



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Institut National des Sciences Appliquées
Discipline ou spécialité : Ingénierie Microbienne et Enzymatique

Présentée et soutenue par Julien PAGLIARDINI
Le 9 juillet 2010

Titre : Optimisation du rendement de production de bioéthanol chez *Saccharomyces cerevisiae* par minimisation de la synthèse du glycérol : Approche intégrée de génie métabolique et microbiologique

JURY

BEAL Catherine, Professeur, AgroParisTech (Rapporteur)
RIGOULET Michel, Professeur, Université Victor Ségalen, Bordeaux (Rapporteur)
CAMARASA Carole, Chargée de recherche, INRA UMR 1083, Montpellier (Examinatrice)
URIBELARREA Jean-Louis, Professeur, INSA Toulouse (Président)
BIDEAUX Carine, Ingénieur de recherche, INSA Toulouse (Directrice de thèse)
GUILLOUET Stéphane, Maître de Conférences, INSA Toulouse (Directeur de thèse)

Ecole doctorale : *Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Biologiques (SEVAB)*
Unité de recherche : *Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés*
Directeur(s) de Thèse : *Dr Stéphane GUILLOUET et Dr Carine BIDEAUX*
Rapporteurs : *Pr Catherine BEAL et Pr Michel RIGOULET*

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les Professeurs Catherine Béal et Michel Rigoulet d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ces travaux.

Je remercie le Professeur Jean-Louis Uribelarrea d'avoir accepté de présider mon jury de thèse. Je remercie également le Docteur Carole Camarasa d'avoir accepté de participer au jury de thèse.

Je remercie particulièrement les Docteurs Stéphane Guillouet et Carine Bideaux, qui ont proposé et dirigé ces travaux. Leur encadrement scientifique et technique, leur aide, leur soutien et leur investissement m'ont permis de progresser et de surmonter les difficultés rencontrées au cours de cette thèse.

Je remercie le Professeur Nicholas Lindley de m'avoir accueilli au sein du Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés et le Professeur Carole Jouve pour m'avoir accueilli au sein de l'équipe de génie microbiologique.

Je remercie l'équipe du Professeur Elke Nevoigt, qui a rendu possible ces travaux grâce à son expertise en génie génétique. J'adresse un merci tout particulier à Georg Hubmann pour la construction des souches utilisées lors de ces travaux de thèse ainsi que pour la grande qualité de son travail, son investissement, son enthousiasme et sa bonne humeur tout au long de son passage au LISBP.

Je remercie aussi le Docteur Sandrine Alfenore pour sa contribution scientifique à ces travaux.

Je remercie DANISCO ainsi que l'ADEME, et plus particulièrement son représentant Léonard Boniface, pour avoir financé mes travaux.

Je tiens à remercier l'ensemble du personnel du LISBP pour son accueil chaleureux. Je remercie tout particulièrement l'ensemble des permanents de l'équipe de génie microbiologique pour leur aide et leur support technique et scientifique, ainsi que pour leur convivialité au quotidien.

Je remercie tous mes collègues doctorants et post-doctorants avec qui j'ai pu passer d'excellents moments lors de ces trois années de thèse : Claire, Sandra, Romain, Jan, Julien, David, Yuri, Bérangère, Siri-Schaï, Nazhia, Lamia, Estelle, Mathieu, Nathalie, Jillian... et tous les autres. Je tiens à exprimer toute ma gratitude à tous ceux qui m'ont apporté un support logistique pour me permettre de mener à bien ces travaux, et notamment Yannick, Grégory, Séverine, Lionel, Emilie et Julie.

Enfin, je remercie ma famille pour son soutien tout au long de mes longues études, leur respect envers mes choix et leur appui lors de la rédaction de ce mémoire.

Nom : PAGLIARDINI

Prénom : Julien

Titre : "Optimisation du rendement de production de bioéthanol chez *Saccharomyces cerevisiae* par minimisation de la synthèse du glycérol : approche intégrée de génie métabolique et microbiologique "

Année : 2010

Lieu : INSA Toulouse

Résumé :

Ces travaux visaient à étudier la possibilité de réduire la production de glycérol chez *Saccharomyces cerevisiae*, afin d'améliorer le rendement éthanol, tout en préservant les capacités de croissance et de production des levures. La production minimale de glycérol nécessaire à la croissance a été déterminée à l'aide d'un modèle de calcul des flux métaboliques. Des souches présentant une activité des enzymes de la voie de production du glycérol modulée, afin de s'approcher au plus près de l'activité minimale nécessaire estimée *in silico*, ont été utilisées.

Cette stratégie d'ajustement de l'activité de la voie de synthèse du glycérol a permis, en condition aérobie, de réduire de 88 % le rendement glycérol et d'améliorer le rendement éthanol de 4,7 % sans modifier la tolérance des mutants à l'éthanol, mais au détriment de la vitesse spécifique de croissance, légèrement réduite. En condition anaérobie, une diminution de 61 % du rendement glycérol et une amélioration de 7 % du rendement éthanol ont pu être obtenues, mais au détriment de la vitesse spécifique de croissance, qui subit une sévère diminution, et de la tolérance à l'éthanol, qui est réduite.

L'analyse fine des résultats, grâce à un modèle métabolique, a permis de mettre en évidence, chez les souches mutantes, un besoin accru en énergie, interprété comme la traduction d'une plus grande difficulté à gérer le stress du procédé et une réorganisation du métabolisme oxydo-réductif, interprétée comme l'impact de la réduction du glycérol sur les voies de réoxydation du cofacteur NADH dans les cellules.

Ces résultats ont permis de valider la pertinence de la stratégie de réajustement des flux métaboliques, assistée par modélisation stoechiométrique pour l'amélioration des souches, mais aussi d'accroître la compréhension du rôle physiologique du glycérol et son intégration au métabolisme cellulaire.

Mots clefs :

Saccharomyces cerevisiae, Amélioration du rendement, Glycérol, Ethanol, Ajustement Métabolique, Modélisation Métabolique, Ingénierie Métabolique, Fed-batch, Acides Organiques

Name : PAGLIARDINI

Firts-Name : Julien

Title : Improvement of *Saccharomyces cerevisiae* bioethanol yield through minimization of glycerol yield: Microbiologic and Metabolic engineering integrative approach

Year : 2010

Place : INSA Toulouse

Abstract :

This work aimed to assess the possibility of reducing *Saccharomyces cerevisiae's* glycerol production, in order to improve ethanol yield, without altering the abilities of yeasts to grow and produce ethanol. Minimum glycerol production required for growth was found, thanks to a metabolic flux calculation model. Strains showing a fine tuned activity in the glycerol synthesis pathway enzymes were used, to get close to the minimum activity established *in silico*.

This fine tuning strategy lead, in aerobiosis, to a 88 % glycerol yield decrease together with a 4.7 % ethanol yield increase, with no reduction of mutants'ethanol tolerance, but there is a slight decrease of the growth rate. In anaerobiosis, a 61 % glycerol yield decrease, together with a 7 % ethanol yield increase were obtained, but mutant strains suffered of a sharp growth rate reduction and a decrease in their ethanol tolerance.

A close analysis of the results, with the help of a metabolic model, highlighted both an increase of mutants' energy requirements, interpreted as an increased difficulty to cope with osmotic stress, and a reorganisation of their oxydo-reductive metabolism, interpreted as glycerol reduction's impact on the NADH cofactor reoxydation pathway.

These results validated the relevance of metabolic fine-tuning, assisted with *in silico* stoichiometric model for strains improvement and they increased the understanding of the integration of glycerol in cell metabolism as well as its physiological role.

Key words :

Saccharomyces cerevisiae, Yield Improvement, Glycerol, Ethanol, Fine-Tuning, Metabolic Modelling, Metabolic Engineering, Fed-batch, Organic Acids

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	20
Chapitre I : Bibliographie.....	24
<i>I.1 Généralités.....</i>	<i>24</i>
I.1.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24
I.1.2 Métabolisme général	25
I.1.3 Métabolisme du glycérol	28
<i>I.2 Implication du glycérol dans l'équilibre oxydo-réductif.....</i>	<i>34</i>
I.2.1 Condition anaérobie, métabolisme fermentaire	34
I.2.2 Condition aérobie (métabolismes oxydatif et oxydo-réductif)	35
<i>I.3 Implication du glycérol dans la réponse au stress.....</i>	<i>37</i>
I.3.1 Réponse générale au stress	38
I.3.2 Réponse au stress osmotique	38
I.3.3 Réponse au stress éthanol	43
I.3.4 Réponse au stress thermique	45
<i>I.4 Métabolisme et impact physiologique des acides organiques.....</i>	<i>46</i>
I.4.1 Métabolisme des acides organiques	47
I.4.2 Lien entre le métabolisme du glycérol et des acides organiques	49
I.4.3 Accumulation intracellulaire des acides organiques	50
I.4.4 Effet toxique des acides organiques	53
<i>I.5 Réduction de la production de glycérol en fermentation éthanolique.....</i>	<i>55</i>
I.5.1 Performance de la fermentation éthanolique	55
I.5.2 Approche de génie microbiologique	56
I.5.3 Approche de génie métabolique	57

Chapitre II : Matériel et Méthodes 68

II.1 Expérimentation.....68

II.1.1 Souches et milieu de culture 68

II.1.2 Cultures en réacteur 70

II.1.3 Méthodes Analytiques 71

II.1.4 Analyse des gaz 75

II.1.5 Evaluation de l'éthanol évaporé 75

II.1.6 Traitement des données 77

II.2 Modélisation métabolique.....78

II.2.1 Introduction 78

II.2.2 Sélection des réactions métaboliques 78

II.2.3 Mise sous forme mathématique et résolution 79

II.2.4 Modèle métabolique 81

Chapitre III : Caractérisation du métabolisme de la souche sauvage en conditions aérobie et anaérobie 82

III.1 Paramètres des fermentations.....82

III.2 Paramètres cinétiques des fermentations.....85

III.3 Rendement de fermentation87

III.4 Viabilité et résistance au stress.....89

III.5 Reproductibilité des fermentations 91

III.6 Conclusion:93

Chapitre IV : Définition de la stratégie d'ingénierie métabolique..... 94

IV.1 Adaptation du réseau métabolique existant.....95

IV.1.1 Construction du réseau métabolique "a priori" à partir de la bibliographie 95

IV.1.2 Etablissement des réseaux métaboliques 101

IV.2 Adaptation aux conditions anaérobies..... 102

IV.2.1 Phosphorylation oxydative	103
IV.2.2 Oxygène Moléculaire	103
IV.2.3 Synthèse des acides gras	104
IV.2.4 Orientation du cycle de Krebs	104
IV.2.5 Navette Ethanol	105
IV.2.6 Etablissement des modèles	106
IV.3 Validation en condition aérobie	107
IV.3.1 Méthode de validation	107
IV.3.2 Résultats:	108
IV.3.3 Utilisation du modèle sélectionné pour l'analyse des résultats de la fermentation de la souche sauvage en condition aérobie	112
IV.4 Validation en condition anaérobie	112
IV.4.1 Sélection du modèle en condition anaérobie	112
IV.4.2 Utilisation du modèle sélectionné pour l'analyse des résultats de la fermentation de la souche sauvage en condition anaérobie	122
IV.5 Stratégie d'ingénierie métabolique	125
IV.5.1 Calcul du flux minimum dans la voie du glycérol	125
IV.5.2 Sélection des promoteurs et construction des souches mutantes	127
IV.5.3 Construction des mutants	128
Chapitre V : Analyse de l'impact de la régulation fine du glycérol en condition aérobie	129
V.1 Résumé	129
V.2 Publication: Quantitative evaluation of yeast's requirement for glycerol formation in very high ethanol performance fed-batch process	130
V.2.1 Abstract	130
V.2.2 Background	132
V.2.3 Methods	134
V.2.4 Results	140

V.2.5 Discussion 148

V.2.6 Conclusions 153

Chapitre VI : Analyse de l'impact de la régulation fine en condition anaérobie.....154

VI.1 Résumé..... 154

VI.2 Publication : "Use of fine-tuning metabolic engineering for improvement of ethanol yield and minimisation of glycerol yield in Saccharomyces cerevisiae anaerobiosis fermentation." 155

VI.2.1 Abstract: 155

VI.2.2 Introduction: 156

VI.2.3 Material And Method 159

VI.2.4 Results 163

VI.2.5 Discussion:168

VI.2.6 Conclusion: 177

Chapitre VII : ACIDES ORGANIQUES.....178

VII.1 Fermentation en condition aérobie..... 179

VII.2 Fermentation en condition anaérobie 182

VII.2.1 Souche sauvage 182

VII.2.2 Souches mutantes 183

VII.3 Accumulation intracellulaire des acides organiques..... 185

VII.3.1 Principe 185

VII.3.2 Limite de la théorie: 187

VII.3.3 Résultats expérimentaux 188

VII.3.4 Interprétation 189

VII.3.5 Conclusion 192

VII.4 Discussion..... 192

VII.4.1 Impact de l'ajustement de la voie de synthèse du glycérol sur la production d'acides organiques	192
VII.4.2 Reconsommation des acides organiques	194
VII.4.3 Origine de l'acide acétique	195
VII.4.4 Effet inhibiteur de l'acide acétique	197
VII.4.5 Lien entre les acides organiques et la balance redox	197
<i>VII.5 Conclusion</i>	200
DISCUSSION	202
BIBLIOGRAPHIE :	202
ANNEXES	224
<i>Réseau métabolique</i>	<i>224</i>
<i>Abbréviation</i>	<i>232</i>

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Démarche utilisée durant la thèse.....	22
Figure I-1: Chaîne respiratoire chez la levure	27
Figure I-2 Voies de synthèse du glycérol et de l'éthanol.....	29
Figure I-3 Voie de dégradation du glycérol.....	30
Figure I-4 Seconde voie de dégradation du glycérol	30
Figure I-5 Synthèse de l'acide phosphatidique à travers les voies du G3P et du DHAP	31
Figure I-6 Schéma récapitulatif du métabolisme du glycérol chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33
Figure I-7 Représentation des trois principaux modes de transfert du pouvoir réducteur du cytosol vers la mitochondrie.....	37
Figure I-8 Représentation de la voie de signalisation HOG	40
Figure I-9 Activation de la branche Sho1 de la voie HOG par le stress thermique.....	46
Figure I-10 Voies métaboliques impliquées dans la synthèse des acides organiques	48
Figure I-11 Mécanismes impliqués dans le transport et l'accumulation des acides organiques.....	51
Figure I-12 Stratégie d'ingénierie du métabolisme des cofacteurs NAD ⁺ /NADH et NADP ⁺ /NADPH.....	61
Figure I-13 Réaction catalysée par l'enzyme GAPN	64
Figure I-14 Schéma métabolique du mutant Δ fps1, Glt1 ⁺	65
Figure I-15 : Amplification des promoteurs et clonage.....	67
Figure II-1 Schéma du dispositif expérimental	71
Figure II-2 Evolution des valeurs de pression osmotique.....	74
Figure II-3 Evolution de la vitesse d'évaporation de l'éthanol.....	76
Figure III-1 Evolution des masses de glucose consommé et des masses d'éthanol, de glycérol et de biomasse produites au cours des fermentations de la souche sauvage CEN.PK113-7D en condition aérobie et anaérobie.....	83

Figure III-2 Taux de croissance et vitesse spécifique de production d'éthanol de la souche sauvage CEN.PK113-7D en fonction de la concentration en éthanol dans le milieu en condition aérobie et anaérobie.....	86
Figure III-3 Vitesse spécifique de production de glycérol en fonction du taux de croissance pour la souche sauvage CEN.PK113-7D en condition aérobie et anaérobie.....	87
Figure III-4 Bilan carbone et bilan des degrés de réduction généralisés	88
Figure III-5 Evolution de la viabilité de la biomasse en fonction de la concentration en éthanol pour la souche sauvage CEN.PK113-7D en condition aérobie et anaérobie.....	90
Figure III-6 Evolution de la viabilité et de la concentration en éthanol dans le milieu de culture en fonction de la concentration en acétate au cours de la fermentation de la souche CEN.PK-113D.	90
Figure III-7 Comparaison de l'évolution des taux de croissance et des vitesses spécifiques de production d'éthanol en fonction de la concentration en éthanol.....	92
Figure IV-1 Représentation du cycle de Krebs tel qu'il est pris en compte dans les réseaux métaboliques.....	105
Figure IV-2 : Fonctionnement des enzymes isocitrates déshydrogénases dans le modèle 2	110
Figure IV-3 Calcul de flux pour les résultats de la fermentation aérobie référence effectués avec le modèle métabolique sélectionné.....	113
Figure IV-4 Représentation des flux intracellulaires calculés avec le modèle anaérobie sélectionné pour les deux répétitions de la fermentation référence en condition anaérobie.....	124
Figure IV-5 : Représentation de la stratégie mise en place pour réorienter le flux de carbone	125
Figure IV-6 G3P incorporé à la biomasse en fonction du flux net de G3P en condition aérobie.	126
Figure IV-7 : G3P incorporé à la biomasse en fonction du flux net de G3P en condition anaérobie.	126
Figure IV-8 Caractérisation de l'activité de la collection de promoteurs	127
Figure IV-9 Voies principales de synthèse du glycérol et de l'éthanol	128
Figure 10 : Evolution of substrate and products masses along the fermentation.....	164
Figure 11 : Specific rate evolution as function of ethanol concentration	166
Figure 12 : Evolution of the viability as a function of Ethanol concentration	168

Figure 13 : Carbon and degree of reduction balance during the fermentation of the wild type strain and the two mutants.....	170
Figure 14 : Involvement of Acetate Pyruvate and succinate production in the redox metabolism under anaerobic condition.	172
Figure 15 : NADH produced by anabolism and organic acids synthesis versus NADH consumed by glycerol and succinate production in the wild type strain and the two mutants.....	173
Figure 16 : Metabolic flux repartition	175
Figure VII-1 Evolution des vitesses spécifiques de production d'acétate, de succinate, de pyruvate et d'éthanol en fonction de la vitesse spécifique de consommation de glucose, lors du ralentissement de la fermentation de la souche sauvage, en condition aérobie.	178
Figure VII-2 Evolution des masses d'acétate, de succinate, de pyruvate et de la biomasse au cours des fermentations, en condition aérobie, de la souche CEN.PK113-7D sauvage et des souches mutantes <i>TEFmut7</i> et <i>TEFmut2</i>	180
Figure VII-3 Evolution de la viabilité cellulaire et de la concentration en éthanol dans le milieu de culture, pour la souche sauvage et les souches mutantes <i>TEFmut7</i> et <i>TEFmut2</i> en fonction de la concentration en acétate pour les fermentations en condition aérobie.....	182
Figure VII-4 Evolution des masses d'acétate, de succinate et de pyruvate au cours des fermentations de la souche CEN.PK113-7D sauvage et des fermentations des souches mutantes <i>TEFmut7</i> et <i>TEFmut2</i> en condition anaérobie.	184
Figure VII-5 Evolution théorique des facteurs d'accumulation du succinate, du pyruvate et de l'acétate en fonction du pH intracellulaire, pour un pH extracellulaire régulé à 4.....	187
Figure VII-6 Evolution de la concentration d'acide acétique	189
Figure VII-7 Mécanisme pouvant permettre la diminution de la concentration intracellulaire de la forme dissociée des acides organiques.....	191
Figure VII-8 Lien entre les productions d'acides organiques et le métabolisme oxydo-réductif.	193
Figure VII-9 Flux calculés, correspondant aux productions de NADPH pour la voie des pentoses phosphates et pour la voie de l'acide acétique, au cours de la fermentation de la souche sauvage en condition aérobie.....	196
Figure VII-10: NADH généré et consommé par l'anabolisme, les productions d'acides organiques et le glycérol au cours de la première phase de la croissance	199

TABLE DES TABLEAUX

Tableau I-1 Quantité de cofacteurs NAD ⁺ et NADP ⁺ utilisés durant la synthèse d'acides aminés.....	35
Tableau I-2 Capacités fermentaires de souches présentant différentes configurations de délétions des gènes <i>GPD</i>	59
Tableau I-3 Résultats des simulations pour les 8 mutants donnant les meilleures performances <i>in silico</i> ainsi que pour des mutants testés dans de précédentes études.....	63
Tableau I-4 Comparaison des résultats obtenus pour le mutant GAPN et la souche de référence	64
Tableau II-1 Références des souches utilisées pour les fermentations.....	68
Tableau III-1 Paramètres des fermentations références de la souche sauvage CEN.PK113-7D en condition aérobie et anaérobie.....	84
Tableau III-2 Paramètres des deux répétitions de la fermentation référence de la souche sauvage CEN.PK113-7D en condition anaérobie.....	91
Tableau IV-1 Localisation de la synthèse de 8 acides aminés identifiés comme potentiellement d'origine mitochondriale par les études de Maaheimo 2001, Förster 2003, Duarte 2004.	98
Tableau IV-2. Description des différentes configurations de modèle envisagées en aérobie.....	101
Tableau IV-3 Résolutions des matrices des réseaux métaboliques 1 à 4.....	102
Tableau IV-4 Description des différentes configurations de modèle envisagées pour l'utilisation du réseau métabolique en conditions anaérobies	106
Tableau IV-5 Résolution des matrices des réseaux métaboliques présentant des solutions parmi les modèles 5 à 12. Vitesses mesurées et calculées lors de la résolution des différents modèles	107
Tableau IV-6 Vitesses expérimentales utilisées pour résoudre le système.....	108
Tableau IV-7 Valeur des Flux métaboliques "clefs" recalculés à partir des données de Gombert et al, 2001 en utilisant nos modèles métaboliques.....	109
Tableau IV-8 Valeur des Flux métaboliques "clefs" recalculés à partir des données de Nissen et al, 1997 en utilisant nos modèles métaboliques anaérobies.....	115
Tableau IV-9 Description des différentes configurations de modèle envisagées.	118
Tableau IV-10 Vitesses expérimentales utilisées pour la résolution des modèles 51 à 83.....	120

Tableau IV-11 Valeur des Flux métaboliques "clefs" recalculés à partir des données de Nissen et al, 1997 en utilisant les modèles métaboliques 51 à 83.	121
Tableau IV-12 Valeurs expérimentales mesurées pour les fermentations références en condition anaérobie pour la souche sauvage.	122
Tableau 13 : <i>Saccharomyces cerevisiae</i> strains used in this study.....	160
Table 14 : Effect of fine-tuning strategy on biomass, ethanol and glycerol production during fed-batch fermentation at 30°C.	165
Tableau VII-1 Rendements en acides organiques au cours des fermentations en condition aérobie.	181
Tableau VII-2 : Rendements en acides organiques au cours des fermentations en condition anaérobie calculés sur la première phase de croissance pour laquelle les rendements varient peu	185
Tableau VII-3 Facteurs d'accumulation intracellulaire de l'acétate, du pyruvate et du succinate pour un pH intracellulaire, respectivement de 7 et de 6,5, le pH extracellulaire étant régulé à 4.....	186
Tableau VII-4 Evolution des rendements au cours des premières heures de fermentation anaérobie pour la souche sauvage et les deux souches mutantes	199



INTRODUCTION

La lutte contre le dérèglement climatique et le remplacement des énergies fossiles en voie d'épuisement ont progressivement émergé comme des enjeux sociétaux et économiques majeurs. La nécessité d'envisager la fin d'un modèle d'approvisionnement énergétique centré sur le pétrole s'est ainsi imposée dans l'opinion publique. Cette prise de conscience a ouvert la voie à des décisions politiques visant à favoriser l'émergence de filières alternatives. L'utilisation de la biomasse pour la production d'agrocarburants et de molécules d'intérêt, afin de remplacer une partie des productions pétrolière et pétrochimique, s'inscrit au cœur de cette démarche. Ainsi, au cours des six dernières années, l'utilisation de la biomasse dans les secteurs des carburants, des lubrifiants et de la pétrochimie a été multipliée par 5 (ADEME 2010). De même, avec un objectif imposé de 7 % d'agrocarburants en France en 2010 et de 10 % en Europe à l'horizon 2020, les productions et consommations européennes de bioéthanol ont pratiquement doublé au cours de l'année 2008.

L'utilisation de nouvelles ressources, l'intensification des productions et l'amélioration des rendements sont autant de défis à relever pour permettre l'émergence de procédés viables et durables. L'ingénierie métabolique des micro-organismes constitue un outil de choix dans la mise au point de ces nouveaux procédés. Elle permet l'optimisation des souches microbiennes par l'expression de voies métaboliques hétérologues ou par la modification et la réorientation des réseaux métaboliques existants. Il est ainsi possible d'obtenir non seulement des souches produisant de nouvelles molécules et/ou utilisant de nouveaux substrats, mais aussi des souches dont le rendement ou la productivité sont améliorés.

La rationalisation des méthodes de développement de ces nouvelles souches et des procédés associés nécessite l'utilisation d'outils prédictifs, tels que des réseaux métaboliques et des modèles phénoménologiques. Ces modèles mathématiques, qui sont au cœur des démarches d'ingénierie métabolique actuelles, décrivent les systèmes microbiens et leurs interactions avec leur environnement. La capacité de ces outils à simuler le métabolisme microbien et à prédire l'impact des modifications métaboliques envisagées sur les productions de métabolites et sur le comportement des micro-organismes *in silico*, avant la modification des souches *in vivo*, présente un intérêt évident en terme de gain de temps et d'argent.

C'est dans ce contexte de développement intensif de nouveaux procédés de production d'agrocarburants et de bioproduits que prennent place ces travaux de recherche. Cette étude a porté sur la production de bioéthanol par *Saccharomyces cerevisiae*. Le bioéthanol est le plus commun des agrocarburants, il est déjà utilisé à grande échelle dans certains pays. En France, le bioéthanol est

incorporé en petite proportion dans l'essence classique sous forme d'ETBE. Le bioéthanol est principalement produit à travers la fermentation de sucre par *S. cerevisiae*. La matière première utilisée est obtenue à partir de cultures sucrières ou de céréales riches en sucre ou en amidon. La production d'éthanol par voie fermentaire est une technologie mature et, aujourd'hui, les principaux défis résident dans la mise au point de l'éthanol de seconde génération, produit à partir de biomasse ligno-cellulosique, dont la production n'entre pas en compétition avec l'approvisionnement alimentaire.

Néanmoins, la faible valeur ajoutée de l'éthanol et le coût élevé de l'approvisionnement en matière première font que l'amélioration du rendement reste un paramètre déterminant pour la viabilité économique des procédés de production. Ainsi, de nombreux travaux de recherche visent toujours à optimiser les rendements des procédés de fermentation éthanolique, en tentant de minimiser les co-produits.

L'un des principaux co-produits de la fermentation éthanolique chez *Saccharomyces cerevisiae* est le glycérol. Selon les procédés, sa production peut mobiliser jusqu'à 10 % du substrat. Détourner le flux de carbone du glycérol vers l'éthanol pourrait donc substantiellement améliorer la rentabilité des procédés de fermentation éthanolique. Cependant, l'étroite imbrication du glycérol dans le métabolisme central du carbone et la place que sa production occupe au cœur de différentes fonctions physiologiques majeures dans la cellule rendent ce problème particulièrement compliqué. En effet, il est difficile de modifier les voies de production du glycérol, sans altérer les capacités fermentaires des levures et leur résistance au stress.

La thèse présentée dans ce manuscrit vise à combiner des approches de génie métabolique et de génie microbiologique, afin de diminuer la production de glycérol associée à la fermentation éthanolique de *S. cerevisiae*, dans des procédés de production à haute performance en éthanol, en vue d'améliorer le rendement fermentaire. L'idée directrice du projet consiste à réguler finement l'activité des enzymes de la voie de synthèse du glycérol, pour minimiser sa production et réorienter le flux de carbone vers l'éthanol, tout en minimisant l'impact négatif des mutations sur la résistance au stress du procédé et les capacités fermentaires des souches construites.

Ainsi il sera possible de répondre à trois questions:

* Dans quelle mesure est-il possible d'utiliser la modélisation métabolique pour aider à l'élaboration de stratégies de modifications de souches ?

* Est-il possible, en utilisant une stratégie d'ajustement de l'activité des gènes de la voie de synthèse du glycérol, d'obtenir des souches présentant une production de glycérol réduite, un rendement éthanol amélioré et des capacités de résistance au stress compatibles avec des procédés industriels ?

* Quel est l'impact de la minimisation de la production de glycérol sur l'organisation du métabolisme cellulaire et comment cette réorganisation métabolique se traduit-elle en terme de coproduits ?

La démarche utilisée dans le cadre de ces travaux a d'abord consisté à développer un modèle mathématique décrivant le réseau métabolique de *S. cerevisiae* (cf. Figure 1). Ce modèle a ensuite servi comme outil prédictif, afin de déterminer le flux de carbone minimum nécessaire, à travers la voie du glycérol, pour satisfaire la demande en précurseurs métaboliques de la croissance. Ces résultats ont permis d'orienter des travaux d'ingénierie métabolique, visant à construire des souches mutantes présentant des productions de glycérol réduites, mais suffisantes pour couvrir les besoins anaboliques, ainsi que des rendements en éthanol améliorés. La construction génétique des souches, réalisée par nos partenaires de l'université de Berlin, s'est appuyée sur l'utilisation d'une collection de promoteurs mutés de force calibrée. Les capacités fermentaires des souches construites ont ensuite été évaluées dans des procédés de fermentation à haute performance en éthanol.

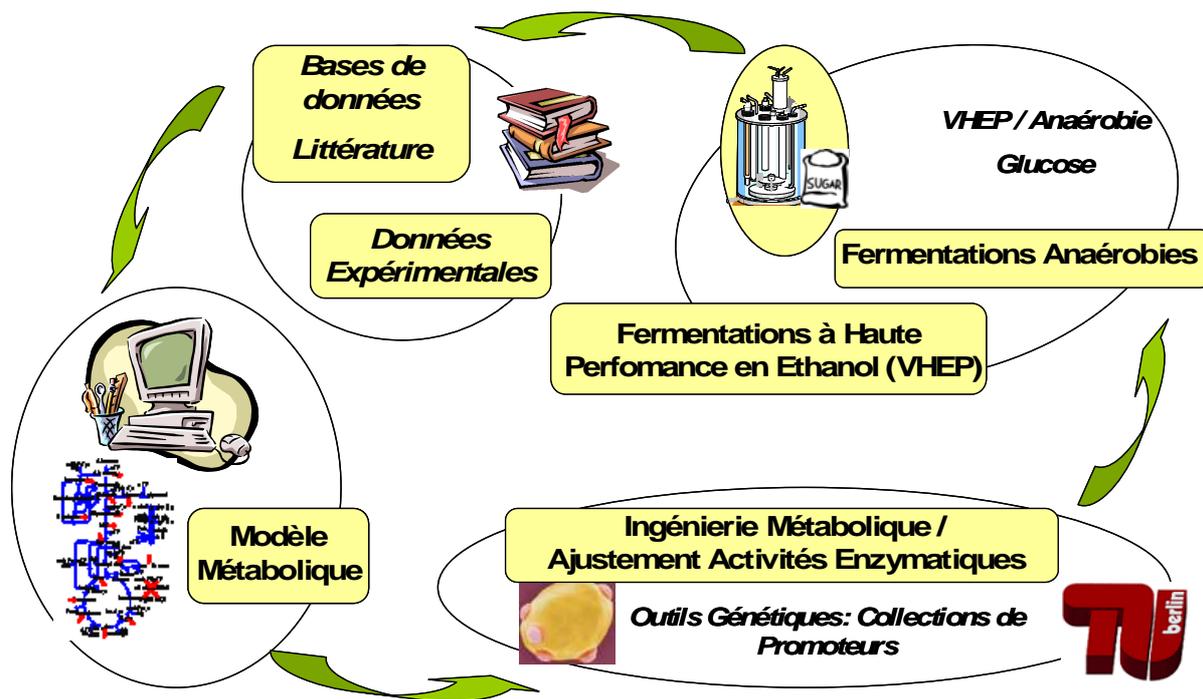


Figure 1 : Démarche utilisée durant la thèse

Ce mémoire s'articule en sept chapitres. Le premier chapitre est une étude bibliographique, présentant la physiologie générale de la levure *S. cerevisiae*, le métabolisme du glycérol et son rôle physiologique, le métabolisme et l'impact physiologique des acides organiques ainsi que leurs interactions avec le métabolisme du glycérol, et enfin un état de l'art des travaux menés autour de la minimisation du glycérol pour l'amélioration du rendement en éthanol chez *S.cerevisiae*.

Le second chapitre décrit les souches et les milieux de culture utilisés, les méthodes de culture et les stratégies de conduite des fermentations, les analyses effectuées et les méthodes de traitement des résultats. De plus, ce chapitre présente les bases théoriques de la construction du modèle utilisé au cours des travaux.

Le troisième chapitre rend compte du choix des voies métaboliques, de leur localisation intracellulaire et des co-facteurs associés menant à l'élaboration et la mise au point du modèle métabolique qui a été utilisé pour déterminer l'activité optimale de la voie de synthèse du glycérol, mais aussi pour l'analyse des résultats.

Le quatrième chapitre présente les résultats des fermentations références effectuées avec la souche sauvage CENPK113-7D, utilisée pour la création des mutants, en procédé VHEP aérobie et en fermentation anaérobie. Ce chapitre décrit la caractérisation cinétique de la souche et ses capacités fermentaires. Il présente aussi une évaluation de la reproductibilité des résultats de fermentation, ce qui permet d'estimer le seuil de significativité des différences observées entre les souches.

Le cinquième et le sixième chapitres sont rédigés sous la forme de publications (dont une acceptée dans *Microbial Cell Factories*). et décrivent les résultats obtenus lors des fermentations, en conditions aérobie et anaérobie, avec les souches mutantes. Ces chapitres présentent l'impact des mutations sur les cinétiques des souches mutantes et leurs capacités fermentaires. Ils s'attachent aussi à donner une interprétation physiologique des phénomènes observés.

Le septième chapitre reprend les résultats obtenus au cours des fermentations aérobies et anaérobies de la souche sauvage et des souches mutantes, en étudiant plus particulièrement l'impact des mutations sur la production des acides organiques.

Enfin, une discussion souligne les principaux résultats, répond aux questions scientifiques de la thèse et dégage des perspectives pour la valorisation de ces travaux.

Chapitre I : Bibliographie

Cette étude bibliographique s'articule en cinq parties et vise, d'une part, à exposer le rôle physiologique du glycérol et sa place dans le métabolisme de la levure *S. cerevisiae* et, d'autre part, à présenter une revue non exhaustive des différentes études portant sur la réduction de la production de glycérol. La première partie expose des généralités sur *S. cerevisiae*, son métabolisme et les voies métaboliques impliquant le glycérol. La seconde et la troisième parties présentent, respectivement, le rôle du glycérol dans l'équilibre oxydo-réductif et son implication dans la résistance au stress. La quatrième partie résume les connaissances disponibles sur la production d'acides organiques lors de la fermentation éthanolique, leur métabolisme étant étroitement lié à la production du glycérol. Enfin, la cinquième partie établit un état de l'art des études visant à minimiser la production de glycérol lors de la fermentation alcoolique chez *S. cerevisiae*.

I.1 Généralités

I.1.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae est une levure non filamenteuse, utilisée par l'homme dans le cadre de productions alimentaires depuis des millénaires. Elle possède un génome relativement réduit pour une cellule eucaryote : approximativement 60 Mégabases, codant environ 6000 gènes, répartis sur 16 chromosomes. Elle a été le premier organisme eucaryote totalement séquencé en 1996 (Goffeau, Barrell et al. 1996).

La disponibilité des outils génétiques nécessaires à la manipulation de son génome et l'importance de la communauté scientifique qui s'y consacre ont fait de cet organisme un modèle pour les études fonctionnelles post-séquençage aussi bien qu'une plate-forme expérimentale pour développer et valider de nouvelles approches et stratégies génomiques (Dujon 1996). L'importance des connaissances accumulées sur son métabolisme et son comportement, mais aussi l'utilisation en routine de techniques de génie génétique permettant de manipuler son métabolisme, en ont aussi fait un organisme de choix pour la production de molécules d'intérêt.

Cette levure est utilisée à très grande échelle aussi bien dans le cadre de productions traditionnelles (boissons alcoolisées, pain, levure de boulangerie, bioéthanol), que pour des productions à visées pharmacologiques ou chimiques telles que des vitamines, des enzymes ou des protéines recombinantes. Ainsi, ses caractéristiques en ont fait l'organisme le plus utilisé dans le cadre de la production de bioéthanol par voie biotechnologique à partir de la biomasse (Lin and Tanaka 2006).

Dans notre étude, nous utiliserons plus précisément la souche CEN.PK113-7D, forme haploïde et prototrophique de la souche CEN.PK122. Cette souche représente un bon compromis entre l'accessibilité génétique et les propriétés physiologiques (van Dijken, Bauer et al. 2000). En effet, elle possède à la fois une tolérance correcte à l'éthanol et un génome haploïde la rendant facile à manipuler génétiquement. Elle présente un taux élevé d'efficacité de transformation, ainsi que de bonnes capacités de croissance. Enfin, ses caractéristiques physiologiques sont très proches de celles de la souche diploïde : par exemple, les activités des enzymes glycolytiques varient peu entre les deux souches.

I.1.2 Métabolisme général

I.1.2.1 Classification métabolique

Trois comportements métaboliques peuvent être distingués chez les levures selon la façon dont elles dégradent la source de carbone utilisée pour produire leur énergie : oxydatif, fermentaire et respiro-fermentaire (mixte). Le type de comportement varie selon l'environnement (présence d'oxygène), la source de carbone et l'espèce de la levure considérée. Ainsi, bien que toutes les levures soient capables de se développer sur glucose (Barnett 1976), le type de métabolisme développé en présence de ce substrat est spécifique de l'espèce.

Käppeli a proposé une classification des levures selon leur comportement vis-à-vis de l'oxygène et du glucose (Käppeli 1986). Il distingue les levures purement oxydatives qui ne produisent jamais d'éthanol, les levures sensibles à l'oxygène qui produisent de l'éthanol uniquement lorsqu'elles sont limitées en oxygène et les levures sensibles au glucose (Crabtree positives) qui présentent un métabolisme respiro-fermentaire en présence d'oxygène, lorsque la concentration en glucose résiduel dans le milieu de culture dépasse une valeur seuil.

S. cerevisiae est une levure Crabtree positive, elle présente un métabolisme oxydatif pour de faibles concentrations de glucose en présence d'oxygène, un métabolisme respiro-fermentaire lorsque la concentration en glucose résiduel augmente et un métabolisme fermentaire en condition anaérobie.

I.1.2.2 Métabolisme oxydatif

Le métabolisme respiratoire, ou oxydatif pur, n'est observable que si la concentration en glucose est inférieure à 150 mg.L^{-1} ou, sur des cultures de type chemostat, si la vitesse d'apport de glucose est inférieure à une valeur seuil appelée taux de dilution critique (D_c) (van Dijken and Scheffers 1986). Au-delà du taux de dilution critique ($0,2 \text{ h}^{-1}$ pour la souche CEN.PK-122), le métabolisme devient respiro-fermentaire et la levure produit de l'éthanol.

Le catabolisme oxydatif du glucose consiste en une dégradation complète de la molécule de glucose en eau et en gaz carbonique, à travers la glycolyse, le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative. En métabolisme oxydatif, le rendement biomasse de la souche *S. cerevisiae* CENPK113-7D est maximum et s'établit à 0,5 gramme de biomasse par gramme de glucose (van Maris, Bakker et al. 2001). Dans ces conditions, les cofacteurs réduits NADH et FADH_2 , produits par la glycolyse et le cycle de Krebs, sont réoxydés dans la mitochondrie. La membrane interne de la mitochondrie étant imperméable aux cofacteurs réduits, le transport du pouvoir réducteur depuis le cytosol vers la mitochondrie s'effectue par l'intermédiaire de navettes (cf. I.2.2). Les électrons libérés par les cofacteurs sont transmis aux différents complexes protéiques constituant la chaîne respiratoire, à travers une cascade de réactions d'oxydoréduction, de potentiel croissant jusqu'à l'oxygène, qui joue le rôle d'accepteur final. L'énergie ainsi libérée permet d'accumuler à contre gradient des ions H^+ dans l'espace intermembranaire des mitochondries. La différence de potentiel ainsi créée active les ATP synthases et permet la phosphorylation de l'ADP en ATP.

L'efficacité de la chaîne respiratoire est illustrée par le nombre de moles d'ATP formées par atome d'oxygène consommé, le rapport P/O. Celui-ci varie selon les conditions de culture, mais aussi en fonction des espèces : ceci en raison des différences de structure de la chaîne respiratoire. Chez *S. cerevisiae*, on considère souvent que P/O est inférieur à 2 (Verduyn, Postma et al. 1992). Le NADH est réoxydé au niveau des enzymes NDE et NDI, le FADH_2 mitochondrial est réoxydé au niveau de l'enzyme succinate déshydrogénase. Contrairement à ce qui est observé chez d'autres organismes, les enzymes NDE et NDI ne transfèrent pas de protons à travers la membrane. Le même nombre de

protons est donc accumulé dans l'espace intermembranaire pour l'accumulation d'une molécule de NADH et celle d'une molécule de FADH₂. Les ratios P/O sont donc identiques pour ces deux cofacteurs. (cf. Figure I-1).

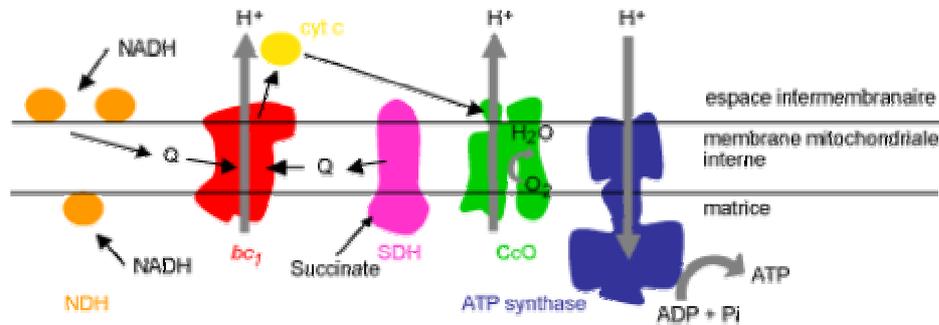


Figure I-1: Chaîne respiratoire chez la levure (Département Biologie Cellulaire et Intégrative - Equipe G. Dujardin http://www.cgm.cnrs-gif.fr/dujardin/bm_fr.html)

I.1.2.3 Métabolisme respiro-fermentaire

En présence d'oxygène, en mode discontinu ou semi-continu lorsque la concentration en glucose est supérieure à un certain seuil, ou en chemostat lorsque le taux de dilution dépasse D_c , *S.cerevisiae* change de métabolisme pour passer à un métabolisme respiro-fermentaire (oxydo-réductif ou mixte). Cette transition respiro-fermentaire est aussi appelée effet Crabtree. Le métabolisme respiro-fermentaire se caractérise par (i) une diminution du rendement biomasse, (ii) la production de co-produits tels que l'acétate, l'éthanol et le glycérol, (iii) une vitesse spécifique de consommation d'oxygène réduite.

En chemostat aérobie, il est possible de distinguer deux types d'effet Crabtree: (i) l'effet Crabtree long terme, lorsque la vitesse d'apport du substrat est supérieure au taux de dilution critique, et (ii) l'effet Crabtree court terme, correspondant au passage d'un métabolisme respiratoire à un métabolisme respiro-fermentaire, suite à un ajout pulsé de glucose dans des cultures présentant un taux de dilution inférieur à D_c . Le taux de dilution critique auquel intervient la transition entre les régimes oxydatif et respiro-fermentaire est dépendant de la souche de levure utilisée, mais il peut être régulé en modifiant les conditions de cultures. Ainsi, par exemple, l'application d'un stress durant une culture en chemostat, qui augmente le besoin en énergie, est susceptible d'abaisser le taux de dilution critique auquel a lieu la transition respiro-fermentaire (Olz, Larsson et al. 1993).

Pour expliquer l'origine de l'effet Crabtree, deux hypothèses principales peuvent être envisagées (Vemuri, Eiteman et al. 2007):

- la limitation de la capacité respiratoire, due à la répression de certaines enzymes par le glucose ; la diminution de la capacité cellulaire de réoxydation du NADH entraînerait l'apparition de conditions réductives dans la cellule, favorisant la production d'éthanol. La transformation du pyruvate en éthanol produit peu d'énergie, en comparaison de la phosphorylation oxydative : le flux glycolytique augmenterait pour subvenir aux besoins cellulaires en ATP. La limitation pourrait notamment se situer au niveau du transport du pouvoir réducteur du cytosol vers la mitochondrie (De Deken 1966; Vemuri, Eiteman et al. 2007).

- la saturation métabolique au niveau du noeud du pyruvate ; un flux glycolytique trop important saturerait progressivement les enzymes en aval du noeud du pyruvate, aboutissant à la redirection d'une partie du carbone vers différents co-produits.(Postma, Verduyn et al. 1989; van Urk, Schipper et al. 1989; Verduyn, Postma et al. 1992; Feria-Gervasio, Mouret et al. 2008)

Malgré de nombreuses études, l'origine exacte du mécanisme de saturation n'est pas clairement établie. En effet, les résultats des différentes expériences, réalisées en modifiant les paramètres des cultures ou en utilisant des souches mutantes, s'interprètent, selon les cas, en utilisant l'une ou l'autre théorie.

I.1.2.4 Métabolisme fermentaire

En absence d'oxygène, *S.cerevisiae* ne peut respirer et présente un métabolisme uniquement fermentaire. Dans ces conditions, l'énergie est uniquement produite par la glycolyse et la fermentation éthanolique permet de réoxyder le NADH. Cependant, le bilan de la transformation de glucose en éthanol est nul d'un point de vue oxydo-réductif et les cellules doivent avoir recours à la production de glycérol pour équilibrer leur balance oxydo-réductive (cf. I.2.1).

