, C., Christoffersen, M.J., Mai, Q.-A., Tran, A.B., Paull, M., Keasling, J.D., Arkin, A.P., et al. (2013). Precise and reliable gene expression via standard transcription and translation initiation elements. *Nat. Methods* *10*, 354–360.

Park, S.-Y., Kim, B., Lee, S., Oh, M., Won, J.-I., and Lee, J. (2014). Increased 2,3-butanediol production by changing codon usages in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 1–6.

Passion culinaire (2019). Les étapes de la fabrication du fromage. *In* Passion culinaire. <http://www.passionculinaire.fr/dossier-fromage-fabrication> (Page consultée le 19 février 2020).

Plotkin, J.B., and Kudla, G. (2011). Synonymous but not the same: the causes and consequences of codon bias. *Nat. Rev. Genet.* *12*, 32–42.

PHYS (2016). Engineered bacterium inhales carbon dioxide and hydrogen and excretes fuel alcohols. *In* PHYS. <https://phys.org/news/2016-05-bacterium-inhales-carbon-dioxide-hydrogen.html> (Page consultée le 30 mars 2020).

Rice University (2013). Modified bacteria turn waste into fat for fuel *In* Rice University News and Media Relations. <https://news.rice.edu/2013/02/28/modified-bacteria-turn-waste-into-fat-for-fuel/> (Page consultée le 22 mars 2020).

SDSU (San Diego State University) (2002) Codon usage in *E. coli*. *In* SDSU *San Diego State*

University. <http://www.sci.sdsu.edu/~smaloy/MicrobialGenetics/topics/in-vitro-genetics/codon-usage.html> (Page consultée le 19 février 2020).

Sezonov, G., Joseleau-Petit, D., and D'Ari, R. (2007). Escherichia coli physiology in Luria-Bertani broth. *J. Bacteriol.* 189, 8746–8749.

Soma, Y., Tsuruno, K., Wada, M., Yokota, A., and Hanai, T. (2014). Metabolic flux redirection from a central metabolic pathway toward a synthetic pathway using a metabolic toggle switch. *Metab. Eng.* 23, 175–184.

St-Pierre, F., Cui, L., Priest, D.G., Endy, D., Dodd, I.B., and Shearwin, K.E. (2013). One-Step Cloning and Chromosomal Integration of DNA. *ACS Synth. Biol.* 2, 537–541.

Statista (2021) Market value of biofuels worldwide in 2019 and 2024. *In* Statista. <https://www.statista.com/statistics/217179/global-biofuels-market-size/> (Page consultée le 15 mai 2021).

Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and D.J.L. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.

Symphony environmental (2020). Plastic made with Symphony's D2P proved to kill Coronavirus within one hour of contact. *In* Symphony environmental. <https://www.symphonyenvironmental.com/fr/resource/21373-2/> (Page consultée le 15 mai 2021).

Transparency (s.d.) 2,3-Butanediol Market. *In* Transparency Market Research. <https://www.transparencymarketresearch.com/2-3-butanediol-market.html> (Page consultée le 30 mars 2020).

Tuwien (s.d.). Combination of protein and strain engineering to obtain an active and stable HRP variant with reduced surface glycosylation. *In* Tuwien Icebe imagineering nature. https://www.vt.tuwien.ac.at/biochemical_engineering/integrated_bioprocess_development/project_archive/solving_the_energy_crisis_in_synthetic_biology_nadh_dehydrogenases_from_methanothermobacter_marburgensis/?L=366 (Page consultée le 19 février 2020).

Wang, Y., Tao, F., and Xu, P. (2014). Glycerol dehydrogenase plays a dual role in glycerol metabolism and 2,3-butanediol formation in Klebsiella pneumoniae. *J. Biol. Chem.* 289, 6080–6090.

Xu, Y., Chu, H., Gao, C., Tao, F., Zhou, Z., Li, K., Li, L., Ma, C., and Xu, P. (2014). Systematic metabolic engineering of *Escherichia coli* for high-yield production of fuel biochemical 2,3-butanediol. *Metab. Eng.* 23C, 22–33.

Yang, J., Nie, Q., Ren, M., Feng, H., Jiang, X., Zheng, Y., Liu, M., Zhang, H., and Xian, M. (2013). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the biosynthesis of alpha-pinene. *Biotechnol. Biofuels* 6, 60.

Yomano, L.P., York, S.W., and Ingram, L.O. (1998). Isolation and characterization of ethanol-tolerant mutants of *Escherichia coli* KO11 for fuel ethanol production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 20, 132–138.

Zheng, Y., Liu, Q., Li, L., Qin, W., Yang, J., Zhang, H., Jiang, X., Cheng, T., Liu, W., Xu, X., et al. (2013). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for high-specificity production of isoprenol and prenol as next generation of biofuels. *Biotechnol. Biofuels* 6, 57.