I.1.3 Métabolisme du glycérol

I.1.3.1 Voie de synthèse et de dégradation du glycérol chez *Saccharomyces cerevisiae*

Synthèse du glycérol

Chez *S.cerevisiae*, le glycérol est majoritairement produit à partir du dihydroxyacétone phosphate (DHAP), un métabolite intermédiaire de la glycolyse. Dans un premier temps, le DHAP est réduit en glycérol-3-phosphate (G3P), puis ce dernier est déphosphorylé pour aboutir au glycérol (cf. Figure I-2).

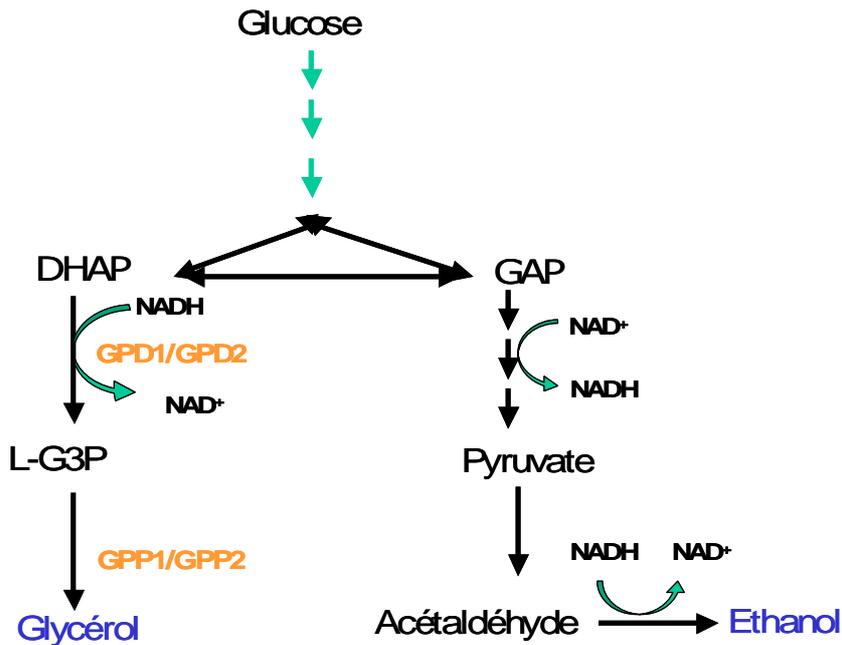


Figure I-2 Voies de synthèse du glycérol et de l'éthanol

La réduction du DHAP est catalysée par l'enzyme cytosolique NAD dépendante Glycérol-3-phosphate déshydrogénase (Gpd). Deux isoformes de cette enzyme existent, codées par les gènes GPD1 (isoforme majeure) et GPD2 (Larsson, Ansell et al. 1993; Albertyn, Hohmann et al. 1994; Ansell, Granath et al. 1997). Bien que possédant des séquences et des affinités similaires pour leur substrat (Eriksson, André et al. 1995), ces deux isoformes assurent des rôles physiologiques différents et sont sous le contrôle de voies de régulation différentes (Ansell, Granath et al. 1997). Ainsi GPD1 est plus particulièrement impliquée dans la réponse au stress osmotique tandis que l'activité de GPD2 est liée aux conditions anoxiques (cf. I.2 et I.3).

La déphosphorylation du G3P est catalysée par l'enzyme glycérol-phosphatase GPP. Il existe aussi deux isoformes de cette enzyme, codées par les gènes *GPP1* (*RHR2*) et *GPP2* (*HOR2*). Les séquences de ces deux enzymes présentent 95 % de similarité (Norbeck, Pahlman et al. 1996). La déphosphorylation du G3P n'est pas l'étape limitante de la formation du glycérol : en effet, la surexpression des deux gènes *GPP1* et *GPP2* ne permet pas d'augmenter la quantité de glycérol synthétisée (Pahlman, Larsson et al. 2002).

Dégradation du glycérol

S.cerevisiae est capable d'utiliser le glycérol comme source de carbone (Gancedo, Gancedo et al. 1968). Pour cela, le glycérol est dégradé en deux étapes (cf. Figure I-3). Tout d'abord, le glycérol est phosphorylé en G3P par l'enzyme cytosolique Gut1 (Pavlik, Simon et al. 1993; Grauslund and

Rønnow 2000). Le G3P est ensuite oxydé en DHAP. Cette réaction est catalysée par l'enzyme mitochondriale Gut2 (Larsson, Pählman et al. 1998).

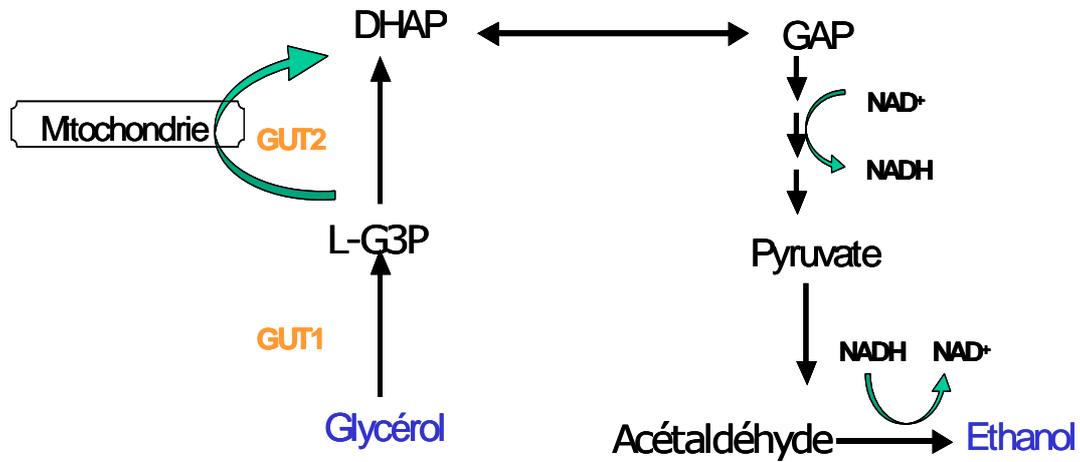


Figure I-3 Voie de dégradation du glycérol

Une seconde voie de dégradation du glycérol a été mise en évidence (cf. Figure I-4). Cette voie implique la glycérol déshydrogénase (Gcy1) catalysant l'oxydation du glycérol en DHA et les dihydroxyacétones kinases (Dak1/Dak2) catalysant la phosphorylation du DHA en DHAP (Norbeck and Blomberg 1997; Molin, Norbeck et al. 2003). Il a été montré que Dak1 est surexprimée dans différentes conditions de stress, et notamment dans le cas du stress osmotique (Molin, Norbeck et al. 2003). La fonction première de ces enzymes semble être de dégrader le DHA, dont l'accumulation est toxique pour les levures.

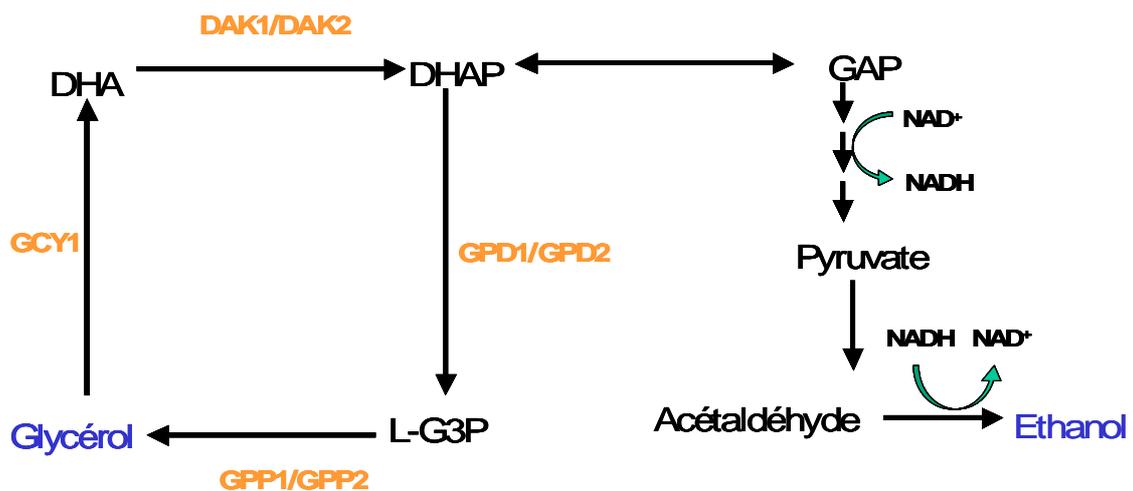


Figure I-4 Seconde voie de dégradation du glycérol

I.1.3.2 Rôle du glycérol dans la synthèse des phospholipides

L'acide phosphatidique (ptdOH) est un substrat essentiel pour la synthèse des glycérophospholipides et des triglycérides. Chez les levures, ce précurseur est synthétisé dans le réticulum endoplasmique, dans les mitochondries et dans les particules lipidiques, soit à partir du glycérol-3-P, soit à partir du DHAP (Figure I-5). Dans le cas de la voie du DHAP, celui-ci est d'abord acylé en 1-acyl DHAP par une enzyme possédant une activité DHAP Acyl Transférase, puis dans une seconde étape, le 1-acyl DHAP est réduit en 1-acylGro3P (Lyso-PtdOH) par l'enzyme 1-Acyl-DHAP-Transférase (Adr) NADPH dépendante. Dans le cas de la voie du glycérol-3-P, le LG3P est directement acylé en 1-AcylGro3P par une enzyme possédant une activité Glycérol Acyl Transférase (GAT). Dans les deux cas, le 1-AcylGro3P est converti en acide phosphatidique, à travers une seconde acylation, catalysée par l'enzyme 1-Acyl-Gro-3-P Acyl Transférase (Athenstaedt and Daum 1999). Plusieurs enzymes, possédant soit l'activité GAT, soit l'activité DHAP Acyl transférase, soit les deux, existent chez *S. cerevisiae*. L'importance relative des voies G3P et DHAP dépend du compartiment. Globalement, dans l'ensemble de la cellule, l'activité GAT est 4,5 fois supérieure à l'activité DHAP Acyl transférase (Athenstaedt and Daum 1999).

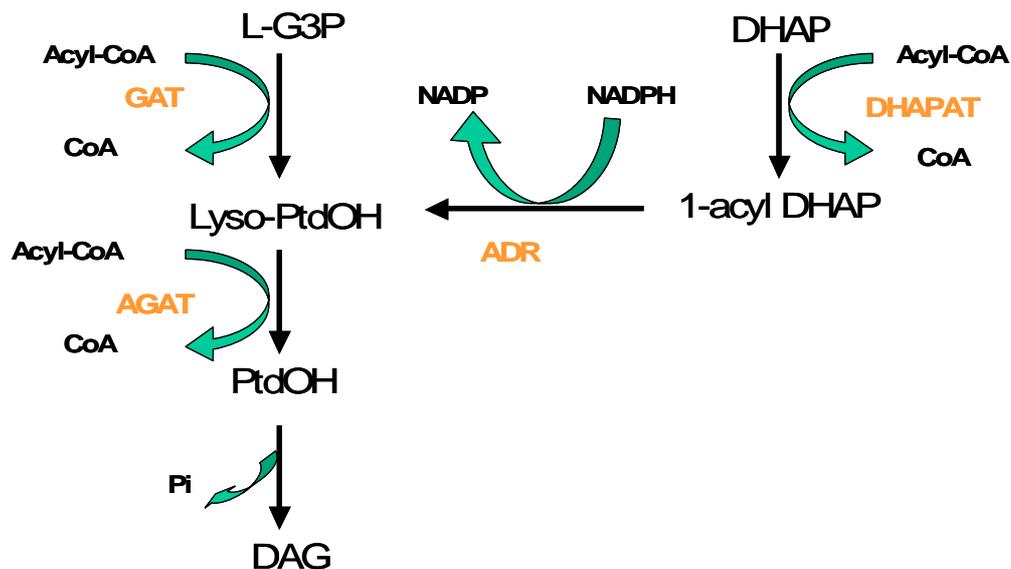


Figure I-5 Synthèse de l'acide phosphatidique à travers les voies du G3P et du DHAP, d'après [Athenstaedt et al, 1999]

I.1.3.3 Mécanismes de transport du glycérol

Les phénomènes de transport du glycérol sont impliqués dans le contrôle de la concentration intracellulaire en glycérol. Le glycérol peut traverser le cytoplasme de trois façons différentes : (i) par

diffusion passive grâce à ses propriétés liposolubles, (ii) par transport facilité à travers un canal protéique, FPS1, et (iii) par un phénomène de transport actif (Oliveira, Lages et al. 2003).

La nature liposoluble du glycérol et l'existence d'une diffusion passive à travers la membrane sont communément admises. Expérimentalement, la perméabilité de la membrane a pu être divisée en deux composantes : l'une, dépendante de la protéine FPS1, et l'autre, indépendante de cette protéine ; cette composante a été identifiée comme une diffusion simple à travers la membrane cellulaire (Luyten, Albertyn et al. 1995). Cependant, Oliveira a largement remis en question l'importance de ce phénomène de diffusion simple. En effet, une analyse plus précise des propriétés chimiques du glycérol indique que celui-ci est peu soluble dans la membrane (Oliveira, Lages et al. 2003). Pour Oliveira, bien que la diffusion simple du glycérol puisse évoluer avec la composition lipidique de la membrane ou avec les modifications de son organisation, elles-mêmes liées aux changements de conditions physico-chimiques, elle reste très faible quelles que soient les conditions (Oliveira, Lages et al. 2003). Ainsi, la majeure partie de la diffusion du glycérol se ferait à travers FPS1 (Oliveira, Lages et al. 2003).

La protéine FPS1 est une aquaglycéroporine, membre de la famille des canaux protéiques MIP (Major Intrinsic Protein), codée par le gène *FPS1*. Cette protéine a été identifiée comme étant un canal protéique, médiateur du transfert du glycérol à travers la membrane cellulaire. L'analyse de la cinétique du transfert du glycérol à travers cette protéine a d'abord conduit à l'interpréter comme un transport facilité (Luyten, Albertyn et al. 1995). Cependant, pour Oliveira, il s'agit d'un artefact cinétique lié à l'activité glycérol kinase à l'intérieur de la cellule ; le transport à travers FPS1 est en réalité passif (Oliveira, Lages et al. 2003).

Cette nouvelle interprétation du fonctionnement de FPS1 ne remet pas en question son rôle prédominant dans le contrôle de la concentration en glycérol intracellulaire. FPS1 permet aux levures d'ajuster rapidement la perméabilité de la membrane pour le glycérol et, ainsi, de réguler le flux de glycérol sortant de la cellule (Luyten, Albertyn et al. 1995; Tamás, Luyten et al. 1999). Cette protéine joue un rôle majeur dans l'adaptation des cellules aux chocs hypo-osmotiques, en permettant la sortie rapide du glycérol. Les mutants de délétion $\Delta fps1$ sont sensibles aux chocs hypo-osmotiques ; de plus, ils présentent un défaut de croissance en condition anaérobie, lorsque la production de glycérol est stimulée (Luyten, Albertyn et al. 1995). FPS1 est aussi impliquée dans la réponse au stress hyperosmotique; ainsi, dans ce cas, une diminution du flux de glycérol à travers la membrane est observée. Cette diminution est principalement due à la fermeture des canaux FPS1. Les mutants, dont les canaux ne sont pas capables de se refermer, ne peuvent pas retenir le glycérol (Tamás, Luyten et al. 1999).

Le transport actif de glycérol, en réponse à un stress osmotique, a pu être observé chez plusieurs espèces de levures halotolérantes comme *Debaryomyces hansenii*, *Pichia sorbitophila*, *Zygosaccharomyces rouxii* (Lucas, Da Costa et al. 1990; Zyl, Kilian et al. 1990; Lages and Lucas 1995). Chez *S. cerevisiae*, lorsque les cellules sont cultivées sur des sucres non-fermentescibles, l'existence d'un transport actif du glycérol, du milieu de culture vers le cytoplasme, a pu être mis en évidence (Lages and Lucas 1997). STL1, une protéine induite durant le shift diauxique, a été identifiée comme étant à l'origine de ce transport (Ferreira, van Voorst et al. 2005). Ce transport, symport H⁺, pourrait jouer un rôle dans l'accumulation du glycérol en condition de stress osmotique : en effet, l'expression de *STL1* est stimulée dans ces conditions (Ferreira, van Voorst et al. 2005). Cependant, *STL1* est réprimé en présence de glucose chez *S. cerevisiae* et la protéine STL1 n'est pas détectable dans ces conditions (Lages and Lucas 1997).

Les différents éléments intervenant dans le métabolisme du glycérol chez *S. cerevisiae* sont récapitulés sur la Figure I-6.

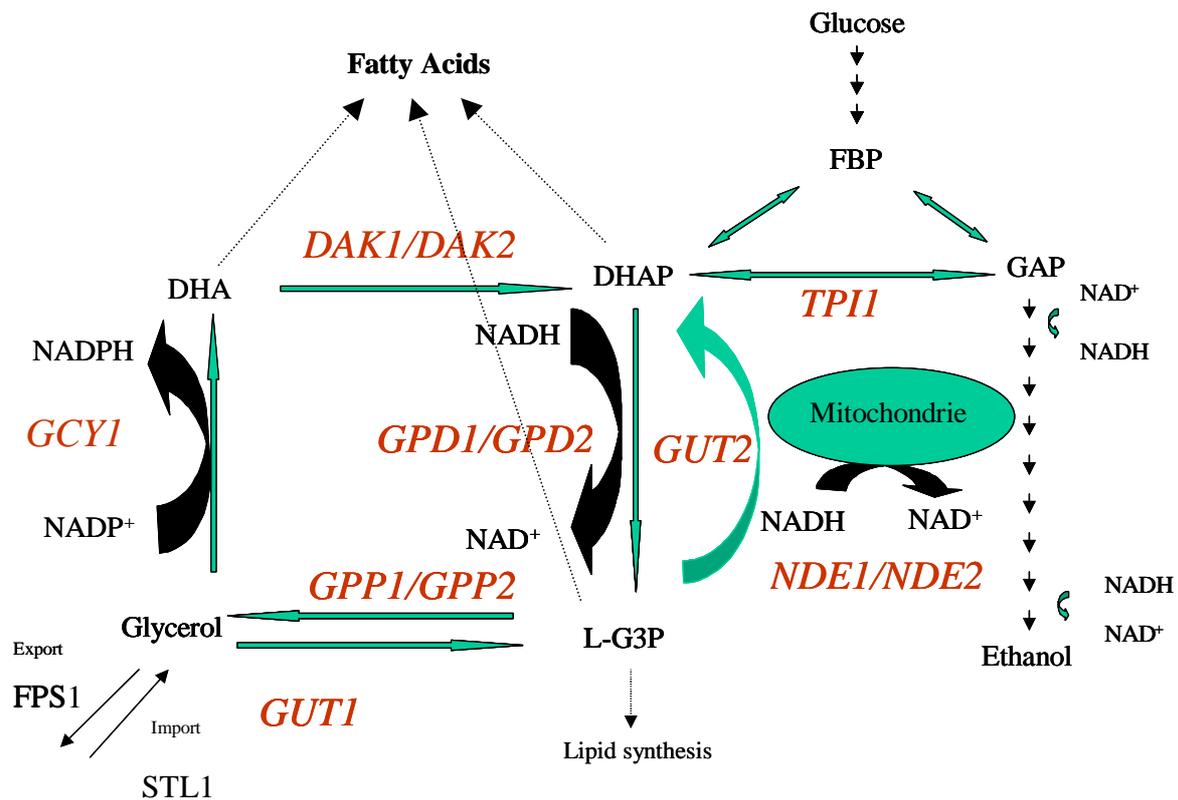


Figure I-6 Schéma récapitulatif du métabolisme du glycérol chez *Saccharomyces cerevisiae*

I.2 Implication du glycérol dans l'équilibre oxydo-réductif

Chez *S. cerevisiae*, l'une des fonctions physiologiques majeures du glycérol est son implication dans le maintien de l'équilibre oxydo-réductif et dans le transport du pouvoir réducteur entre les compartiments cellulaires. La régulation de l'équilibre d'oxydo-réduction intracellulaire est déterminante pour le maintien de l'activité cellulaire. Les coenzymes NADH/ NAD⁺ jouent un rôle majeur comme réservoir et transporteur de pouvoir réducteur (Ansell, Granath et al. 1997). Ainsi, le maintien de l'équilibre oxydo-réductif passe par la régulation du ratio NADH/ NAD⁺ et la réoxydation de l'excès de NADH cytosolique. Chez *S. cerevisiae*, cette réoxydation peut avoir lieu de différentes façons, selon les conditions de croissance et l'état métabolique de la cellule.

I.2.1 Condition anaérobie, métabolisme fermentaire

Dans des conditions où les cellules présentent un métabolisme fermentaire pur, la réaction de réduction de l'acétaldéhyde en éthanol suffit à réoxyder le NADH produit par la dégradation du glucose lors de la glycolyse. Le couplage de ces deux réactions possède un bilan oxydo-réductif nul. Cependant, les différentes réactions de biosynthèse nécessaires pour supporter le métabolisme cellulaire, en particulier les synthèses d'acides aminés (cf. Tableau I-1) et d'acides organiques, produisent un excès de NADH, que la cellule doit réoxyder pour maintenir son activité (van Dijken and Scheffers 1986; Bjorkqvist, Ansell et al. 1997). La quantité de NADH à réoxyder lors de la production de la biomasse a été évaluée à 1300 mmol de NADH pour 100 g de biomasse (van Dijken and Scheffers 1986).

Pour contrebalancer l'excès de NADH, un accepteur endogène d'électrons est nécessaire. Ainsi, une petite part du glucose est métabolisée en glycérol (van Dijken and Scheffers 1986). Dans ces conditions, la formation du glycérol joue un rôle de puits oxydo-réductif : une mole de NADH étant réoxydée pour chaque mole de glycérol produite Van dijken (van Dijken and Scheffers 1986; Nissen, Schulze et al. 1997). Ainsi, Bjorkqvist et al ont montré qu'un double mutant $\Delta gpd1/\Delta gpd2$, incapable de synthétiser du glycérol, présente un grave défaut de croissance en conditions anaérobies (Bjorkqvist, Ansell et al. 1997). Il est possible de supprimer ce défaut de croissance en ajoutant au milieu de culture un accepteur d'électrons, tel que de l'acétoïne; l'acétoïne est alors réduite, remplaçant le DHAP dans son rôle d'accepteur final d'électrons (Bjorkqvist, Ansell et al. 1997). D'autre part, la même étude a montré, qu'en conditions anoxiques, l'augmentation de l'activité de la glycérol déshydrogénase nécessaire pour supporter l'activité cellulaire est principalement due à la surexpression du gène *GPD2* et que *GPD1* possède un rôle mineur dans ces conditions (Bjorkqvist,

Ansell et al. 1997). Enfin, le niveau d'expression de *GPP1* augmente, lui aussi, en conditions anaérobies (Pahlman, Granath et al. 2001). *GPP2* ne semble pas affecté par les conditions anoxiques.

Tableau I-1 Quantité de cofacteurs NAD⁺ et NADP⁺ utilisés durant la synthèse d'acides aminés à partir de glucose et de sel d'ammonium [Albers et al, 1996]

Amino acid or product	Precursor(s) ^b	mol/mol of amino acid or product			
		NAD ⁺	NADP ⁺	NAD ⁺ or NADP ⁺	Total produced NADH
Amino acids					
Alanine	Pyr	1	0	0	1
Arginine	α-Keto	4	-3	1	4-5
Aspartate-asparagine	Oxal	1	-1	0	1
Cysteine	3P-Glyc, S ^o /Oxal, AcCoA, S ^o , Ser ^c	2/5 ^c	-3/-4 ^c	0/-1 ^c	2-5
Glutamate-glutamine	α-Keto	3	-1	1	3-4
Glycine	3P-Glyc	2	-1	0	2
Histidine	PrPP	2	1	0	2
Isoleucine	Pyr, Thr	2	-4	-1	1-2
Leucine	2 Pyr, AcCoA	5	-2	0	5
Lysine	α-Keto, AcCoA	6	-3	1	6-7
Methionine	3P-Glyc, S ^o , Oxal, AcCoA/Oxal, AcCoA, S ^o ^c	4/2 ^c	-6/-5 ^c	-1/-1 ^c	1-4
Phenylalanine	Ery4-P, 2 PEP	2	-2/0 ^c	0 ^c	2
Proline	α-Keto	3	-1	-2/1 ^c	1-4
Serine	3P-Glyc	2	-1	0	2
Threonine	Oxal	1	-2	-1	0-1
Tryptophan	Ery4-P, PEP, PrPP, Ser	3	0/2 ^c	0	3
Tyrosine	Ery4-P, 2 PEP	3	-2/0 ^c	0	3
Valine	2 Pyr	2	-1	0	2
Products					
Acetic acid		1	0	1	1-2
Pyruvic acid		1	0	0	1
Succinic acid		4	0	1	4-5
α-Ketoglutarate		3	0	1	3-4

I.2.2 Condition aérobie (métabolismes oxydatif et oxydo-réductif)

En condition aérobie ou micro-aérobie, *S. cerevisiae*, peut présenter un métabolisme respiratoire ou respiro-fermentaire (cf. I.1.2.3 et I.1.2.4).

Dans les deux cas, l'oxygène présent dans le milieu de culture peut jouer le rôle d'accepteur final d'électrons, permettant aux levures de réoxyder l'excès de NADH issu des réactions anaboliques, sans avoir recours à la production de glycérol. Ainsi, la présence d'oxygène diminue considérablement la quantité de glycérol produite par les cellules (Alfenore, Cameleyre et al. 2004). Cependant, en condition respiro-fermentaire, on constate que si la production de glycérol est largement plus faible qu'en condition anaérobie, elle ne disparaît pas complètement (Olz, Larsson et al. 1993; Vemuri, Eiteman et al. 2007).

La chaîne respiratoire impliquée dans l'oxydation de l'excès de pouvoir réducteur, en condition aérobie, est localisée dans les mitochondries. Cependant, la membrane mitochondriale interne est

impermeable au NADH (von Jagow 1970; Geertman, van Maris et al. 2006). La réoxydation du NADH cytosolique en excès par les mitochondries intervient donc, soit à travers la NADH déshydrogénase externe, soit par l'intermédiaire d'une navette (Bakker, Overkamp et al. 2001) (cf. Figure I-7).

La NADH déshydrogénase mitochondriale catalyse la réoxydation directe du NADH cytosolique en NAD^+ . Cette enzyme est localisée dans la membrane interne des mitochondries. Son site catalytique est orienté vers l'espace intermembranaire (Luttik, Overkamp et al. 1998). Les électrons issus de la réoxydation du NADH sont transmis directement à la chaîne respiratoire et permettent l'accumulation de protons dans l'espace intermembranaire. Deux isoformes de cette enzyme existent chez *S. cerevisiae*, NDE1 et NDE2, codées respectivement par les gènes *NDE1* et *NDE2* (Luttik, Overkamp et al. 1998; Geertman, van Maris et al. 2006).

La navette glycérol-3-phosphate est une des voies permettant le transfert des électrons du NADH vers la chaîne respiratoire de la mitochondrie (Bakker, Overkamp et al. 2001). Deux enzymes constituent cette navette, l'enzyme cytosolique NAD^+ dépendante glycérol-3-phosphate déshydrogénase, et l'enzyme mitochondriale FAD dépendante glycérol-3-phosphate déshydrogénase (Bakker, Overkamp et al. 2001), codée par le gène *GUT2* (Rønnow and Kielland-Brandt 1993). Le DHAP est réduit en G3P par le NADH cytosolique, le G3P entre dans l'espace inter-membranaire de la mitochondrie et est réoxydé en DHAP par l'enzyme *GUT2*, en réduisant FAD^+ en FADH_2 (Larsson, Pålman et al. 1998). Le DHAP retourne ensuite vers le cytosol. Le rôle de la navette glycérol serait mineur face à celui des enzymes NDE1 et NDE2 en présence de concentrations importantes de glucose et pour des taux de croissance élevés ; l'importance de la navette glycérol augmenterait à de faibles taux de dilution (Larsson, Pålman et al. 1998; Pahlman, Larsson et al. 2002; Rigoulet, Aguilaniu et al. 2004). Pour Pahlman et al, les enzymes NDE pourraient exercer un contrôle cinétique sur la navette glycérol, limitant son activité. L'importance relative des systèmes de transport serait le fruit d'une régulation fine des deux systèmes, liée aux besoins énergétiques. En effet, pour ces auteurs, bien que le nombre de protons accumulés dans l'espace intermembranaire soit identique pour les deux systèmes, le ratio P/O de ces enzymes serait aussi dépendant de l'importance du flux ; le flux à travers la navette glycérol étant plus faible, son ratio P/O serait plus élevé. Ainsi, l'utilisation accrue de la navette glycérol en présence de faibles quantités de substrats pourrait fournir un avantage énergétique aux cellules. Par ailleurs, la navette glycérol est essentielle pour la croissance sur des substrats non fermentescibles (Grauslund and Rønnow 2000). Enfin, une inhibition du gène *GUT2* a pu être observée pour des mutants présentant un ratio NADH/NAD^+ cytosolique diminué (Vemuri, Eiteman et al. 2007).

La navette éthanol est une autre voie permettant le transfert du pouvoir réducteur dans la mitochondrie. Cependant, son rôle principal serait d'exporter le NADH mitochondrial en excès, en condition anaérobie (Overkamp, Bakker et al. 2000). L'éthanol est produit dans la mitochondrie en réoxydant une molécule de NADH, puis il est transféré dans le cytosol où il est réoxydé en acétaldéhyde, en réduisant une molécule de NAD⁺ mitochondrial en NADH (cf. Figure I-7) (Overkamp, Bakker et al. 2000).

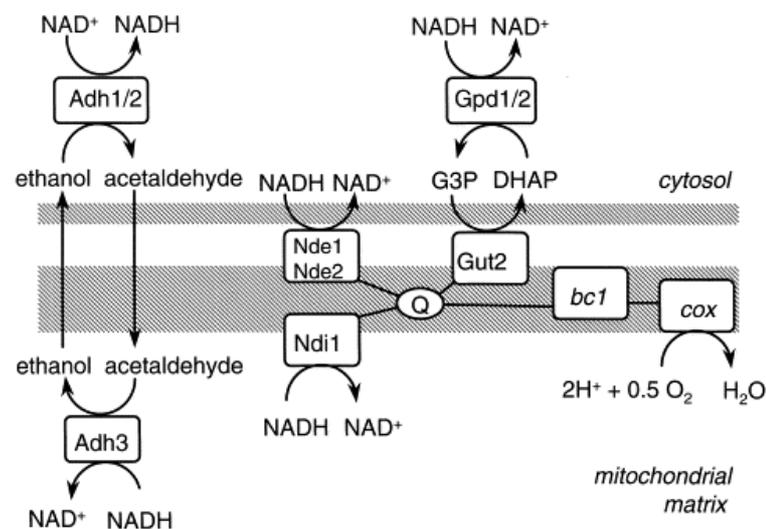


Figure I-7 Représentation des trois principaux modes de transfert du pouvoir réducteur du cytosol vers la mitochondrie. De gauche à droite, la navette éthanol, les enzymes déshydrogénases NDE1 et NDE2, et la navette glycérol. [Overkamp et al, 2002]

D'autres navettes permettant le transfert du pouvoir réducteur, telles que les navettes malate/oxaloacétate, malate/aspartate, glutamate/ α -céto-glutarate, malate/pyruvate, existent et sont plus ou moins actives, selon les conditions de croissance de la cellule, mais elles semblent n'avoir que des rôles mineurs (Overkamp, Bakker et al. 2000).

I.3 Implication du glycérol dans la réponse au stress

En tant qu'organismes unicellulaires, les levures doivent en permanence mettre en œuvre des mécanismes de régulation pour s'adapter à leur environnement et maintenir leur homéostasie. Le glycérol joue un rôle majeur dans l'adaptation au stress chez *S. cerevisiae*. Il est, notamment, particulièrement important dans l'adaptation au stress osmotique, mais il semble aussi jouer un rôle dans la lutte contre d'autres types de stress, tels que le stress thermique.

I.3.1 Réponse générale au stress

Il a été largement démontré que soumettre des levures à un stress modéré peut considérablement améliorer leur capacité à résister à d'autres types de stress. L'expression de 10 % des gènes est affectée par différentes conditions de stress (Hohmann 2002). Plusieurs phénomènes peuvent être mis en avant pour expliquer les similarités observées dans les réponses à différents stress : l'existence d'une voie générale de réponse au stress, la superposition de certaines voies de signalisation, le contrôle de l'expression des gènes par différentes voies de signalisation convergeant au niveau des promoteurs (Hohmann 2002).

De nombreux gènes sont régulés par les éléments de réponse au stress (STREs), à travers des régulateurs transcriptionnels MSN2 et MSN4 (Hohmann 2002). Souvent, les éléments de contrôle STREs peuvent être combinés avec d'autres sites de contrôle plus spécifiques d'un certain type de stress. Ainsi, dans les mutants Δ msn2/MSN4, le gène *GPD1* est induit de façon normale en condition de stress osmotique, mais possède une induction réduite en condition de stress thermique (Rep, Albertyn et al. 1999; Hohmann 2002). La protéine kinase A contrôle l'activité des gènes STRE-dépendants : une activité réduite de la kinase A entraîne une plus haute activité de base de ces gènes (Hohmann 2002). L'activité de la protéine kinase A pourrait être elle-même régulée par le taux d'AMP cyclique dans la cellule (Thevelein and de Winde 1999).

Ces différents mécanismes pourraient expliquer que la synthèse de glycérol semble augmenter pour divers types de stress.

I.3.2 Réponse au stress osmotique

I.3.2.1 Distinction entre stress osmotique et stress hydrique

L'inhibition non spécifique de la croissance et de l'activité des micro-organismes, en raison de l'accumulation de solutés dans le milieu de culture, peut être reliée à deux phénomènes: d'une part, l'augmentation de la pression osmotique du milieu de culture et, d'autre part, la minimisation de l'activité de l'eau intracellulaire (Walter, Morris et al. 1987).

En conditions normales, la pression osmotique à l'intérieur des levures est supérieure à celle du milieu de culture; l'eau a donc tendance à pénétrer dans les cellules et à les dilater. Seule la présence de la paroi cellulaire empêche l'explosion des cellules, en exerçant une pression sur celles-ci (Gervais and

Benevise 2001). Cette pression est appelée pression de turgescence (Π_t); à l'équilibre, elle correspond à la différence entre les pressions osmotiques interne (Π_i) et externe (Π_e) de la cellule $\Pi_t = \Pi_e + \Pi_f$ (Smith, Zhang et al. 2000). Pour préserver leur activité, les cellules doivent maintenir une pression de turgescence suffisante. Les solutés dits imperméants ne pénètrent pas dans la cellule et augmentent donc la pression osmotique du milieu de culture, sans augmenter celle du cytosol : ceci génère ainsi un stress osmotique, contre lequel les cellules doivent lutter pour maintenir leur pression de turgescence.

Les solutés dits perméants pénètrent dans la cellule et ont tendance à s'équilibrer entre les compartiments intracellulaires et extracellulaires. Les solutés perméants ne génèrent donc pas de stress osmotique à proprement parler, mais diminuent l'activité de l'eau. L'activité de l'eau caractérise la disponibilité de l'eau pour les réactions biologiques et constitue un facteur déterminant de la croissance microbienne. Une faible activité de l'eau a notamment un effet négatif sur la stabilité des liaisons hydrogènes. Dans le cas où la faible activité de l'eau est à l'origine de l'inhibition de la croissance, on parle de stress hydrique.

1.3.2.2 Maintien de la pression de turgescence

L'apparition d'un stress osmotique dans le milieu de culture se traduit au niveau du métabolisme des levures par des modifications des flux de carbone et d'énergie. Ainsi, une partie du carbone est détournée vers la production de glycérol, qui est accumulé dans la cellule en tant que principal soluté neutre ; parallèlement, la consommation d'énergie liée aux transports actifs des ions entre les milieux intracellulaires et extracellulaires augmente.

Voie de signalisation

Quand elles sont soumises à des conditions hypertoniques (potentiel hydrique réduit), les levures doivent faire face à une perte rapide d'eau, aboutissant à une perte de la pression de turgescence, un effondrement du cytosquelette, des dommages intracellulaires et, finalement, l'arrêt de la croissance (Nevoigt and Stahl 1997; Wojda, Alonso-Monge et al. 2003). La réponse à ce type de stress entraîne la modification de l'activité de 10 % des gènes de la cellule. La voie de signalisation cellulaire à l'origine de cette réponse au stress osmotique est appelée High Osmolarity Glycerol Pathway (HOG) (cf. Figure I-8).

Cette voie de signalisation appartient à la famille des MAP kinase pathways (MAPK). Elle est constituée d'une succession de protéines kinases, le signal étant transmis depuis les récepteurs membranaires jusqu'aux facteurs de transcription (HOG1) par une cascade de phosphorylations. La

voie est divisée en deux branches correspondant à deux récepteurs membranaires différents, SLN1 et SHO1.

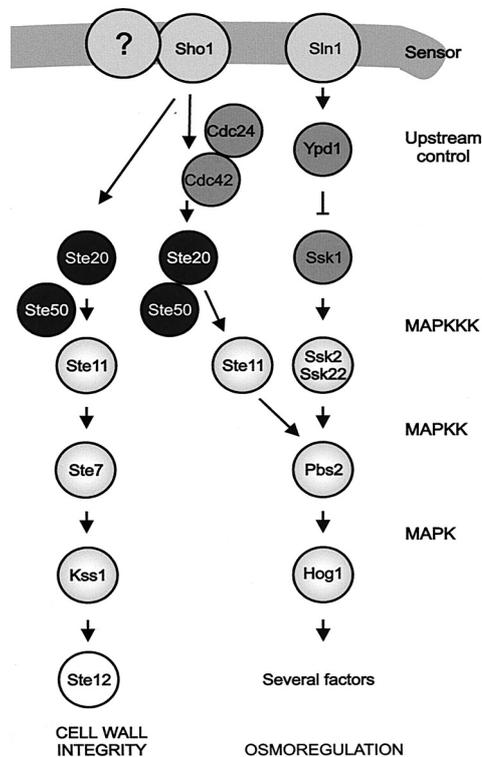


Figure I-8 Représentation de la voie de signalisation HOG (Hohmann 2002)

Accumulation intracellulaire du glycérol

La réponse la plus significative au stress osmotique consiste en l'accumulation de solutés neutres dans le cytoplasme, en particulier des polyols, pour contrebalancer la pression osmotique (Brown 1978). Ceci, en augmentant l'osmolarité de la cellule, permet de préserver l'eau dans le cytoplasme, assurant le maintien de la pression de turgescence et du volume de la cellule. Les protéines restent hydratées, les enzymes sont stabilisées et l'activité biologique est préservée (Nevoigt and Stahl 1997). D'autre part, cette réponse s'accompagne aussi par des changements dans la composition lipidique de la membrane. Chez *S. cerevisiae*, le glycérol est le principal soluté neutre accumulé (Blomberg, Larsson et al. 1988), les cellules sont capables d'accumuler le glycérol jusqu'à une concentration intracellulaire molaire (Olz, Larsson et al. 1993). Ainsi, des levures, cultivées en présence 0,9 Mole de NaCl en chemostat, peuvent accumuler 600 fois la concentration en glycérol extracellulaire dans leur cytosol et 60 % de la quantité totale de glycérol produit (Olz, Larsson et al. 1993).

Mécanisme de l'accumulation

L'accumulation du glycérol dans les cellules est principalement due à l'activité accrue des enzymes GPD (Edgley and Brown 1983). Cette augmentation d'activité est liée à la surexpression des enzymes (André, Hemming et al. 1991). L'augmentation d'activité est plus particulièrement le fait de *GPD1*; en effet, il a été montré que ce gène était surexprimé en conditions de stress osmotique. De plus, dans ces conditions, les mutants Δ gpd1 présentent une plus faible accumulation de glycérol ainsi qu'un défaut de croissance, par rapport à la souche sauvage (Larsson, Ansell et al. 1993; Albertyn, Hohmann et al. 1994; Michnick, Roustan et al. 1997). Par ailleurs, aucune surexpression de *GPD2* n'a été observée dans ces conditions et les mutants Δ gpd2 présentent une croissance normale dans un milieu hypertonique (Ansell, Granath et al. 1997).

Les enzymes impliquées dans la déphosphorylation du G3P présentent aussi une suractivité en condition de stress osmotique ; cependant, les auteurs divergent sur l'origine de cette suractivité. Ainsi, pour Norbeck et al (1996) (Norbeck and Blomberg 1997), seul *GPP2* est induit, alors que selon les résultats de northern blot de Pählman et al (2001), les deux gènes seraient induits (Pahlman, Granath et al. 2001). Dans tous les cas, c'est l'étape de réduction du DHAP qui contrôlerait la cinétique de la réaction.

La modification du transport du glycérol joue aussi un rôle dans l'accumulation de ce dernier dans la cellule. Ainsi, la modification de la composition de la membrane pourrait engendrer une modification de la perméabilité de celle-ci au glycérol (Hohmann 2002). D'autre part, il a été montré que le canal FPS1 se fermerait en condition de stress osmotique (Tamás, Luyten et al. 1999) (cf. I.1.3.3). La fermeture de ce canal diminue le flux sortant de glycérol, facilitant son accumulation et donc le maintien de la pression de turgescence de la cellule. Enfin, il est possible que des phénomènes de transport actif du glycérol depuis le milieu de culture vers la cellule faisant intervenir STL1 soient impliqués (Ferreira, van Voorst et al. 2005).

Transports ioniques

La régulation des concentrations intracellulaires des principaux cations monovalents (K^+ , Na^+ et H^+) est un paramètre essentiel de l'homéostasie cellulaire, influant à la fois la force ionique cellulaire et la pression osmotique (Serrano 1980). L'augmentation de la concentration en sels dans le milieu de culture se traduit par une plus grande demande d'énergie, liée à la maintenance cellulaire (Olz, Larsson et al. 1993). Cette augmentation de la demande en énergie est traditionnellement attribuée aux mécanismes de transport actif des ions, permettant de maintenir une composition en ions du milieu intracellulaire compatible avec les conditions de croissance (Norkrans and Kylin 1969; Watson 1970; Gustafsson and Larsson 1990; Olz, Larsson et al. 1993). Ainsi l'ion Na^+ étant toxique

pour les cellules, sa concentration intracellulaire doit être maintenue faible (Darley, van Wuytswinkel et al.). De même, la concentration cytosolique en ions K^+ est maintenue constante même lorsque la concentration extracellulaire en ions K^+ varie de manière importante ; cette régulation est nécessaire pour maintenir le potentiel de membrane (Lichko, Okorokov et al. 1982), (Kinclova-Zimmermannova, Gaskova et al. 2006).

I.3.2.3 Lien entre stress osmotique et croissance

La théorie du stress de surface formulée par Koch en 1983 relie la croissance à la pression de turgescence et aux modifications morphologiques (Koch 1983). Cette théorie implique que la pression de turgescence est la force motrice de l'expansion cellulaire et qu'elle est à l'origine des modifications morphologiques de la paroi. Des protéines spécifiques, localisées dans les zones où la paroi cellulaire est soumise au stress, assurent la modification de la structure et de la composition de celle-ci, facilitant sa déformation en réponse à la pression de turgescence. Enfin, des systèmes de régulation assurent le contrôle de ces protéines et facilitent leur rôle dans ce processus.

Ainsi, dans ce modèle, les forces gouvernant la croissance microbienne sont le résultat du gradient osmotique entre le cytoplasme et le milieu extérieur. La pression de turgescence entraîne un stress de surface et l'adaptation de la cellule à ce stress, à travers l'accroissement de la membrane et de la paroi cellulaire, est à l'origine de la croissance.

Cependant, le processus est plus complexe. En effet, pour que la croissance cellulaire soit limitée aux zones de bourgeonnement, des mécanismes permettant la régulation fine du système sont nécessaires. Ainsi, pour éviter d'endommager la paroi cellulaire, l'osmolarité interne est finement régulée à travers la voie de signalisation HOG. La déformation localisée de la paroi cellulaire nécessite, d'une part, la mise en place d'un gradient local de pression osmotique dans les zones de bourgeonnement et d'autre part, la mise en place d'une véritable polarisation de la cellule, permettant l'acheminement du matériel cellulaire et des enzymes nécessaires à la croissance de la paroi et de la membrane cytoplasmique. Deux principaux mécanismes sont impliqués dans la polarisation cellulaire : l'orientation des filaments d'actine du cytosquelette, qui dirigent le transport myosine dépendant des organelles et des vésicules de sécrétion vers le site de croissance, et la localisation des protéines, modifiant la structure de la paroi, uniquement dans la zone de croissance.

D'autre part, il a pu être démontré que la protéine SHO1, médiateur de l'une des deux branches de la voie de régulation HOG, était principalement localisée dans les zones d'expansion cellulaire. Le fonctionnement localisé du complexe protéique contrôlé par cette voie de régulation agirait ainsi comme un régulateur osmotique local, à l'origine d'un gradient de pression osmotique dans la cellule.

I.3.3 Réponse au stress éthanol

L'éthanol possède un effet toxique sur les levures. Ainsi, lorsque la concentration en éthanol augmente, elle affecte la vitesse de croissance, les cinétiques des réactions et la viabilité cellulaire. Il est difficile de quantifier ou même de définir le stress éthanol chez les levures. Le rôle de l'éthanol dans le stress osmotique, l'importance de son action en tant qu'agent chaotropique, mais aussi ses potentiels effets spécifiques sur le métabolisme sont autant de sujets de controverses entre les différents auteurs.

I.3.3.1 Concentration intracellulaire en éthanol

La concentration intracellulaire en éthanol est une question très controversée. Ainsi, selon les auteurs, la concentration en éthanol intracellulaire est soit en équilibre avec le milieu de culture, soit supérieure, soit inférieure. En 1976, Nagodawithana et Steinkraus ont constaté que l'éthanol ajouté à des cultures de *S. cerevisiae* avait, à concentration égale, un effet toxique inférieur à celui de l'éthanol produit par les cellules (Nagodawithana and Steinkraus 1976). Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer ce phénomène : l'apparition d'autres substances toxiques dans la cellule (Viegas, Rosa et al. 1989), la carence en nutriments (Casey, Magnus et al. 1984; Dombek and Ingram 1986), mais aussi l'accumulation intracellulaire en éthanol (Nagodawithana and Steinkraus 1976; Navarro and Durand 1978; Beaven, Charpentier et al. 1982). Cependant, cette dernière hypothèse est très discutée. D'autres études ont conclu que la concentration en éthanol intracellulaire était inférieure ou égale à celle du milieu (Dasari, Roddick et al. 1983; Guijarro and Lagunas 1984; Dombek and Ingram 1986). Pour D'Amore et al, ces différences dans le dosage sont dues à des problèmes de méthode (D'Amore, Panchal et al. 1988). Ainsi le lavage des cellules, l'estimation du volume d'eau intracellulaire, le prélèvement initial et la remise en suspension des cellules sont autant de sources d'erreurs, biaisant la mesure de la concentration intracellulaire en éthanol (D'Amore, Panchal et al. 1988). En utilisant des méthodes de marquage au carbone 14, il a pu être démontré que la concentration en éthanol intracellulaire était égale à la concentration extracellulaire et que les phénomènes d'accumulation intracellulaire se limitaient aux premières heures de la croissance (D'Amore, Panchal et al. 1988).

I.3.3.2 Effet aspécifique de l'éthanol

L'accumulation de l'éthanol dans le milieu a pour effet d'augmenter la pression osmotique. Si l'on admet que la concentration intracellulaire en éthanol est équilibrée avec la concentration extracellulaire, sa présence ne crée pas de différence de pression osmotique entre le milieu de culture et le milieu intracellulaire, n'engendrant pas ainsi de conditions hypertoniques. Cependant, l'augmentation de la concentration intracellulaire en éthanol a pour effet de diminuer l'activité de l'eau dans la cellule. Ainsi, bien qu'il n'y ait pas mise en place d'un stress osmotique sous l'effet de l'éthanol, celui-ci engendre tout de même un stress hydrique à l'intérieur de la cellule. Le stress hydrique, correspondant à la diminution de l'activité de l'eau dans la cellule, se caractérise par une perturbation des liaisons hydrogènes (Hallsworth 1998). Cette perturbation des liaisons hydrogènes entraîne des perturbations de la bicouche lipidique de la membrane et affecte aussi l'activité des enzymes. L'effet négatif de la diminution de l'activité de l'eau est observable, même si les activités de l'eau intracellulaire et extracellulaire sont équivalentes (Hallsworth 1998).

I.3.3.3 Effet spécifique de l'éthanol

Il a pu être observé que l'effet inhibiteur de l'éthanol apparaissait plus vite dans le cas d'une réduction de l'activité de l'eau engendrée par la présence d'éthanol dans le milieu que lorsque cette réduction était due à un autre composé. Ainsi, chez le champignon *Aspergillus oryzae*, la comparaison entre l'effet du stress induit par des concentrations élevées en éthanol avec l'effet induit par d'autres substances (KCl, Sorbitol, glucose, glycérol et polyéthylène glycol 400) montre que, dans le cas de l'éthanol, l'inhibition apparaît pour des activités de l'eau plus élevées que dans le cas des autres composés (Hallsworth, Nomura et al. 1998). Pour expliquer ce phénomène, les auteurs utilisent la notion d'effet spécifique de l'éthanol. L'effet spécifique de l'éthanol a été défini comme l'action de l'éthanol sur les régions hydrophobes de certains composants cellulaires, tels que les membranes (Hallsworth, Nomura et al. 1998), l'inhibition de processus métaboliques spécifiques et le déclenchement d'effets métaboliques indirects (Hallsworth, Nomura et al. 1998). Ainsi, l'un des effets spécifiques de l'éthanol est son action sur divers systèmes enzymatiques: inhibition de l'hexokinase (Navarro and Durand 1978), de la pyruvate décarboxylase (Millar, Griffiths-Smith et al. 1982) et de l'alcool déshydrogénase. L'éthanol possède aussi un effet sur les membranes cytoplasmiques, dont il modifie la structure et augmente la perméabilité aux petites molécules et aux ions (Leao and Van Uden 1982).

I.3.3.4 Réponse cellulaire au stress éthanol

L'un des effets les plus importants de la perturbation des liaisons hydrogènes est observé au niveau de la membrane. L'éthanol entraîne ainsi une augmentation de la perméabilité de la membrane aux petites molécules et aux ions, affectant le potentiel transmembranaire et perturbant le transport de certains composés comme les sucres (Leao and Van Uden 1982). De plus, l'éthanol affecte la fluidité de la membrane, allant jusqu'à causer la lyse cellulaire. Une adaptation de la membrane à l'éthanol a pu être observée dans plusieurs études (Ingram and Buttke 1984). L'accumulation de solutés neutres pourrait aussi avoir un rôle dans la protection des membranes et des enzymes, en cas de faible activité de l'eau (Hallsworth 1998). Ils sont notamment impliqués dans la protection des éléments cellulaires, affectés par la perturbation des liaisons cellulaires, perturbation liée à la diminution de l'activité de l'eau. Cet effet, distinct de leur rôle d'osmoprotectant a peu été étudié, mais a été suggéré dans plusieurs études (Hallsworth, Prior et al. 2003).

I.3.4 Réponse au stress thermique

Le glycérol semble particulièrement important dans le cas du stress thermique. En effet, le glycérol pourrait avoir un rôle dans la stabilisation et la renaturation des protéines cellulaires en cas de température élevée (Zancan and Sola-Penna 2005). De plus, il a été montré que la synthèse de glycérol augmentait en cas de culture à des températures élevées. Ainsi, un phénomène de découplage entre la croissance et la production de glycérol existe pour des températures supérieures à 36°C, suggérant un rôle protecteur du glycérol contre le stress thermique (Aldiguier, Alfenore et al. 2004). De même, il a été montré que les doubles mutants *GPP1/GPP2* sont capables de croître à température élevée (Siderius, Wuytswinkel et al. 2000) uniquement si on les cultive sur des milieux contenant du glycérol. Enfin, les souches mutées pour la voie HOG sont moins sensibles au stress osmotique, quand elles sont cultivées à température élevée (Wojda, Alonso-Monge et al. 2003).

Cette convergence entre les réponses au stress osmotique et au stress thermique ne semble pas être due à la voie générale de réponse au stress, mais à l'activation de la branche Sho1 de la voie HOG (Winkler, Arkind et al. 2002) (cf. Figure I-9).

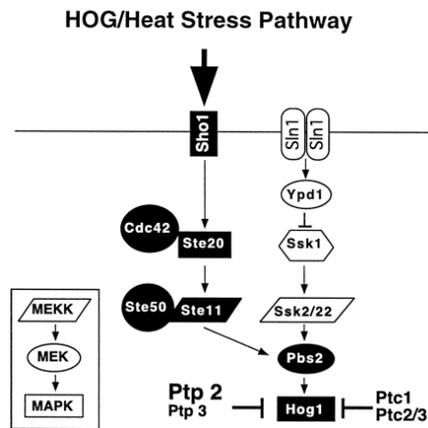


Figure I-9 Activation de la branche Sho1 de la voie HOG par le stress thermique [Hohmann, 2002].

I.4 Métabolisme et impact physiologique des acides organiques

Les acides organiques, au même titre que le glycérol, font partie des principaux co-produits de la fermentation éthanolique ; pourtant, leur éventuel rôle physiologique et leur place dans le métabolisme restent mal définis. La production d'acides organiques est souvent attribuée à des mécanismes de saturation des voies métaboliques, liés à l'importance du flux glycolytique. Elle est ainsi assimilée à une fuite de carbone, sans rôle particulier apparent. Cependant, du fait des positions clés occupées par ces acides organiques dans le métabolisme central du carbone, leur production impacte considérablement les métabolismes énergétique et oxydo-réductif. Ainsi, une part importante du glycérol est produite afin de réoxyder le surplus de NADH, engendré par la production des acides organiques. Par ailleurs, l'accumulation des acides organiques dans le milieu possède un effet inhibiteur pouvant considérablement influencer la physiologie des levures durant la fermentation. Les principaux acides organiques connus pour être accumulés dans le milieu lors de la fermentation éthanolique de *S. cerevisiae* sont l'acide acétique, l'acide succinique, l'acide pyruvique, l'acide fumarique, l'acide malique et l'acide oxoglutarique (Verduyn, Postma et al. 1990). Parmi ces acides, seuls les acides acétique, pyruvique et succinique ont été détectés durant nos fermentations et ont donc été considérés.

I.4.1 Métabolisme des acides organiques

I.4.1.1 Mécanisme de l'overflow

La saturation des voies métaboliques par l'importance du flux glycolytique est la principale théorie retenue par la littérature pour expliquer la production des acides organiques. En effet, pour des vitesses de consommation spécifique de glucose élevées, du fait de l'importance du flux glycolytique et donc de la production de pyruvate, les enzymes situées en aval de la glycolyse seraient saturées. Ce phénomène de saturation est étroitement lié à l'effet Crabtree en condition aérobie (Postma, Verduyn et al. 1989) (cf. I.1.2.3). En condition anaérobie, bien qu'on ne puisse pas parler d'effet Crabtree, du fait de l'absence d'oxygène, un phénomène similaire de saturation des voies métaboliques est observé (Verduyn, Postma et al. 1990). Cette saturation entraînerait l'accumulation des métabolites intermédiaires, dont les acides organiques, dans le cytosol et aboutirait ainsi à leur sécrétion dans le milieu de culture.

Pyruvate

Le pyruvate, produit final de la glycolyse possède un rôle central dans le métabolisme de *S. cerevisiae*, au carrefour entre les réactions anaboliques et cataboliques (Pronk, Steensma et al. 1996). L'excrétion de pyruvate dans le milieu de culture par *S. cerevisiae* est traditionnellement associée à un phénomène d'overflow au niveau du carrefour du pyruvate, le flux glycolytique étant trop important pour les trois enzymes principalement impliquées dans la dégradation du pyruvate : la pyruvate déshydrogénase, la pyruvate décarboxylase et la pyruvate carboxylase (cf. Figure I-10). D'un point de vue oxydo-réductif, la production et la sécrétion, dans le milieu de culture, d'une mole de pyruvate à partir de glucose aboutit à la production nette d'une mole de NADH. Ce NADH doit être réoxydé par la cellule, soit à travers la voie de synthèse du glycérol, soit à travers la phosphorylation oxydative. D'un point de vue énergétique, cette production d'une mole de pyruvate est associée à la production d'une mole d'ATP.

Acétate

Dans le métabolisme de *S. cerevisiae*, l'acétate apparaît principalement comme intermédiaire de la synthèse de l'acétyl-coA cytosolique. L'acétate est produit par oxydation de l'acétaldéhyde, par les différentes isoenzymes acétaldéhydes déshydrogénases, qui sont présentes aussi bien dans le cytosol

que dans les mitochondries. Ces enzymes peuvent être réparties en deux groupes, selon qu'elles utilisent le NAD^+ ou le NADP^+ comme cofacteur. Le cofacteur réduit majoritaire, associé à une production d'acétate, a longtemps été discuté. Plusieurs auteurs ont ainsi émis l'hypothèse que le cofacteur majoritaire soit le NADH , mais un consensus semble s'être dégagé pour désigner le NADPH . En effet, les enzymes NADP^+ dépendantes ont, peu à peu, émergé comme les probables principales sources de NADPH dans le cytosol (Remize, Andrieu et al. 2000; Saint-Prix, Bonquist et al. 2004), aussi bien que dans les mitochondries (Miyagi, Kawai et al. 2009).

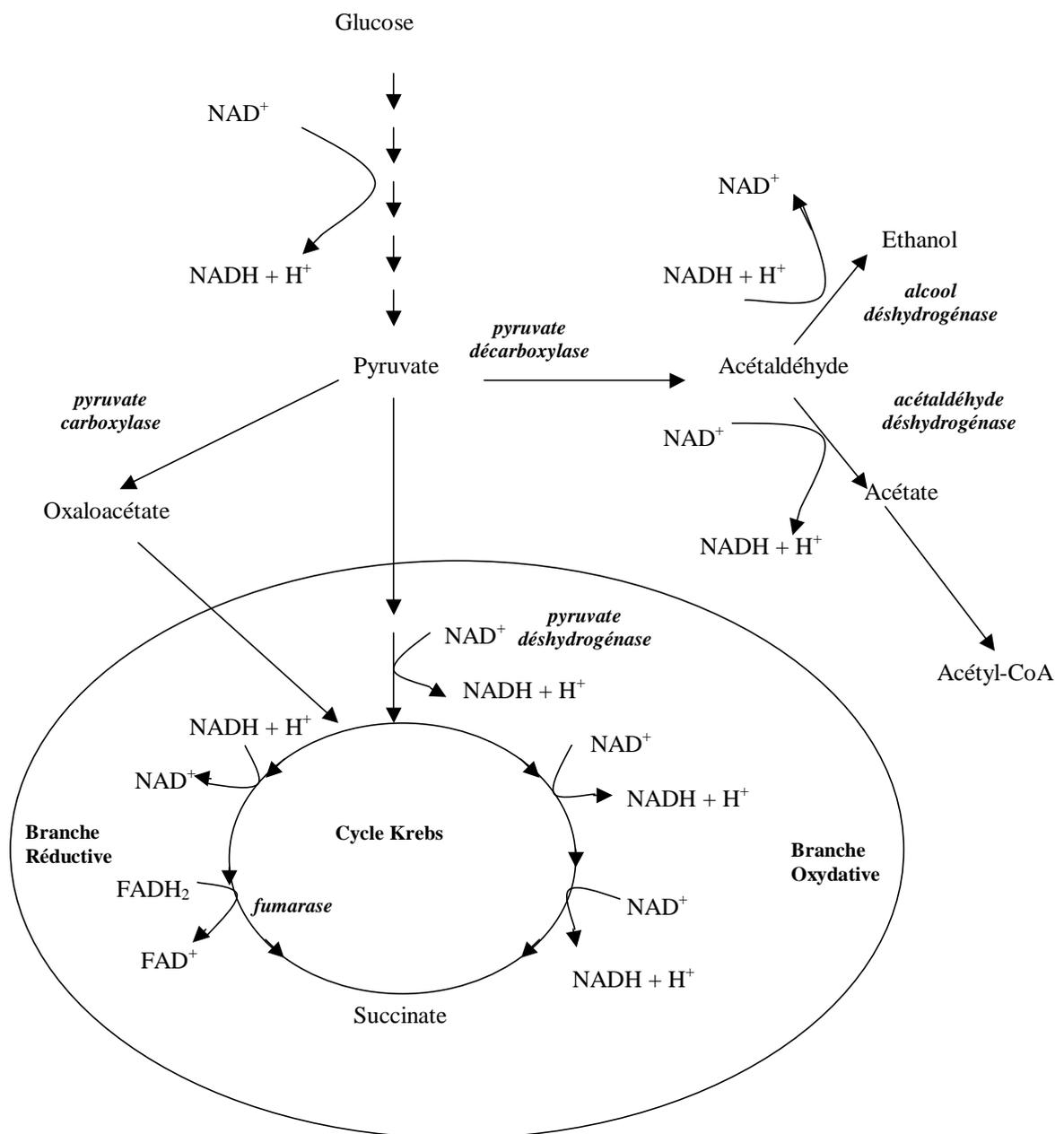


Figure I-10 Voies métaboliques impliquées dans la synthèse des acides organiques

L'excrétion d'acétate est très étroitement associée à l'effet Crabtree. Ainsi, Postma et al ont suggéré que l'accumulation d'acétate, liée à la saturation de l'acétyl-CoA synthase (cf. Figure I-10) pourrait être à l'origine de l'effet Crabtree : l'accumulation d'acétate entraînerait l'inhibition de l'acétaldéhyde déshydrogénase, provoquant l'accumulation d'acétaldéhyde et sa conversion en éthanol (Postma, Verduyn et al. 1989).

Succinate

Le succinate, en condition aérobie, est produit par voie oxydative à travers le cycle de Krebs ; son excrétion correspond à un flux trop important dans cette voie. En revanche, la production du succinate en condition anaérobie correspond à un métabolisme radicalement différent. En effet, il est couramment admis qu'en condition anaérobie le cycle de Krebs (cf. Figure I-10) ne fonctionne plus comme un cycle, mais comme deux branches, l'une oxydative et l'autre réductive (Atzpodien, Gancedo et al. 1968; Chapman and Bartley 1968; Sols, Gancedo et al. 1971). Ainsi, les enzymes succinate déshydrogénase (SDH) et succinyl-CoA synthase sont connues pour être fortement réprimées, à la fois au niveau de l'expression du gène et de la synthèse protéique, limitant le flux depuis l'alpha-cétoglutarate vers le succinate (de Groot, Daran-Lapujade et al. 2007). Cependant, il a pu être montré que l'enzyme fumarate réductase prenait le relais de la SDH en condition anaérobie et permettait la production de succinate à partir de fumarate dans la mitochondrie ; cette réaction est essentielle pour réoxyder le FADH₂ produit en condition anaérobie (Camarasa, Grivet et al. 2003; Camarasa, Faucet et al. 2007). Dans ces conditions, la majeure partie du succinate serait produite par voie réductive (cf. Figure I-10)

I.4.2 Lien entre le métabolisme du glycérol et des acides organiques

Le métabolisme des acides organiques étant étroitement lié au métabolisme oxydo-réductif, il interagit avec la production de glycérol. Ce phénomène a particulièrement été mis en évidence pour l'acétate. Ainsi, plusieurs études ont permis d'observer une diminution du rendement acétate dans des souches modifiées pour minimiser la production de glycérol (Ansell, Granath et al. 1997; Zhang and Chen 2008). De plus, en condition anaérobie, une augmentation de la production d'acétate a pu être observée dans une souche modifiée pour sur-produire le glycérol (Remize, Roustan et al. 1999). Cette augmentation de la production d'acétate, interprétée par Remize et al comme une façon d'augmenter la production de NADPH, pourrait aussi être liée à une réorientation du flux d'acétaldéhyde depuis la production d'éthanol vers l'acétate, en raison de la modification de l'équilibre NAD⁺/NADH. Enfin, la production d'acétate est largement diminuée en condition anaérobie, comparée à celle obtenue en condition aérobie (Alfenore, Cameleyre et al. 2004). Selon qu'elle soit effectuée par l'enzyme NAD⁺

ou NADP⁺ dépendante, la production d'une mole d'acétate à partir de glucose a pour bilan respectivement la production d'une mole de NADH, d'une mole de NADPH et d'une mole d'ATP ou la production de deux moles de NADH et d'une mole d'ATP. De même, la diminution du ratio NADH/NAD⁺ dans la cellule, par l'expression d'enzymes NADH oxydases hétérologues, provoque une augmentation de la production de NADH (Heux, Cachon et al. 2006; Vemuri, Eiteman et al. 2007; Hou and Vemuri 2009).

I.4.3 Accumulation intracellulaire des acides organiques

Les phénomènes d'accumulation des acides organiques dans le cytosol sont étroitement liés à la régulation du pH intracellulaire. En effet, les concentrations en acides organiques intracellulaires et extracellulaires s'équilibrent selon le gradient pH entre les deux milieux.

Par ailleurs, l'accumulation des acides dans le cytosol tend à diminuer le pH intracellulaire et nécessite la mise en œuvre de systèmes de régulation pour le maintien de l'homéostasie.

I.4.3.1 Mécanisme de transport des acides organiques

Les acides organiques sont des acides faibles dont les formes dissociées et non dissociées coexistent en solution. L'équilibre entre ces deux formes s'établit en fonction du pKa de l'acide et du pH de la solution, en suivant l'équation de Henderson-Hasselbach (Equation 1):

Équation 1: Equation de Henderson-Hasselbach

$$pH = pKa + \text{Log}\left(\frac{[A^-]}{[AH]}\right)$$

Sous forme non dissociée, les acides peuvent diffuser librement entre les milieux extracellulaires et intracellulaires, soit par diffusion simple à travers la membrane (Kell, Peck et al. 1981; Krebs, Wiggins et al. 1983), soit par diffusion facilitée à travers des canaux protéiques (Russell 1992; Mollapour and Piper 2007). En revanche, la membrane étant imperméable aux anions, les acides organiques sous forme dissociée ne peuvent la traverser (Cassio, Leao et al. 1987). L'équilibre entre les milieux extracellulaire et intracellulaire est atteint lorsque la forme non dissociée se trouve en concentration identique, à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule. Cependant, le pH intracellulaire étant supérieur à celui du milieu de culture, la dissociation est plus importante dans la cellule : ce qui peut entraîner une accumulation de l'acide sous sa forme dissociée, en fonction des valeurs relatives des pH intra et extracellulaires (Pampulha and Loureiro-Dias 1989).

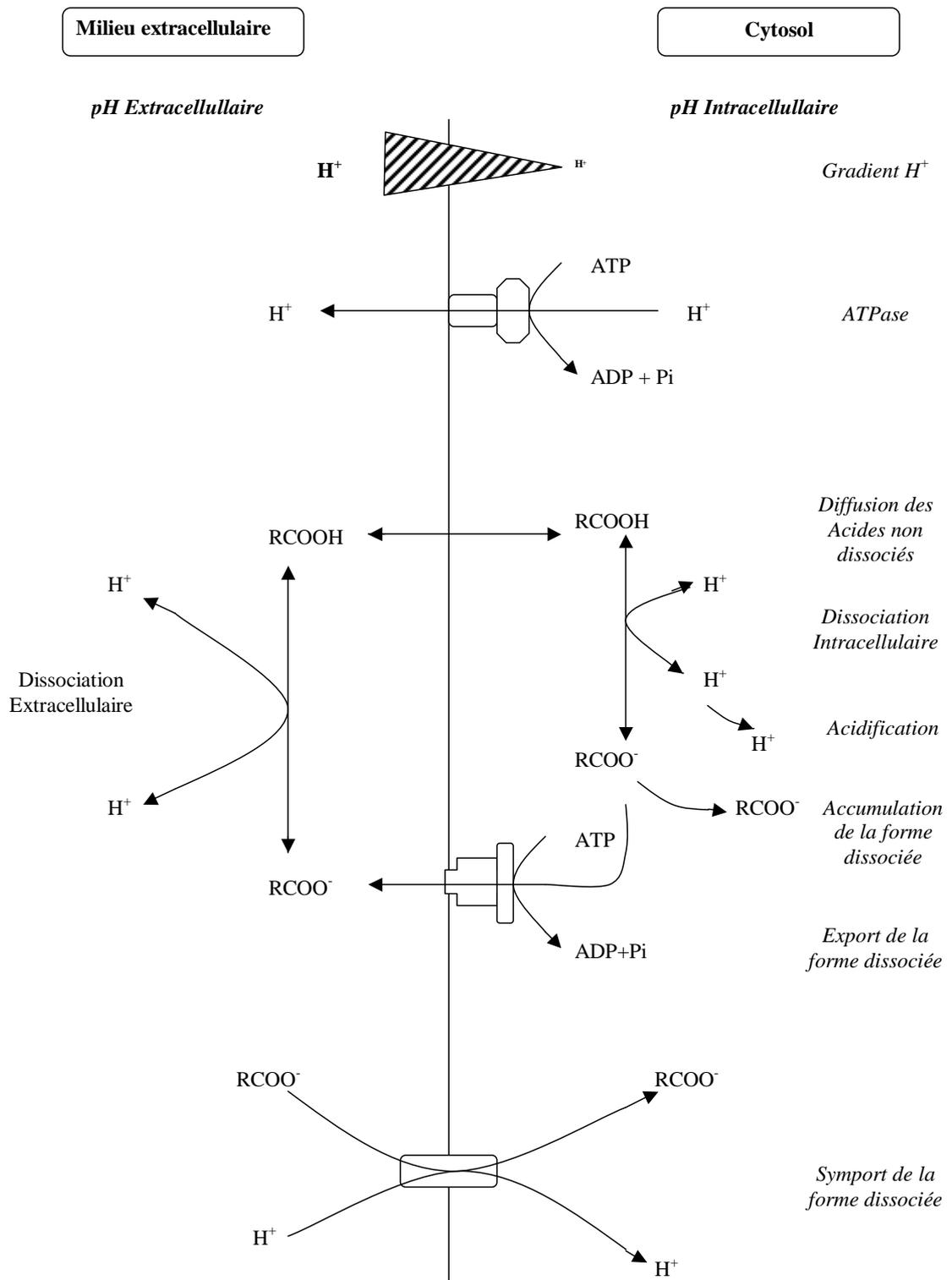


Figure I-11 Mécanismes impliqués dans le transport et l'accumulation des acides organiques

Outre les phénomènes de diffusion de la forme non dissociée, les acides organiques peuvent aussi pénétrer dans la cellule sous leur forme dissociée par des mécanismes de symport H^+ à travers des canaux protéiques (cf. Figure I-11). De tels canaux, possédant des fonctionnements plus ou

moins spécifiques, ont pu être mis en évidence pour l'acétate (Casal, Cardoso et al. 1996) et le pyruvate (Makuc, Paiva et al. 2001; Tsuboi, Wakisaka et al. 2003). Ces protéines membranaires sont toutes soumises à la répression glucose et ne devraient donc pas être actives dans nos fermentations. Ces canaux permettent l'entrée de la forme dissociée des acides organiques dans la cellule, en l'absence de glucose, pour leur utilisation comme source de carbone.

Par ailleurs, l'activité d'un transporteur d'acides faibles, permettant l'excrétion de la forme dissociée des acides organiques en présence de glucose, a pu être mise en évidence (Piper, Mahe et al. 1998). La suppression de ce transporteur diminue de façon drastique, notamment, la tolérance à l'acétate.

I.4.3.2 Maintien de l'homéostasie

La régulation du pH intracellulaire (pHi) est un paramètre essentiel de l'homéostasie des micro-organismes. En effet, l'efficacité de nombreux mécanismes cellulaires, tels que la glycolyse ou la division cellulaire, dépend du pH intracellulaire. Sous l'effet de l'accumulation des acides organiques, le milieu intracellulaire a tendance à s'acidifier : ce qui nécessite la mise en œuvre par la cellule de mécanismes de régulation.

pH intracellulaire

Différentes méthodes de mesure ont permis d'évaluer le pH intracellulaire de *S.cerevisiae* entre 6,5 et 7,1 (Dombek and Ingram 1987; Eraso, MazÓN et al. 1987; Ramos, Haro et al. 1989; Ramos, Balbin et al. 1989; Kotyk and Georghiou 1991). Cependant, aucune de ces méthodes de mesure du pHi ne semble vraiment satisfaisante, car elles impliquent toutes des manipulations qui sont de nature à modifier ce pHi.

Plusieurs auteurs ont clairement remis en question la capacité des levures à maintenir des valeurs de pHi proches de 7 durant la fermentation (Valle, Bergillos et al. 1986; Pampulha and Loureiro-Dias 1989; Taipa, Cabral et al. 1993; Taherzadeh, Niklasson et al. 1997). L'un des principaux arguments allant à l'encontre du maintien de valeurs de pHi supérieures à 6,5 est la valeur irréaliste des concentrations en acides organiques intracellulaires qui correspondrait à de tels pH.

Mécanismes de régulation

Pour lutter contre l'acidification du cytosol sous l'effet de la dissociation des acides organiques, des pompes à protons ATPases sont activées et permettent d'exporter les ions H⁺ hors de la cellule. Cependant, l'accumulation de la forme dissociée de l'acide, chargée négativement, tandis que les

protons issus de la dissociation sont exportés vers le milieu extracellulaire, crée un déséquilibre de charges de nature à altérer le potentiel membranaire. Le maintien du potentiel membranaire nécessite donc la mise en place d'un mécanisme de compensation de charges. Une entrée et une accumulation d'ions potassium dans le cytosol ont ainsi pu être mises en évidence dans les cellules de *S. cerevisiae* exposées à des acides organiques (Ryan, Ryan et al. 1971; Ryan and Ryan 1972). Par ailleurs, des souches mutées pour les transporteurs K^+ présentent une tolérance aux acides organiques réduite (Macpherson, Shabala et al. 2005). Un consensus grandissant tend à reconnaître l'entrée d'ions potassium dans le cytosol comme un élément à part entière de la régulation du pH, y compris dans des conditions normales de croissance (Yenush, Mulet et al. 2002).

I.4.4 Effet toxique des acides organiques

Les acides organiques sont connus pour avoir un effet toxique sur les cellules microbiennes. Cet effet toxique peut se manifester de diverses façons : inhibition de la croissance, chute de la viabilité, diminution du rendement biomasse. Plusieurs phénomènes participent à l'explication de la toxicité de ces molécules: l'apparition d'un découplage entre anabolisme et catabolisme, l'augmentation de la pression osmotique intracellulaire, la chute du pH intracellulaire ou encore l'effet spécifique inhibiteur des acides organiques sur certaines voies métaboliques.

I.4.4.1 Le découplage métabolique.

Lors d'ajouts d'acides organiques dans le milieu de culture, la différence entre le $pH_{intracellulaire}$ et le $pH_{extracellulaire}$ entraîne une accumulation intracellulaire de la forme dissociée et une importante libération de protons dans le cytosol. Pour éviter l'acidification du cytosol et maintenir son pH_i , les cellules activent des pompes à protons, coûteuses en énergie : on parle alors d'effet découplant, une partie de l'énergie produite par la cellule ne servant plus à la production de biomasse, mais à la lutte contre le stress généré par l'accumulation des acides, diminuant ainsi le rendement biomasse (Maiorella, Blanch et al. 1983; Verduyn, Postma et al. 1990). Au-delà d'une certaine concentration en acide non dissocié, la vitesse d'entrée de l'acide dans la cellule devient supérieure aux capacités de transport des protéines membranaires, provoquant l'acidification du cytosol (Verduyn, Postma et al. 1990), ce qui finit par inhiber la croissance. Un $pH_{extracellulaire}$ inférieur au pK_a de l'acide augmente la proportion d'acide non dissocié dans le milieu extracellulaire et, donc, la toxicité de cet acide. L'effet découplant est plus particulièrement associé à l'acide acétique, l'acide benzoïque et l'acide octanoïque (Taherzadeh, Niklasson et al. 1997). Cependant, pour certains auteurs, l'effet découplant des acides organiques est largement moins important que celui observé

avec des agents découplants synthétiques et l'effet toxique des acides organiques serait plutôt lié à l'accumulation des anions dans le cytosol (Russell 1992).

I.4.4.2 Diminution du pH intracellulaire

Plusieurs auteurs ont suggéré que, malgré les mécanismes de régulation, les levures ne peuvent maintenir leur pH intracellulaire à des valeurs élevées, lorsque la concentration en acides organiques dans le milieu est trop élevée. La diminution du pH_i pourrait expliquer une partie de l'effet inhibiteur des acides organiques. En effet, le pH_i influe sur les activités des différentes enzymes : ainsi, un pH_i trop bas pourrait altérer l'activité cellulaire.

I.4.4.3 Pression osmotique et diminution du pH intracellulaire

L'accumulation des acides organiques sous leur forme dissociée dans le cytosol des micro-organismes, due à la différence entre les pH intracellulaire et extracellulaire, entraîne une augmentation de la pression osmotique (Roe, McLaggan et al. 1998). Cet effet est accentué par la nécessité pour la cellule d'accumuler des ions positifs afin de maintenir son potentiel membranaire. Cette augmentation de la pression de turgescence au-dessus des valeurs seuils pourrait inhiber la croissance.

Dans sa thèse de doctorat, Ardaillon Simoes (Ardaillon Simoes 1994) a proposé une théorie reliant la régulation du pH_i à la régulation de la pression de turgescence de la cellule chez *E. coli*. Selon cette théorie, l'accumulation intracellulaire d'acides organiques sous leur forme dissociée, due à l'augmentation de la concentration en acides dans le milieu de culture, induirait une compétition entre la régulation du pH_i et celle de la pression osmotique. Ainsi, tant que la pression de turgescence maximum ne serait pas atteinte, la régulation du pH entraînerait l'accumulation d'anions ; puis, lorsque la pression osmotique intracellulaire dépasserait un certain seuil, la cellule ne pourrait plus réguler son pH_i.

I.4.4.4 Inhibition spécifique des voies métaboliques

Outre l'effet inhibiteur lié à la fonction acide, des effets plus spécifiques de certains acides sur l'activité cellulaire des micro-organismes ont été mis en évidence. Ainsi chez *E. coli*, l'acétate est plus

toxique que d'autres composés (Salmond, Kroll et al. 1984). Chez *S. cerevisiae*, l'acide acétique est suspecté d'être un inducteur de l'apoptose dans certaines conditions (Ludovico, Sousa et al. 2001).

I.5 Réduction de la production de glycérol en fermentation éthanolique

I.5.1 Performance de la fermentation éthanolique

La concentration d'éthanol minimum requise pour obtenir un procédé économiquement viable s'établit aux alentours de 8 °GL soit environ 60 g.L⁻¹ : ce seuil est déterminé par les coûts liés aux procédés d'évaporation et de purification de l'éthanol. Le rendement théorique maximal (rendement de Gay-Lussac) est de 0,511 g_{éthanol}/g_{glucose}. Ce rendement ne tient pas compte de la production de biomasse ; les rendements pratiques obtenus se situent en général entre 80 et 90 % du rendement théorique. Dans les procédés industriels actuels, la productivité en éthanol est de 1 à 2 kg.m⁻³.h⁻¹ et le rendement est de 0,42 à 0,48 g_{éthanol}/g_{glucose}. En laboratoire, l'optimisation des conditions de fermentation permet d'obtenir des performances considérablement améliorées. Ainsi, des concentrations de 22° Gay Lussac ont pu être obtenues (Thomas and Ingledew 1992), tandis que des records de productivité ont pu être établis à 160 g.L⁻¹ en 45 heures en mode fed-batch (Alfenore, Molina-Jouve et al. 2002) et à 40 g.L⁻¹.h⁻¹ pour une concentration de 8 ° Gay Lussac et un rendement éthanol de 0,44 g/g_{glucose}, en utilisant un réacteur continu bi-étagé avec recyclage des cellules (BBRC) (Ben Chaabane, Aldiguiet et al. 2006).

De nombreux travaux ont étudié l'influence des différents paramètres du procédé sur l'efficacité de la fermentation. Des performances améliorées peuvent être obtenues en régulant le niveau d'oxygène, en optimisant la stratégie d'alimentation en vitamines, en régulant la température ou en optimisant la composition du milieu de culture.

La composition du milieu de culture a une influence directe sur l'efficacité de la fermentation. Ainsi, des ajouts en extrait de levure, en ammonium (Jones and Ingledew 1994) ou en magnésium (Birch and Walker 2000) ont un effet protecteur sur les levures et améliorent leur viabilité. Cette protection permet d'élever le point critique en éthanol au-delà duquel la croissance des levures est

inhibée et, ainsi, d'obtenir des titres plus élevés en éthanol (Alfenore, Molina-Jouve et al. 2002). L'application d'une stratégie d'alimentation exponentielle en vitamines permet, elle aussi, d'améliorer la viabilité des cellules, augmentant à la fois le taux de croissance et le titre final en éthanol (Alfenore, Molina-Jouve et al. 2002).

La régulation de la température peut permettre d'améliorer la viabilité cellulaire, diminuer la production de glycérol et augmenter la production d'éthanol. Aldiguier et al (2004) ont montré par des expériences de fed-batch à différentes températures que celles-ci influençaient les performances en éthanol de la fermentation (Aldiguier, Alfenore et al. 2004).

La stratégie d'aération appliquée lors de la fermentation influence, aussi, considérablement les résultats obtenus. Ainsi, la comparaison de cultures en conditions d'oxygène limitant ou non limitant a permis de montrer que l'absence de limitation en oxygène permet d'augmenter la viabilité des cellules : on atteint ainsi des titres en éthanol plus élevés et une meilleure productivité (Alfenore, Cameleyre et al. 2004).

I.5.2 Approche de génie microbiologique

Parallèlement à l'augmentation de l'efficacité du procédé de fermentation éthanolique, plusieurs études se sont aussi intéressées à l'influence de paramètres opératoires, tels que la composition du milieu, la température de culture et l'alimentation en oxygène, sur la production de glycérol.

Ainsi, la production de glycérol est liée à la composition du milieu. Les travaux menés par Albers et al (1996), sur les procédés de fermentation VHG (Very High Gravity) en condition anaérobie, ont montré qu'il est possible de diminuer la production de glycérol en modifiant la source d'azote du milieu de culture (Albers, Larsson et al. 1996). Le remplacement du sel d'ammonium par des acides aminés, directement utilisables par les cellules, diminue la production d'acides aminés endogènes et donc la production de NADH associée. Cette limitation de la production de NADH permet de limiter la production de glycérol, associée à la régénération du NAD⁺ (Albers, Larsson et al. 1996). L'utilisation d'acides aminés est aussi accompagnée d'une augmentation du taux de croissance maximum du rendement biomasse et du rendement éthanol. La température de culture influe, elle aussi, sur la production de glycérol : en effet, un phénomène de découplage entre la croissance et la production de glycérol pour des températures supérieures à 36°C a été mis en évidence par Aldiguier

et al (2004), suggérant un rôle protecteur du glycérol contre le stress thermique (Aldiguié, Alfenore et al. 2004). Enfin, l'augmentation de l'aération, en permettant une réoxydation du NADH à travers la chaîne respiratoire, permet une réduction du rendement en glycérol (Alfenore, Cameleyre et al. 2004).

Ces travaux permettent aujourd'hui d'envisager de piloter les paramètres des fermentations éthanoliques, de manière à minimiser la production de glycérol. En utilisant cette stratégie, Bideaux et al (2006) ont réalisé une expérience de modélisation prédictive ayant pour but de diminuer la production de glycérol, lors d'une fermentation fed-batch à haute performance (Bideaux, Alfenore et al. 2006). Pour cela, l'équipe a développé un modèle couplant un descripteur métabolique de *S.cerevisiae* et des équations phénoménologiques, décrivant la consommation de substrats, la croissance cellulaire et la production de métabolites dans le bioréacteur. Ce modèle a, par la suite, été utilisé afin de prédire les conditions opératoires permettant de diminuer la production de glycérol liée à la réoxydation du NADH lors de la fermentation éthanolique. Les prédictions du modèle ont permis, en régulant finement l'alimentation de glucose (de manière à maintenir un coefficient respiratoire inférieur à 6), de diminuer la quantité de glycérol produite de 3,8 à 1,7 g.L⁻¹ (Bideaux, Alfenore et al. 2006). Cependant, cette diminution du rendement glycérol n'a pas été accompagnée d'un gain de rendement en éthanol : celui-ci se trouvant aussi diminué au profit de la biomasse.

I.5.3 Approche de génie métabolique

Plusieurs stratégies d'ingénierie des voies métaboliques, pouvant permettre de diminuer le rendement en glycérol et réorienter le flux de carbone vers l'éthanol, ont été explorées. Ainsi, la méthode la plus directe est de modifier la voie principale de biosynthèse du glycérol. Une autre stratégie plus fine consiste à tenter de modifier le métabolisme oxydo-réductif dans la cellule, pour essayer de diminuer l'excès de NADH non réoxydé par l'éthanol et donc également le glycérol. La tendance des études les plus récentes consiste à combiner ces deux stratégies et à y ajouter éventuellement des modifications de l'expression des protéines impliquées dans les phénomènes de transport du glycérol à travers la membrane cellulaire.

I.5.3.1 Ingénierie des voies de synthèse du glycérol

Les premières expériences visant à diminuer la production de glycérol des levures se sont concentrées sur les gènes structuraux de la voie de biosynthèse du glycérol : plus particulièrement sur

les gènes codant pour les enzymes glycérol phosphate déshydrogénases, *GPD1/GPD2*. Les simples et doubles mutants Δ gpd1, Δ gpd2, Δ gpd1/ Δ gpd2 ont été construits et testés dans différentes études (Larsson, Ansell et al. 1993; Eriksson, André et al. 1995; Ansell, Granath et al. 1997; Bjorkqvist, Ansell et al. 1997; Michnick, Roustan et al. 1997; Valadi, Larsson et al. 1998; Nissen, Hamann et al. 2000; Guo, Zhang et al. 2009). Ainsi, il a été démontré que le double mutant Δ gpd1/ Δ gpd2 n'est pas capable de croître en condition anaérobie et que son taux de croissance est fortement affecté en condition aérobie (Bjorkqvist, Ansell et al. 1997; Nissen, Hamann et al. 2000). Des taux de production de glycérol réduits ont été obtenus respectivement pour le mutant Δ gpd1, en condition de stress osmotique (Michnick, Roustan et al. 1997) et pour le mutant Δ gpd2, en condition anaérobie (Valadi, Larsson et al. 1998) ; cependant, ces mutants présentent des taux de croissance fortement altérés (Valadi, Larsson et al. 1998).

Dans la plupart de ces études, les gènes *GPD* ont été délétés en utilisant des marqueurs d'auxotrophie pour la sélection des clones. Les mutants obtenus nécessitent donc des milieux de culture complétés en acides aminés. La présence de ces compléments dans les milieux de culture peut diminuer la quantité de NADH, issue de la production de biomasse et modifie le bilan carbone : elle est donc de nature à biaiser les résultats (Nissen, Hamann et al. 2000). En 2000, l'équipe de Nissen a étudié l'effet des délétions des gènes *GPD* sur les rendements glycérol et éthanol, en utilisant des souches prototrophes. Cette étude a, pour la première fois, permis de suivre précisément le devenir du carbone lors de la fermentation (Nissen, Hamann et al. 2000). Les résultats ont montré que l'utilisation des simples mutants, Δ gpd1 et Δ gpd2, permettait d'obtenir, en condition aérobie, des rendements réduits en glycérol, sans altérer de façon importante la croissance et la production de biomasse et en augmentant légèrement le rendement en éthanol (Nissen, Hamann et al. 2000). En condition anaérobie, les mutants de simple délétion Δ gpd1 et Δ gpd2 ont permis d'augmenter le rendement en éthanol de 2,8 % et 4,7 % respectivement, tandis que le mutant de double délétion Δ gpd1/ Δ gpd2 ne présentait aucune croissance. En condition aérobie, Δ gpd1 et Δ gpd2 ont permis d'augmenter le rendement en éthanol de 2,2 % et 3,3 % respectivement, tandis que le mutant Δ gpd1/ Δ gpd2 a permis d'obtenir une augmentation de 12 % du rendement éthanol, mais avec une réduction de 28,8% du rendement biomasse. Cependant, cette étude a été menée dans un milieu contenant une faible concentration de sucre et les titres finaux en éthanol ne correspondent pas à ceux que l'on peut trouver en milieu industriel : elle ne prend donc pas en compte l'effet négatif que pourrait avoir la minimisation de la production de glycérol, en condition de stress osmotique. Les capacités de différents mutants de délétion pour les gènes *GPD* sont résumées dans le Tableau I-2.

Tableau I-2 Capacités fermentaires de souches présentant différentes configurations de délétions des gènes *GPD*

Souche parentale	Conditions de culture	Mutation	μ_{max}	$Y_{EtOH/Gluc}$ g_{EtOH}/g_{Gluc}	$Y_{Glycérol/Gluc}$ $g_{Glycérol}/g_{Gluc}$	Référence
Toutes les souches	Anaérobie	$\Delta gpd1/\Delta gpd2$	0	0	0	Toutes les études
V5 ScV5M MAT α ura3	Glc 100 g.L ⁻¹ ; YNB 80 mg. ⁻¹ NH4Cl 120 mg. ⁻¹ Batch, 28°C Anaérobie	$\Delta gpd1$	ND	0,47→0,49	0,08→0,03	Michnick 1997
TN1	Minéral+Glc25g/L; 3,75g.L ⁻¹ (NH4)2SO4 Ergostérol Tween 80 Batch 30°C Anaérobie	$\Delta gpd1$	0,41 →0,38	0,38→0,39	0,105→0,098	Nissen 2000
TN1	Minéral+Glc25g/L; 3,75g.L ⁻¹ (NH4)2SO4 Ergostérol Tween 80 Batch 30°C Anaérobie	$\Delta gpd2$	0,41 →0,008	0,38→0,36	0,105→0,73	Nissen 2000
TN1	Minéral+Glc25g/L 3,75 g.L ⁻¹ (NH4)2SO4 Aérobie	$\Delta gpd1$		0,34→0,35	0,024→0,008	Nissen 2000
TN1	Minéral+Glc25g/L 3,75 g.L ⁻¹ (NH4)2SO4 Aérobie	$\Delta gpd2$		0,34→0,36	0,024→0,008	Nissen 2000
TN1	Minéral+Glc25g/L 3,75 g.L ⁻¹ (NH4)2SO4 Aérobie	$\Delta gpd1/\Delta gpd2$		0,35→0,39	0,024→ NonDétecté	Nissen 2000

En 2001, l'équipe de Adler a étudié l'effet des délétions des gènes *GPP1* et *GPP2* (Pahlman, Granath et al. 2001). Il a ainsi été montré que le double mutant $\Delta gpp1/\Delta gpp2$ présente une hypersensibilité au stress osmotique, tandis que les simples mutants $\Delta gpp1$ et $\Delta gpp2$ ne semblent pas affectés (Pahlman, Granath et al. 2001). De même, l'étude de ces mutants dans notre laboratoire, en condition de fermentation à hautes performances (VHEP), a montré que les mutants délétés pour un seul des gènes *GPP* avaient une croissance peu affectée. Le mutant $\Delta gpp1/\Delta gpp2$, étudié dans les mêmes conditions, présentait, en revanche, une tolérance réduite à l'éthanol (concentration critique d'éthanol réduite de 20 %) ainsi qu'un défaut de croissance (taux de croissance réduit de 15 %). De plus, même si ce mutant était capable de produire moins de glycérol, il produisait aussi moins d'éthanol (Boulahya 2005).

Les différentes études menées sur les gènes *GPD1/GPD2* et *GPP1/GPP2* montrent que la suppression de l'un ou plusieurs de ces gènes, même si elle est de nature à diminuer la quantité de glycérol produite par les levures, altère aussi leur croissance et leur viabilité. Ceci est lié à l'implication du glycérol dans l'équilibre oxydo-réductif de la cellule et de son rôle protecteur face aux stress rencontrés lors de la fermentation éthanolique. Ainsi, le test du mutant Δ gpd1/ Δ gpd2, en condition de fermentation à haute performance en éthanol (VHEP), a montré que la concentration finale en éthanol est réduite de 35% et que la concentration à laquelle la croissance cesse est réduite de 25 % : il y a donc une réduction drastique de la robustesse de la souche (Boulahya 2005).

I.5.3.2 Ingénierie du métabolisme oxydo-réductif des cellules

Les études portant sur l'ingénierie du métabolisme oxydo-réductif des cellules ont, notamment, visé les cofacteurs NAD^+/NADH et $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$. L'objectif de ces études était de réarranger le métabolisme cellulaire de façon à, soit minimiser l'excès de NADH mitochondrial, réduisant ainsi la quantité de glycérol produite pour équilibrer le bilan oxydo-réductif de la cellule, soit permettre la ré-oxydation du NADH sans entraîner la production de glycérol-3-P et donc de glycérol. Ces stratégies peuvent être réparties en quatre groupes (Bro, Regenberget al. 2006) (cf. Figure I-12).

- substitution d'une réaction d'oxydation du NADPH par une réaction d'oxydation du NADH (A)
- substitution d'une réaction réduisant le NAD^+ par une réaction réduisant du NADP^+ (B)
- introduction de réactions permettant, soit directement, soit à travers des cycles, la conversion de NADH en NADPH (C)
- substitution de la production de glycérol par la production d'éthanol (D)

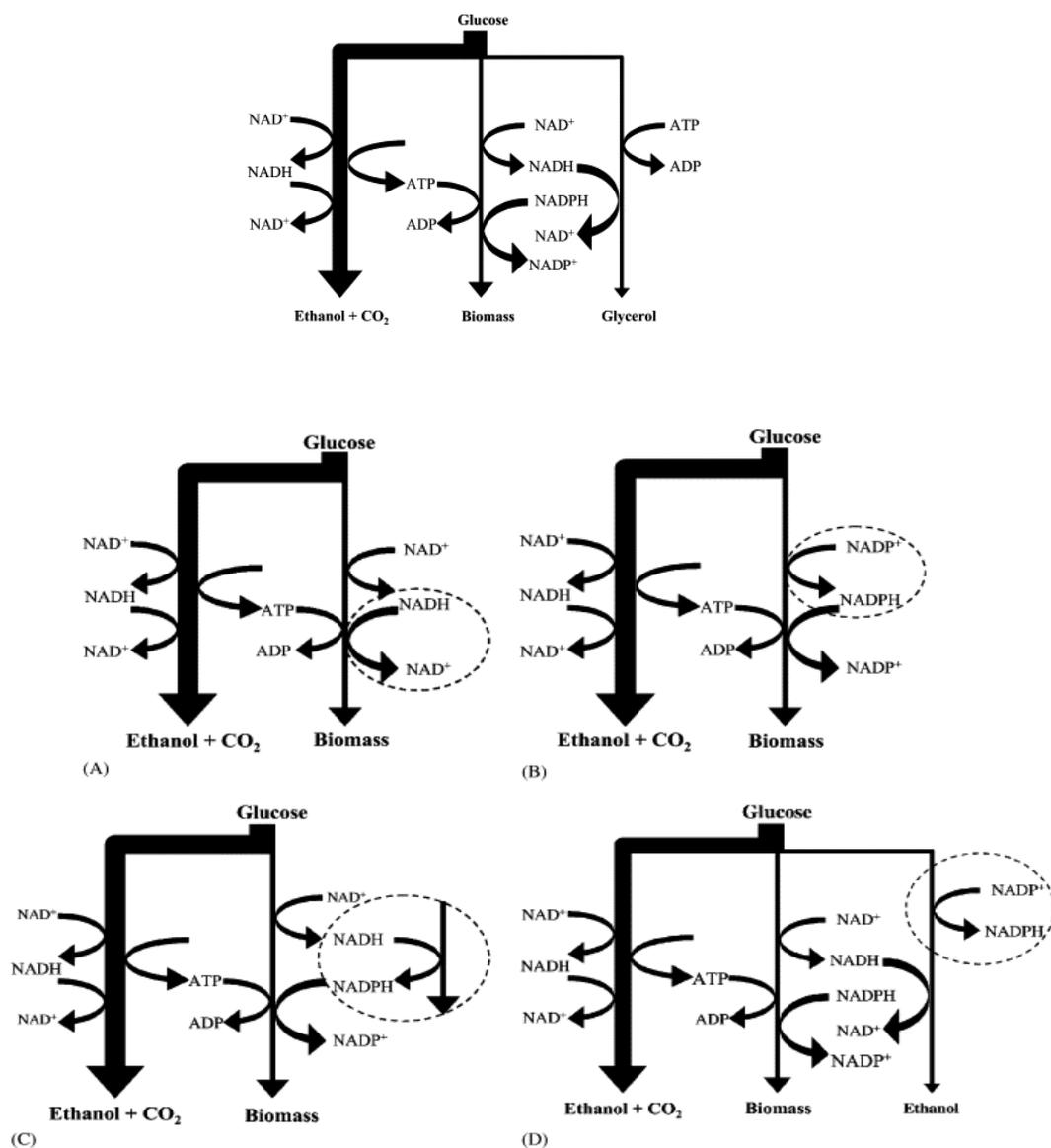


Figure I-12 Stratégie d'ingénierie du métabolisme des cofacteurs NAD^+/NADH et $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ pour la réorientation du flux de carbone du glycérol vers l'éthanol [Bro et al, 2006].

Une façon de diminuer le NADH en excès dans le cytosol pourrait être de directement transférer le pouvoir réducteur de celui-ci au NADPH, grâce à l'activité d'une transhydrogénase (stratégie C). Cependant, aucune transhydrogénase n'a pu être identifiée chez *S. cerevisiae* (Bruinenberg, Van Dijken et al. 1983). En 2001, une transhydrogénase cytoplasmique de *A. vinelandii* a été exprimée dans le double mutant $\Delta\text{gpp1}/\Delta\text{gpp2}$ (Nissen, Anderlund et al. 2001). Cette enzyme catalyse la conversion de NADH et NADP^+ en NAD^+ et NADPH. Cependant, dans ce mutant, le ratio $(\text{NADPH}/\text{NADP}^+)/(\text{NADH}/\text{NAD}^+)$, s'avère être tel que l'enzyme fonctionne dans le sens opposé, convertissant NAD^+ et NADPH en NADH et NADP^+ . Ceci entraîne une augmentation de la formation de glycérol et de 2-oxoglutarate, ainsi qu'une chute du taux de croissance.

La même équipe a travaillé sur la voie d'assimilation de l'ammonium pour tenter de remplacer une réaction consommant du NADPH par une réaction consommant du NADH (stratégie A) (Nissen, Kielland-Brandt et al. 2000). Pour cela, un mutant, dans lequel le gène GDH1, codant pour la glutamate déshydrogénase NADPH dépendante (cf. Équation 2), est utilisé. Ce mutant est complété, soit par la surexpression de GDH2, codant pour une glutamate déshydrogénase NADH dépendante (cf.

Équation 3), soit par la sur-expression des gènes GLT1, codant pour la glutamate synthase, et GLN1, codant pour la glutamine synthétase (cf. Équation 4).

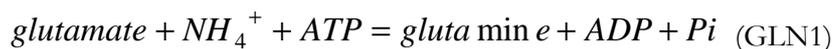
Équation 2 Assimilation de l'ammonium NADPH dépendante (**GDH1**)



Équation 3 Assimilation de l'ammonium NADH dépendante (GDH2)



Équation 4 Ingénierie de l'assimilation de l'ammonium



Les meilleurs résultats ont été obtenus avec la surexpression de *GLT1* : une souche, avec un rendement en éthanol accru de 10 % et un rendement en glycérol diminué de 38 %, a été obtenue.

En 2006, l'équipe de Nielsen utilisa un modèle métabolique pour simuler le comportement de différents mutants (Bro, Regenberget al. 2006). Un grand nombre de configurations de mutants, correspondant aux quatre stratégies décrites précédemment, ont été testées (cf. Tableau I-3). Les meilleurs résultats in silico ont été obtenus avec l'introduction dans le modèle de l'enzyme GAPN de *Streptococcus mutans* (Boyd, Cvitkovitch et al. 1995), catalysant la conversion de glyceraldéhyde-3-phosphate et NADP en 3-phospho-glycérate et NADPH (Bro, Regenberget al. 2006) (cf. Figure I-13).

Tableau I-3 Résultats des simulations pour les 8 mutants donnant les meilleures performances *in silico* ainsi que pour des mutants testés dans de précédentes études [Bro et al , 2006]

Strategy	Inserted/overexpressed reaction	Ethanol yield	Glycerol yield	Biomass yield
		Increase ^a (%-g EtOH/g glc)	Decrease ^a (%-g gly/g glc)	Increase ^a (%-g DW/g glc)
<i>Strategy 1</i>				
Deletion of <i>GDH1</i> and overexpression of <i>GLT1</i> and <i>GLN1</i>	2-Oxoglutarate+NH ₄ ⁺ +NADH+ATP=Glutamate+NAD ⁺ +ADP	5.2 (8) ^b	49.3 (38) ^b	5.2 (?1) ^b
Deletion of <i>GDH1</i> and overexpression of <i>GDH2</i>	2-Oxoglutarate+NH ₄ ⁺ +NADH=l-Glutamate+NAD ⁺	4.2 (2) ^b	46.8 (31) ^b	9.7 (14) ^b
Insertion of NAD ⁺ -dependent glycine dehydrogenase	Glyoxylate+NH ₃ +NADH=glycine+NAD ⁺ +H ₂ O	4.2	46.8	9.7
<i>Strategy 2</i>				
Insertion of NADP ⁺ -dependent orotate reductase	(S)-Dihydroorotate+NADP ⁺ =Orotate+NADPH	9.0	100.0	16.5
<i>Strategy 3</i>				
Insertion of a transhydrogenase	NADH+NADP ⁺ =NADPH+NAD ⁺	9.0	100.0	16.5
Insertion of NADH kinase	NADH+ATP=NADPH+ADP	10.4	100.0	7.6
Insertion of NADP ⁺ -dependent glycerol dehydrogenase	Glycerol+NADP ⁺ =Dihydroxyacetone+NADPH	10.4	100.0	7.6
<i>Strategy 4</i>				
Insertion of NADP ⁺ -dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase	Glycerol 3-phosphate+NADP ⁺ =d-glyceraldehyde 3-phosphate+NADPH	9.0	100.0	16.5
Insertion of NADP ⁺ -dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	d-Glyceraldehyde 3-phosphate+NADP ⁺ +P=3-phospho-d-glyceroyl phosphate+NADPH	9.0	100.0	16.5
Insertion of non-phosphorylating, NADP ⁺ -dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (e.g. GAPN)	d-Glyceraldehyde 3-phosphate+NADP ⁺ =3-phospho-d-glycerate+NADPH	10.4	100.0	7.6

^a Compared to wild-type strain model prediction.

^b Experimentally determined yield (Nissen et al., 2000b).

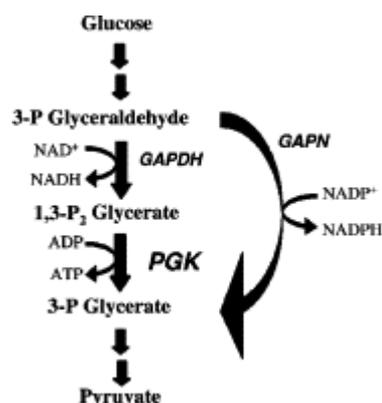


Figure I-13 Réaction catalysée par l'enzyme GAPN et sa relation avec les réactions de la glycolyse. [Bro et al, 2006].

Cette réaction permet de shunter une réaction de la glycolyse productrice de NADH, tout en produisant du NADPH (stratégie B). Ainsi, si le carbone entrant dans la voie de la glycolyse emprunte ce shunt, le bilan du couplage entre la glycolyse et la production d'éthanol n'est plus neutre, mais aboutit à la production de 1 NADPH et à la consommation de 1 NADH. Le NADPH produit peut facilement être reconstitué par la production de biomasse, tandis que la consommation de NADH, par la réduction de l'acétaldéhyde en éthanol, pourrait permettre de reconstituer une partie du NADH issu de la production de la biomasse et des acides organiques : ce qui réduit la synthèse de glycérol. Un mutant, capable d'exprimer cette enzyme hétérologue, fut construit et testé en fermentation anaérobie, dans un procédé batch. Les résultats montrèrent une diminution d'environ 50 % du rendement glycérol (de 0,081 g_{Glycérol}/g_{Glucose} à 0,046 g_{Glycérol}/g_{Glucose}) ; cependant, aucune augmentation significative du rendement éthanol ne fut obtenue (cf. Tableau I-4).

Tableau I-4 Comparaison des résultats obtenus pour le mutant GAPN et la souche de référence, culture en batch sur milieu minéral, 30g/L de glucose, source d'azote (NH₄)₂SO₄ [Bro et al, 2006].

Souche	Taux de croissance maximum (h ⁻¹)	Rendement Biomasse (g _{DW} ,g _{glc})	Rendement Glycérol (g _{glycérol} ,g _{glc})	Rendement Ethanol (g _{EtOH} ,g _{glc})
Référence	0,27±0,00	0,098±0,001	0,081±0,004	0,41±0,03
GAPN	0,28±0,01	0,101±0,001	0,046±0,001	0,42±0,03

I.5.3.3 Combinaison des modifications

Les stratégies consistant simplement à déléter les gènes structuraux de la voie de synthèse du glycérol ou à modifier le métabolisme oxydo-réductif de la cellule ayant montré leurs limites, un nombre croissant de travaux ont récemment porté sur des mutants plus complexes. Ces mutants combinent plusieurs modifications visant le métabolisme oxydo-réductif, la voie de synthèse du glycérol ou encore le transport de ce dernier. L'optimisation de ces trois mécanismes pourrait permettre d'obtenir une souche présentant une diminution du rendement en glycérol, une amélioration du rendement en éthanol et une résistance au stress compatible avec un usage industriel. Ainsi, l'action sur les gènes structuraux de la voie de biosynthèse peut permettre de diminuer la production de glycérol ; de même, la modification du métabolisme oxydo-réductif pourrait permettre de compenser l'effet négatif de la diminution de la production de glycérol sur la balance redox ; enfin, la régulation des phénomènes de transport du glycérol, notamment la réduction du flux de glycérol sortant de la cellule, pourrait minimiser l'effet négatif de la diminution de la production du glycérol vis-à-vis de la résistance au stress (plus particulièrement au stress osmotique).

Plusieurs études récentes tendent à intégrer ces différents paramètres. Ainsi, l'équipe de Kong a surexprimé le gène *GLT1* dans un mutant Δ gpd1 et dans un mutant Δ gpd2 (Kong, Cao et al. 2007; Kong, Zhang et al. 2007). Zhang a étudié l'effet de la délétion du transporteur membranaire du glycérol *FPS1* sur la fermentation éthanolique (Zhang, Kong et al. 2007). *FPS1* a aussi été délété dans un mutant surexprimant *GLT1* (Kong, Gu et al. 2006) (cf. Figure I-14) et dans un mutant délété des gènes *GPD* et surexprimant *GLT1* (Cao, Zhang et al. 2007). Cependant, les tests des capacités fermentaires de la plupart de ces mutants ont été réalisés sur milieu riche ou en présence d'acides aminés ; ce qui rend difficile l'analyse métabolique.

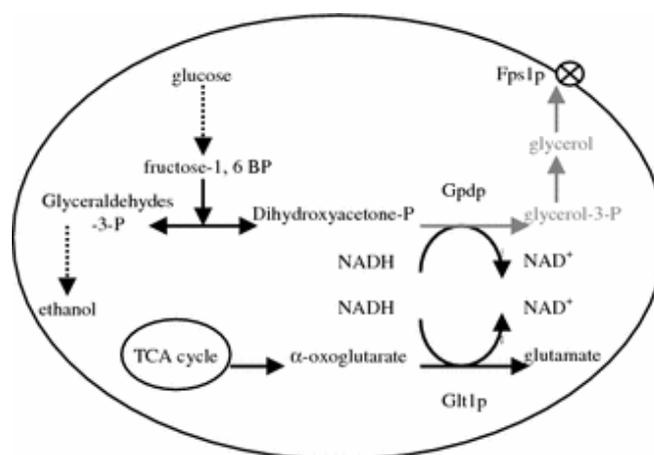


Figure I-14 Schéma métabolique du mutant Δ fps1, Glt1⁺ [Kong, 2006]

Finalement, dans une étude très récente, Medina et al ont réussi à restaurer la croissance, en condition anaérobie, d'un mutant délété pour les deux enzymes GPD, tout en améliorant le rendement éthanol de 13 %, en y exprimant une voie hétérologue de consommation d'acétate (Medina, Almering et al. 2010).

I.5.3.4 Stratégie d'ajustement des flux métaboliques

Les différentes stratégies d'ingénierie métabolique, mises en œuvre jusqu'à présent, pour tenter de minimiser la production de glycérol au profit du rendement éthanol, ont toutes souffert des limites existantes concernant la régulation de l'activité des gènes. Avec les méthodes de génie génétique classique, il était seulement possible de garder l'expression au niveau de la souche sauvage, de complètement déléter les gènes ou de fortement les surexprimer (Nevoigt, Kohnke et al. 2006).

Plusieurs stratégies ont été envisagées pour ajuster plus finement l'activité des gènes et obtenir une expression de niveau intermédiaire : l'utilisation de promoteurs natifs de forces différentes, l'utilisation de vecteurs présentant des nombres d'exemplaires cellulaires différents ou encore l'utilisation de promoteurs inductibles.

Ainsi, il est possible de modérer la surexpression des gènes en utilisant des vecteurs plasmidiques présentant des nombres d'exemplaires différents dans la cellule (Jones, Kim et al. 2000; Jin, Ni et al. 2003; Tao, Jackson et al. 2005). Cependant, cette stratégie est limitée, d'une part, par la disponibilité de vecteurs dont le nombre de copies cellulaires permettrait d'atteindre le niveau d'expression souhaité et, d'autre part, par la variation du nombre de copies contenues dans les différentes cellules d'une même culture.

De même, le remplacement des promoteurs naturels par des promoteurs inductibles est limité par la toxicité et le coût des inducteurs, ainsi que par les phénomènes d'hétérogénéité dans les cultures, conduisant à des niveaux d'induction non homogènes dans les populations (Patkar, Vijayasankaran et al. 2002).

Enfin, l'utilisation de promoteurs natifs de la cellule de forces différentes n'est pas non plus une solution appropriée (Yan and Craig 1999). En effet, ces promoteurs étant soumis à la régulation de la machinerie cellulaire, ils ne permettent pas de fixer de façon robuste l'activité d'un gène.

A ce jour, la seule méthode robuste développée pour ajuster finement l'activité des gènes consiste à utiliser des collections de promoteurs mutés. Cette stratégie a été employée avec succès dans le cas de l'ingénierie génétique de bactéries (Jensen and Hammer 1998; Solem and Jensen 2002; Alper, Fischer et al. 2005). Une collection de promoteurs mutés a été développée pour *Saccharomyces*

cerevisiae (Alper, Fischer et al. 2005). Le promoteur sélectionné pour la création de cette collection est le promoteur du gène *TEF1* (translation and elongation factor 1) (Nevoigt, Kohnke et al. 2006). Le promoteur *TEF1* est un promoteur constitutif, le gène *TEF1* étant fortement transcrit dans de nombreuses conditions (Schirmaier and Philippsen 1984). De plus, ce promoteur possède une séquence hautement conservée durant l'évolution, rendant possible l'utilisation de cette collection chez d'autres levures (Kitamoto, Matsui et al. 1998; Solem and Jensen 2002). La collection de promoteurs a été insérée dans des cassettes de clonage, pour faciliter leur insertion dans l'ADN chromosomique de *S. cerevisiae* (Nevoigt, Kohnke et al. 2006).

La collection comprend 11 promoteurs mutés dont l'activité varie entre 7 et 120 % du promoteur *TEF1* sauvage. Ces promoteurs sont intégrés dans des cassettes de clonage sur le plasmide CEN/ARS *p416-loxP-KmR-TEFmut-yEcitrine*, afin de faciliter leur utilisation. Pour leur intégration génomique, les cassettes de clonage contenant ces promoteurs sont amplifiées par PCR à partir des plasmides (cf. Figure I-15). La sélection s'effectue grâce au marqueur de résistance à l'antibiotique *loxP-KanMX-loxP*.

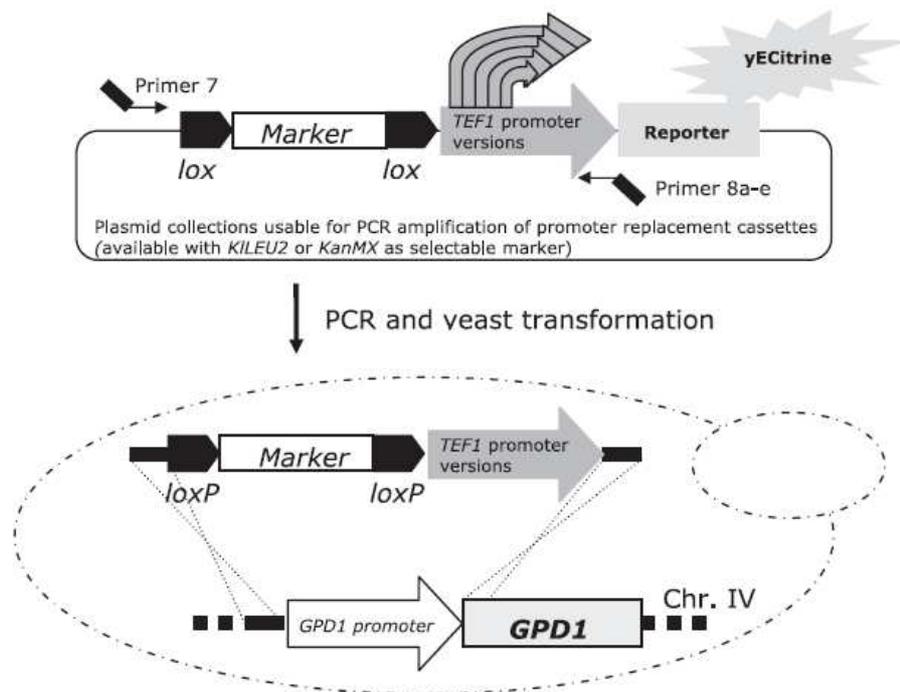


Figure I-15 : Amplification des promoteurs et clonage : Les cassettes de clonage sont amplifiées par PCR à partir du plasmide CEN/ARS *p416-loxP-KmR-TEFmut-yEcitrine* dans lequel elles sont intégrées. Les levures sont ensuite transformées à l'aide des cassettes de clonage qui s'insèrent dans leur génome par recombinaison homologue. Le marqueur de résistance à la gentamycine permet la sélection des clones positifs. La séquence *loxP* permet éventuellement de se débarrasser de ce marqueur pour pouvoir répéter le protocole plusieurs fois, afin de modifier les promoteurs de plusieurs gènes [Nevoigt et al, 2006].

Chapitre II : Matériel et Méthodes

II.1 Expérimentation

II.1.1 Souches et milieu de culture

II.1.1.1 Description des souches testées

Les souches utilisées ont été construites à partir de la souche sauvage CEN.PK 113-7D. Les deux souches mutantes, TEFmut2 et TEFmut7 sont délétées pour le gène *GPD2* et le promoteur du gène *GPD1* (cf. Tableau II-1). Le promoteur natif du gène *GPD1* est remplacé par un promoteur mutant de faible activité de la collection TEF (Nevoigt, Kohnke et al. 2006). Les promoteurs *TEF1_2* et *TEF1_7* ont été respectivement utilisés pour la construction des souches TEFmut2 et TEFmut7. La construction des souches a été effectuée à la TUB de Berlin. Le protocole utilisé est décrit dans la partie "Methods" de la publication " Quantitative evaluation of yeast's requirement for glycerol formation in Very High Ethanol Performance fed-batch process.", qui constitue le chapitre V de ce manuscrit.

Tableau II-1 Références des souches utilisées pour les fermentations

Souche	Génotype	Source ou référence
CEN.PK 113-7D	<i>Wild Type</i>	(van Dijken, Bauer et al. 2000)
<i>TEFmut7*</i>	<i>gpd2Δ::loxP-ble^R-loxP</i> <i>GPD1pΔ::loxP-KanMX4-loxP-TEF1p mutant 7</i>	(Pagliardini, Hubmann et al. 2010)
<i>TEFmut2*</i>	<i>gpd2Δ::loxP-ble^R-loxP</i> <i>GPD1pΔ::loxP-KanMX4-loxP-TEF1p mutant 2</i>	(Pagliardini, Hubmann et al. 2010)

*Souches isogéniques de la souche CEN.PK 113-7D.

II.1.1.2 Stockage des souches et propagation des cultures

Stockage des souches

Les souches sont stockées à - 80°C dans un mélange 30 % glycérol / 70 % YEPD (Glucose 2 g.L⁻¹, Extrait de levure 1 g.L⁻¹, Bactopectone 1 g.L⁻¹, NaCl 0,9 g.L⁻¹). Elles sont repiquées sur boîte de Petri sur milieu riche YEPD solide (Glucose 2 g.L⁻¹, Extrait de levure 1 g.L⁻¹, Bactopectone 1 g.L⁻¹, NaCl 0,9 g.L⁻¹, Agar 2 g.L⁻¹). Les colonies sur boîte de Petri sont ensuite conservées à 4 °C.

Propagation des cultures

A partir des colonies sur boîte de Petri, trois étapes de précultures en erlenmeyers bafflés sont effectuées avant l'ensemencement du réacteur (5 mL, 30 mL et 300 mL). Chaque étape dure 12 h et permet l'ensemencement à 10% (V/V) de l'étape de propagation suivante. Les erlenmeyers de 300 mL sont finalement utilisés pour inoculer des fermenteurs de 5 litres contenant 2,7 litres de milieu. Toutes les précultures sont réalisées sur un milieu minéral identique à celui utilisé dans les fermenteurs.

II.1.1.3 Composition des milieux de culture

Composition de base

Le milieu de culture de base est identique pour toutes les fermentations. Ce milieu comprend une solution saline principale (KH₂PO₄ 3,0 g.L⁻¹; (NH₄)₂SO₄, 3,0 g.L⁻¹; Na₂HPO₄·12H₂O, 3,0 g.L⁻¹; sodium glutamate, 1,0 g.L⁻¹; MgSO₄·7 H₂O, 0,5 g.L⁻¹), des oligo-éléments (ZnSO₄·7H₂O 0,04 g.L⁻¹; MnSO₄·H₂O, 0,0038 g.L⁻¹; CoCl₂·6H₂O, 0,0005 g.L⁻¹; CuSO₄·5H₂O, 0,0009 g.L⁻¹; Na₂MoSO₄·2H₂O, 0,00006 g.L⁻¹; CaCl₂·2H₂O, 0,023 g.L⁻¹; (NH₄)₂Fe(SO₄)₆·6H₂O, 0,023 g.L⁻¹; H₃BO₃, 0,003 g.L⁻¹), des vitamines (pantothénate 0,0006 g.L⁻¹; acide nicotinique 0,0005 g.L⁻¹; méso-inositol 0,0125 g.L⁻¹; thiamine 0,0005 g.L⁻¹; pyridoxine 0,0005 g.L⁻¹; acide para-aminobenzoïque 0,0001 g.L⁻¹; biotine 0,0012 mg.L⁻¹) et du glucose à 100 g.L⁻¹. Tous les produits utilisés pour la préparation du milieu de culture sont du plus haut degré de pureté disponible.

Complémentation en anaérobie

La synthèse de certains lipides requiert la présence d'oxygène. La culture en condition anaérobie nécessite donc l'ajout d'ergostérol (63 mg.L^{-1}) et de tween 80 ($2,63 \text{ g.L}^{-1}$) pour compléter le milieu de culture et permettre la croissance des levures dans ces conditions.

II.1.2 Cultures en réacteur

II.1.2.1 Stratégie de culture

Alimentation en glucose

Les fermentations sont réalisées en mode fed-batch. Outre le glucose contenu dans le milieu au début de la fermentation, des ajouts séquentiels de glucose à partir d'une solution à 700 g.L^{-1} sont réalisés tout au long de la fermentation afin de maintenir la concentration de glucose entre 20 et 100 g.L^{-1} dans un premier temps, puis entre 20 et 50 g.L^{-1} en fin de fermentation (afin de limiter les phénomènes de stress osmotique).

Ajout de vitamines

Une stratégie d'alimentation séquencée en vitamines, basée sur la croissance des levures, est aussi appliquée afin d'optimiser la viabilité de la biomasse tout au long de la fermentation [161]. Pour cela, un ajout de vitamines est réalisé à chaque doublement de population : la quantité de vitamines ajoutée double à chaque génération ; elle est calculée de telle sorte que la quantité totale de vitamines ajoutée au cours de la fermentation soit identique à la quantité de vitamines initialement présente dans le milieu.

Aération

Dans le cas de la fermentation anaérobie, le réacteur est soumis à un flux d'azote de $0,5 \text{ L.mn}^{-1}$. Dans le cas des fermentations aérobies, un flux d'air régulé de façon à toujours maintenir les levures dans des conditions non limitées en oxygène est apporté au réacteur.

Dispositif expérimental

Les fermenteurs utilisés sont des fermenteurs Biostat B DCU B.BRAUN (SARTORIUS) de 5L. La température est régulée à 30°C par un système de double enveloppe. Le pH est mesuré en ligne grâce à une sonde pH (Metler Toledo 405-DPAS-SC-K8S/325) ; il est régulé à 4 par ajout d'ammoniaque (14% vol/vol). La pression en oxygène dissous dans le réacteur est mesurée par une sonde ampérométrique (Metler Toledo Inpro 6050) (cf. Figure II-1).

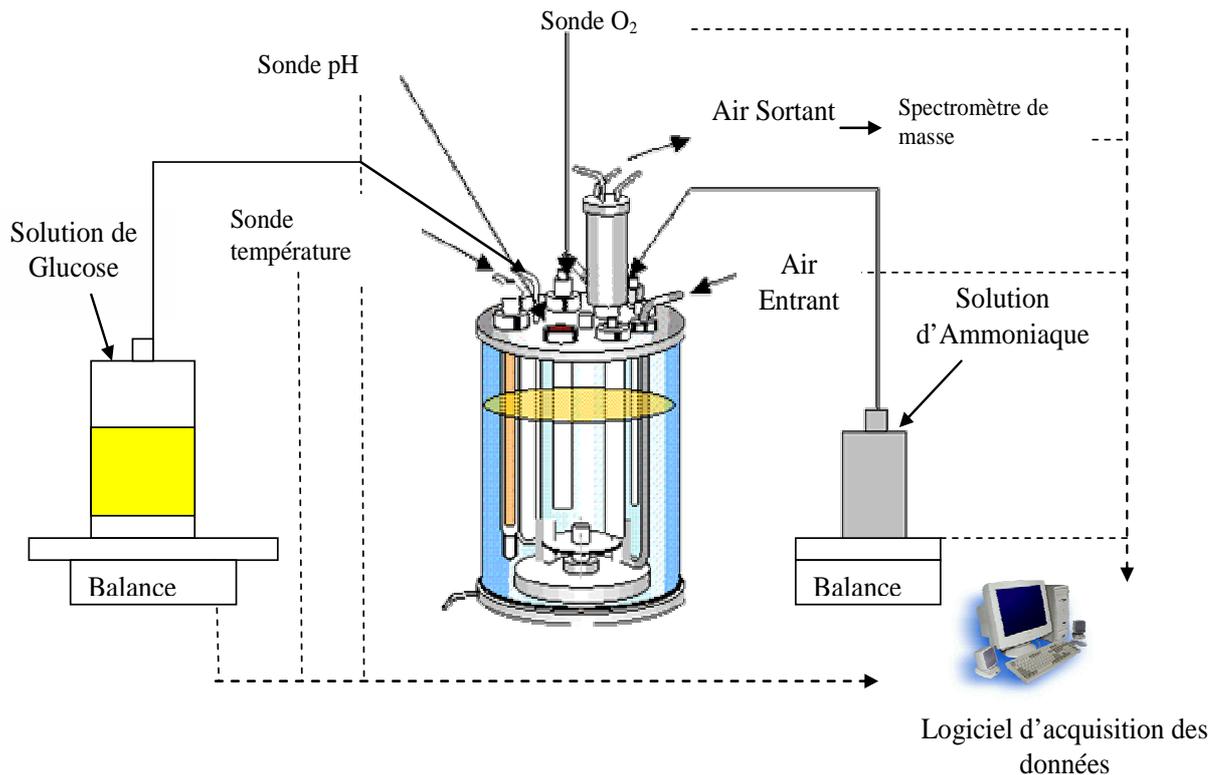


Figure II-1 Schéma du dispositif expérimental

II.1.3 Méthodes Analytiques

II.1.3.1 Caractérisation de la biomasse

Densité optique et masse sèche

Pour chaque prélèvement, la densité optique (DO) est mesurée à 620 nm à l'aide d'un spectromètre Libra S4 (Biochrom) pour suivre la croissance microbienne. La détermination de la

concentration de biomasse microbienne (exprimée en gramme de matière sèche par litre de milieu de culture) dans le réacteur est réalisée par gravimétrie sur plusieurs points afin d'établir une corrélation entre la densité optique et la concentration en biomasse. Pour cela, de 15 à 20 mL de milieu sont filtrés sur des filtres de porosité 0,45 µm de diamètre (Sartorius Biolab Product), préalablement séchés et pesés, puis les filtres sont séchés dans une étuve à une température de 60 °C et à une pression de 200 mmHg pendant 24h avant d'être pesés à nouveau.

Viabilité

La viabilité de la biomasse est évaluée à l'aide d'une cellule de THOMAS, par une technique de marquage au bleu de méthylène (bis-(diméthylamino)-3,7phenazathionium chlorure). Pour cela, 100 µL de bleu de méthylène stérile sont mélangés à 100 µL de biomasse, à la dilution utilisée pour la mesure de la DO. Le nombre de cellules colorées (cellules non actives) et le nombre de cellules non colorées (cellules actives) sont comptés dans au moins 5 carreaux de la cellule de Thomas. Le nombre total de cellules comptées doit atteindre au minimum 150. Le pourcentage de cellules mortes correspond au ratio entre le nombre de cellules colorées et le nombre total de cellules.

II.1.3.2 Métabolites présents dans le milieu

Les concentrations en glucose, éthanol, glycérol, acétate, succinate, citrate et pyruvate sont suivies au cours du temps par analyse HPLC (High Pressure Liquid Chromatography). L'appareil utilisé est un chromatographe (Waters, Alliance 2690), équipé d'une colonne Aminex HPX 87 H (300 mm x 7,8 mm) et d'un logiciel d'acquisition et de traitement de données. Une solution de H₂SO₄ à 5 mM est utilisée comme éluant, le flux est de 0,5 mL/min, le volume de surnageant analysé est 20 µL. Le temps d'analyse est de 30 mn, la température de la colonne est maintenue à 50 °C. En sortie de colonne, l'éluant est soumis à une double analyse RI (Refraction Index) et UV 210 nm (Ultra Violet) grâce à un réfractomètre (Waters2414) et un détecteur UV à barrette de diodes (Waters 996).

Pour analyser le surnageant, 1,5 mL de milieu de culture est centrifugé pendant 5 mn à 10 000 RPM. Le surnageant est récupéré, filtré et stocké dans un vial en verre en vue de son analyse. Les concentrations des divers composés dosés sont évaluées à partir d'une gamme de solutions étalons préalablement analysée par l'appareil. Pour chaque prélèvement, deux analyses sont réalisées, le milieu

non dilué et le milieu dilué au 10^{ème} : ceci permet d'être sûr que les concentrations de tous les composés analysés se trouveront dans les gammes de validité de la mesure.

II.1.3.3 Dosage du glycérol et des acides organiques intracellulaires

Les concentrations intracellulaires en acides organiques et glycérol ont été déterminées par comparaison entre la concentration présente dans les surnageants du milieu de culture et la concentration présente dans tout l'échantillon. Pour cela, le milieu de culture contenant les cellules est baigné dans un bain-marie à 100 °C tout de suite après prélèvement.

Les cellules sont ensuite lysées par sonication en utilisant un sonicateur Bioblock, 4 fois 30 secondes, entrecoupées de deux minutes dans la glace à 100 % de la puissance. L'échantillon est ensuite centrifugé pendant 5 mn à 10 000 rpm.

Le surnageant est récupéré, filtré et stocké dans un vial en verre en vue de son analyse par HPLC. Les concentrations des divers composés sont évaluées à partir d'une gamme de solutions étalons, préalablement analysées par l'appareil. Pour chaque prélèvement, deux analyses sont réalisées : le milieu non dilué et le milieu dilué au 10^{ème}.

II.1.3.4 Caractérisation de la pression osmotique

La pression osmotique dans les surnageants de culture a été évaluée à l'aide d'un micro-osmomètre automatique Hermann Roebling type 12/12DR (Messtechnik, Berlin, Germany). Le principe de fonctionnement de l'appareil est basé sur la détermination du point de congélation des solutions aqueuses; l'abaissement du point de congélation de ces solutions par rapport à celui de l'eau ultrapure donne une mesure directe de la concentration osmolaire. Le point de congélation de l'eau ultrapure est de 0°C. Le point de congélation d'une solution dont l'osmolarité de 1 osmole Kg_{Eau}⁻¹ est de -1,858°C. Avant toute mesure, l'appareil est calibré en utilisant de l'eau distillée et une solution standard (300 milliosmoles.Kg_{Eau}⁻¹), déterminant ainsi une gamme de linéarité entre 0 et 300 milliosmoles.Kg_{Eau}⁻¹. 100 µL de surnageant de culture sont utilisés pour la mesure de la pression osmotique. Le résultat obtenu est exprimé en milliosmoles.Kg_{Eau}⁻¹.

La pression osmotique est aussi calculée à partir des mesures des concentrations en métabolites et des concentrations initiales en sels. La pression osmotique dans le milieu initial est évaluée à partir

de sa concentration en sels principaux. Cette pression a été évaluée à 199 milliosmoles.Kg_{Eau}⁻¹. La pression osmotique lors de la fermentation est calculée en prenant en compte le glucose, l'éthanol, le glycérol et l'acétate. Le nombre d'espèce ionique utilisé pour chacune de ces quatre espèces est 1.

Equation 5 :
$$\pi = \sum_i \gamma_i \times \frac{C_i}{M_i}$$

Π : Pressio, Osmotique

γ_i : Coefficient d'activité de la molécule i dans l la solution

C_i : Molalité de la molécule i dans la solution

La mesure de la pression osmotique, lors de la fermentation aérobie de la souche sauvage, a permis de montrer une bonne corrélation entre la pression osmotique mesurée et la pression osmotique calculée (cf. Figure II-2). Par conséquent, pour les autres expériences, la pression osmotique a uniquement été calculée.

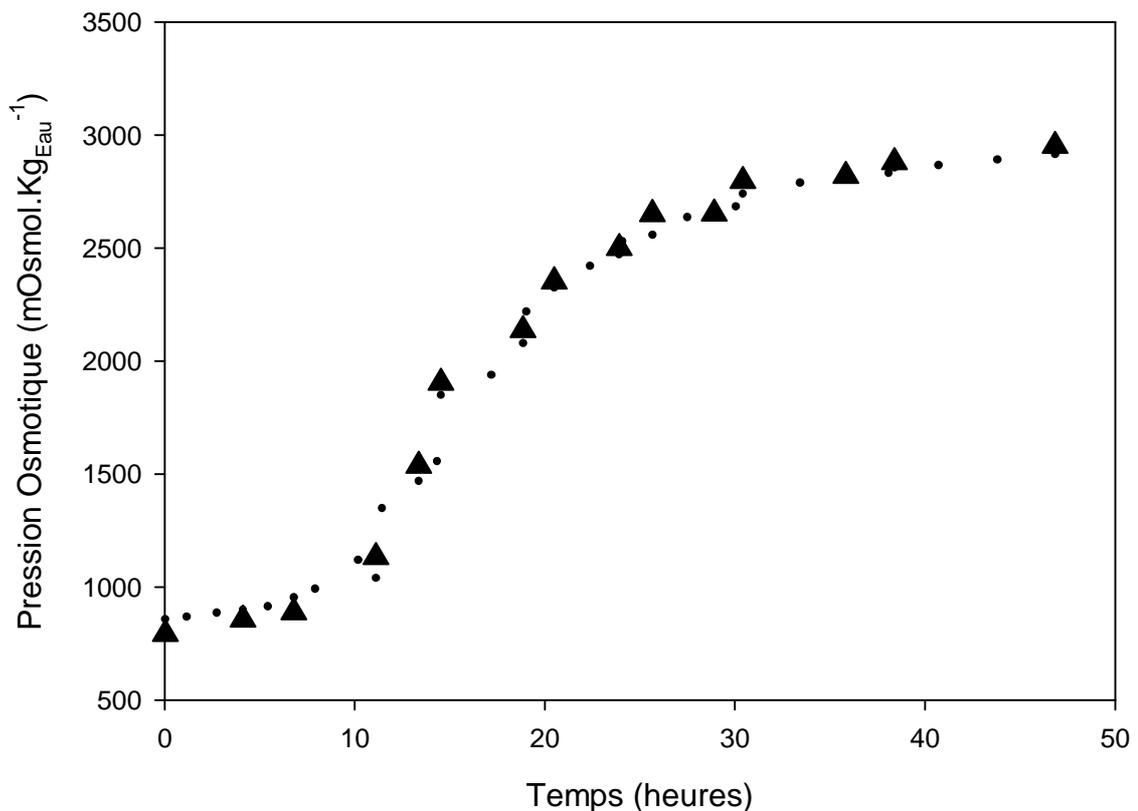


Figure II-2 Evolution des valeurs de pression osmotique

Evolution des valeurs de pression osmotique mesurée (▲) et calculée (●) pour la souche sauvage CEN-PK113-7D en condition aérobie.

II.1.4 Analyse des gaz

L'analyse des gaz est effectuée à l'aide d'un spectromètre de masse Proline Dycor^{2a} (Ametek Process Instrument). Ces analyses permettent de déterminer les compositions en O₂, CO₂ et N₂ de l'air en sortie du réacteur et, ainsi, de calculer les quantités d'O₂ consommé et de CO₂ produites, en tenant compte de l'évolution du débit d'aération, du volume de liquide dans le réacteur, de la température et de la pression.

II.1.5 Evaluation de l'éthanol évaporé

Au cours des fermentations éthanoliques, une partie de l'éthanol produit s'évapore et n'est pas retrouvée dans le milieu de culture. La quantité d'éthanol évaporé est fonction de l'efficacité du condenseur de gaz : l'éthanol évaporé peut dépasser 20 % de la production totale d'éthanol (Duboc and Stockar 1998) et cette évaporation peut considérablement biaiser les bilans carbone et oxydo-réductif. Afin de pouvoir prendre en compte cette évaporation dans nos calculs, pour évaluer avec plus de précision le devenir du carbone au cours de nos fermentations, des expériences d'évaporation de l'éthanol ont été menées.

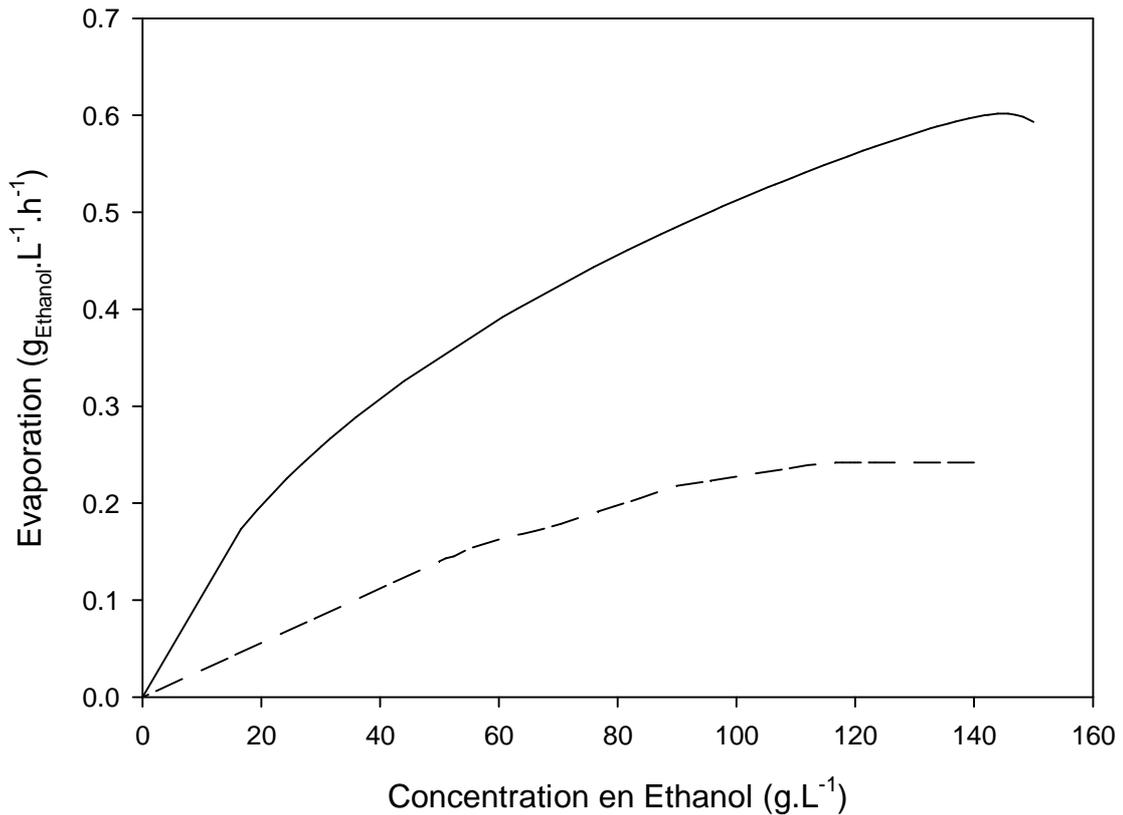


Figure II-3 Evolution de la vitesse d'évaporation de l'éthanol

en fonction de la concentration de ce dernier dans un réacteur soumis à une aération de 1 L.mn⁻¹

(—) ou 0,5 L.mn⁻¹ (---) pour un volume de départ de 3 L

Pour cela, des fermenteurs, contenant de l'éthanol et le milieu de culture utilisé au cours des fermentations, ont été utilisés. Deux expériences ont été réalisées : la première expérience consistait à soumettre un fermenteur contenant 150 g.L⁻¹ d'éthanol à une aération de 1 L.mn⁻¹, tandis que, dans la seconde expérience, un fermenteur contenant 140 g.L⁻¹ d'éthanol était soumis à une aération de 0,5 L.mn⁻¹. Dans les deux cas, la température était réglée à 30 °C, la vitesse d'agitation à 300 RPM et le volume de départ dans le fermenteur était de 3 L. Ces expériences ont permis d'obtenir des courbes reliant l'évaporation à la concentration en éthanol et à la vitesse d'aération (cf. Figure II-3). L'utilisation de ces données a permis de recalculer l'éthanol évaporé et de le prendre en compte dans les bilans.

II.1.6 Traitement des données

II.1.6.1 Lissage

Toutes les données brutes mesurées sont converties en masse, pour s'affranchir des variations de volume et des dilutions, dues aux ajouts ou aux prélèvements. Les valeurs expérimentales prises en compte pour le lissage sont les masses de glucose, d'éthanol, de biomasse, de glycérol, d'acétate, de pyruvate, et de succinate ainsi que les vitesses de consommation d'oxygène et de production de dioxyde de carbone. Les autres composés présents dans le milieu sont considérés comme négligeables, du fait de leur faible concentration.

Les résultats expérimentaux sont traités à l'aide d'un logiciel de lissage. Ce logiciel permet de mieux appréhender les évolutions réelles des différentes concentrations et de déterminer les vitesses des réactions. Les courbes lissées sont obtenues par interpolation des points expérimentaux par des polynômes sur une fenêtre glissante. Ce lissage permet d'obtenir une continuité de valeurs lissées, décrivant la variation de la masse d'un composé au cours du temps. La dérivée de la courbe obtenue décrit l'évolution de la vitesse de consommation ou de production de ce composé et permet de déterminer les rendements.

II.1.6.2 Réconciliation

Les données lissées sont analysées par une méthode de réconciliation développée au laboratoire, dérivée des méthodes décrites par van Heijden et al (van der Heijden, Heijnen et al. 1994; van der Heijden, Romein et al. 1994), pour la détection d'erreurs et l'ajustement des données. Cette méthode permet l'ajustement des taux de conversion dans leur globalité. Les calculs se font à partir de la matrice élémentaire E , construite sur l'ensemble des variables d'état définissant le système du vecteur r_m , des taux de conversion mesurés et de la matrice de variance associée à ces mesures. Les formules brutes en Cmoles des différentes espèces chimiques sont utilisées pour la matrice E , la formule utilisée pour la biomasse est $C_{10}H_{1,748}O_{0,596}N_{0,148}$. On obtient des valeurs qui permettent d'équilibrer les bilans sur les quatre éléments pris en compte : carbone, hydrogène, oxygène et azote. Pour chaque point expérimental, la meilleure estimation des flux de conversion est calculée sur la base d'une vérification des bilans élémentaires des flux de conversion du carbone, de l'hydrogène, de l'oxygène et de l'azote. Cette estimation est effectuée par minimisation d'un critère d'erreur sur l'ensemble des mesures ou par élimination d'une mesure, si le système est surdimensionné. Les variables d'état sont recalculées par intégration des vitesses et ce traitement permet la vérification de la cohérence des données expérimentales.

II.2 Modélisation métabolique

II.2.1 Introduction

Le modèle métabolique est basé sur un modèle préexistant et déjà validé, développé au sein du laboratoire et correspondant au réseau métabolique de *S. cerevisiae* (Bideaux, Alfenore et al. 2006; Bideaux, Goma et al. 2008). Il est basé sur le principe de l'Analyse des Flux Métaboliques (MFA).

Outre la quantification des flux intracellulaires, l'analyse MFA peut procurer des informations sur d'autres caractéristiques physiologiques. Elle permet notamment de déterminer les points de contrôle des voies métaboliques, de mettre en évidence des voies métaboliques alternatives et, enfin, de déterminer les flux non mesurés et les rendements théoriques (Stephanopoulos 1998).

La méthodologie de conception d'un modèle métabolique a été théorisée par Vanrolleghem et Heijnen (Vanrolleghem P. A. 1998). Cette construction s'effectue en 5 étapes :

- Le regroupement *a priori* des connaissances sur les voies métaboliques et l'élaboration de modèles
- La vérification et la sélection de l'un des modèles construits
- L'estimation des paramètres inconnus dans le modèle
- La vérification de l'acceptabilité biologique et thermodynamique du modèle
- La validation du modèle par les données expérimentales

II.2.2 Sélection des réactions métaboliques

La création d'un modèle métabolique nécessite la sélection des réactions métaboliques et des espèces chimiques pertinentes. Effectivement, l'introduction d'un trop grand nombre de réactions et d'espèces chimiques mènerait à un système trop complexe et impossible à résoudre (Stephanopoulos 1998).

Trois types de réactions sont considérés : les réactions anaboliques, les réactions cataboliques et le transfert à travers la membrane (Vanrolleghem P. A. 1998).

Les espèces chimiques intégrées aux modèles sont regroupées en quatre catégories (Stephanopoulos 1998):

- Les substrats: espèces chimiques, présentes dans le milieu de culture, consommées par les cellules pour leur croissance, telles que la source de carbone ou la source d'azote.
- Les métabolites intracellulaires: espèces chimiques n'apparaissant pas hors de la cellule et pour lesquels le bilan total de production et de consommation doit être nul.
- Les produits métaboliques: espèces produites par la cellule et excrétées dans le milieu de culture.
- La biomasse: produit final des réactions d'anabolisme, elle est constituée d'un assemblage de macromolécules (lipides, protéines, carbohydrates...), dont les proportions varient selon les souches et les conditions de culture. Cette variation de composition va être traduite dans notre modèle par des coefficients symboliques, dont les valeurs ou la fonction de variation pourront être fixées par l'expérimentateur au moment de la résolution numérique du système mathématique.

Après avoir réuni les connaissances disponibles sur le métabolisme du micro-organisme grâce à une recherche bibliographique, plusieurs principes peuvent être appliqués pour simplifier le modèle. Ainsi, les réactions « cul-de-sac métabolique », ne menant apparemment pas vers des métabolites impliqués dans d'autres réactions, peuvent être supprimées du modèle. De même, les réactions menant vers des espèces très minoritaires, n'influant que très peu sur le reste du schéma métabolique, peuvent être négligées.

Finalement, les réactions quasi-linéaires vont être regroupées dans une réaction unique, affectée d'une stœchiométrie globale pour l'ensemble de la réaction, ce qui ne laissera apparaître dans le modèle que les points de branchement métaboliques (Varma and Palsson 1994).

II.2.3 Mise sous forme mathématique et résolution

Une fois les espèces chimiques et les réactions métaboliques à introduire dans le modèle sélectionnées et écrites sous forme d'équations stœchiométriques, le modèle va être traduit sous forme mathématique par un logiciel développé au laboratoire qui permet également de résoudre le système matriciel obtenu. Pour cela, des bilans matière sont effectués sur les différentes espèces chimiques introduites dans le modèle, chaque bilan prenant en compte l'ensemble des réactions productrices et consommatrices de l'espèce.

$$\text{accumulation} = \text{consommation} + \text{production} + \text{transport}$$

Les constantes de temps caractérisant les réactions métaboliques étant très petites comparées à celles de la croissance cellulaire et de la dynamique du procédé, toutes les réactions métaboliques sont considérées en régime permanent. Pour un composé A, il est donc possible de considérer que l'accumulation est nulle et on établit l'équation suivante :

$$R_A = \sum_{i=1}^n \alpha_i r_i$$

Avec :

R_A le flux net du composé A

α_i le coefficient stœchiométrique de l'espèce A dans la réaction i

r_i la vitesse de la réaction i

Cette simplification permet d'aboutir à un système de r équations métaboliques, correspondant aux bilans sur les n espèces chimiques du modèle. Ce système peut être écrit sous une forme matricielle :

$$S * r = R$$

La matrice S correspondant au réseau métabolique possède m lignes correspondant aux m intermédiaires métaboliques introduits dans le modèle, et n colonnes correspondant aux n réactions métaboliques sélectionnées. Le terme S_{ij} correspond au coefficient stœchiométrique du métabolite i dans la réaction j.

Le vecteur r correspond aux vitesses réactionnelles des n réactions métaboliques.

Le vecteur R correspond aux vitesses nettes de conversion des métabolites, qui sont nulles pour les métabolites intracellulaires.

$$\begin{bmatrix} s_{11} & - & - & - & - & - & - & s_{1n} \\ | & & & & & & & | \\ | & & & & & & & | \\ | & & & & & & & | \\ s_{m1} & - & - & - & - & - & - & s_{mn} \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} r_1 \\ | \\ | \\ | \\ | \\ | \\ r_n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} R_{X1} \\ | \\ R_{Xk} \\ 0 \\ | \\ 0 \end{bmatrix}$$

Ce système matriciel est sous-déterminé. Pour le résoudre, il est nécessaire de connaître d'abord son degré d'indétermination (d) : le système pourra alors être résolu de façon unique, en fonction de d vitesses. Ces vitesses peuvent être des flux nets ou des vitesses de réaction et correspondent à une sélection de données expérimentales. Les vitesses choisies doivent être non redondantes et, de préférence, facilement accessibles expérimentalement.

Le logiciel permet de calculer les valeurs des vitesses nettes de conversion ainsi que les valeurs des vitesses réactionnelles à partir des mesures expérimentales réconciliées. Des cartes de répartition des flux peuvent ainsi être établies.

II.2.4 Modèle métabolique

Le modèle utilisé correspond au réseau métabolique de *S. cerevisiae*. Il est basé sur un modèle préexistant et déjà validé, ayant été développé dans le laboratoire (Bideaux, Alfenore et al. 2006). Le modèle développé par Bideaux contient le métabolisme de base (Glycolyse, pentoses phosphates, cycle de Krebs, chaîne respiratoire...), les réactions de synthèse des monomères à l'origine de la biomasse (synthèse des acides aminés, synthèse des acides gras...), les réactions de polymérisation de molécules constitutives de la biomasse (protéines, ADN..), la réaction de formation de la biomasse et les réactions de transport entre la cellule et le milieu de culture.

Le modèle a été modifié afin d'y introduire la notion de compartimentation cellulaire et, également, en vue de l'adapter au problème particulier du métabolisme du glycérol. Les modifications du modèle ont été réalisées *a priori*, à partir des données disponibles dans la bibliographie, et n'ont pas nécessité la conduite d'expériences (cf. Chapitre III).

Chapitre III : Caractérisation du métabolisme de la souche sauvage en conditions aérobie et anaérobie

La souche CEN.PK113-7D a été sélectionnée dans le cadre de cette étude en raison de la disponibilité des outils pour son ingénierie génétique et pour ses bonnes aptitudes à produire de l'éthanol. Les capacités fermentaires de la souche sauvage ont été étudiées en mode fed-batch, à la fois en condition aérobie et en condition anaérobie. La fermentation éthanolique en condition aérobie (VHEP) est, traditionnellement, caractérisée par une viabilité améliorée de la biomasse, une concentration élevée en éthanol en fin de production et une forte productivité en éthanol (Alfenore, Cameleyre et al. 2004); en revanche, le rendement en éthanol est plus élevé en condition anaérobie. Les fermentations références ont été répétées deux fois en condition anaérobie afin d'évaluer la reproductibilité des résultats.

III.1 Paramètres des fermentations

En condition aérobie aussi bien qu'en condition anaérobie, deux phases peuvent être distinguées dans les fermentations. Durant la première phase, l'éthanol est produit de façon concomitante à la biomasse ; puis la croissance s'arrête, mais les cellules continuent à produire de l'éthanol. De l'ensemencement à la fin de la production d'éthanol, la durée de la fermentation est de 55 heures en condition aérobie et de 70 heures en condition anaérobie (cf. Tableau III-1). La phase de croissance correspond aux 20 premières heures de fermentation en condition aérobie et aux 24 premières heures en condition anaérobie. En condition aérobie, 5 ajouts de glucose ont été effectués pour une consommation totale de sucre de 1245 g, contre 5 ajouts et une consommation totale de 1210 g en condition anaérobie (cf. Figure III-1).

Le bilan carbone et celui des degrés de réduction généralisés de la fermentation aérobie bouclent respectivement à 89 et 83 %. En condition anaérobie, le bilan carbone boucle à 95 % et le bilan des degrés de réduction généralisés à 93 %. Le degré d'oxydation du carbone manquant est 5,2 en condition aérobie et 6,44 en condition anaérobie : ceci confirme l'hypothèse que la majorité du carbone manquant dans les bilans correspond à l'éthanol. La différence dans le recouvrement des bilans carbone, entre les conditions aérobie et anaérobie, est principalement liée aux différences de

débit d'aération. En effet, en condition anaérobie, le débit d'azote a été maintenu à 0,5 L.mn⁻¹ tout au long de la fermentation, tandis que, lors de la fermentation aérobie, le débit d'air a été ajusté pour fournir suffisamment d'oxygène aux levures, afin de ne jamais être en condition de limitation. En condition aérobie, le débit d'air a ainsi varié entre 0,5 et 2 L.mn⁻¹, générant une évaporation plus importante.

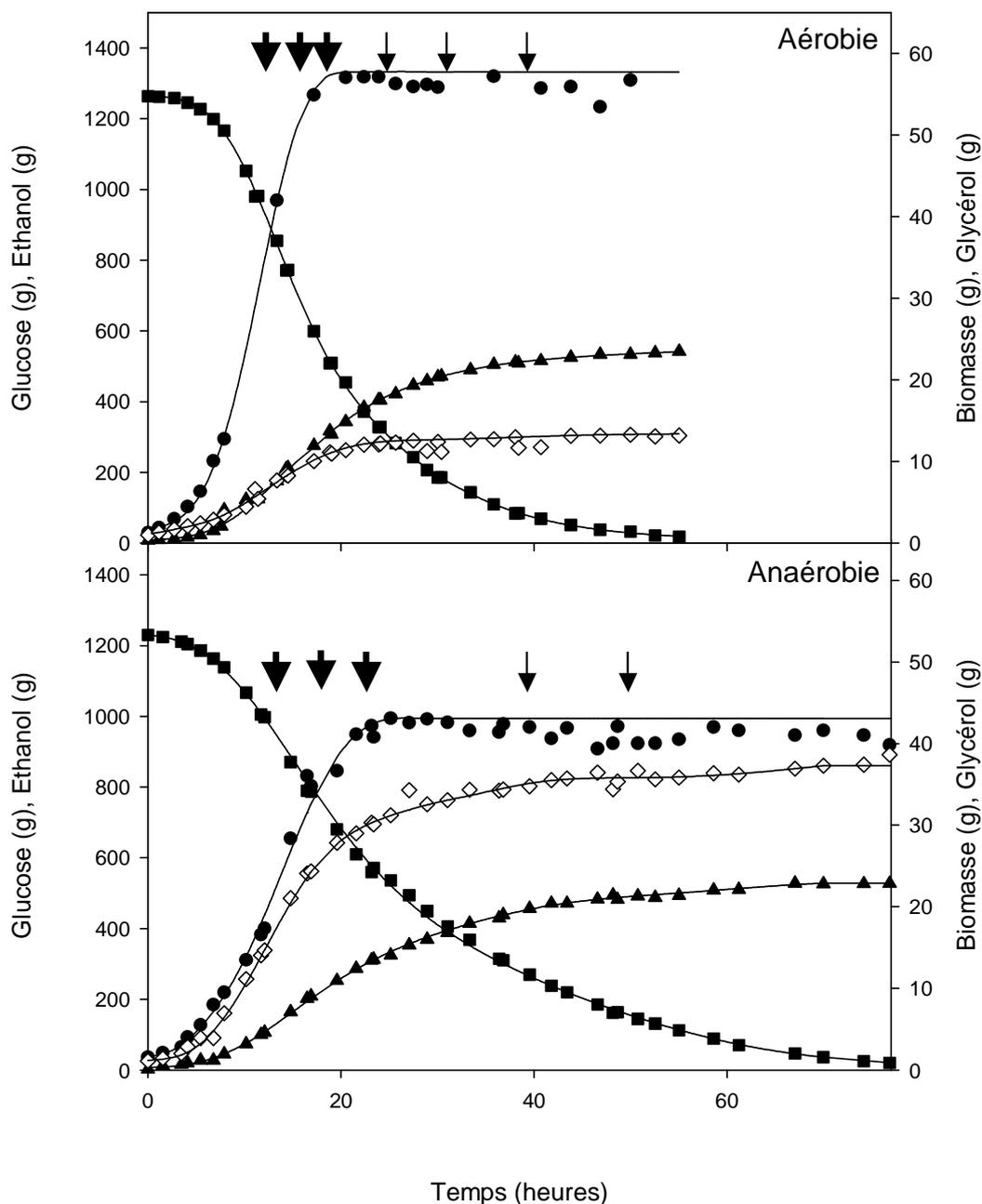


Figure III-1 Evolution des masses de glucose consommé (■) et des masses d'éthanol(▲), de glycérol (◇) et de biomasse (●) produites au cours des fermentations de la souche sauvage CEN.PK113-7D en condition aérobie(a) et anaérobie(b).

Les flèches larges correspondent aux ajouts de glucose remontant la concentration à 100 g.L⁻¹, les flèches étroites correspondent aux ajouts de glucose remontant la concentration à 50 g.L⁻¹.

L'évaluation de l'éthanol évaporé par la méthode de calcul décrite précédemment (cf.: Matériel et méthode) permet de faire boucler les bilans carbone et des degrés de réduction généralisés à 98 et 96 % respectivement, dans le cas de la fermentation aérobie, et à 100 %, dans le cas de la fermentation anaérobie. La quantité d'éthanol évaporé a été évaluée à 66 g en condition aérobie et 45 g en condition anaérobie.

Tableau III-1 Paramètres des fermentations références de la souche sauvage CEN.PK113-7D en condition aérobie et anaérobie.

Les valeurs des rendements éthanol, glycérol et biomasse sont calculées à la fin de la phase de croissance. La productivité, les masses de produits, les masses de substrat consommé, les concentrations finales et le rendement acétate correspondent aux valeurs obtenues à la fin de la production d'éthanol. Les valeurs en condition aérobie correspondent à une expérience, les écarts-types traduisent l'incertitude du calcul de rendement. Les valeurs en conditions anaérobies correspondent à la moyenne de deux répétitions indépendantes, les écarts-types traduisent la variabilité entre les deux expériences.

	Condition Aérobie	Condition Anaérobie
Durée de la fermentation (h)	55	70
Durée de la phase de croissance (h)	20	24
Glucose consommé (en g)	1245	1210
Ethanol produit (en g)	534	567
Biomasse (en g)	58	43
Glycérol (en g)	13	36
Acétate (en g)	22	5
μ_{max} (h ⁻¹)	0,35 ±0,02	0,3 ±0,01
Rendement Ethanol/Glucose (g.g ⁻¹)	0,41 ±0,006	0,45 ±0,003
Rendement Glycérol/Glucose (g.g ⁻¹)	0,013 ±0,001	0,040 ±0,01
Rendement Biomasse/Glucose (g.g ⁻¹)	0,083 ±0,006	0,056 ±0,001
Rendement Glycérol/Biomasse (g.g ⁻¹)	0,16 ±0,02	0,72 ±0,04
Rendement Acétate/Glucose (g.g ⁻¹)	0,017 ±0,002	0,0052 ±0,0003
Productivité Moyenne Ethanol (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	2,1 ±0,1	1,9 ±0,1
Concentration Finale Ethanol (g.L ⁻¹)	117 ±4	139 ±1
Concentration Finale Glycérol (g.L ⁻¹)	3,1 ±0,1	9 ±0,3
Concentration Maximum Biomasse (g.L ⁻¹)	15,7 ±0,5	12,3 ±0,5
Concentration critique en Ethanol (g.L ⁻¹) pour μ	87 ±3	92 ±1

Un total de 534 g d'éthanol, 13 g de glycérol, 22 g d'acétate et 58 g de biomasse ont été produits durant la fermentation aérobie tandis que 567 g d'éthanol, 36 g de glycérol, 5 g d'acétate et 43 g de biomasse ont été produits durant la fermentation anaérobie (cf. Tableau III-1). La concentration maximum atteinte en biomasse était de $15,7 \pm 0,5 \text{ g.L}^{-1}$ en aérobie contre $12,3 \pm 0,5 \text{ g.L}^{-1}$ en anaérobie. La quantité et la concentration de glycérol produites sont trois fois plus importantes en condition anaérobie. Ainsi, les concentrations finales en glycérol sont de $3,1 \pm 0,1 \text{ g.L}^{-1}$ en aérobie et $9 \pm 0,3 \text{ g.L}^{-1}$ en anaérobie. En condition anaérobie, la concentration finale en éthanol atteinte est de 19 % supérieure à celle atteinte en condition aérobie : $117 \pm 4 \text{ g.L}^{-1}$ en aérobie contre $139 \pm 1 \text{ g.L}^{-1}$ en anaérobie. Par contre, l'acétate produit en condition aérobie est 4 fois plus important qu'en condition anaérobie.

III.2 Paramètres cinétiques des fermentations

Le taux de croissance maximum et la vitesse spécifique maximum de production d'éthanol observés sont respectivement $0,35 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$ et $1,31 \pm 0,02 \text{ g}_{\text{Ethanol}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}} \cdot \text{h}^{-1}$ en condition aérobie, contre $0,3 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ et $1,43 \pm 0,02 \text{ g}_{\text{Ethanol}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}} \cdot \text{h}^{-1}$ en condition anaérobie (cf. Figure III-2). La productivité globale des fermentations est de $2,1 \text{ g}_{\text{Ethanol}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ en condition aérobie contre $1,9 \text{ g}_{\text{Ethanol}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ en condition anaérobie (cf. Figure III-2); en se limitant aux phases de croissance, les productivités observées sont de $4,5 \text{ g}_{\text{Ethanol}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ en condition aérobie contre $3,7 \text{ g}_{\text{Ethanol}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ en condition anaérobie. Ainsi, bien que la vitesse spécifique de production d'éthanol soit plus importante en condition anaérobie, la croissance plus rapide et les plus fortes concentrations de biomasse atteintes en condition aérobie permettent d'atteindre une plus forte productivité, ce qui est en accord avec la littérature (Alfenore, Cameleyre et al. 2004). Comme cela était attendu, la vitesse spécifique maximum de production de glycérol est quatre fois plus faible en présence d'oxygène, s'établissant à $0,05 \text{ g}_{\text{Glycérol}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}} \cdot \text{h}^{-1}$ en condition aérobie contre $0,2 \text{ g}_{\text{Glycérol}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}} \cdot \text{h}^{-1}$ en condition anaérobie (cf. Figure III-3).

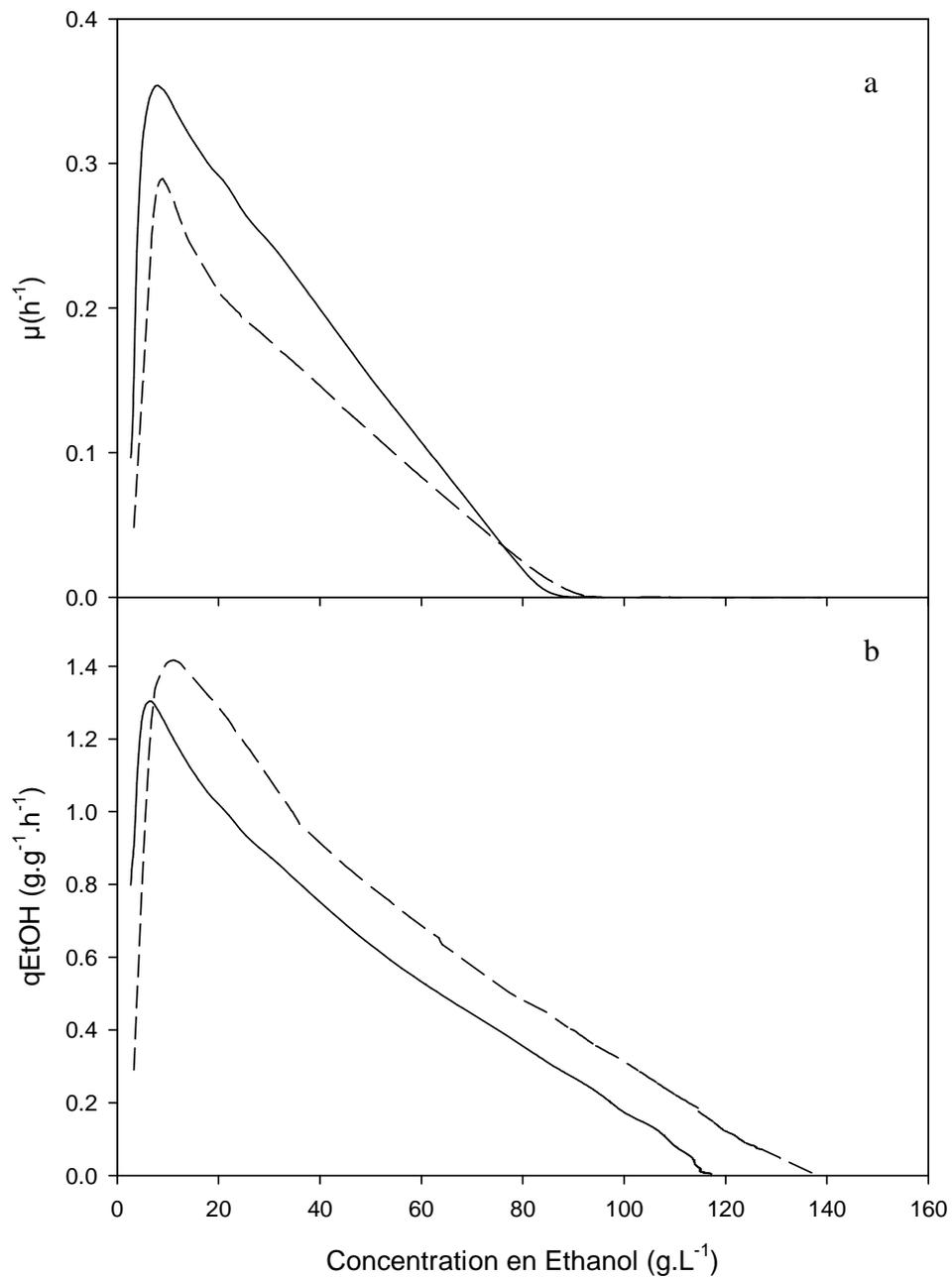


Figure III-2 Taux de croissance (a) et vitesse spécifique de production d'éthanol (b) de la souche sauvage CEN.PK113-7D en fonction de la concentration en éthanol dans le milieu en condition aérobie (—) et anaérobie (---)

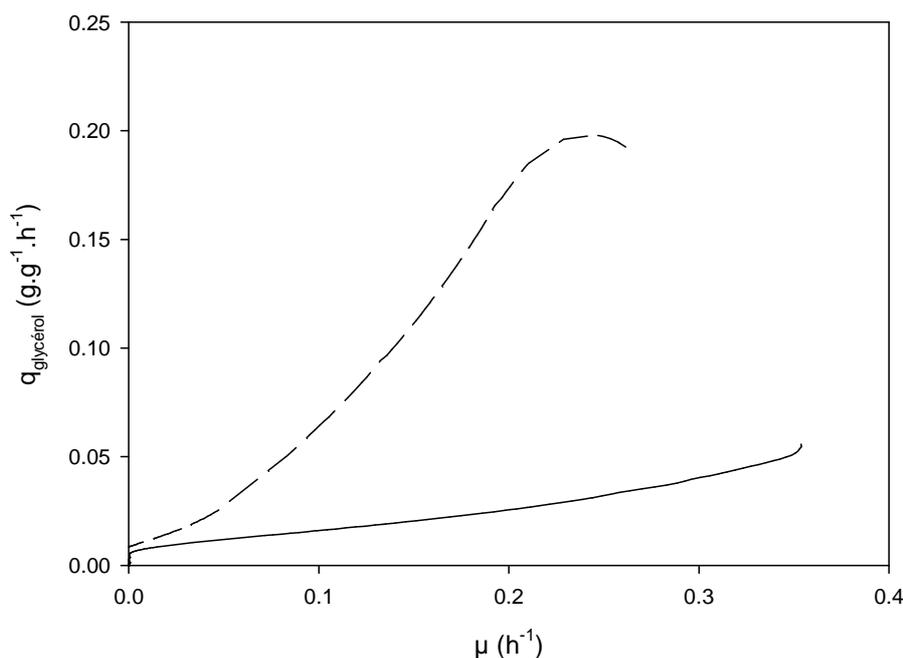


Figure III-3 Vitesse spécifique de production de glycérol en fonction du taux de croissance pour la souche sauvage CEN.PK113-7D en condition aérobie (—) et anaérobie (---)

III.3 Rendement de fermentation

Le rendement glycérol/glucose est largement réduit en présence d'oxygène, $0,013 \text{ g}_{\text{Glycérol}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{glucose}}$ en aérobie contre $0,040 \text{ g}_{\text{Glycérol}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{glucose}}$ en condition anaérobie, tout comme le rendement glycérol/biomasse, $0,16 \text{ g}_{\text{Glycérol}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}}$ en aérobie contre $0,72 \text{ g}_{\text{Glycérol}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{DCW}}$ en condition anaérobie. Ceci traduit le rôle prépondérant, en condition anaérobie, de la production de glycérol pour le maintien de l'équilibre oxydo-réductif de la cellule. Le rendement biomasse est plus important en condition aérobie : $0,083 \text{ g}_{\text{DCW}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{glucose}}$ contre $0,056 \text{ g}_{\text{DCW}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{glucose}}$ en condition anaérobie, la présence d'oxygène ayant un effet bénéfique sur la croissance. Le rendement éthanol, au cours de la phase de croissance, est plus important en condition anaérobie ($0,45 \text{ g}_{\text{Ethanol}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{glucose}}$) qu'en condition aérobie ($0,41 \text{ g}_{\text{Ethanol}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{glucose}}$) (cf. Tableau III-1) : ce résultat est lié à l'absence de phosphorylation oxydative en condition anaérobie. Durant la phase de production, en condition anaérobie, le rendement éthanol est très proche du rendement théorique limite : $0,5 \text{ g}_{\text{Ethanol}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{glucose}}$, car il subsiste très peu de co-produits. En condition aérobie, ce rendement est moindre : $0,47 \text{ g}_{\text{Ethanol}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{glucose}}$: en effet, bien que les cellules ne produisent plus de biomasse et ne produisent plus qu'une quantité de glycérol négligeable, elles produisent toujours de l'acétate et une consommation résiduelle d'oxygène indique qu'une partie du

carbone est encore oxydée à travers la respiration. Sur l'ensemble de la fermentation, le rendement éthanol est de $0,43 \text{ g}_{\text{Ethanol}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{glucose}}$ en condition aérobie et $0,47 \text{ g}_{\text{Ethanol}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{glucose}}$ en condition anaérobie.

Le rendement CO_2 /éthanol en condition aérobie est de $0,53 \text{ mol}_{\text{CO}_2} \cdot \text{Cmol}^{-1}_{\text{Ethanol}}$ durant la phase de croissance et de $0,51 \text{ mol}_{\text{CO}_2} \cdot \text{Cmol}^{-1}_{\text{Ethanol}}$ durant la phase de production. En condition anaérobie, ce rendement s'élève à $0,51 \text{ mol}_{\text{CO}_2} \cdot \text{Cmol}^{-1}_{\text{Ethanol}}$ durant la phase de croissance et $0,50 \text{ mol}_{\text{CO}_2} \cdot \text{Cmol}^{-1}_{\text{Ethanol}}$ durant la phase de production. Le rendement CO_2 /Ethanol est plus élevé en condition aérobie, en raison de l'oxydation d'une partie du glucose par la voie respiratoire : ce qui augmente la production de CO_2 .

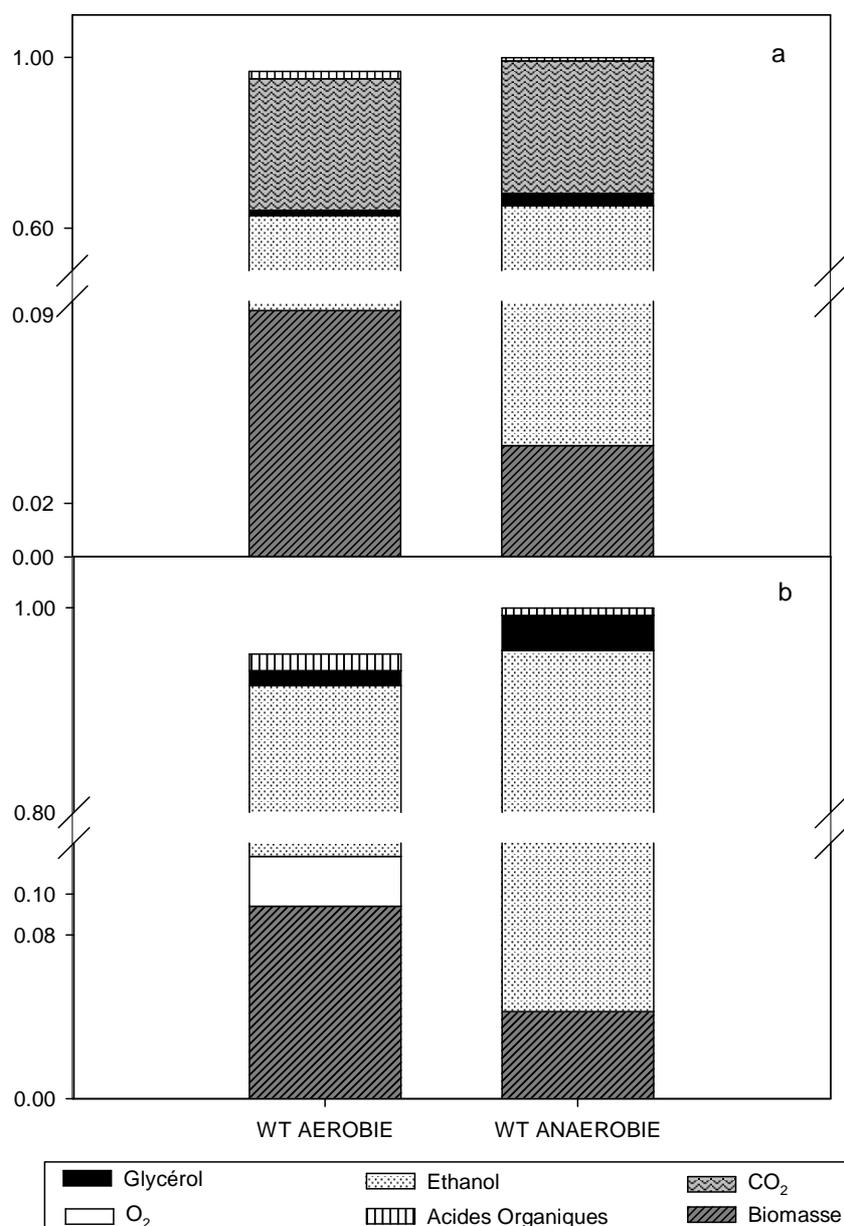


Figure III-4 Bilan carbone (a) et bilan des degrés de réduction généralisés (b) au cours des fermentations de la souche CEN.PK113-7D sauvage (WT) en condition aérobie et anaérobie.

Les bilans carbone et les bilans des degrés de réduction généralisés des fermentations aérobie et anaérobie sont représentés sur la Figure III-4. Ces bilans montrent clairement qu'en condition anaérobie la part du carbone consacrée à la production de biomasse est moindre que lors de la fermentation en condition aérobie ; par contre, le glycérol et l'éthanol augmentent; enfin, on peut aussi observer une diminution de la part des acides organiques.

III.4 Viabilité et résistance au stress

Les cultures peuvent être, chacune, divisées en deux phases : une première phase durant laquelle la production d'éthanol est couplée à la croissance et une seconde phase, après l'arrêt de la croissance, durant laquelle seule la production d'éthanol se poursuit. Ce phénomène de découplage survient pour des concentrations d'éthanol appelées "concentrations critiques en éthanol" ($P_{\text{critique}/\mu}$), qui caractérisent communément l'inhibition de la croissance par l'éthanol (cf. Figure III-2). Les $P_{\text{critique}/\mu}$, s'établissent à 87 g.L⁻¹ en condition aérobie et 90 g.L⁻¹ en condition anaérobie. De plus, la concentration finale en éthanol atteint 117 g.L⁻¹ en condition aérobie contre 138 g.L⁻¹ en condition anaérobie, indiquant que la production d'éthanol se poursuit plus longtemps en condition anaérobie. Il est notable, qu'en condition aérobie, l'arrêt de la production d'éthanol ne correspond pas à la chute de la viabilité, puisqu'il intervient pour une viabilité de 80 %. L'estimation de la viabilité cellulaire par la technique de la coloration au bleu de méthylène montre aussi que la chute de viabilité intervient pour une concentration en éthanol plus faible en condition aérobie qu'en condition anaérobie (cf. Figure III-5).

Ces données sont en contradiction avec ce qui a été observé, dans des conditions de culture identiques, pour d'autres souches de levures (Alfenore, Cameleyre et al. 2004). En effet, l'oxygène est connu pour améliorer la viabilité des levures et atténuer l'effet négatif de l'éthanol, permettant ainsi de repousser le paramètre $P_{\text{critique}/\mu}$ des levures et d'atteindre des concentrations finales en éthanol plus élevées. Or, dans le cas de nos fermentations, le $P_{\text{critique}/\mu}$ et la concentration maximum en éthanol atteinte sont réduits en présence d'oxygène. Ces phénomènes pourraient être liés à l'importance de la production d'acétate en condition aérobie. En effet, en condition aérobie, la souche CEN.PK113-7D produit beaucoup plus d'acétate que la souche utilisée par Alfenore et al : 0,016 g_{acétate}/g_{glucose} contre 0,008 g_{acétate}/ g_{glucose} pour la souche CBS 8066 ; la concentration en acétate atteinte à la fin de la production d'éthanol est de 2,2 g_{Acétate}. L⁻¹ pour la souche CBS 8066 contre 5,5 g_{Acétate}. L⁻¹ pour la souche CEN.PK113-7D. De plus, la production d'acétate se poursuit au-delà de l'arrêt de la production d'éthanol (cf. Figure III-6) et une corrélation semble exister entre la chute de la viabilité et l'augmentation de la concentration en acétate (cf. Figure III-6).

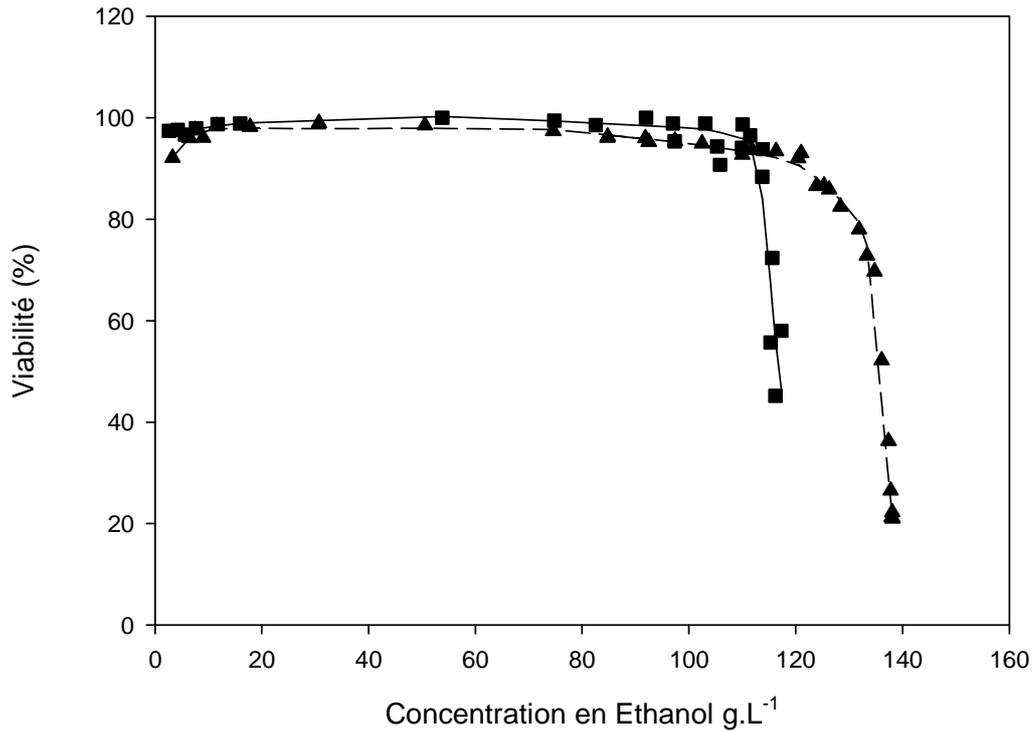


Figure III-5 Evolution de la viabilité de la biomasse en fonction de la concentration en éthanol pour la souche sauvage CEN.PK113-7D en condition aérobie (■) et anaérobie (▲).

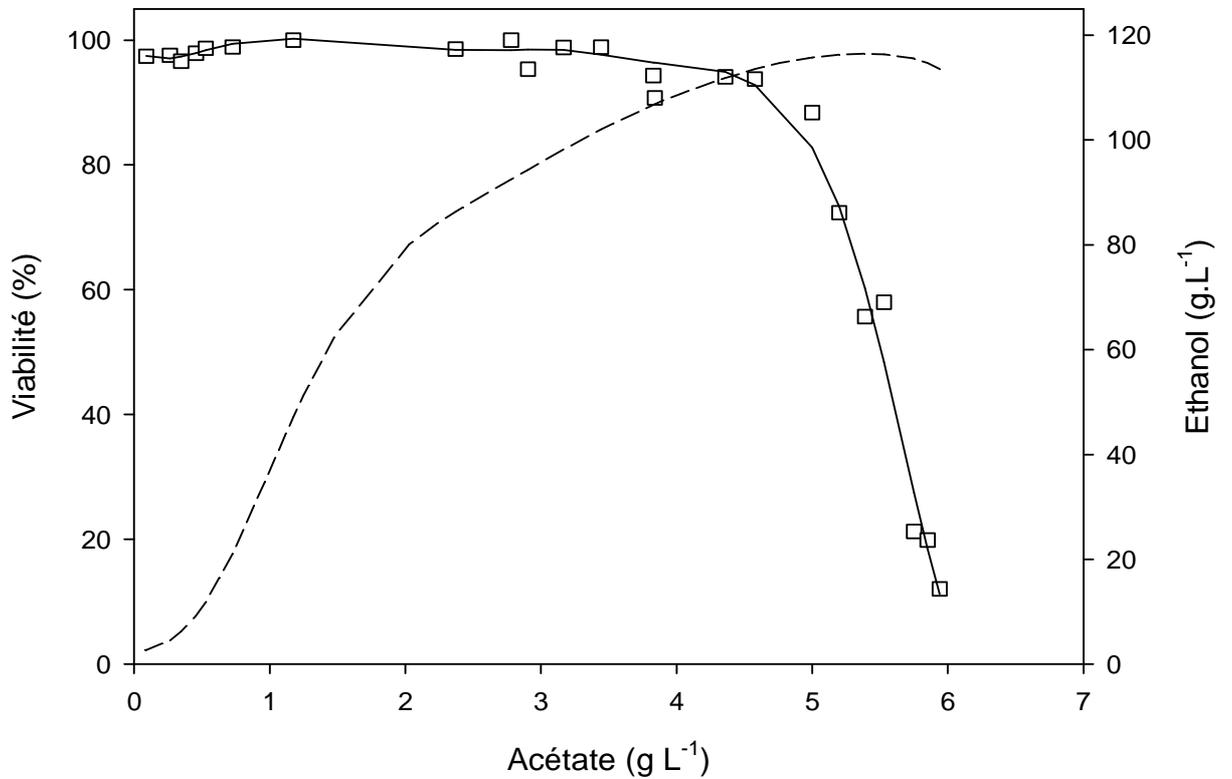


Figure III-6 Evolution de la viabilité (□) et de la concentration en éthanol (- - -) dans le milieu de culture en fonction de la concentration en acétate au cours de la fermentation de la souche CEN.PK-113D.

III.5 Reproductibilité des fermentations

La fermentation référence de la souche en condition anaérobie a été réalisée deux fois afin de pouvoir évaluer l'écart minimum permettant de valider l'amélioration du rendement. Les rendements des différents produits de la fermentation, calculés pendant toute la phase de croissance pour les deux expériences (Anaérobie A et Anaérobie B), sont présentés dans le Tableau III-2. L'écart-type le plus important correspond à la valeur du rendement en acétate. Cet écart-type important est dû aux faibles valeurs de production d'acide acétique en condition anaérobie et à la difficulté de les mesurer avec précision. Les autres écarts-types sur les rendements sont faibles, ce qui autorise à appréhender même de faibles améliorations de rendements. La comparaison des vitesses spécifiques de croissance et des vitesses spécifiques de production d'éthanol, en fonction de la concentration en éthanol, montre que celles-ci aussi sont très proches pour les deux répétitions de la fermentation (cf. Figure III-7).

Tableau III-2 Paramètres des deux répétitions de la fermentation référence de la souche sauvage CEN.PK113-7D en condition anaérobie

	Anaérobie A	Anaérobie B	Ecart-Type
μ_{\max} (h ⁻¹)	0,29	0,3	2,40%
Rendement Ethanol/Glucose (g.g ⁻¹)	0,447	0,447	0,00%
Rendement Glycérol/Glucose (g.g ⁻¹)	0,0402	0,0407	0,87%
Rendement Biomasse/Glucose (g.g ⁻¹)	0,0557	0,0568	1,38%
Rendement Acétate/Glucose (g.g ⁻¹)	0,0050	0,0055	6,73%
Rendement Glycérol/Biomasse (g.g ⁻¹)	0,721	0,716	0,49%
Productivité Moyenne Ethanol (g. L ⁻¹ .h ⁻¹)	1,97	1,82	5,60%
Concentration Finale Ethanol (g.L ⁻¹)	138	140	1,02%
Concentration Finale Glycérol (g.L ⁻¹)	8,7	9,16	3,64%
Concentration Maximum Biomasse (g.L ⁻¹)	12	12,5	2,89%
Concentration critique en Ethanol (g.L ⁻¹) Pour μ	92,5	91,9	0,46%

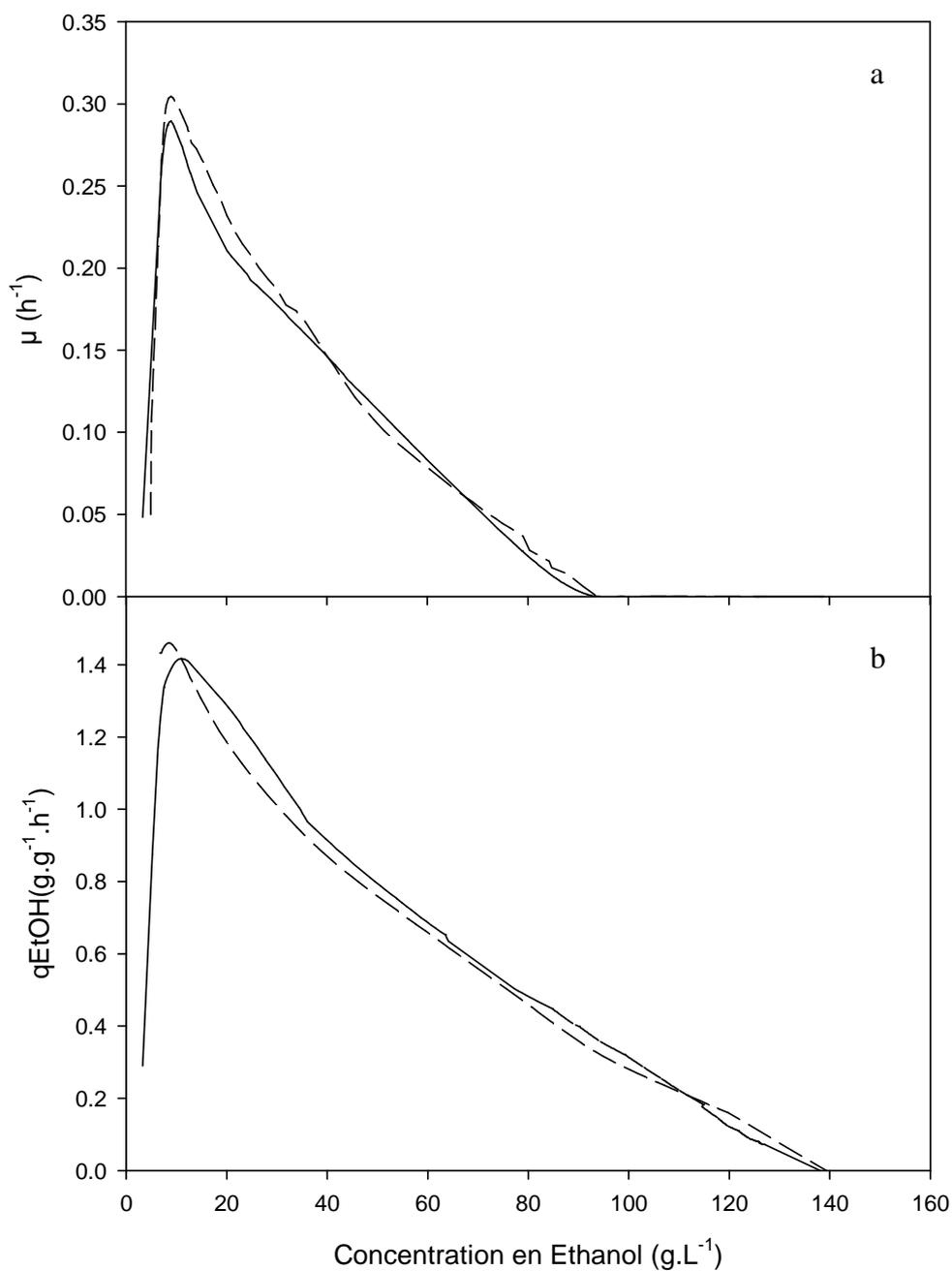


Figure III-7 Comparaison de l'évolution des taux de croissance(a) et des vitesses spécifiques de production d'éthanol(b) en fonction de la concentration en éthanol pour les deux répétitions de la fermentation de la souche sauvage CEN.PK113-7D en condition anaérobie : Anaérobic A (___) et Anaérobic B (- -)

III.6 Conclusion:

Ces fermentations ont permis de caractériser le comportement de la souche sauvage CEN.PK113-7D en conditions aérobie et anaérobie. Les bonnes capacités de la souche pour la production d'éthanol ont été confirmées puisqu'une concentration maximum de 139 g.L⁻¹ a pu être atteinte en 180 heures. La souche se caractérise aussi par sa faible production de glycérol, avec des rendements glycérol en condition aérobie et anaérobie, correspondant à respectivement à 50 % et 40 % de ceux déterminés pour la souche TN1, qui est souvent utilisée dans les études sur la réduction de la production de glycérol [Nissen2000]. Ce faible rendement glycérol réduit la marge d'amélioration potentielle du rendement éthanol chez les souches mutantes. Dans ces conditions, toute amélioration du rendement restera forcément limitée. En supposant que tout le carbone consacré à la production de glycérol soit réorienté vers l'éthanol, chez la souche sauvage, sans modification du rendement biomasse et des autres co-produits, l'amélioration maximum possible du rendement éthanol serait 1,6 % en condition aérobie et 4,5% en condition anaérobie. Cependant, l'utilisation d'une souche possédant des rendements proches de ceux des souches industrielles présente un intérêt évident pour une éventuelle application des résultats. Enfin, une troisième caractéristique majeure de la souche est sa forte production d'acide acétique, notamment en condition aérobie, où l'acide acétique affecte vraisemblablement la viabilité de la souche.

Chapitre IV : Définition de la stratégie d'ingénierie métabolique

L'intégration et l'interconnexion importantes des différentes composantes du métabolisme central, aussi bien au niveau énergétique qu'au niveau des réactions d'oxydo-réduction, rendent complexe la définition des stratégies d'ingénierie métabolique. Ainsi, il est difficile de parvenir à réorienter un flux de carbone depuis un co-produit vers un produit d'intérêt, sans profondément altérer le métabolisme de la souche et affecter son comportement, notamment vis-à-vis des stress environnementaux. Le développement récent de collections de promoteurs, permettant d'ajuster finement l'activité des gènes, fournit une plus grande souplesse dans le choix de la construction génétique des souches mutantes. En parallèle, l'utilisation accrue de modèles métaboliques doit permettre la mise en place d'une démarche rationnelle dans la création des mutants : en particulier, ces modèles métaboliques permettent de déterminer *in silico* les configurations de mutations nécessaires, afin d'optimiser les souches pour un procédé donné.

Notre démarche s'est appuyée sur ces nouveaux outils afin de créer des mutants dans lesquels le flux de carbone à travers la voie du glycérol serait ajusté, pour correspondre au plus près aux besoins anaboliques : ceci afin de minimiser la production de glycérol, sans affecter la synthèse de biomasse. Pour cela, le réseau métabolique construit par Bideaux (Bideaux, Alfenore et al. 2006; Bideaux, Goma et al. 2008) a préalablement été modifié, de façon à y intégrer la compartimentation cellulaire. Puis, ce réseau compartimenté a été utilisé comme base pour la construction d'un second réseau adapté au métabolisme anaérobie. Ces réseaux métaboliques ont, par la suite, été utilisés pour calculer les flux intracellulaires correspondant aux fermentations de références effectuées avec la souche sauvage, en conditions aérobie et anaérobie. Ces résultats ont permis d'estimer le flux minimum nécessaire, à travers la voie du glycérol, pour permettre la production des précurseurs nécessaires à la synthèse de la biomasse. Enfin, ces calculs de flux ont permis la sélection des promoteurs mutés, semblant les plus à même de fournir le flux désiré dans cette voie. Ces promoteurs ont finalement été utilisés pour la construction des souches.

IV.1 Adaptation du réseau métabolique existant

Le réseau métabolique conçu par Bideaux (Bideaux, Alfenore et al. 2006; Bideaux, Goma et al. 2008) ne prend pas en compte la compartimentation cellulaire. *In vivo*, la membrane interne mitochondriale présente une perméabilité sélective pour les différents composés ; la matrice mitochondriale constitue un espace partiellement isolé et est le siège de nombreuses réactions fondamentales pour les micro-organismes. L'objectif principal des transformations apportées au modèle était d'introduire une ségrégation entre les réactions cytosoliques et les réactions mitochondriales, en les répartissant en deux pools distincts. D'un point de vue pratique, le nom des espèces se situant dans la mitochondrie a été complété par le suffixe «-mi». Ainsi une espèce chimique X, présente à la fois dans le cytosol et la mitochondrie, est dédoublée en deux espèces de composition élémentaire identique, mais possédant des noms différents, X et Xmi.

IV.1.1 Construction du réseau métabolique "a priori" à partir de la bibliographie

IV.1.1.1 Répartition des réactions entre le cytosol et la mitochondrie

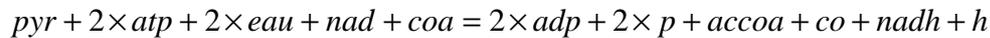
Le pool des réactions cytosoliques comprend : la glycolyse, la voie des Pentoses Phosphates, la formation des précurseurs des Acides aminés (5-Phosphoribosyl-1-diphosphate, Chorismate, Carbamoyl-phosphate, Inosine monophosphate), la synthèse des bases azotées, la synthèse des acides gras, les réactions du pyruvate, de l'acétaldéhyde, du glycérol et du dihydroxyacétone phosphate. Les réactions du cycle de Krebs et de la chaîne respiratoire sont intégrées au pool mitochondrial.

La localisation de la synthèse de l'acétyl-coA pose un problème particulier dans les modèles compartimentés (Gombert, Moreira dos Santos et al. 2001; dos Santos, Gombert et al. 2003). En effet, l'acétyl-coA est nécessaire à la fois dans le cytosol, où il intervient dans la synthèse des lipides, et dans la mitochondrie, où il est nécessaire pour alimenter le cycle de Krebs. Dans la cellule, l'acétyl-coA est synthétisé, soit grâce à l'enzyme pyruvate déshydrogénase dans la mitochondrie (Équation 1), soit par la voie métabolique appelée by-pass de la pyruvate déshydrogénase dans le cytosol (Équation 2) ; ces deux voies ne présentant pas le même bilan énergétique.

Équation 1 : (pyruvate déshydrogénase)



Équation 2 : (by-pass de la pyruvate déshydrogénase)



Le transfert d'acétyl-coA entre le cytosol et la mitochondrie peut donc modifier le bilan énergétique de la synthèse de biomasse. Cependant, ce transfert n'est possible qu'en présence de carnitine dans le milieu : ces expériences se déroulant sans carnitine, le modèle n'intègre donc pas ce transfert. Les deux voies de synthèse de l'acétyl-coA sont intégrées dans le modèle, chacune des voies produisant exactement l'acétyl-coA nécessaire dans son compartiment.

Une attention particulière a été portée à la localisation des synthèses des acides aminés (cf. IV.1.1.4) et à la compartimentation du cofacteur réduit NADPH (cf. IV.1.1.5).

IV.1.1.2 Transport des métabolites entre les compartiments

La compartimentation du modèle en deux pools distincts nécessite l'introduction d'équations stœchiométriques de transport entre les compartiments dans le modèle. Ainsi, toutes les espèces produites dans le cytosol, mais impliquées dans des réactions localisées dans la mitochondrie, doivent pouvoir y entrer ; inversement les espèces, produites dans la mitochondrie et utilisées dans le cytosol, doivent pouvoir en sortir. Ces transports s'effectuent, soit par des phénomènes de diffusion simple, soit à travers des transporteurs. *In vivo*, 34 transporteurs mitochondriaux ont été identifiés dans le génome de *Saccharomyces cerevisiae* et les fonctions de 15 d'entre eux ont pu être déterminées [Palmieri, 2006]. Ces transporteurs font appel à des mécanismes de symport ou d'antiport, utilisant pour force motrice le gradient de protons entre l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale. Cependant, pour simplifier le modèle, la compartimentation des protons n'a pas été prise en compte et une réaction d'échange simple, permettant à ces derniers de diffuser librement entre la mitochondrie et le cytosol, a été introduite. Ceci permet de simplifier, après vérification de l'existence de transporteurs, l'ensemble des réactions de symport et d'antiport en les remplaçant par des réactions d'échange simple. Les molécules échangées entre les compartiments sont donc les protons, les molécules simples (CO₂, H₂O et O₂), les molécules phosphorylées (Gawaz, Douglas et al. 1990; Lawson, Gawaz et al. 1990; Gropp, Brustovetsky et al. 1999; Hamel, Saint-Georges et al. 2004; Vozza, Blanco et al. 2004), les acides aminés mitochondriaux et les intermédiaires du cycle de Krebs

(Conover 1987; Kaplan, Mayor et al. 1995; Palmieri, Lasorsa et al. 1997; Bojunga, Kötter et al. 1998; Soetens, Crabeel et al. 1998; Palmieri, Voza et al. 1999; Maaheimo, Fiaux et al. 2001; Palmieri, Agrimi et al. 2001; Hildyard and Halestrap 2003). La possibilité d'échanger l'acétyl-coA entre le cytosol et la mitochondrie n'a pas été introduite dans le modèle (cf. IV111).

IV.1.1.3 Transport du pouvoir réducteur du cofacteur réduit NADH

La membrane interne de la mitochondrie est imperméable au cofacteur réduit NADH : l'excédent de NADH cytosolique, réoxydé à travers la phosphorylation oxydative, ne peut donc pas pénétrer ce compartiment. Le transfert de pouvoir réducteur vers la chaîne respiratoire se fait, soit à travers des NADH déshydrogénases externes (NDE1 et NDE2), situées sur la face interne de la mitochondrie, soit par l'intermédiaire de navettes permettant son passage dans la matrice mitochondriale. Plusieurs navettes ont pu être identifiées chez *S. cerevisiae* : glycérol/DHAP, acétaldéhyde/éthanol, malate/aspartate. Toutes ces navettes fonctionnent sur le même principe : l'espèce réduite pénètre dans la mitochondrie où elle est réoxydée, libérant son pouvoir réducteur sous forme de NADH ou de FADH₂ ; puis, l'espèce réoxydée retourne vers le cytosol. Les cofacteurs réduits ainsi formés sont réoxydés à travers la chaîne respiratoire. Dans notre modèle, le bilan énergétique de la chaîne respiratoire est identique pour la réoxydation du NADH et du FADH₂ : les modes de transfert sont donc équivalents d'un point de vue énergétique et oxydo-réductif. De plus, des tests préliminaires ont aussi permis de démontrer que le mode de transfert choisi n'influe pas sur la valeur du flux. Bien que, *in vivo*, les différents modes de transport du pouvoir réducteur coexistent, la structure du modèle ne permet pas d'insérer plusieurs de ces réactions sans créer une linéarité ; cette linéarité impose de disposer de mesures de flux intracellulaires pour la résolution mathématique. Finalement, la navette glycérol a été insérée dans le modèle, pour modéliser l'ensemble du transfert du pouvoir réducteur entre le cytosol et la mitochondrie.

IV.1.1.4 Compartimentation de la synthèse des Acides Aminés

Localisation de la synthèse des différents acides aminés

Chez *S. cerevisiae*, la production des différents acides aminés est répartie entre le cytosol et la mitochondrie. La répartition des voies de synthèse des acides aminés entre ces deux compartiments, dans le modèle, est d'autant plus importante que ces réactions génèrent un flux net de NADH qui est de nature à influencer la production de glycérol. Cependant, la localisation de la synthèse des acides aminés *in vivo* est très discutée. Ainsi, dès 1974, Ryan et Kohlhaw suggérèrent que les enzymes de synthèse de la valine et l'isoleucine étaient localisées dans la mitochondrie (Ryan and Kohlhaw 1974). En 1981, Brandriss et Magasanik indiquèrent que les synthèses de la proline et de l'arginine pourraient

être localisées dans la mitochondrie (Brandriss and Magasanik 1981). En 1996, Kispal et ses collaborateurs démontrèrent que l'une des protéines impliquées dans la synthèse des acides aminés à « chaîne branchée » (Isoleucine, Valine, Leucine) était présente à la fois dans le cytosol et la mitochondrie ; ils démontrèrent également que la délétion d'un seul des deux gènes ne suffisait pas à affecter la croissance ; cela pouvant indiquer que ces acides aminés pourraient être synthétisés à la fois dans la mitochondrie et le cytosol (Kispal, Steiner et al. 1996). En 2001, une technique de marquage isotopique au carbone 13 a été utilisée pour localiser la synthèse des acides aminés dans la cellule (Maaheimo, Fiaux et al. 2001). Cette étude situe la synthèse de plusieurs acides aminés dans la mitochondrie (cf. Tableau IV-1). De même, Förster et Duarte (Förster, Famili et al. 2003; Duarte, Herrgard et al. 2004), dans leurs modèles compartimentés, ont donné chacun une répartition possible de la synthèse des acides aminés dans les compartiments cellulaires (Förster, Famili et al. 2003; Duarte, Herrgard et al. 2004).

Tableau IV-1 Localisation de la synthèse de 8 acides aminés identifiés comme potentiellement d'origine mitochondriale par les études de Maaheimo 2001, Förster 2003, Duarte 2004.

	Alanine	Leucine	Isoleucine	Glutamate	Proline	Arginine	Lysine	Valine
Maaheimo et al 2001	Mit	Mit	Cyt + Mit	Mit	Mit	Mit	Cyt+ Mit	Mit
Duarte et al 2004	Mit/ Cyt	Mit/ Cyt	Mit/ Cyt	Mit + Cyt	Cyt	Cyt	Cyt	Cyt
Förster et al 2003	Mit/ Cyt	Mit/ Cyt	Mit/ Cyt	Cyt	Cyt	Cyt	Cyt	Cyt
Configuration retenue	Mit	Mit	Cyt	Testé	Mit	Mit	Cyt	Mit

Mit = Synthèse mitochondriale

Cyt = Synthèse cytosolique

Mit/Cyt= Synthèse mitochondriale ou cytosolique

Cyt + Mit= Synthèse ayant lieu à la fois dans le cytosol et dans la mitochondrie

Face à la difficulté de déterminer clairement la localisation de la synthèse des acides aminés dans les compartiments cellulaires, plusieurs configurations basées sur les données de la littérature ont été envisagées dans notre étude. En se basant sur la bibliographie, il a été décidé, dans un premier temps, de placer l'alanine, la leucine, la proline, l'arginine et la valine dans la mitochondrie; l'isoleucine et la lysine ont été placées dans le cytosol. Le glutamate étant nécessaire comme précurseur pour la synthèse des autres acides aminés, sa synthèse influence considérablement la consommation de NADPH dans le compartiment où elle est localisée ; les deux configurations, synthèse cytosolique et synthèse mitochondriale, ont donc été testées.

IV.1.1.5 Compartmentation du cofacteur NADP⁺/NADPH

Besoins physiologiques en NADPH

Biologiquement, la production de NADPH est essentielle pour le fonctionnement de la cellule. Effectivement, celui-ci est le cofacteur réduit préférentiel d'un grand nombre de réactions anaboliques et est donc nécessaire à la production de biomasse. Pour produire 100 g de biomasse, les besoins en NADPH ont été évalués à 900 mmoles (van Dijken and Scheffers 1986). Dans le modèle métabolique, la répartition, entre la mitochondrie et le cytosol, des réactions anaboliques consommant du NADPH nécessite que celui-ci soit disponible dans les deux compartiments. D'après la bibliographie disponible sur ce sujet, il n'existe pas de transport de NADPH entre les deux compartiments. Il est donc nécessaire d'introduire dans le modèle des réactions productrices de NADPH, à la fois dans le cytosol et dans la mitochondrie.

NADPH cytosolique

Jusqu'à récemment, il était communément admis que le NADPH cytosolique était principalement produit via l'action de la glucose phosphate déshydrogénase (G6PD), enzyme contrôlant l'entrée dans la voie des pentoses phosphates (Lagunas and Gancedo 1973), et via l'action de l'enzyme 6-phosphogluconate déshydrogénase, intervenant elle aussi dans la voie des pentoses phosphates. Cependant, d'autres enzymes, engendrant la formation de NADPH cytosolique, semblent aussi posséder des rôles importants. Ainsi, l'isocitrate déshydrogénase NADPH dépendante (IDP2), localisée dans le cytosol, pourrait fournir une partie du NADPH. Cependant, cette enzyme n'est pas essentielle à la croissance de la cellule. En effet, le mutant de triple délétion $\Delta idp1/ \Delta idp2/ \Delta zwf1$, dans lequel les isocitrates déshydrogénases mitochondriales et cytosolique ainsi que l'enzyme G6PD (codée par le gène *ZWF1*) sont délétés, est capable de croître : ceci indique la présence d'autres sources de NADPH cytosolique (Minard, Jennings et al. 1998). D'autre part, l'acétaldéhyde déshydrogénase, catalysant l'oxydation de l'acétaldéhyde en acétate, existe sous deux isoformes dans le cytosol; l'une de ces formes, codée par le gène *ALD6*, étant NADPH dépendante (Wang, Mann et al. 1998). Cette enzyme pourrait avoir un rôle majeur dans la production de NADPH cytosolique. Il est intéressant de noter que la double mutation $\Delta ald6/ \Delta zwf1$ n'est létale que dans des conditions de culture où l'isocitrate déshydrogénase cytosolique n'est pas exprimé (Grabowska and Chelstowska 2003). Ainsi, les phénotypes des mutants de délétion semblent indiquer qu'il existe trois sources de NADPH cytosoliques contribuant significativement à la production de NADPH cytosolique, sans qu'aucune des trois ne soit essentielle à la survie des cellules (Pollak, Niere et al. 2007). Dans les modèles métaboliques construits, le NADPH cytosolique est produit par la voie des pentoses phosphates et par l'enzyme ALD6.

NADPH mitochondrial

L'origine du NADPH mitochondrial reste très discutée. Ainsi, comme dans le cas du NADPH cytosolique, plusieurs enzymes NADP⁺ dépendantes, telle que l'enzyme malique, l'isocitrate déshydrogénase NADPH dépendante mitochondriale IDP1, mais aussi plus récemment les enzymes acétaldéhyde déshydrogénase ALDH4 et ALDH5 ont pu être identifiées et ont été évoquées comme source potentielle de NADPH mitochondrial. D'autre part, la phosphorylation du NADH mitochondrial en NADPH est aussi une hypothèse avancée par certains auteurs comme une source possible de NADPH mitochondrial (Outten and Culotta 2003; Shi, Kawai et al. 2005).

Le rôle de l'isocitrate déshydrogénase a été identifié comme essentiel dans la production du NADPH mitochondrial dans les cellules chez les mammifères, cette production étant notamment induite en condition aérobie (Jo, Son et al. 2001). Cependant, la délétion de cette enzyme, chez la levure *S. cerevisiae*, n'a pas d'effet sur la résistance au stress oxydatif ou sur la croissance cellulaire (Minard, Jennings et al. 1998). La possibilité que le NADPH mitochondrial soit produit par une réaction de phosphorylation du NADH a été envisagée par plusieurs auteurs (Outten and Culotta 2003; Shi, Kawai et al. 2005). Miyagi et al ont confirmé, en 2009, le rôle des enzymes kinases transformant le NADH en NADPH dans la mitochondrie de *S. cerevisiae*; cependant, les mêmes auteurs ont aussi mis en évidence l'importance des enzymes acétaldéhyde déshydrogénases NADP⁺ dépendantes ALDH4 et ALDH5 pour la production de NADPH (Miyagi, Kawai et al. 2009). Enfin, Miyagi et al ont aussi suggéré que l'enzyme malique jouerait un rôle mineur chez *S. cerevisiae* (Miyagi, Kawai et al. 2009) : elle n'a donc pas été insérée dans le modèle.

Pour la production du NADPH mitochondrial dans le modèle, plusieurs solutions ont été envisagées. En se basant sur la littérature, deux voies de production de NADPH mitochondrial ont été testées : (i) l'isocitrate déshydrogénase NADP⁺ dépendante et (ii) l'acétaldéhyde déshydrogénase NADP⁺ dépendante. L'utilisation des deux enzymes, l'isocitrate déshydrogénase NADP⁺ dépendante et l'acétaldéhyde déshydrogénase NADP⁺ dépendante, dans le même réseau métabolique, n'est pas possible, car elle génère une linéarité. Deux configurations de réseau métabolique, basées sur ces deux enzymes, ont donc été envisagées. Ainsi, des réseaux comprenant l'isocitrate déshydrogénase NADP⁺ dépendante en parallèle de l'isocitrate déshydrogénase NAD⁺ dépendante, mais aussi des réseaux comprenant l'acétaldéhyde déshydrogénase NADP⁺ mitochondriale en parallèle de l'isocitrate déshydrogénase NAD⁺ dépendante ont été testés. L'insertion de l'isocitrate déshydrogénase seul a été exclue, car, dans ce cas, le flux de production d'alpha-cétoglutarate serait limité par la consommation mitochondriale du NADPH. L'insertion des enzymes kinases étant susceptible de créer un cycle permettant la conversion massive de NADH en NADPH et leur rôle restant mineur *in vivo*, celles-ci n'ont pas été intégrées au modèle.

IV.1.2 Etablissement des réseaux métaboliques

Plusieurs points critiques concernant la structure du modèle ont été identifiés au cours de la recherche bibliographique: le transport du pouvoir réducteur du cytosol vers la mitochondrie, le choix du cofacteur de l'acétaldéhyde déshydrogénase cytosolique, l'existence d'un transport d'acétyl-coA entre le cytosol et la mitochondrie, l'origine du NADPH mitochondrial, la localisation de la synthèse du glutamate. Le transfert du pouvoir réducteur à travers la navette du glycérol, l'utilisation de l'acétaldéhyde déshydrogénase cytosolique NADPH dépendante, l'absence de transport d'acétyl-coA entre le cytosol et la mitochondrie ont été choisis à partir de la bibliographie. Différentes configurations de réseaux métaboliques ont été testées pour l'origine du NADPH mitochondrial (IDPH NADP⁺ dépendante en parallèle de l'IDPH NAD⁺ dépendante; ALDH NADP⁺ en parallèle de l'IDPH NAD⁺ dépendante), et pour la localisation de la synthèse du glutamate (cytosolique ou mitochondriale).

Les différentes combinaisons possibles entre les éléments à tester ont abouti à la création de 4 configurations du modèle de base présentées dans le Tableau IV-2.

Tableau IV-2. Description des différentes configurations de modèle envisagées en aérobie.

	Modèle 1	Modèle 2	Modèle 3	Modèle 4
NADPH Mitochondrial	2 IDPH	2 IDPH	ALDH	ALDH
Glutamate	Cyto.	Mito.	Cyto.	Mito.

Cyto= Cytosolique, Mito= Mitochondriale

Pour les résolutions, 15 espèces chimiques ont été définies comme potentiellement extracellulaires en condition aérobie: le glucose (glc), l'eau (eau), le CO₂ (co), l'éthanol (etoh), l'acétate (acetat), le glycérol (glyc), l'O₂ (o), le phosphate (Pextra), l'ion H⁺ (h), le NH₄⁺ (nh), le So₄²⁻ (soextra), le succinate (suc), le pyruvate (pyr), le citrate (cit) et la biomasse (biomass). Le nombre de vitesses à fournir pour la résolution dépend du degré de liberté du système d'équations correspondant à la matrice de chaque réseau métabolique. Les vitesses utilisées pour résoudre les modèles possédant des solutions mathématiques sont présentées dans le Tableau IV-3.

IV.2 Adaptation aux conditions anaérobies

Les différences existant entre les métabolismes aérobie et anaérobie de *S. cerevisiae* rendent nécessaire l'adaptation des réseaux métaboliques pour pouvoir les utiliser en condition anaérobie. Dans nos modèles, les réactions susceptibles d'être modifiées sont, (i) les réactions de phosphorylation oxydative, (ii) les réactions consommant de l'oxygène moléculaire, (iii) la production des acides gras et (iv) le cycle de Krebs, connu pour fonctionner en deux branches distinctes en condition anaérobie.

Tableau IV-3 Résolutions des matrices des réseaux métaboliques 1 à 4

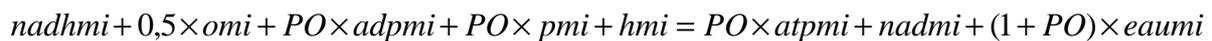
Les vitesses grisées correspondent aux vitesses qu'il est nécessaire de mesurer expérimentalement pour résoudre le système d'équation correspondant au réseau métabolique. Les vitesses non grisées correspondent aux vitesses recalculées lors de la résolution.

	Modèle 1	Modèle 2	Modèle 3	Modèle 4
Glucose	Mesuré	Mesuré	Mesuré	Mesuré
CO2	Calculé	Calculé	Calculé	Calculé
O2	Calculé	Calculé	Calculé	Calculé
Ethanol	Mesuré	Mesuré	Mesuré	Mesuré
Citrate	Mesuré	Mesuré	Mesuré	Mesuré
Pyruvate	Mesuré	Mesuré	Mesuré	Mesuré
Acétate	Mesuré	Mesuré	Mesuré	Mesuré
Succinate	Mesuré	Mesuré	Mesuré	Mesuré
Biomasse	Mesuré	Mesuré	Mesuré	Mesuré
Glycérol	Mesuré	Mesuré	Mesuré	Mesuré
Vitesse à fournir	8	8	8	8

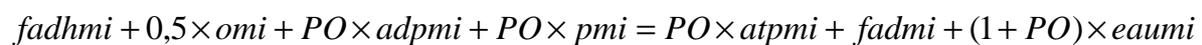
IV.2.1 Phosphorylation oxydative

Du fait de l'absence d'oxygène dans le milieu, les réactions correspondant à la phosphorylation oxydative (Équation 3 et Équation 4) n'ont plus lieu d'être et sont donc supprimées.

Équation 3 :

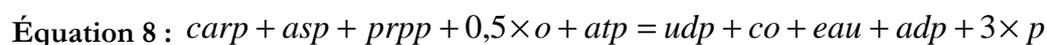
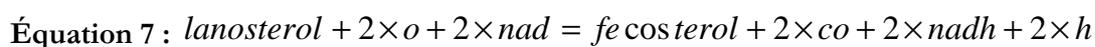
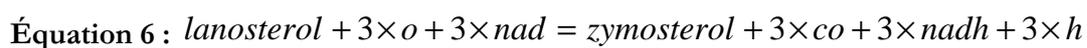
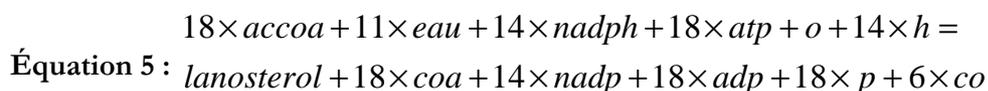


Équation 4 :



IV.2.2 Oxygène Moléculaire

Outre la consommation d'oxygène par voie respiratoire, un certain nombre de réactions non respiratoires utilisent de l'oxygène en quantité dite "moléculaire" (Rosenfeld and Beauvoit 2003). Dans nos réseaux métaboliques, quatre réactions relevant de l'anabolisme consomment de l'oxygène : trois réactions impliquées dans la synthèse des stérols (Équation 5, Équation 6, Équation 7) et la synthèse d'uridine diphosphate (Équation 8).



Au cours des fermentations en condition anaérobie, l'absence d'oxygène pour la synthèse des stérols est compensée par l'ajout d'ergostérol dans le milieu de culture. Pour utiliser les réseaux métaboliques en condition anaérobie, l'ergostérol a été ajouté à la liste des métabolites extracellulaires. En l'absence d'oxygène, dans le modèle, l'ergostérol est ainsi consommé pour produire les autres stérols nécessaires à la synthèse de biomasse par inversion de la voie de synthèse des stérols. Par ailleurs, la réaction de conversion de l'acétyl-coA en lanostérol (Équation 5) est aussi supprimée pour éviter que, dans le modèle, l'acétyl-coA soit produit à partir de la dégradation du lanostérol.

L'inversion du sens des réactions de synthèse des stérols entraîne une faible production d'oxygène. D'autre part, la production de l'uridine diphosphate entraîne une légère consommation d'oxygène. Des tests préliminaires ont montré que, selon la composition de la biomasse choisie, le bilan global de ces réactions engendrait, soit une légère consommation d'oxygène, soit une légère production d'oxygène. Cependant, l'oxygène ayant été découplé des bilans énergétiques et oxydo-réductif par la suppression des réactions de phosphorylation oxydative, le flux d'oxygène observé peut être négligé.

IV.2.3 Synthèse des acides gras

En condition anaérobie, les levures sont incapables de synthétiser des acides gras insaturés (Andreasen and Stier 1953). En l'absence d'une source d'acides gras insaturés dans le milieu, la croissance des levures est alors très limitée ou complètement impossible (Andreasen and Stier 1953; Macy and Miller 1983; Verduyn, Postma et al. 1990). Pour pallier ce manque, du tween 80 a été ajouté au milieu de culture. En 1974, Bulder et Reinik ont suggéré que chez *S.cerevisiae*, dans ces conditions, la majorité des acides gras sont des acides gras insaturés provenant du milieu de culture (Bulder and Reinink 1974). Plus récemment, Pilkington a estimé que la proportion d'acides gras, issue du milieu de culture, incorporée à la biomasse variait, selon la source d'acide gras utilisée, entre 13 et 53 % (Pilkington and Rose 1991). Des tests préliminaires visant à déterminer l'effet du remplacement des acides gras synthétisés par la cellule par ceux issus du milieu de culture, à hauteur de 50 %, ont montré que seuls les flux à travers la voie des pentoses phosphates (à hauteur de 2%), de la réaction de dissipation de l'ATP (3%), du CO₂ (<0.5%) et de l'éthanol (<0.5%) étaient affectés. La proportion exacte d'acides gras exogènes intégrée à la biomasse n'étant pas connue, nous avons donc choisi de ne pas la prendre en compte et de conserver les réactions de productions des acides gras et des lipides utilisées pour les modèles en condition aérobie.

IV.2.4 Orientation du cycle de Krebs

Il est couramment admis qu'en condition anaérobie, le cycle de Krebs (cf. Figure IV-1) ne fonctionne plus comme un cycle, mais comme deux branches, l'une oxydative et l'autre réductive (Atzpodien, Gancedo et al. 1968; Chapman and Bartley 1968; Sols, Gancedo et al. 1971). Ainsi, les enzymes succinate déshydrogénase (SDH) et succinyl-CoA synthase sont connues pour être fortement réprimées, à la fois au niveau de l'expression du gène et de la synthèse protéique, limitant le flux depuis l'alpha-cétoglutarate vers le succinate (de Groot, Daran-Lapujade et al. 2007). Cependant il a pu être montré que l'enzyme fumarate réductase prend le relais de la SDH en condition anaérobie et permet la production de succinate à partir de fumarate dans la mitochondrie, cette réaction étant

essentielle pour réoxyder le FADH₂ généré par la synthèse de biomasse (Camarasa, Grivet et al. 2003; Camarasa, Faucet et al. 2007). Pour pouvoir observer la division du cycle de Krebs en deux branches, la réaction catalysée par la succinyl-CoA synthase (Équation 9) est complètement supprimée du modèle (cf. Figure IV-1).

Équation 9 : $sucami + gpdm_i + pmi = sucmi + gtmi + coami$

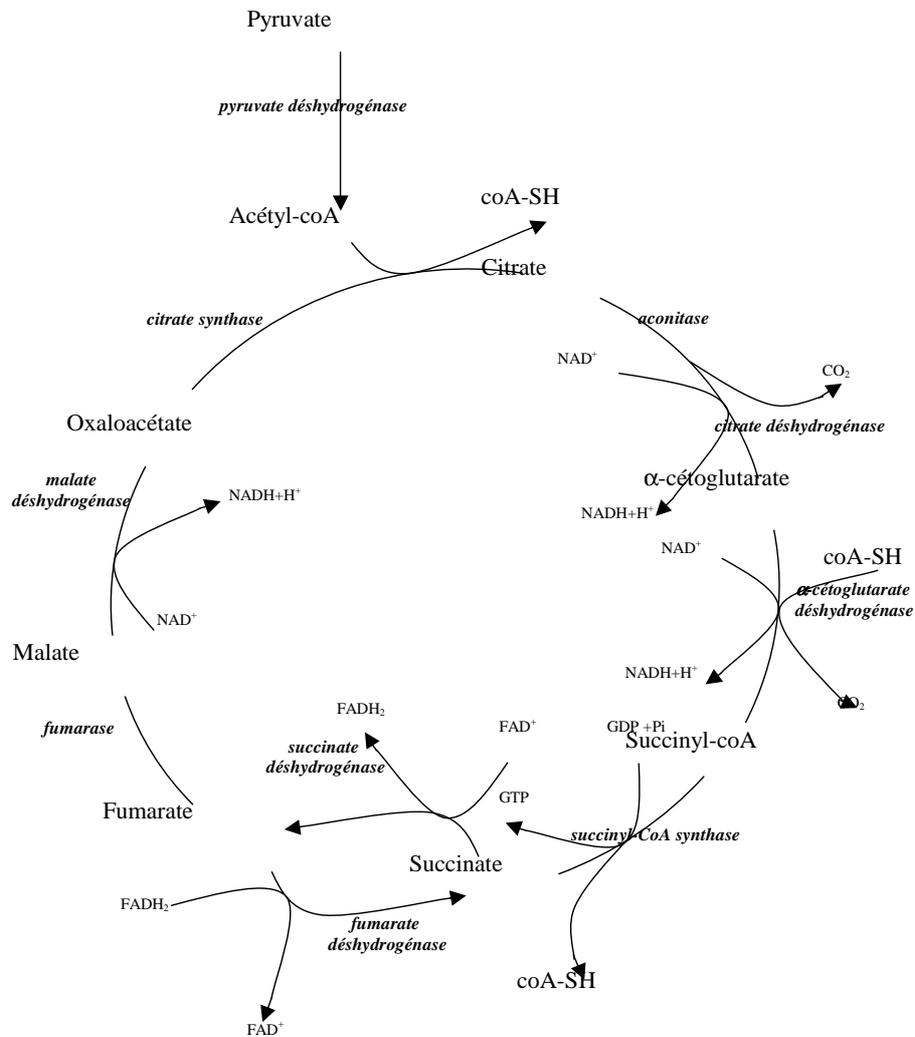


Figure IV-1 Représentation du cycle de Krebs tel qu'il est pris en compte dans les réseaux métaboliques

IV.2.5 Navette Ethanol

En condition aérobie, la structure du modèle n'autorisant pas la présence de deux navettes, la navette glycérol a été choisie afin de modéliser le transport du NADH. En condition anaérobie, la suppression de plusieurs réactions dans le cycle de Krebs rend possible la résolution de modèles

possédant deux navettes, sans avoir recours à la mesure de vitesses intracellulaires. Plusieurs auteurs ayant suggéré l'importance de la navette éthanol en condition anaérobie pour exporter du pouvoir réducteur depuis la mitochondrie vers le cytosol, celle-ci est intégrée aux modèles (Nissen, Schulze et al. 1997; Bakker, Overkamp et al. 2001). En revanche, la navette glycérol, qui a pour rôle de transférer l'excédent de pouvoir réducteur du cytosol vers la mitochondrie, ne devrait pas fonctionner en condition anaérobie. Cependant, l'inversion du sens du flux dans la seconde branche du cycle de Krebs, entraîne une consommation de FADH₂ mitochondrial. Aucune réaction productrice de FADH₂ mitochondrial n'étant présente dans le modèle, conserver la navette glycérol en condition anaérobie est un moyen simple de fournir le FADH₂ nécessaire au flux dans la branche réductive. Finalement, des modèles basés sur les 4 modèles initiaux, mais contenant soit uniquement la navette glycérol, soit à la fois la navette glycérol et la navette éthanol, ont été testés.

IV.2.6 Etablissement des modèles

Toutes les modifications décrites ont été effectuées dans tous les modèles testés en condition aérobie. Finalement, 8 modèles ont été construits pour être testés en condition anaérobie (cf. Tableau IV-4), les 4 modèles initiaux adaptés aux conditions anaérobies (modèles 5 à 8) et 4 modèles supplémentaires possédant la même structure de base, mais dans lesquels a été ajoutée la navette éthanol (modèles 9 à 12). Les vitesses expérimentales utilisées pour la résolution des modèles sont présentées dans le Tableau IV-6. Les modèles 11 et 12 sont exclus, car ils nécessitent la mesure de vitesses intracellulaires pour leur résolution.

Tableau IV-4 Description des différentes configurations de modèle envisagées pour l'utilisation du réseau métabolique en conditions anaérobies .

Les Modèles grisés nécessitent la connaissance de vitesses intra- cellulaires pour la résolution. Cyto= Cytosolique, Mito= Mitochondriale.

	Modèle 5	Modèle 6	Modèle 7	Modèle 8
NADPH	2 IDPH	2 IDPH	ALDH	ALDH
Glutamate	Cyto.	Mito.	Cyto.	Mito.
Navette Ethanol	NON	NON	NON	NON
	Modèle 9	Modèle 10	Modèle 11	Modèle 12
NADPH	2 IDPH	2 IDPH	ALDH	ALDH
Glutamate	Cyto.	Mito.	Cyto.	Mito.
Navette Ethanol	OUI	OUI	OUI	OUI

Tableau IV-5 Résolution des matrices des réseaux métaboliques présentant des solutions parmi les modèles 5 à 12. Vitesses mesurées (Gris) et calculées (Blanc) lors de la résolution des différents modèles

	Modèle 5	Modèle 6	Modèle 7	Modèle 8	Modèle 9	Modèle 10
Glucose	Mesuré	Mesuré	Mesuré	Mesuré	Mesuré	Mesuré
CO2	Calculé	Calculé	Calculé	Calculé	Calculé	Calculé
O2	0	0	0	0	0	0
Ethanol	Calculé	Calculé	Calculé	Calculé	Calculé	Calculé
Pyruvate	Mesuré	Mesuré	Mesuré	Mesuré	Mesuré	Mesuré
Acétate	Calculé	Calculé	Calculé	Calculé	Mesuré	Mesuré
Succinate	Calculé	Calculé	Calculé	Calculé	Calculé	Calculé
Biomasse	Mesuré	Mesuré	Mesuré	Mesuré	Mesuré	Mesuré
Glycérol	Mesuré	Mesuré	Mesuré	Mesuré	Mesuré	Mesuré
Vitesse à fournir	4	4	4	4	5	5

IV.3 Validation en condition aérobie

IV.3.1 Méthode de validation

En 2001, en utilisant une technique de marquage isotopique au ^{13}C , Gombert et ses collaborateurs (Gombert, Moreira dos Santos et al. 2001) ont quantifié les flux métaboliques de *S. cerevisiae*, en condition respiro-fermentaire (batch). Ces résultats expérimentaux ont été utilisés pour tester les capacités de nos modèles à recalculer les flux de métabolites et faire un choix parmi les différentes configurations de réseaux établies. Pour cela, des calculs de flux ont été effectués, résolvant le système matriciel grâce aux flux nets de substrats et de métabolites mesurés au cours de l'expérience de Gombert (cf. Tableau IV-6) en condition respiro-fermentaire et en utilisant les coefficients de composition de la biomasse déterminés expérimentalement lors de cette expérience.

Les flux calculés par nos réseaux ont ensuite été comparés aux flux déterminés par Gombert pour évaluer la validité de nos modèles. Bien que d'autres cartes de flux soient disponibles (Fiaux, Cakar et al. 2003; Blank, Kuepfer et al. 2005), l'expérience de Gombert est la seule pour laquelle toutes les données expérimentales nécessaires pour nos calculs de flux sont disponibles : aussi, les autres expériences ne peuvent nous fournir que des informations qualitatives.

Tableau IV-6 Vitesses expérimentales utilisées pour résoudre le système [Gombert et al, 2001]. Les valeurs sont exprimées en moles pour 100 moles de glucose (g pour 100 moles de glucose pour la biomasse)

	Batch
Consommation de glucose	100
Flux net d'éthanol	158.7
Flux net d'acétate	3.3
Flux net de glycérol	5.3
Flux net de succinate	0.0
Production de biomasse	1890

Ces tests ont permis de déterminer lesquelles des 4 configurations de modèle aérobie retranscrivaient le mieux la distribution réelle des flux métaboliques.

IV.3.2 Résultats:

Le Tableau IV-7 donne les valeurs des flux clefs recalculés en utilisant les données expérimentales de Gombert avec les réseaux métaboliques présentant des solutions mathématiques, en conditions aérobies. Ces flux ont été sélectionnés pour leur importance métabolique. Les flux utilisés sont : le flux d'entrée dans la voie des pentoses phosphates, les flux d'entrée d'oxaloacétate et de pyruvate dans la mitochondrie, les flux correspondant au cycle de Krebs, la production de CO₂ et la consommation d'oxygène. Le flux de l'oxaloacétate à l'alpha-céto glutarate représenté par une seule réaction chez Gombert est représenté par deux réactions successives dans nos modèles, la transformation de l'oxaloacétate en citrate et la transformation du citrate en alpha-céto glutarate. De plus, cette dernière transformation est dédoublée en deux réactions parallèles dans certains de nos modèles, correspondant aux deux enzymes isocitrates déshydrogénases. Le flux de l'alpha-céto glutarate au fumarate, représenté par une seule réaction chez Gombert, est représenté par trois réactions successives dans nos modèles. Les flux sont exprimés en moles et ramenés à une

consommation de 100 moles de glucose. Les cases grisées correspondent aux valeurs utilisées pour exclure les modèles.

Tableau IV-7 Valeur des Flux métaboliques "clefs" recalculés à partir des données de Gombert et al, 2001 en utilisant nos modèles métaboliques.

moles/100 moles de glucose	Gombert (2001)	Modèle 1	Modèle 2	Modèle 3	Modèle 4
Flux entrée dans la voie des pentoses	16,2	6,2	0,8	7,0	7,0
Pyruvate entrant dans la mitochondrie	-3,9	9,0	10,8	8,8	8,8
Oxaloacétate entrant dans la mitochondrie	6,5	1,1	1,1	1,1	1,1
Flux de l'oxaloacétate au citrate (1)	2,5	6,3	8	6	6
Flux du citrate à l'alpha-céto glutarate (1bis)	2,5	4,5/1,7	-4,4 /12,4	6	6
Flux de l'alpha-céto glutarate au succinate (2)	0	4,2	6	4	4
Flux du succinate au fumarate (2)	0	4,2	6	4	4
Flux du fumarate à l'oxaloacétate(2)	0	5,2	7	4,9	4,9
O ₂	18,9	24,2	24,2	24,2	24,2
CO ₂	185,6	188,7	188,7	188,7	188,7

(1) et (1bis): Réactions successives correspondant au flux de l'oxaloacétate à l'alpha-céto glutarate dans le modèle de Gombert

(1bis) Réaction correspondant à l'isocitrate déshydrogénase, dans le cas où les deux isocitrate déshydrogénases sont présentes dans le modèle : la première valeur correspond à l'isocitrate déshydrogénase NAD⁺ dépendante et la seconde à l'isocitrate déshydrogénase NADP⁺

(2) Réactions successives correspondant au flux de l'alpha-céto glutarate au fumarate dans le modèle de Gombert

Le modèle 2 est exclu en raison de la formation d'un cycle entre les deux isocitrates déshydrogénases dans le cycle de Krebs, simulant le comportement d'une transhydrogénase consommant du NADH et produisant du NADPH (cf. Figure IV-2). La comparaison entre le modèle 1 et le modèle 2 indique que ce cycle est probablement lié au besoin accru en NADPH dans la mitochondrie, engendré par la localisation mitochondriale de la synthèse du glutamate. L'existence d'un tel cycle n'a, à notre connaissance, pas été décrite et paraît biologiquement peu vraisemblable.

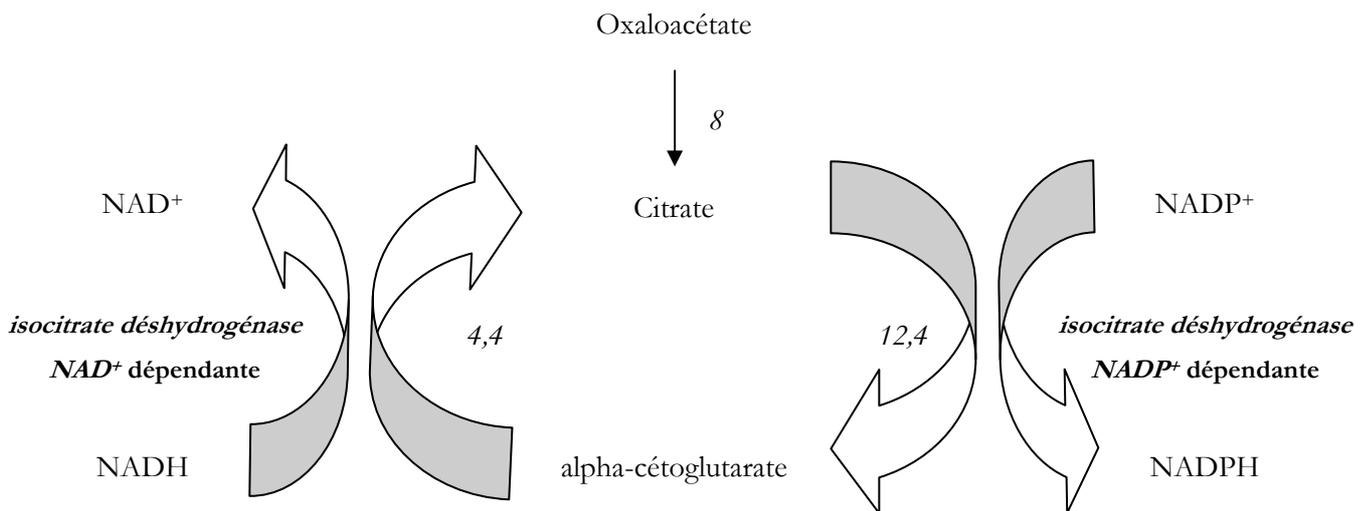


Figure IV-2 Fonctionnement des enzymes isocitrates déshydrogénases dans le modèle 2

Les modèles 1, 3 et 4 sont très proches entre eux pour les flux considérés, mais ces modèles présentent un flux, dans la seconde partie du cycle de Krebs, qui n'a pas été observé dans l'expérience de Gombert. Or, en utilisant la technique METAFoR (Metabolic Flux Ratio Analysis), Fiaux et al (2003) ont, eux aussi, pu observer un flux de carbone dans la seconde branche du cycle de Krebs en condition respiro-fermentaire (Fiaux, Cakar et al. 2003). Fiaux suggère que ce flux n'a pas pu être identifié par Gombert et al, du fait de sa trop petite contribution au bilan total des isotopomères.

Outre le flux observé dans le cycle de Krebs, d'autres différences subsistent entre les données de Gombert et le résultat des calculs de flux. Ainsi, Gombert et al trouvent un flux d'entrée dans la voie des Pentoses Phosphates supérieur à ce qui est estimé par nos calculs. Dans le cas de nos réseaux métaboliques, cette différence est en partie liée à l'introduction d'une enzyme ALDH NADP⁺ dépendante. Ainsi, dans ce cas, le flux de production d'acétate, à travers la voie cytosolique, engendre une production de NADPH qui réduit le flux nécessaire à travers la voie des pentoses phosphates. Cependant, Fiaux et al ont, eux aussi, trouvé un flux inférieur à celui observé par Gombert et al dans

cette voie (Fiaux, Cakar et al. 2003). De même Blank et al ont trouvé un flux dans la voie des pentoses phosphates du même ordre que celui recalculé par nos modèles (Blank, Kuepfer et al. 2005). Il est donc probable que le flux à travers la voie des pentoses phosphate ait été surestimé par Gombert.

Enfin, la dernière différence majeure, entre les flux mesurés par Gombert et al et nos résultats, se situe au niveau des transferts d'oxaloacétate et de pyruvate entre le cytosol et la mitochondrie. En effet, le flux d'oxaloacétate est sous-estimé dans nos calculs de flux comparé au flux déterminé par Gombert et al (cf. tableau IV-7); de plus, les résultats du marquage isotopique chez Gombert indiquent un flux de pyruvate sortant de la mitochondrie. Cependant, ces différences s'expliquent facilement par l'absence de l'enzyme malique et l'absence de transfert d'acétyl-coA dans notre modèle. En effet, l'enzyme reconvertit une partie de l'oxaloacétate entré dans la mitochondrie en pyruvate. Donc, le pyruvate mitochondrial peut provenir de deux origines : soit d'un transfert direct du pyruvate cytosolique dans la mitochondrie, soit d'une reconversion de l'oxaloacétate mitochondrial en pyruvate. Or, nous avons choisi de ne pas intégrer cette enzyme dans nos modèles. Ainsi, dans nos modèles, l'oxaloacétate mitochondrial ne sert qu'à alimenter le cycle de Krebs, tandis que le pyruvate mitochondrial provient uniquement du transfert du pyruvate cytosolique. De plus, une partie du pyruvate pénétrant dans la mitochondrie, dans nos réseaux métaboliques, sert à produire l'acétyl-coA, tandis que, dans le réseau métabolique de Gombert, l'acétyl-coA cytosolique peut directement pénétrer dans la mitochondrie. Dans l'expérience de Blank (Blank, Kuepfer et al. 2005), en l'absence du transfert d'acétyl-coA entre le cytosol et la mitochondrie, le flux d'entrée de pyruvate est du même ordre de grandeur que celui recalculé par nos modèles ; cependant, Blank n'ayant pas non plus trouvé de flux dans la seconde branche du cycle de Krebs, on retrouve la même différence concernant le flux d'oxaloacétate.

Globalement, les modèles retenus permettent d'estimer de façon correcte les flux intracellulaires, même si, pour certaines réactions, les résultats du calcul des flux s'éloignent des flux calculés par Gombert. Les modèles 3 et 4 sont préférés aux autres, car ils possèdent l'avantage de posséder une production de NADPH mitochondriale découplée du cycle de Krebs. En effet, l'utilisation des enzymes isocitrates déshydrogénases NAD^+ et NADP^+ dépendante s'est montrée susceptible de générer des cycles de transhydrogénation dans la mitochondrie. L'examen détaillé de l'ensemble des flux des modèles 3 et 4 montre que, dans le modèle 4, du fait de la localisation mitochondriale de la synthèse de glutamate, le besoin en NADPH mitochondrial est plus élevé. La production de NADPH mitochondrial étant obtenue à travers l'Aldh dans ce modèle, un flux important d'acétate sort de la mitochondrie et la réaction de formation d'acétate cytosolique fonctionne à l'envers, pour dégrader une partie de l'acétate originaire de la mitochondrie: le modèle 3

est donc préféré au modèle 4. Finalement, dans le modèle retenu, le NADPH mitochondrial est fourni par l'enzyme Aldhp déshydrogénase NADP⁺ dépendante, et la synthèse de glutamate est localisée dans le cytosol.

IV.3.3 Utilisation du modèle sélectionné pour l'analyse des résultats de la fermentation de la souche sauvage en condition aérobie

Le modèle sélectionné a été utilisé pour calculer les flux intracellulaires en condition aérobie (cf. Figure IV-3). Les flux sont exprimés en moles pour 100 moles de glucose consommé. Sur la carte de flux obtenue, on constate qu'une partie du cycle de Krebs est inversée.

La partie inversée correspond aux réactions du cycle de Krebs, connues pour former la branche dite "réductive", allant de l'oxaloacétate au succinate en passant par le malate et le fumarate, auxquelles s'ajoute la réaction de conversion de l'alpha-cétoglutarate. La branche "réductive" est connue pour fonctionner dans le sens réducteur, en condition anaérobie. Selon certains auteurs, en condition aérobie, elle fonctionnerait aussi dans le sens réducteur en mode batch et fed-batch ; cependant, cela reste très discuté, car évaluer les flux dans le cycle de Krebs est très difficile, du fait de leur faible poids face à la totalité des métabolites (Blank and Sauer 2004). La transformation de l'alpha-cétoglutarate en succinyl-coA, en revanche, est connue pour être irréversible et son inversion n'est donc pas possible. L'observation de flux inversés dans le cycle de Krebs est probablement liée à des erreurs de mesures expérimentales. Etant donné la faible valeur des flux dans le cycle de Krebs, une faible erreur de mesure sur la production d'éthanol suffit à inverser le flux. De plus, la carte de flux correspond aux flux observés à μ_{max} . L'inversion ne dure que quelques heures et correspond donc à une légère sous-estimation de la production d'éthanol face à la production de biomasse (cf.: ChapitreV).

IV.4 Validation en condition anaérobie

IV.4.1 Sélection du modèle en condition anaérobie

Pour valider les modèles anaérobies, des calculs de flux, basés sur les données expérimentales de Nissen en 1997 (Nissen, Schulze et al. 1997) ont été effectués. Les calculs sont réalisés en utilisant les rendements mesurés durant l'expérience de Nissen comme entrée pour nos modèles. Les coefficients de composition de la biomasse utilisés sont ceux déterminés par Nissen.

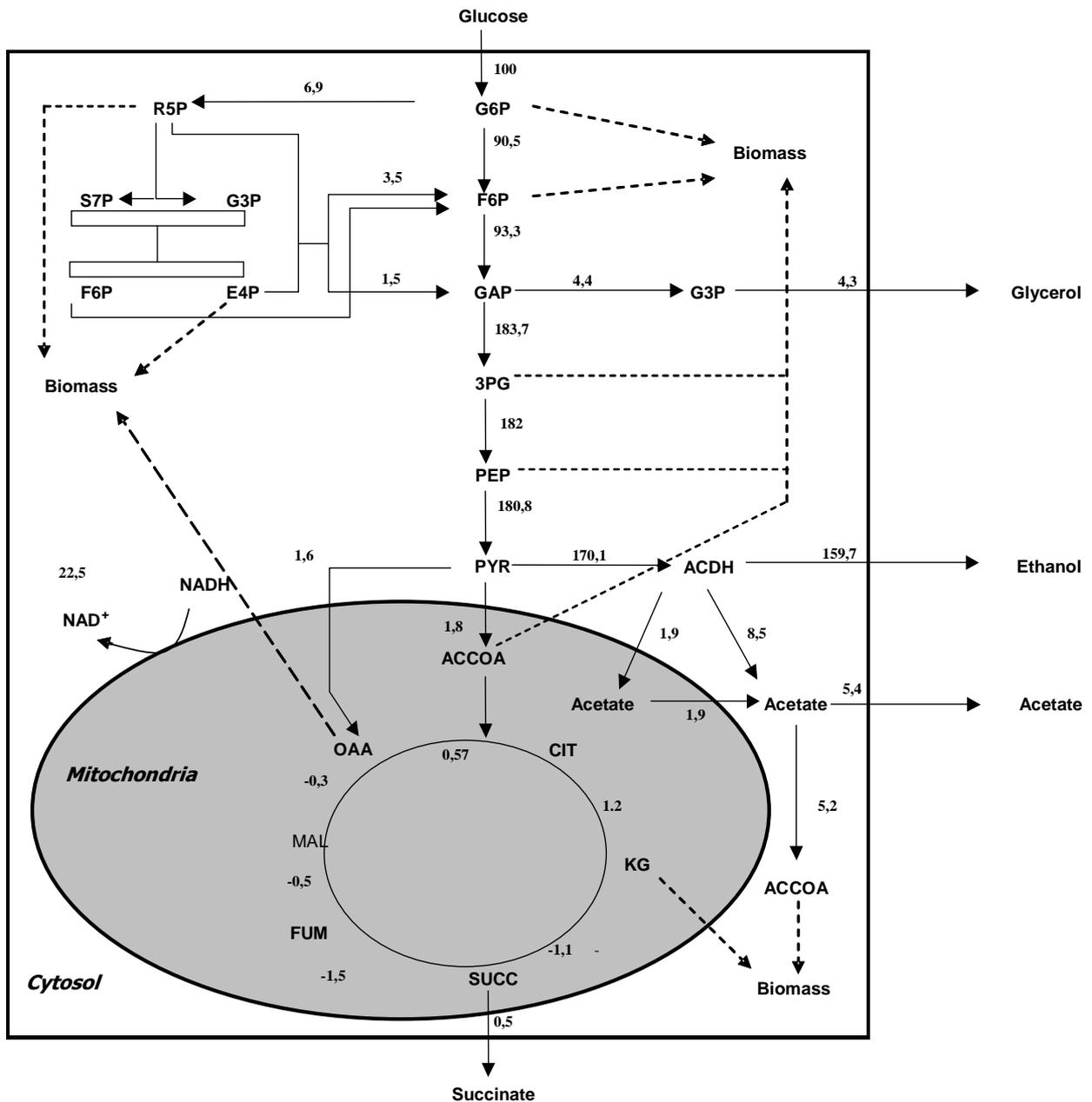


Figure IV-3 Calcul de flux pour les résultats de la fermentation aérobie référence effectués avec le modèle métabolique sélectionné.

Le Tableau IV-8 donne les valeurs des flux clefs recalculés, en utilisant les données expérimentales de Nissen avec les réseaux métaboliques présentant des solutions mathématiques en condition anaérobie. Ces flux ont été sélectionnés pour leur importance métabolique. Les flux utilisés sont: le flux d'entrée dans la voie des pentoses phosphates, les flux d'entrée d'oxaloacétate et de pyruvate dans la mitochondrie, les flux correspondant au cycle de Krebs, les productions d'éthanol et de CO₂. Le flux entre l'isocitrate et l'alpha-céto glutarate, représenté par une seule réaction chez Nissen, peut être représenté par deux réactions parallèles dans nos modèles (isocitrate

déshydrogénase NAD⁺ dépendante et NADP⁺ dépendante). Le flux du succinate au malate, représenté chez Nissen par une seule réaction, correspond dans notre réseau à deux réactions successives : flux du succinate au fumarate, puis flux du fumarate au malate.

La réaction de transformation du succinyl-coA en succinate ayant été supprimée, aucun flux permettant de convertir l'alpha-céto glutarate en succinate par l'intermédiaire de cette réaction n'est observable dans nos modèles; ce flux, estimé à 0,06 moles pour 100 moles de glucose par Nissen, est donc nul dans tous nos modèles et n'est pas représenté dans les tableaux de résultats.

Dans les modèles 6 et 10, comme en condition aérobie, l'utilisation de deux isocitrates déshydrogénases mitochondriales entraîne l'apparition de cycles convertissant du NADH en NADPH ; de plus, la résolution de ces modèles impose la consommation de succinate et la branche "réductive" du cycle de Krebs fonctionne dans le sens malate oxaloacétate : ces modèles peuvent donc être exclus.

Les modèles restant présentent tous des déviations similaires par rapport au modèle de Nissen : ainsi, les entrées de métabolites (pyruvate, oxaloacétate) dans la mitochondrie sont plus importantes dans nos calculs que dans ceux de Nissen, le flux dans la seconde branche du cycle de Krebs est aussi plus important. De même, dans tous les modèles, à l'exception de ceux présentant un cycle, la production de succinate recalculée est très supérieure à la mesure expérimentale. Enfin, dans les modèles où, à la fois, le succinate et l'acétate sont recalculés, on observe une production de succinate surestimée et une production d'acétate sous-estimée.

La surproduction de succinate peut être attribuée à une trop grande quantité de cofacteurs réduits NADH, engendrée par la synthèse de biomasse. En effet, la production d'une mole de succinate à partir du fumarate permet la réoxydation d'une mole de FADH₂, tandis que la production d'une mole de succinate à partir de l'oxaloacétate permet la réoxydation d'une mole de FADH₂ et d'une mole de NADH. Si l'on utilise ces modèles avec une configuration de résolution pour laquelle le flux de production de succinate, mesuré expérimentalement, est fourni aux modèles et le flux de glycérol est recalculé, on observe une consommation de glycérol permettant de réoxyder la même quantité de NADH que la surproduction de succinate réoxydé dans la première résolution (Résultats non présentés).

Tableau IV-8 Valeur des Flux métaboliques "clefs" recalculés à partir des données de Nissen et al, 1997 en utilisant nos modèles métaboliques anaérobies.

moles/100Cmoles de glucose	Nissen (1997)	Modèle 5	Modèle 6	Modèle 7	Modèle 8	Modèle 9	Modèle 10
Flux entrée dans la voie des pentoses	7,5	6,9	1,7	7,8	7,8	6,4	1,1
Pyruvate entrant dans la mitochondrie	1,9	5	5	5	5	5	5
Oxaloacétate entrant dans la mitochondrie	1,8	5,4	-5,1	7,2	7,2	-3,4	-4,11
Ethanol Produit	154,8	150,3	162,7	148,3	148,3	149,5	161,8
Flux de l'oxaloacétate à l'isocitrate	1,9	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1
Flux de l'isocitrate à l'alpha-céto glutarate (1)	2	1,8/0,3	-10,2/12,3	2,1	2,1	1,8/0,3	-10,2/12,3
Flux du Succinate au Fumarate(2)	-0,08	-4,1	6,5	-5,9	-5,9	-5,1	5,5
Flux du Fumarate au Malate (2)	-0,08	-3,3	7,3	-5,1	-5,1	-4,3	6,2
Flux du Malate à l'oxaloacétate	-0,17	-3,3	7,3	-5,1	-5,1	-4,3	6,2
Succinate	0,3	4,1	-6,5	5,9	5,9	5,1	-5,5
Acétate	1,8	0,8	0,8	0,8	0,8	1,8	1,8
CO2 (R4)	160,2	159,4	177	156,4	156,4	156,9	174,6
Degré de liberté		4	4	4	4	5	5

(1) Flux de l'isocitrate à l'alpha-céto glutarate ; dans le cas où les deux isocitrate déshydrogénases sont présentes dans le modèle, la première valeur correspond à l'isocitrate déshydrogénase NAD⁺ dépendante et la seconde à l'isocitrate déshydrogénase NADP⁺ dépendante.

(2) Réactions successives correspondant au flux du succinate au malate dans le modèle de Nissen

Dans les modèles de degré de liberté 4, où, à la fois, l'acétate et le succinate produits sont calculés, l'importance moindre de la production d'acétate s'explique aussi par un problème de bilan oxydo-réductif. En effet, la production d'une mole d'acétate détourne une mole d'acétaldéhyde de la production d'éthanol et diminue de fait la quantité de NADH réoxydé par la voie de l'éthanol. La réduction de la production d'acétate dans les modèles où celui-ci est calculé permet ainsi de réoxyder plus de NADH à travers la voie de l'éthanol et participe au rééquilibrage du bilan oxydo-réductif. Dans les modèles de degré de liberté 5, si la vitesse recalculée est celle de l'acétate, on observe une consommation d'acétate et une surproduction d'éthanol, permettant, dans ce cas, de réoxyder le NADH en excès en consommant du NADPH (Résultats non présentés). Si l'on choisit de fournir au modèle les vitesses de l'acétate et du succinate pour la résolution et que l'on calcule le glycérol produit, on constate une surproduction de glycérol permettant de réoxyder exactement la même quantité de NADH que la surproduction de succinate précédemment observée (Résultats non présentés). Enfin, dans le cas où la biomasse est calculée, on constate que la production de biomasse correspond à 80% de la biomasse mesurée expérimentalement.

Tous ces résultats confirment la trop grande importance de la production de NADH, liée à la production de biomasse. Pour diminuer l'importance de cette production, il est nécessaire de modifier les réactions anaboliques pour remplacer, soit une réaction productrice de NADH par une réaction productrice de NADPH, soit une réaction consommatrice de NADPH par une réaction consommatrice de NADH. La principale réaction consommatrice de NADPH dans notre modèle est la réaction de production du glutamate ; cependant, dans le modèle de Nissen, la production de glutamate est dédoublée en deux réactions, une NADPH dépendante et une autre NADH dépendante (Nissen, Schulze et al. 1997). En effet, chez *Saccharomyces cerevisiae*, les deux réactions sont possibles. L'assimilation de l'ammoniaque à travers la voie du glutamate peut se faire, soit grâce à l'enzyme NADPH dépendante glutamate déshydrogénase (cf. Équation 10), codée par le gène *GDH1*, soit à travers deux réactions couplées, catalysées par la glutamate synthase (cf. Équation 11), codée par le gène *GLT1*, et la glutamine synthétase (cf. Équation 12), codée par le gène *GLN1* (Mitchell and Magasanik 1983; Cogoni, Valenzuela et al. 1995) ; le bilan de ces deux dernières réactions permettant de former du glutamate en utilisant du NADH (cf. Équation 13).

Équation 10 : $akg + nh + nadph = glut + eau + nadp$

Équation 11 : $akg + glum + nadh + h = 2 \times glut + nad$

Équation 12 : $glut + atp + nh = glum + adp + p + h$

Équation 13 : $akg + atp + nh + nadh + h = glut + adp + p + nad$

Chez les souches sauvages, l'activité de GLT1 est 80 fois plus faible que celle de GDH1; l'importance de la réaction est donc probablement faible. Cependant, dans son modèle, Nissen trouve un flux à travers la voie NADH dépendante 4 fois supérieur à celui à travers la voie NADPH dépendante. Il a donc été décidé d'insérer une réaction de synthèse du glutamate NADH dépendante dans nos modèles. Cependant, l'Équation 11 étant déjà présente dans nos modèles pour permettre la synthèse de glutamine, il est possible d'intégrer l'assimilation NADH dépendante uniquement en ajoutant l'Équation 10. Les modèles anaérobies ont été testés en intégrant la réaction NADH dépendante, soit dans le cytosol, soit dans la mitochondrie, soit dans les deux. Les modèles de base utilisés sont les modèles n'ayant pas été éliminés à l'issue de la première étape de sélection, soit 4 modèles (les modèles 5, 7, 8 et 9); il est donc nécessaire d'établir 12 nouveaux modèles.

Les configurations des nouveaux modèles sont présentées dans le Tableau IV-9, les vitesses utilisées pour la résolution de ces modèles sont présentées dans le Tableau IV-10.

Les résultats des calculs de flux, effectués en utilisant ces nouveaux modèles, sont analysés en observant les flux "clefs"; les flux utilisés sont les mêmes flux que pour les premiers modèles anaérobies auxquels s'ajoutent la production de glutamate NADH dépendante et la production de glutamate NADPH dépendante. Les valeurs des flux pour les différents modèles sont données dans le Tableau IV-11.

L'ajout de la voie de synthèse du glutamate NADH dépendante entraîne l'augmentation du degré de liberté des systèmes correspondant aux réseaux métaboliques et donc augmente le nombre de vitesses mesurées nécessaires pour les résoudre.

Si l'on considère les modèles pour lesquels le degré de liberté passe de 4 à 5, on peut faire une distinction entre l'ajout de la glutamate synthase dans le cytosol et dans la mitochondrie. Ainsi, on constate que l'ajout de la glutamate synthase dans le cytosol améliore peu les résultats du calcul de

flux. En effet, si l'on compare les modèles 5, 7 et 8, d'une part, et les modèles 51, 71 et 81, d'autre part, le degré de liberté passe de 4 à 5 et la vitesse de production d'acétate, qui était calculée, devient fixée. On constate que la part de l'excès de NADH qui était réoxydé par la diminution du ratio acétate/éthanol, d'après les données expérimentales, dans les modèles 5, 7 et 8, est transférée vers la voie de synthèse du glutamate NADH dépendante (1 mole de glutamate produite par cette voie pour 1 mole d'acétate produite en plus), mais il n'y a pas de diminution de la production de succinate. Ces trois modèles peuvent donc être exclus.

Tableau IV-9 Description des différentes configurations de modèle envisagées.

Les modèles 51 à 91 correspondent aux modèles 5 à 9 dans lesquels on ajoute la réaction de synthèse du glutamate NADH dépendante dans le cytosol; les modèles 52 à 92 correspondent aux modèles 5 à 9 dans lesquels on ajoute la réaction de synthèse du glutamate NADH dépendante dans la mitochondrie; les modèles 53 à 93 correspondent aux modèles 5 à 9 dans lesquels on ajoute la réaction de synthèse du glutamate NADH dépendante dans le cytosol et la mitochondrie. Le modèle 93 est grisé, car il nécessite la connaissance de vitesses intracellulaires pour sa résolution.

	Modèle 51	Modèle 71	Modèle 81	Modèle 91
NADPH	2 IDPH	ALDH	ALDH	2 IDPH
Glutamate (NADP)	Cyto.	Cyto.	Mito.	Cyto.
Glutamate (NAD)	Cyto.	Cyto.	Cyto.	Cyto.
Navette Ethanol	NON	NON	NON	OUI
	Modèle 52	Modèle 72	Modèle 82	Modèle 92
NADPH	2 IDPH	ALDH	ALDH	2 IDPH
Glutamate (NADP)	NON	NON	Mito.	NON
Glutamate (NAD)	Mito.	Mito.	Mito.	Mito.
Navette Ethanol	NON	NON	NON	OUI
	Modèle 53	Modèle 73	Modèle 83	Modèle 93
NADPH	2 IDPH	ALDH	ALDH	2 IDPH
Glutamate (NADP)	NON	NON	Mito.	NON
Glutamate (NAD)	Cyto.+Mito.	Cyto.+Mito.	Cyto.+Mito.	Cyto.+Mito.
Navette Ethanol	NON	NON	NON	OUI

Si l'on considère les modèles pour lesquels la glutamate synthase a été ajoutée dans la mitochondrie, pour les modèles 52 et 72, il n'est plus possible de résoudre le système en utilisant la valeur de l'acétate qui n'est plus indépendante de la biomasse ; le flux de succinate est fixé et l'excédent de NADH est réoxydé par la voie du glutamate. Dans le modèle 82, la valeur du flux d'acétate est fixée, on constate que cela diminue considérablement le flux de production de succinate. Dans ces trois modèles (52, 72, 82), on observe des changements importants au niveau de la branche réductive du cycle de Krebs. Ainsi, le fumarate peut être soit réduit en succinate, soit oxydé en malate.

Si l'on considère les modèles pour lesquels le degré de liberté passe de 5 à 6, on distingue les modèles comprenant la navette éthanol de ceux qui ne la comprennent pas. Les modèles comprenant la navette éthanol sont les modèles 91 et 92 ; on constate que l'ajout de la glutamate synthase, soit dans le cytosol, soit dans la mitochondrie, n'a pas d'influence sur les flux et, notamment, pas non plus sur le pourcentage de glutamate produit par la voie NADPH dépendante : ce pourcentage, dans les deux cas, s'établit à 55 %. Les seules différences entre ces modèles s'observent sur les transferts de pouvoir réducteur et de glutamate entre la mitochondrie et le cytosol ; dans le modèle 91, la navette éthanol fonctionne de la mitochondrie vers le cytosol, alors que, dans le cas du modèle 92, elle fonctionne du cytosol vers la mitochondrie. Le modèle 91 est donc préférable au modèle 92.

Les modèles, ne comprenant pas la navette éthanol et dont le degré de liberté est 6, sont les modèles 53, 73 et 83. Dans ces modèles, la glutamate synthase a été ajoutée dans les deux compartiments. On constate que la différence principale observée est le pourcentage de glutamate qui est produit à travers la voie NADPH dépendante : il s'élève à 55 % pour le modèle 53 contre seulement 38 % pour les modèles 73 et 83. Les modèles 73 et 83 peuvent donc être exclus au profit du modèle 53.

Dans tous les modèles de degré de liberté 6, on observe le même flux, à travers la branche réductive du cycle de Krebs, que dans les modèles 52, 72 et 82. Ce flux peut s'expliquer par la nécessité de recycler le flux de fumarate issu de la production des acides aminés ; en effet, ce flux de fumarate est supérieur au flux de succinate sortant de la cellule, une partie est donc réoxydée, via le malate et l'oxaloacétate.

Les modèles conservés à l'issue de cette première sélection sont les modèles 91, 82 et 53. Le modèle 91 est préféré aux deux autres, car il est le plus proche de ce qui est décrit dans la littérature.

L'intégration dans ce modèle d'une seconde voie de dégradation du fumarate pour éliminer le problème observé dans la branche réductive du cycle de Krebs n'a pas été possible, car le modèle ainsi obtenu nécessite de disposer de vitesses intracellulaires pour sa résolution.

Tableau IV-10 Vitesses expérimentales utilisées pour la résolution des modèles 51 à 83.

	Modèle 51	Modèle 71	Modèle 81	Modèle 91	Modèle 52	Modèle 72	Modèle 82	Modèle 92	Modèle 53	Modèle 73	Modèle 83
Glucose	Mesuré										
CO2	Calculé										
O2	Calculé										
Ethanol	Calculé										
Pyruvate	Mesuré										
Acétate	Mesuré	Mesuré	Mesuré	Mesuré	Calculé	Calculé	Mesuré	Mesuré	Mesuré	Mesuré	Mesuré
Succinate	Calculé	Calculé	Calculé	Mesuré	Mesuré	Calculé	Calculé	Mesuré	Mesuré	Mesuré	Mesuré
Biomasse	Mesuré										
Glycérol	Mesuré										
Vitesse à fournir	5	5	5	6	5*	4*	5	6	6	6	6

X* : Modèle pour lequel il n'est pas possible d'utiliser la vitesse de l'acétate pour la résolution

Tableau IV-11 Valeur des Flux métaboliques "clefs" recalculés à partir des données de Nissen et al, 1997 en utilisant les modèles métaboliques 51 à 83.

moles/100 moles de glucose	Nissen (1997)	Modèle 51	Modèle 71	Modèle 81	Modèle91	Modèle 52	Modèle 72	Modèle 82	Modèle92	Modèle 53	Modèle 73	Modèle 83
Flux entrée dans la voie des pentoses	7,5	5,9	6,8	6,8	4	5,1	5,1	5,1	4	4	4	4
Pyruvate entrant dans la mitochondrie	1,9	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Oxaloacétate entrant dans la mitochondrie	1,8	5,4	7,2	7,2	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6
Ethanol produit	154,8	149,6	147,6	147,6	154	154,7	154,7	154,7	154	154	154	154
Flux de l'oxaloacétate à l'isocitrate	1,9	0,3/1,8	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1
Flux de l'isocitrate à l'alpha-céto glutarate (1)	2	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1
Flux du Succinate au Fumarate (2)	-0,08	-4,1	-5,9	-5,9	-0,3	-0,3	-0,3	-0,3	-0,3	-0,3	-0,3	-0,3
Flux du Fumarate au Malate (2)	-0,08	-3,3	-5,1	-5,1	0,47	0,47	0,47	0,47	0,47	0,47	0,47	0,47
Flux du Malate à l'oxaloacétate	-0,17	-3,3	-5,1	-5,1	0,47	0,47	0,47	0,47	0,47	0,47	0,47	0,47
Glutamate (NADH)		1	1	1	4,8	4,8	5,6	4,8	4,8	1/3,8	1/5,6	1/5,6
Glutamate (NADPH)		9,6	9,6	9,6	5,8	5,8	5	5,8	5,8	5,8	4	4
Succinate	0,3	4,1	5,9	5,9	0,3	0,3	0,3	0,8	0,3	0,3	0,3	0,3
Acétate	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	0,8	0,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8
CO2	160,2	158,7	155,7	155,7	165	165,6	165,6	165	165	165	165	165
Degré de liberté		5	5	5	6	5	5	5	6	6	6	6

Les cases grisées correspondent à des valeurs de flux utilisées pour exclure les modèles.

Finalement, le modèle choisi en condition anaérobie est un modèle dans lequel le NADPH mitochondrial est fourni par l'isocitrate-déshydrogénase NADP⁺ dépendante, les synthèses de glutamate NADH et NADPH dépendantes sont localisées dans le cytosol et la navette éthanol permet d'exporter une partie du pouvoir réducteur depuis la mitochondrie vers le cytosol.

IV.4.2 Utilisation du modèle sélectionné pour l'analyse des résultats de la fermentation de la souche sauvage en condition anaérobie

Le modèle sélectionné est utilisé pour calculer les flux intracellulaires correspondant aux expériences de fermentation anaérobie avec la souche sauvage. Deux expériences indépendantes ont été réalisées. Les calculs de flux sont réalisés à partir de la moyenne des rendements calculés pour la première partie de la phase de croissance, de 0 à 16 heures dans les deux expériences (cf. Tableau IV-12). Les flux sont exprimés en moles, à l'exception de la biomasse exprimée en grammes, et ramenés à 100 moles de glucose consommées.

Tableau IV-12 Valeurs expérimentales mesurées pour les fermentations références en condition anaérobie pour la souche sauvage.

	WT ANAEROBIE
Glucose (moles)	100
Pyruvate (moles)	0.61
Ethanol (moles)	167,5
Acétate (moles)	1,5
Glycérol (moles)	10,95
Succinate (moles)	0,72
Biomasse(grammes)	1368

La Figure IV-4 présente les résultats des calculs de flux effectués avec le modèle anaérobie sélectionné pour les fermentations références en condition anaérobie.

Si l'on s'intéresse aux flux d'échange entre la cellule et le milieu extérieur, on constate que les valeurs de CO₂ et d'éthanol mesurées, 173 et 166,1 moles pour 100 moles de glucose consommées, sont très

proches des valeurs recalculées par le modèle, 173,6 et 167,5 moles pour 100 moles de glucose consommées. La très légère différence observée entre ces flux calculés et les flux mesurés est due à la consommation d'ergostérol. En effet, lors de la réconciliation des données, la consommation d'ergostérol n'a pas été prise en compte, car elle n'a pas été mesurée expérimentalement. La consommation d'ergostérol, recalculée par le modèle, est de $7,3 \times 10^{-6}$ moles d'ergostérol /g biomasse et la bonne adéquation entre les résultats du modèle et de la réconciliation nous indiquent qu'elle influe très peu sur les bilans carbone et redox.

Si l'on s'intéresse aux flux intracellulaires, on constate que le flux à travers la voie des pentoses phosphates est plus faible (1,5) que celui recalculé par notre modèle en utilisant les données de Nissen (4) ; ceci est lié au rendement biomasse, qui est plus faible dans nos cultures que dans celles de Nissen. Le rendement biomasse étant plus bas, le besoin en NADPH est moins important. Or, le NADPH cytosolique est produit dans notre modèle par la voie des pentoses phosphates ou à travers la formation d'acétate. Le flux d'acétate produit étant fixé à partir des mesures expérimentales, la différence de besoin en NADPH s'observe au niveau de la voie des pentoses phosphates.

Contrairement à ce qui a pu être observé en utilisant les données de Nissen, on observe bien le fonctionnement du cycle de Krebs en deux branches, une branche réductive et une branche oxydative. Le flux dans la branche oxydative est en adéquation avec ce qui a été calculé, à la fois par nous et par Nissen lui-même.

Enfin, avec les données de nos expériences, 72 % du glutamate est produit par la voie NADH dépendante. Le même calcul avec notre modèle et les données expérimentales de Nissen estimait le flux, dans cette voie, à 45 % de la production de glutamate. L'écart entre le calcul effectué avec nos données et celles de Nissen est lié à la plus grande production de glycérol chez Nissen; en effet, le rendement glycérol dans cette expérience est de $0,097 \text{ g}_{\text{glycérol}}/\text{g}_{\text{glucose}}$ contre seulement $0,051 \text{ g}_{\text{glycérol}}/\text{g}_{\text{glucose}}$ dans notre expérience. Ainsi, dans notre expérience, une quantité moindre de NADH est réoxydée par la voie du glycérol et celui-ci est donc transféré vers la voie de production du glutamate NADH dépendante.

Ainsi, les modifications apportées au modèle pour l'adapter à l'anaérobiose ont permis de visualiser des flux cohérents.

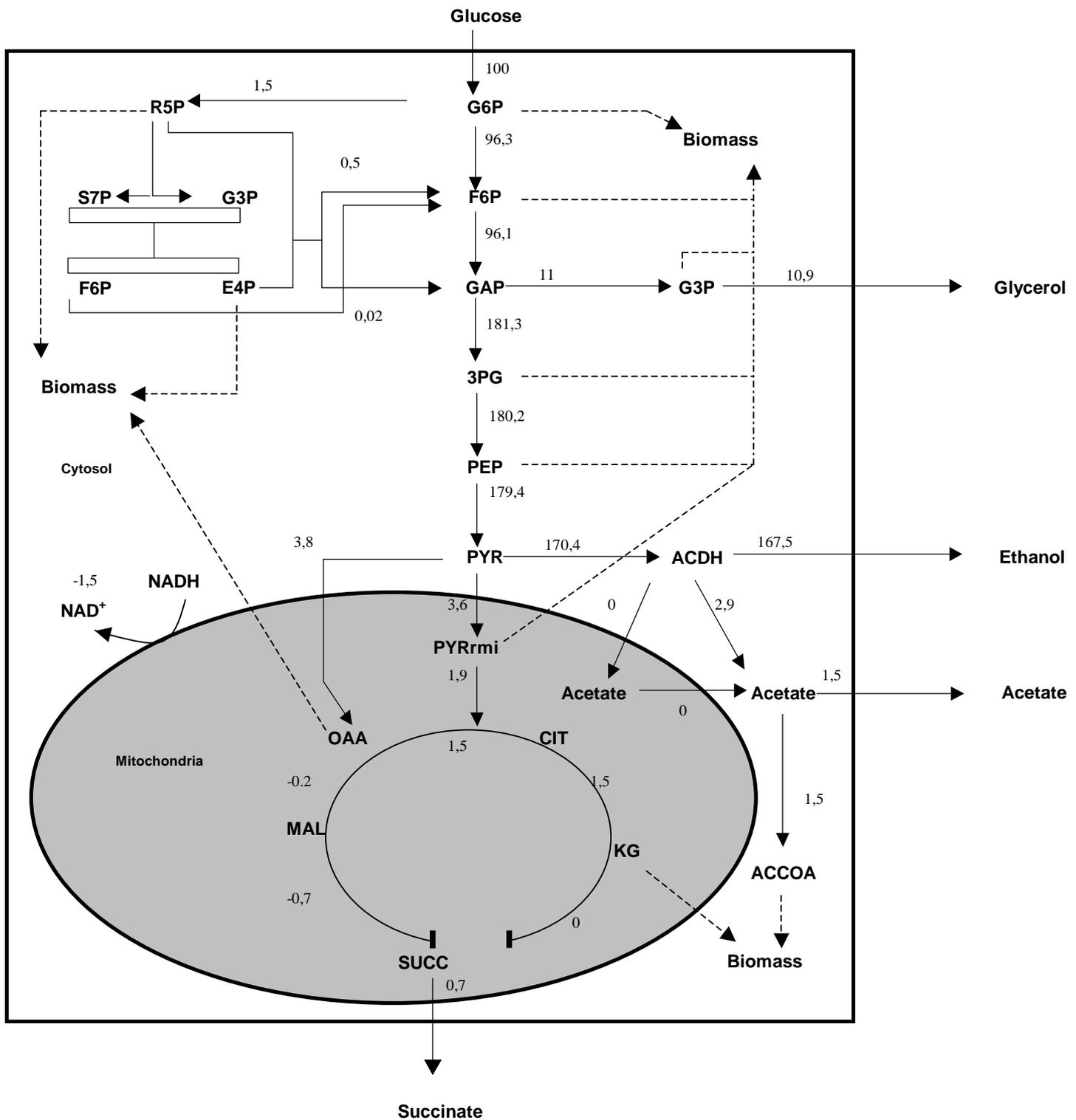


Figure IV-4 Représentation des flux intracellulaires calculés avec le modèle anaérobie sélectionné pour les deux répétitions de la fermentation référence en condition anaérobie

IV.5 Stratégie d'ingénierie métabolique

IV.5.1 Calcul du flux minimum dans la voie du glycérol

Les résultats des calculs de flux effectués à partir des données mesurées lors des fermentations de la souche sauvage en aérobie et anaérobie ont été utilisés pour déterminer quel serait le flux minimum nécessaire dans la voie du glycérol. Ce flux correspond au flux nécessaire pour satisfaire uniquement la demande de précurseurs pour la synthèse de la biomasse, dans l'hypothèse où le flux de déphosphorylation du G3P en glycérol serait totalement suspendu (cf. Figure IV-5). Ces besoins sont estimés à partir de l'analyse de la phase de croissance linéaire, au cours de laquelle le ratio entre la vitesse spécifique de conversion du DHAP en G3P et le taux de croissance spécifique varie peu. Cette méthode de calcul permet de s'affranchir des variations de vitesse de production de glycérol, liées à l'avancement de la réaction ou à la quantité de biomasse présente dans le milieu de culture. Ce flux minimum a été estimé à 4 % du flux net, dans le cas de la fermentation en condition aérobie (cf. Figure IV-6), et à moins de 1% du flux net, dans le cas de la fermentation en condition anaérobie (cf. Figure IV-7). L'objectif poursuivi lors de la construction des mutants sera donc de s'approcher le plus possible de ces valeurs cibles, pour essayer de détourner le flux de carbone vers la production d'éthanol.

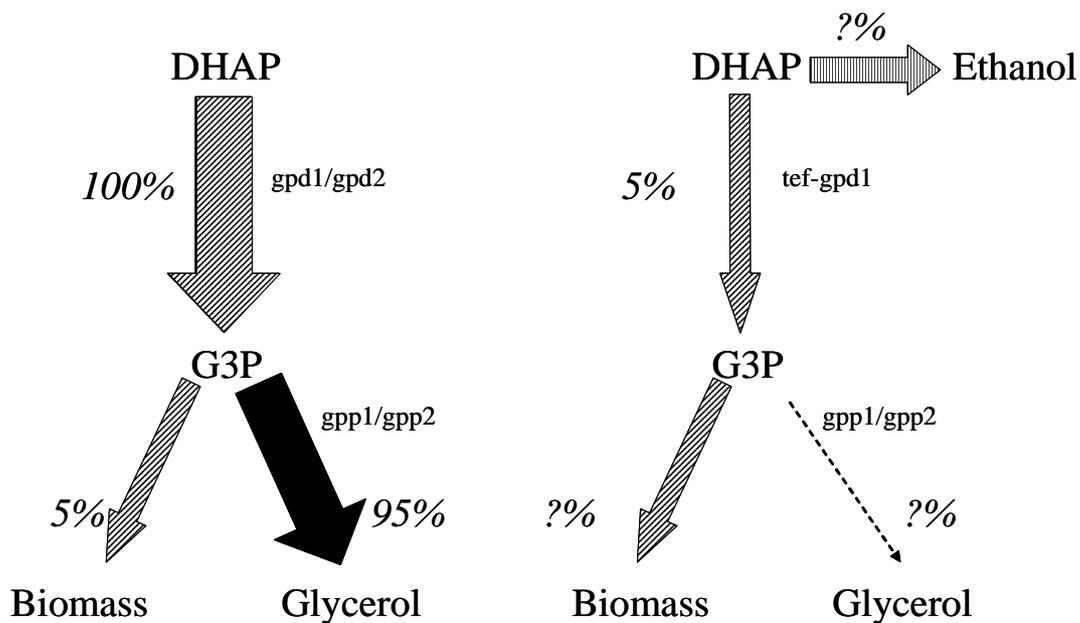


Figure IV-5 : Représentation de la stratégie mise en place pour réorienter le flux de carbone

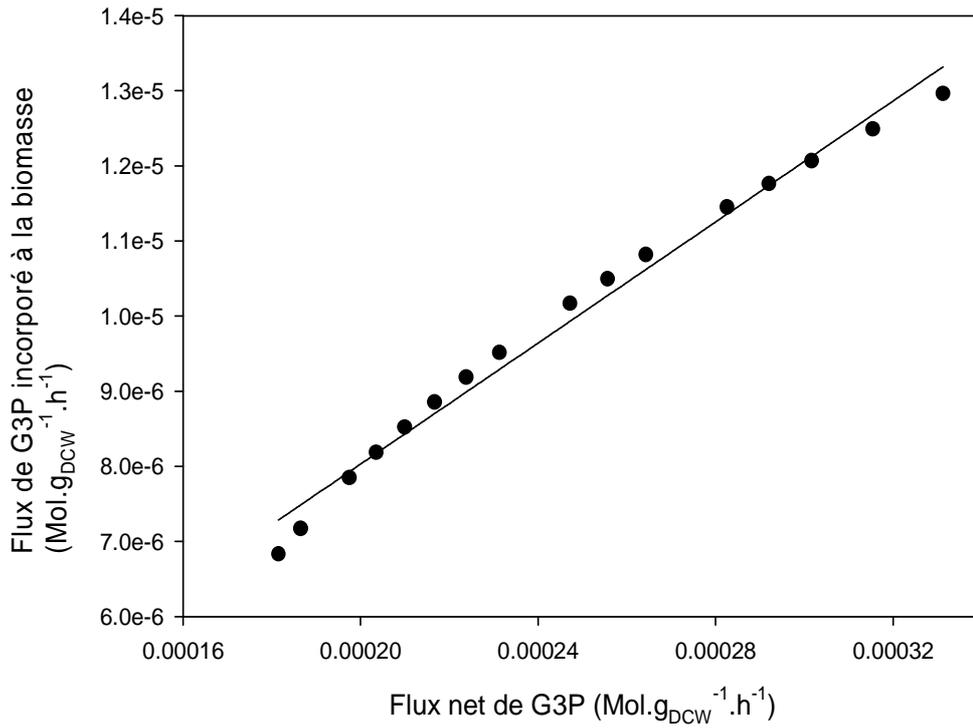


Figure IV-6 G3P incorporé à la biomasse en fonction du flux net de G3P en condition aérobie.

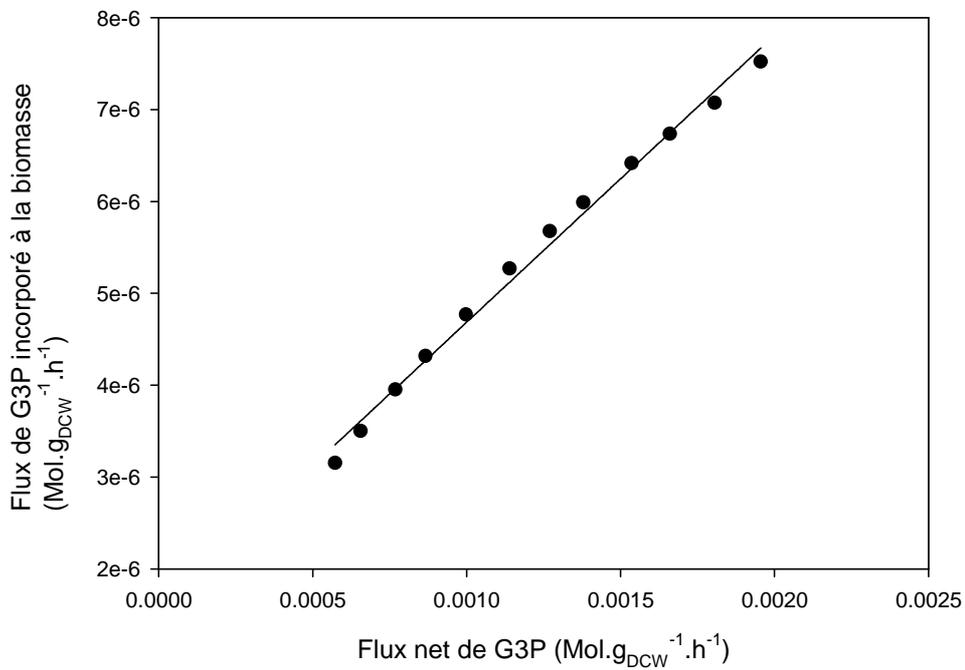


Figure IV-7 : G3P incorporé à la biomasse en fonction du flux net de G3P en condition anaérobie.

IV.5.2 Sélection des promoteurs et construction des souches mutantes

La collection de promoteurs développée par Alper et al (Alper, Fischer et al. 2005) comprend 11 promoteurs mutants dont l'activité varie entre 7 et 120 % de celle du promoteur *TEF1* sauvage (Nevoigt, Kohnke et al. 2006; Nevoigt, Kohnke et al. 2006). L'activité de ces promoteurs a été caractérisée par trois mesures différentes (cf. Figure IV-8) : expression du gène rapporteur (*GFP*) par mesure de la fluorescence spécifique durant la croissance sur glucose, mesure de l'ARNm de la *GFP* contenue dans les cellules cultivées sur glucose, expression du gène rapporteur (*GFP*) par mesure de la fluorescence spécifique durant la croissance sur un mélange éthanol/glycérol.

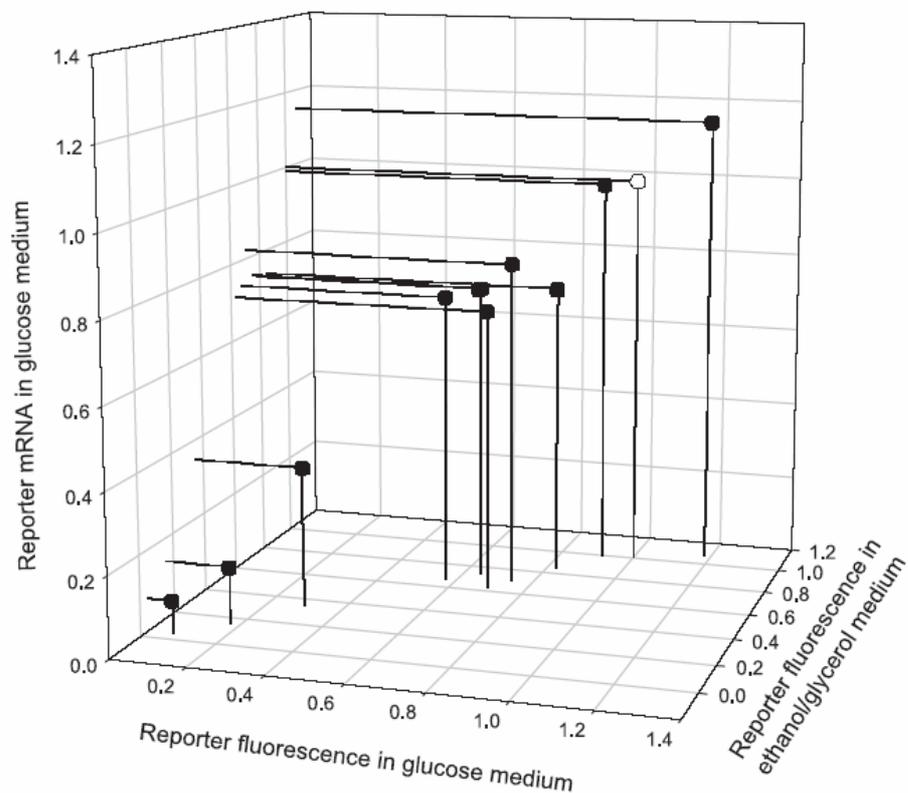


Figure IV-8 Caractérisation de l'activité de la collection de promoteurs [Nevoigt, 2006]

Fluorescence dans les cellules cultivées sur glucose, éthanol/glycérol, et ARNm dosé dans les cellules cultivées sur glucose, exprimé pour chaque promoteur comme le ratio entre l'activité spécifique mesurée chez le mutant lui correspondant et celle du mutant modifié avec le promoteur *TEF* sauvage.

Le flux nécessaire étant très faible et la corrélation exacte entre l'activité des promoteurs et les flux à travers les voies enzymatiques n'étant pas connus, les deux promoteurs les plus faibles de la collection

ont été sélectionnés pour être testés. Ainsi, les souches CENPK113-7DTEF*mut2* et CENPK113-7DTEF*mut7*, possédant des promoteurs présentant respectivement 7 % et 16 % de l'activité du promoteur TEF sauvage, ont été construites.

IV.5.3 Construction des mutants

Les mutants utilisés au cours de ce travail ont été construits par notre partenaire de la Technische Universität Berlin. Les modifications génétiques opérées s'intéressent à la voie principale de synthèse du glycérol (cf. Figure IV-9).

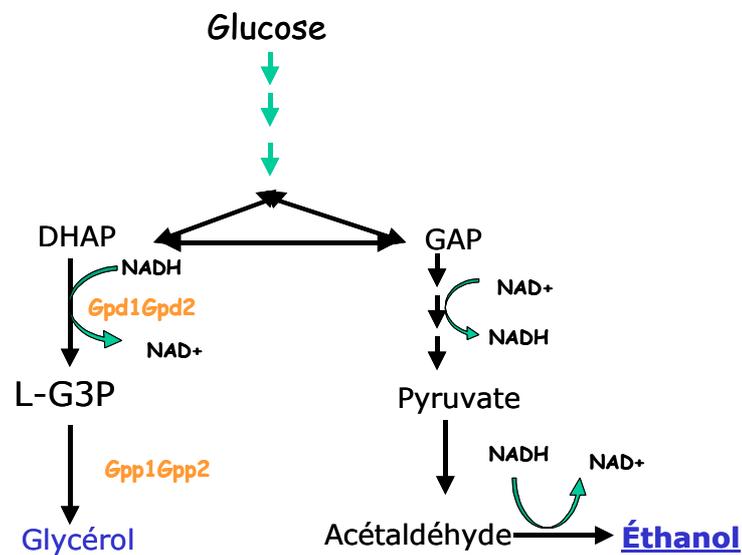


Figure IV-9 Voies principales de synthèse du glycérol et de l'éthanol

Dans les deux mutants, seul le gène *GPD2* est délété : le gène *GPD1* n'est pas altéré, mais son promoteur est remplacé, afin de modifier le taux d'expression de l'enzyme, et ainsi de moduler son activité dans la cellule (cf. chapitre 5). Les souches construites ont été caractérisées, lors de fermentations aérobies et anaérobies en conditions de production intensive d'éthanol, pour les comparer à la souche sauvage (cf chapitre 5 et 6)

Chapitre V : Analyse de l'impact de la régulation fine du glycérol en condition aérobie

V.1 Résumé

Ce chapitre est rédigé sous forme de publication actuellement sous presse dans le journal *Microbial Cell Factories* (Pagliardini, Hubmann et al. 2010). Il décrit les résultats obtenus lors de la culture des souches génétiquement modifiées en condition aérobie. Il présente l'impact des modifications génétiques sur les cinétiques de croissance et de production des souches testées. Il s'attache aussi à donner une interprétation physiologique des phénomènes observés.

Les souches utilisées sont les souches CEN.PK113-7D *TEFmut7* (*TEFmut7*) et CEN.PK113-7D *TEFmut2* (*TEFmut2*). Ces souches ont été construites à partir de la souche CEN.PK113-7D en délétant le gène *GPD2* et en remplaçant le promoteur natif du gène *GPD1* par les promoteurs mutés *TEF1pmut7* et *TEF1pmut2*. L'activité GPD résiduelle a pu être évaluée respectivement à 55 % et à 6% de l'activité de la souche sauvage chez *TEFmut7* et *TEFmut2*. Les capacités fermentaires de ces deux souches ont été évaluées dans un procédé VHEP identique à celui utilisé pour la caractérisation de la souche sauvage (cf. Chapitre III). L'ajustement de l'activité de la voie du glycérol, grâce aux promoteurs mutés, a permis de réduire le rendement glycérol de 61 % chez *TEFmut7* et de 88 % chez *TEFmut2*. Cette diminution de la production de glycérol s'est accompagnée d'une augmentation du rendement éthanol de 0,43 g.g⁻¹ chez la souche sauvage, contre 0,44 g.g⁻¹ chez *TEFmut7* et 0,45 g.g⁻¹ chez *TEFmut2*.

Bien que le taux de croissance maximum des souches mutantes soit réduit respectivement de 20 % et de 30 % pour *TEFmut7* et *TEFmut2*, ni la concentration en éthanol inhibitrice de croissance ($P_{critique}$), ni la concentration en éthanol maximum atteinte n'ont été significativement affectées.

D'un point de vue de la balance redox, une augmentation de la part de NADH réoxydée par la phosphorylation oxydative, correspondant à une augmentation du rendement oxygène/biomasse, a permis aux mutants de compenser la diminution du glycérol. D'un point de vue énergétique, chez les deux mutants, une augmentation relative de l'importance des réactions de production d'énergie par rapport aux réactions productrices de biomasse a pu être observée ; elle se traduit par une augmentation du rendement ATP/biomasse. Ce besoin accru en énergie a été interprété comme l'indice d'une plus grande difficulté pour les souches mutantes à gérer le stress osmotique en raison de leur faible production de glycérol.

V.2 Publication: Quantitative evaluation of yeast's requirement for glycerol formation in very high ethanol performance fed-batch process

Julien Pagliardini¹, Georg Hubmann^{2,3}, Carine Bideaux¹, Sandrine Alfenore¹, Elke Nevoigt^{2,3,4}, Stéphane E Guillouet^{1§}

¹Université de Toulouse, INSA, UPS, INP, LISBP, 135 Av. de Rangueil, F-31077 Toulouse France

INRA, UMR792 Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, F-31400 Toulouse, France

CNRS, UMR5504, F-31400 Toulouse, France

² Department of Molecular Microbiology, VIB, Kasteelpark Arenberg 31 - bus 2438, B-3001 Heverlee, Flanders, Belgium

³ Laboratory of Molecular Cell Biology, Institute of Botany and Microbiology, Katholieke Universiteit Leuven, Kasteelpark Arenberg 31 - bus 2438, B-3001 Heverlee, Flanders, Belgium

⁴School of Engineering and Science, Jacobs University gGmbH, Campus Ring 1, 27579 Bremen, Germany

§Corresponding author

Email addresses:

JP: julien.pagliardini@insa-toulouse.fr

GH: Georg.Hubmann@mmbio.vib-kuleuven.be

CB: carine.bideaux@insa-toulouse.fr

SA: sandrine.alfenore@insa-toulouse.fr

EN : e.nevoigt@jacobs-university.de

SEG: stephane.guillouet@insa-toulouse.fr

V.2.1 Abstract

Background

Glycerol is the major by-product accounting for up to 5 % of the carbon in *Saccharomyces cerevisiae* ethanolic fermentation. Decreasing glycerol formation may redirect part of the carbon toward ethanol production. However, abolishment of glycerol formation strongly affects yeast's robustness towards different types of stress occurring in an industrial process. In order to assess whether glycerol

production can be reduced to a certain extent without jeopardising growth and stress tolerance, the yeast's capacity to synthesize glycerol was adjusted by fine-tuning the activity of the rate-controlling enzyme glycerol 3-phosphate dehydrogenase (GPDH). Two engineered strains whose specific GPDH activity was significantly reduced by two different degrees were comprehensively characterized in a previously developed Very High Ethanol Performance (VHEP) fed-batch process.

Results

The prototrophic strain CEN.PK113-7D was chosen for decreasing glycerol formation capacity. The fine-tuned reduction of specific GPDH activity was achieved by replacing the native *GPD1* promoter in the yeast genome by previously generated well-characterized *TEF* promoter mutant versions in a *gpd2Δ* background. Two *TEF* promoter mutant versions were selected for this study, resulting in a residual GPDH activity of 55 and 6 %, respectively. The corresponding strains were referred to here as *TEFmut7* and *TEFmut2*. The genetic modifications were accompanied to a strong reduction in glycerol yield on glucose; the level of reduction compared to the wild-type was 61 % in *TEFmut7* and 88 % in *TEFmut2*. The overall ethanol production yield on glucose was improved from 0.43 g g⁻¹ in the wild type to 0.44 g g⁻¹ measured in *TEFmut7* and 0.45 g g⁻¹ in *TEFmut2*. Although maximal growth rate in the engineered strains was reduced by 20 and 30 %, for *TEFmut7* and *TEFmut2* respectively, strains' ethanol stress robustness was hardly affected; i.e. values for final ethanol concentration (117 ± 4 g L⁻¹), growth-inhibiting ethanol concentration (87 ± 3 g L⁻¹) and volumetric ethanol productivity (2.1 ± 0.15 g l⁻¹ h⁻¹) measured in wild-type remained virtually unchanged in the engineered strains.

Conclusions

This work demonstrates the power of fine-tuned pathway engineering, particularly when a compromise has to be found between high product yield on one hand and acceptable growth, productivity and stress resistance on the other hand. Under the conditions used in this study (VHEP fed-batch), the two strains with “fine-tuned” *GPD1* expression in a *gpd2Δ* background showed slightly better ethanol yield improvement than previously achieved with the single deletion strains *gpd1Δ* or *gpd2Δ*. Although glycerol reduction is known to be even higher in a *gpd1Δ gpd2Δ* double deletion strain, our strains could much better cope with process stress as reflected by better growth and viability.

V.2.2 Background

Ideally, a micro-organism engineered for industrial biotechnology shows high product yield, final product concentration and productivity and can cope with process constraints. Achieving all these goals is a major challenge, particularly when it comes to modifications of the central carbon metabolism which is inherently coupled to energy and redox issues. Moreover, the cell's ability to cope with environmental stress can be severely affected. One prominent example for such a challenge is the reduction of glycerol formation in *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) in order to improve yield in ethanol production. Glycerol is produced from the glycolytic intermediate dihydroxyacetone phosphate (DHAP) which is reduced to glycerol-3-phosphate (G3P) by the two homologous isoenzymes of glycerol 3-phosphate dehydrogenase (GPDH), Gpd1 and Gpd2 [Eriksson, André et al. 1995; Gancedo, Gancedo et al. 1986]. G3P is then dephosphorylated into glycerol by the glycerol 3-phosphatases Gpp1 and Gpp2 [Gancedo, Gancedo et al. 1986, Bjorkvist, Ansell et al. 1997]. In fact, glycerol is the main by-product beside carbon dioxide and biomass, accounting for up to 5 % of the carbon [Oura, 1977].

A strain showing a reduced glycerol yield to the benefit of ethanol yield would result in substantial profit for the bioethanol industry. The challenge in reducing glycerol is that this compound and its formation fulfil major physiological functions in *S. cerevisiae*. Glycerol formation indeed participates in maintaining cytosolic redox balance [van Dijken and Scheffers 1986; Albers, Larsson et al. 1996; Ansell, Granath et al. 1997; Rigoulet, Agilaniu et al. 2004] and in providing the intermediate G3P, essential for the biosynthesis of glycerophospholipids and triacylglycerols [Athenstaedt and Daum 1999]. Glycerol is known to also contribute to stress management such as osmotic stress [Hohmann 2002; Blomberg and Alder 1989; Luyten, Albertyn et al. 1995], heat, freezing/thawing or oxidative stress [Hohmann 2002, Aldiguier, Alfenore et al. 2004].

Although glycerol formation by wild-type *S. cerevisiae* is, to a certain extent, strain dependent, it predominantly depends on the environmental conditions. The most important environmental factors are oxygen availability, type of nitrogen source, osmotic pressure, heat and pH. For example, the presence of amino acids in the growth medium reduces the requirement of producing their carbon backbones. This results in a significantly lower generation of excess NADH, i.e. lower glycerol formation when compared to minimal medium without any amino acids [van Dijken and Scheffers 1986].

The first studies which aimed at redirecting the carbon flux toward ethanol by reducing glycerol synthesis focused on GPDH (see above). Mutants deleted in one or both isogenes encoding for GPDH were constructed in different strain backgrounds and tested for ethanolic fermentation [Eriksson, André et al. 1995; Bjorkvist, Ansell et al. 1997; Ansell, Granath et al. 1997; Michnick,

Roustan et al. 1997; Valardi, Larsson et al. 1998; Nissen, Hamann et al. 2000; Guo, Zhang et al. 2009]. Nissen et al [Nissen, Hamann et al. 2000] reported that single deletion mutants *gpd1Δ* and *gpd2Δ* showed respectively a 2.8 % and a 4.7 % ethanol yield improvement under anaerobic conditions and a 2.2 % and 3.3 % under aerobic conditions. The double deletion mutant was not able to grow under anaerobic conditions and showed a 12.7 % yield improvement, but also a 29 % reduction in biomass yield in aerobic conditions. Other metabolic engineering strategies have targeted redox metabolism with the goal to produce less net excess NADH during the biomass synthesis and organic acid formation [Nissen, Kielland-Brandt et al. 2000]. Bro et al. [Bro, Regenberg et al., 2006] obtained a 3 % increase in the ethanol yield without any reduction in growth rate by by-passing the NAD⁺-dependent glycolytic conversion of glyceraldehyde to glycerate through the heterologous expression of a NADP⁺-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Nevertheless, these studies were made on low glucose concentration and did not imply industrially relevant process stresses such as high glucose and ethanol concentration. It was indeed shown that a *gpd1Δ gpd2Δ* double deletion mutant was severely affected in ethanol production (35% decrease in final titre) and ethanol tolerance (25 % reduction in the P_{critical} / μ value (ethanol concentration at which growth stopped)) when placed under intensive ethanol production process [Boulahya 2005].

Recent studies have combined single deletion of *GPD1* or *GPD2*, engineering of redox metabolism and/or modification of yeast glycerol export [Kong, Cao et al. 2007; Kong, Zhang et al. 2007; Zhang, Kong et al. 2007; Kong, Gu et al. 2006; Cao, Zhang et al. 2007] The best results, a 39.7 % reduction in glycerol yield accompanied by a 12.3 % ethanol yield improvement [Cao, Zhang et al. 2007], were obtained with a strain deleted for *GPD1*, *FPS1* and engineered for ammonium assimilation. Though, these results were obtained in a rich medium containing amino acids which is irrelevant in regards of most industrial processes. In addition, the use of rich medium compromises a correct conclusion about the redirection of carbon flow within these strains as long as catabolism of amino acids (in addition to glucose) is not taken into account.

Although some of the studies mentioned above gave interesting results, they suffer from a lack of information in terms of fermentative capacity in a high ethanol production process in which coping with process stress such as high ethanol titers becomes a critical issue for the yeast. For this purpose we previously developed a Very High Ethanol Performance fed-batch process [Alfenore, Cameleyre et al. 2004] as a tool for studying the yeast physiology during ethanol production processes with high productivity and final ethanol concentration. We also showed that it was possible to reduce glycerol yield and final titer by finely monitoring the Respiratory Quotient (RQ) through glucose feeding in VHEP fed-batch [Bideaux, Alfenore et al. 2006]. However, this did not result in an increase in ethanol yield on glucose. We therefore searched for an avenue to further reduce glycerol formation in the VHEP fed-batch process. We envisaged identifying the optimal combination of

process parameters and yeast strain genetic background for our process. However, it was clear from published data, that completely abolishing glycerol formation was accompanied by a drastic loss of process robustness [Nissen, Hamann et al. 2000; Boulahya 2005]. We therefore envisaged an approach where glycerol formation capacity was strongly reduced but higher than in the *gpd1Δ gpd2Δ* double deletion strain. In this context, recent advances in yeast promoter engineering [Alper, Fischer et al. 2005] have opened new possibilities for fine-tuning of metabolic fluxes. Based on the knowledge about Gpd1 and Gpd2 activities in yeast and available promoters for fine-tuning gene expression, an appropriate engineering strategy was defined supported by metabolic flux calculations (see results). To engineer the according strains, *GPD2* was deleted and *GPD1* expression was reduced by replacing its native promoter by two previously constructed *TEF1* promoter versions [Nevoigt, Kohnke et al. 2006] with strongly reduced but different activities. We present here the kinetic analysis of the two genetically modified strains by characterizing (i) the effect of the genetic modification on product formation and growth (rates, yields and titers) and (ii) the robustness of the strains in our VHEP fed-batch process.

V.2.3 Methods

Strains, media and growth conditions

The *Escherichia coli* strain DH5 α TM (Invitrogen Corp., Carlsbad) was used for amplification of plasmids. The strain was grown in Luria-Bertani (LB) medium (0.5 % yeast extract, 1 % peptone, 1% NaCl, pH 7) at 37 °C. *E. coli* transformation and isolation of plasmid DNA were carried out using standard techniques [Sambrook, Maniatis et al. 1989]. All *Saccharomyces cerevisiae* strains used in this study are listed in Table 1 and were derived from the prototrophic haploid wild-type strain CEN.PK 113-7D. For initial pre-cultivations, yeast strains were grown on YPD plates (2 g L⁻¹ glucose, 1 g L⁻¹ yeast extract, 1 g L⁻¹ bacto peptone, 0.9 g L⁻¹ NaCl, 1.5 g L⁻¹ agar) and stored in 30 % glycerol at -80 °C. All yeast strains used in this study are prototrophic allowing the use of minimum mineral media without any amino acid supplementation. All subsequent pre-cultures and fermentation experiments were carried out in synthetic mineral medium prepared as follows (all concentrations in g L⁻¹): KH₂PO₄, 3.0; (NH₄)₂SO₄, 3.0; Na₂HPO₄ 12H₂O, 3.0; sodium glutamate, 1.0; MgSO₄ 7H₂O, 0.5; ZnSO₄ 7H₂O, 0.04; MnSO₄ H₂O, 0.0038; CoCl₂ 6H₂O, 0.0005; CuSO₄ 5H₂O, 0.0009; Na₂MoSO₄ 2H₂O, 0.00006; CaCl₂ 2H₂O, 0.023; (NH₄)₂Fe(SO₄)₆ 6H₂O, 0.023; H₃BO₃, 0.003; pantothenate, 0.005; nicotinic acid, 0.005; meso-inositol, 0.125; thiamine, 0.005; pyridoxine, 0.005; para-aminobenzoic acid: 0.001, and biotin, 0.000012 [Alfenore, Molina-Jouve et al. 2002]. Three steps of propagation with increasing culture volumes (5 mL, 30 mL, 300 mL) were carried out before inoculating the reactor for the VHEP fed-batch fermentations. Each pre-culture was grown for 12 hours and used as the inoculum for the next step at a 10 % v/v ratio.

Table 1 - *Saccharomyces cerevisiae* strains used in this study

Strain	Genotype	Source or reference
CEN.PK 113-7D	<i>Wild Type</i>	van Dijken (2000)
<i>TEF^{mut7}*</i>	<i>gpd2Δ::loxP-ble^R-loxP</i> <i>GPD1pΔ::loxP-KanMX4-loxP-TEF1p mutant 7</i>	This study
<i>TEF^{mut2}*</i>	<i>gpd2Δ::loxP-ble^R-loxP</i> <i>GPD1pΔ::loxP-KanMX4-loxP-TEF1p mutant 2</i>	This study

* These strains are isogenic to CEN.PK 113-7D.

Engineered yeast strain construction

Genetic modifications of *S. cerevisiae* CEN.PK 113-7D carried out within this study comprise both the deletion of *GPD2* and the replacement of native *GPD1* promoter by two low-activity promoters (*TEF1* promoters' versions see below). Gene deletion and promoter replacements based on homologous recombination in yeast were carried out according to the method described by Güldener *et al.* (2002). Transformation of *S. cerevisiae* was carried out according to Gietz *et al.* (1991) using treatment with lithium acetate and polyethylene glycol. In order to allow expression of the antibiotic resistance genes cells directly after transformation were first incubated for at least 4 h at 30 °C in YD containing 1% yeast extract and 1% glucose. Afterwards, cells were spread on YD agar plates supplemented with 7.5 µg/ml phleomycin (for *GPD2* deletion) or 100 µg/ml geneticin G418 (for *GPD1* deletion and integration of *GPD1* promoter replacement cassettes).

GPD1 and *GPD2* coding regions show strong similarities. In order to assure gene-specific homologous recombination of the *GPD2* disruption cassette we used the *GPD2* upstream region, which is different from the region upstream of *GPD1*. Primers used for amplification of the *GPD2* disruption cassette and verification of correct gene disruption, listed in Table 2, were synthesized by Metabion International AG (Martinsried, Germany). Primers and PCR conditions used for the amplification of promoter replacement cassettes from our *TEF1* promoter mutant collection were the same as previously described [Nevoigt, Kohnke *et al.* 2006]. The thermostable *Pfu* DNA polymerase with proofreading activity was obtained from BIONEER (Korea) and used for amplification of both gene-disruption and promoter-replacement cassettes. Top DNA polymerase (BIONEER, Korea) was used in all diagnostic PCRs. PCR reaction mixtures were prepared according to the manufacturer's guidelines.

Table 2 - Primers used for amplification the *GPD2* disruption cassette and verification of its correct genomic integration

No.	Function	Sequence
P60*	Forward primer for amplification of <i>GPD2</i> deletion cassette	5'-TAGCTTACGGACCTATTGCCATTGTATTCCGATTA ATCTATTGTcagctgaagcttcgtacgc-3'
P61*	Reverse primer for amplification of <i>GPD2</i> deletion cassette	5'-CACATTCTCACCTCTGGCTCGAAGAT ATGGGAATGCAATTCTGTgcatagccactagtgatctg-3'
P62	Forward primer for verification of <i>GPD2</i> deletion	5'-ACGATGG CTCTGCCATT-3'
P63	Reverse primer for verification of <i>GPD2</i> deletion	5'-GATCAGGATCGGCCACTA-3'

*Sequences in low chase letters correspond to the primer sequences for the amplification of the *loxP-bleR-loxP* deletion cassette from the plasmid pUG66 used as a template (Gueldener, Heinisch et al. 2002). Nucleotides in capital letters are derived from *S. cerevisiae* S288c genome sequence for integration of the deletion cassette by homologous recombination at the *GPD2* locus.

The *GPD2* gene was deleted using the *loxP-bleR-loxP* cassette located on the plasmid pUG66 [Gueldener, Heinisch et al. 2002]. The gene *bleR* confers resistance to phleomycin. The primers used for the amplification of the disruption cassette were P60 and P61 (Table 2). The *GPD2* disruption cassette used here replaced 305 bp upstream of the *GPD2* coding region and 360 bp of the *GPD2* coding sequence. The correct integration of the *loxP-bleR-loxP* cassette was verified by diagnostic PCR using the primer pair P62/P63 (Table 2) and the following PCR conditions: 94 °C for 1 min, 50 °C for 1 min, and 72 °C for 2 min. The PCR was performed in 30 cycles. If wild-type genomic DNA was used as a template, this diagnostic PCR resulted in a product of 855 bp in size, whereas the product obtained from positive *gpd2Δ* transformants had a size of 1.5 kbp.

In order to replace the native *GPD1* promoter by promoters of much lower activities, the *TEF1* promoter mutant versions 2 and 7 of our previously published promoter collection for fine-tuning gene expression in yeast [Nevoigt, Kohnke et al. 2006] were used. The promoters were located on the described CEN/ARS plasmids *p416-loxP-KmR-TEFmut2-yECitrine* and *p416-loxP-KmR-TEFmut7-yECitrine* bearing the *loxP-KanMX-loxP* cassette upstream of the *TEF1* promoter mutant 2 and 7, respectively. Integrations of the low-strength promoters were confirmed by PCR diagnosis using primers and PCR conditions as described earlier [Nevoigt, Kohnke et al. 2006] except the temperature for primer annealing was set to 57 °C instead of 60 °C. The PCR product obtained from

native *GPD1* promoter was 1.6 kbp, while a positive integration of the *TEF1* promoter mutant 2 or 7 cassette yielded a product size of 2.6 kbp.

Measurement of specific GPDH activity

In order to determine the specific activity of glycerol 3-phosphate dehydrogenase (GPDH), yeast strains were aerobically grown in shake flask cultures using the synthetic minimal medium as described above supplemented with 2 % [w/v] glucose. The GPDH activity was measured in logarithmically growing cells (i.e. when OD₆₀₀ reached about 1) according to a previously described method [Gancedo, Gancedo et al. 1968; Nevoigt and Stahl 1996].

VHEP fed-batch protocol

VHEP fed-batch fermentations were carried on in 5 L bioreactors B DCU B.BRAUN (SARTORIUS) with a starting volume of 3 L. Temperature was set at 30 °C and pH regulated at 4 by adding 14 % (vol/vol) NH₃ solution. The reactor was flushed continuously with air; dissolved O₂ was maintained above 20 % of saturation by adapting the air flow and stirring rate in order to maintain fully aerated conditions. A sequential vitamin feeding strategy based on the growth profile [Alfenore, Molina-Jouve et al. 2002] was applied. The fermentations were started with an initial glucose concentration of 100 g L⁻¹. Whenever the residual glucose concentration was lower than 20 g L⁻¹, glucose feeding was carried out with a 700 g L⁻¹ glucose solution to restore a glucose concentration of 100 g L⁻¹. At the later phase of fermentation, i.e. when the ethanol concentration was above 90 g L⁻¹, the glucose feeding adjusted the concentration to 50 g L⁻¹.

Gas analysis

Outlet and inlet gas analysis was performed using a mass spectrometer Proline Dycor^{2a} (Ametek Process Instrument). Gas analysis was performed on the outlet flow of the reactor every 5 minutes and on the inlet air every hour. The volumetric O₂ consumption rate and the CO₂ production rate were calculated from the differences between the inlet and outlet gas compositions, taking into account the evolution of the liquid volume in the reactor, the inlet airflow rate (regulated by a mass flowmeter), the temperature and the pressure.

Analytical methods

Yeast growth was evaluated by spectrophotometric measurements at 620 nm in a spectrophotometer Libra S4 (Biochrom) and calibrated against cell dry weight measurements. Cells were harvested by filtration on 0.45- μm -pore-size polyamide membranes (Sartorius Biolab Product) and dried to a constant weight at 60 °C under a partial vacuum (200 mm Hg \sim 26.7 kPa) for 24 hours. Rapid determination of glucose and ethanol concentrations from broth supernatants during fermentation was performed with an YSI analyser (YSI model 27 A; Yellow Springs Instruments).

Determination of ethanol, organic acids and glucose from supernatants was performed by HPLC using an Aminex HPX-87H+ column (300 mm \times 7.8 mm) and dual detection (refractometer and UV at 210 nm) at 50 °C with 5 mM H₂SO₄ as an eluant (flow rate of 0.5 mL min⁻¹). Three independent metabolite quantifications (taking into account sampling, separation and HPLC quantification) showed that the measurement was reproducible; typically standard deviation was lower than 1% of mean value for ethanol and glucose and lower than 5 % for glycerol and acetate.

Chemicals

All chemicals were of the highest analytical grade available.

Determination of the cells' viability

To determine cells' viability, the methylene blue technique was used as previously described [Alfenore, Molina-Jouve et al. 2002].

Assessment of ethanol evaporation

When balancing aerobic ethanolic fermentation experiments, there is commonly a lack in carbon due to evaporation of ethanol. In fact, this may account for more than 20 % of the total carbon [Nissen, Hamann et al. 2000; Duboc And Stockar 1998]. To assess the part of evaporated ethanol, evaporation experiments were carried out under the same cultivation conditions as performed in this study but without yeast. The bioreactor was filled with 3 liters of the synthetic mineral medium used in this study and ethanol was added up to a concentration of 150 g L⁻¹. Decrease in the ethanol concentration was recorded over time by taking regular liquid samples and HPLC quantification. The rate of evaporation was found to be dependent on ethanol concentration, aeration rate and liquid volume. No significant impact of stirring on evaporation was observed which is in accordance to a previous study [Duboc And Stockar, 1998]. Evaporation was investigated for the 2 aeration rates used during the fermentations 1 L.mn⁻¹ and 0.5 L.mn⁻¹. Based on these data, an evaporation rate was attributed to each ethanol liquid concentration. Integration of this evaporation

rate over time and liquid volume allowed calculating the evaporated ethanol in our yeast fermentations. The fact that the measured ethanol evaporation during the period of fermentation when cells had stopped producing ethanol exactly matched the calculated ethanol evaporation validated the method.

Metabolic Flux Calculation

Metabolic fluxes were calculated using a MFA based model extrapolated from a previously described Metabolic Descriptor [Bideaux, Alfenore et al. 2006; Bideaux, Goma et al. 2008]. The metabolic network was modified by adding mitochondrial compartmentation. Repartition of the reactions between cytosol and mitochondria was made according literature and previously described models [Ryan and Kohlhaw 1974; Brandriss and Magasanik 1981; Kispal, Steiner et al. 1996; Maaheimo, Fiaux et al. 2001; Förster, Famili et al. 2003; Duarte, Herrgard et al. 2004]. Glycolysis, pentose phosphate pathway, synthesis of amino-acid precursors and nitrogen bases as well as formation of ethanol and glycerol were attributed to the cytosol. TCA cycle and respiratory chain were attributed to the mitochondria. Acetate and acetyl-coA synthesis were assumed to be localized in both cytosol and mitochondria. Segregation of amino acids synthesis between cytosol and mitochondria was inserted into the model according to the literature cited above. All transport reactions between the cytosol and the mitochondria were assumed to be simple transport reactions except for redox equivalent translocation via the glycerol shuttle. Our final metabolic network consists in 142 reactions, including 14 exchange reactions between the cell and external medium, 88 cytosolic reactions, 24 transport reactions between mitochondria and cytosol, and 16 mitochondrial reactions (cf. Additional file 1). Validity of the model was assessed using published data based on ¹³C labelling experiments [Gombert, Moreira dos Santos et al. 2001; Fiaux, Cakar et al. 2003].

The $Y_{ATP,X}$ values and NADH balance were calculated from the results of metabolic flux calculation as follows:

$$Y_{ATP,X} = \frac{\mu}{\sum_i \alpha_i^{ATPOP} \times q_i^{Gly} + \sum_i \alpha_i^{ATP} \times q_i^{OP}}$$

$$NADH_{pro} = \sum_i \alpha_i^{NADH} \times q_i^{Gly} + \sum_i \alpha_i^{NADH} \times q_i^{TCA} + \sum_i \alpha_i^{NADH} \times q_i^{Ana}$$

$$NADH_{con} = \alpha_{EtOH}^{NADH} \times q_{EtOH} + \alpha_{Glyce}^{NADH} \times q_{Glyce} + \sum_i \alpha_i^{NADH} \times q_i^{OP}$$

α_i^x : Stoichiometric coefficient of metabolite x in reaction i

q_i : Rate of reaction i belonging to metabolic pathway y

Ana: Anabolism

Gly: Glycolysis

OP: Oxidative Phosphorylation

TCA: Tricarboxylic acid cycle

Glyce: Glycerol

Etol: Ethanol

NADHcon: NADH consumed

NADHpro: NADH produced

The uncertainties of the TCA cycle fluxes values were estimated to impact the $Y_{atp,x}$ and NADH balance by less than 3%.

V.2.4 Results

Design and construction of the *GPD* engineered strains supported by *in silico* flux calculations

The central question of this study was to evaluate whether and to what extent glycerol formation in *S. cerevisiae* can be reduced without severely affecting yeast's robustness, particularly ethanol tolerance under Very High Ethanol Performance fed-batch process conditions. Apart from the knowledge about the remarkably reduced ethanol tolerance of the *gpd1Δ gpd2Δ* double deletion strain, no quantitative data was available about the impact of reduced glycerol formation capacity on yeast's performance in our VHEP fed-batch process. A data set of specific substrate consumption and metabolite production rates measured during VHEP fed-batch cultivation with the CEN.PK 113-7D wild-type strain allowed us to calculate intracellular carbon fluxes including the one from DHAP to G3P necessary to fulfil biomass building block requirements. Flux calculations revealed that the ratio between the specific DHAP-to-G3P conversion rate and the specific growth rate were constant over a long period of the growth. Based on our metabolic model, 5 % of the total DHAP-to-G3P flux observed in the wild-type strain was required for anabolic reactions while 95 % of this flux was diverted toward glycerol production (Figure. 1). This 5 % flux should represent the minimum of carbon flux needed for anabolic requirements. Thus, one obligation for strain construction was to provide them with this minimal glycerol formation capacity.

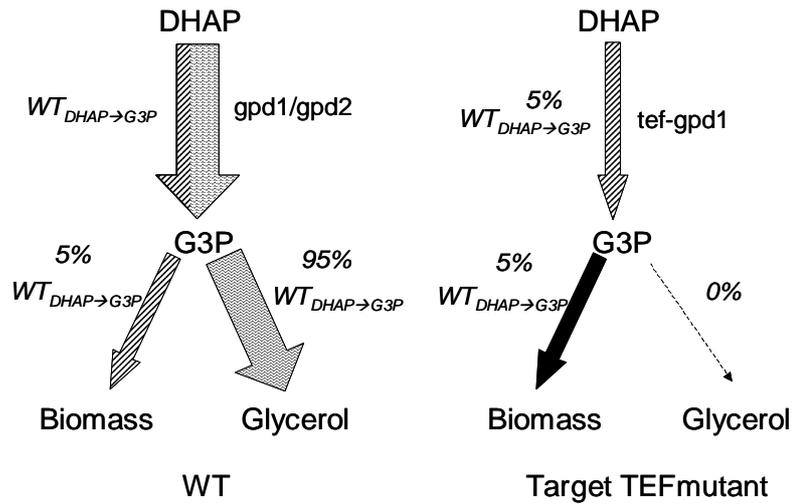


Figure 1 - Flux repartition into the glycerol pathway

Fluxes were calculated using our Metabolic Descriptor model (see Methods, see Additional file 1) and experimental data obtained from a VHEP fed-batch fermentation with the wild type strain CEN.PK 113-7D.

In order to engineer *S. cerevisiae* strains with a strongly reduced but not completely abolished glycerol formation capacity, we envisaged to delete one isogene of GPDH and fine-tune the expression of the other one by replacing its native promoter by another one with much lower activity. We decided to delete *GPD2* and fine-tune *GPD1* expression since the latter is known to be responsible for the major part of GPDH activity and *GPD2* deletion has been demonstrated to have no major impact on yeast physiology except when synthetic minimal medium was used under strictly anaerobic conditions [Remize, Cambon et al. 2003]. In order to replace the native *GPD1* promoter in CEN.PK 113-7D *gpd2Δ* background, two previously characterized mutated versions of the *S. cerevisiae* *TEF1* were used (see Material and Methods). We chose the two weakest promoters available for this study, i.e. *TEF1p* mutant 2 (normalized promoter strength 7%) and *TEF1p* mutant 7 (promoter strength 16 % normalized to the native *TEF* promoter) [Nevoigt, Kohnke et al. 2006]. Specific GPDH activity of the wild type was 0.041 U/mg protein. The down-regulation of *GPD1* gene expression by *GPD1* promoter replacement in the *gpd2Δ* background resulted in significantly reduced GPDH activities. The use of *TEF1p* mutant 7 upstream of *GPD1* reduced GPDH activity to 55 % (0.023 U/mg protein) whereas the use of *TEF1p* mutant 2 reduced GPDH activity to 6 % (0.006 U/mg protein) compared to wild-type activity.

Impact of reduced GPDH activity on fermentations parameters

The two engineered strains *TEFmut7* and *TEFmut2* and the wild type were studied in VHEP fed-batch cultivation under comparable operating conditions in a synthetic mineral medium in order to precisely quantify the effect of the modulation of glycerol synthesis on ethanol production and growth capacities. Time courses of glucose consumption, biomass, ethanol and glycerol production are shown in Figure 2. All three fermentations showed two characteristic phases: a first “growth phase” where biomass was produced concomitant with ethanol, and a second “production phase”, where growth had stopped due to ethanol inhibition but cells kept on producing ethanol. Growth of both the wild-type strain and the *TEFmut7* strain ended after about 20 hours while growth of *TEFmut2* ended after 23 hours.

Calculated growth rate, biomass yield, glycerol yield as well as ethanol yield, final titer and productivity are summarized in Table 3. Carbon balances were closed to 89 % for the wild type, to 94 % for *TEFmut7* and to 94 % for *TEFmut2*; the degree of reduction balances closed to 83 %, 90 % and 90 %, respectively. Evaluation of evaporated ethanol resulted in carbon and degree of reduction balances above 94 % for all three fermentations. Acetaldehyde was not measured due to its volatility and could likely explain part of the deficit in carbon and degree of reduction balances.

The final biomass concentration obtained for the wild-type strain was 15.7 g L⁻¹ while both modified strains showed a final biomass concentration of 14.5 g L⁻¹. Final glycerol concentration was 3.1 g L⁻¹ for the wild-type strain compared to 1 g L⁻¹ for *TEFmut7* and 0.4 g L⁻¹ for *TEFmut2*. The final ethanol concentration reached was 117 g L⁻¹ for the wild-type and slightly reduced to 112 g L⁻¹ for *TEFmut7* and 114 g L⁻¹ for *TEFmut2*. At the end of fermentation, acetate concentration reached 5.5 g L⁻¹ in the wild type and 5.1 g L⁻¹ in the two mutants.

Table 3 - Fermentation characteristics for *S. cerevisiae* wild-type strain CEN.PK 113-7D and the two mutants

	WT	<i>TEFmut7</i>	<i>TEFmut2</i>
Fermentation Time (h)	55	49	49
Growth Time (h)	20	20	23
Final Volume (L)	3.10	2.89	2.92
μ_{\max} (h⁻¹)	0.35±0.02	0.28±0.02	0.24±0.02
DCW_{max} (g L⁻¹)	15.7±0.5	14.5±0.5	14.5±0.5
YDCW/glucose g g⁻¹	0.093±0.006 [5-15h]	0.091±0.007 [5-15h]	0.087±0.005 [5-17h]
Yethanol/glucose g g⁻¹ (growth)	0.41±0.006 [0-20h]	0.42±0.01 [0-20h]	0.44±0.005 [0-23h]
Yethanol/glucose g g⁻¹ (overall)	0.43±0.005 [0-55h]	0.44±0.008 [0-49h]	0.45±0.003 [0-49h]
Y glycerol/glucose mg g⁻¹	13±0.01 [0-20h]	5.1±0.2 [0-20h]	1.6±0.1 [0-23h]
[ethanol] final (g L⁻¹)	117 ±4	112±4	114±4
[glycerol] final (g L⁻¹)	3.1±0.1	1±0.1	0.4±0.1
Ethanol Productivity (g L⁻¹ h⁻¹)	2.13±0.15	2.2±0.15	2.3±0.15
P_{critical}/μ (g L⁻¹)	87±3	85±3	86±3

μ_{\max} : maximum specific growth rate; DCW_{max}: maximum cell concentration; Y_i/glucose: production yield of the constituent *i* on glucose; P_{critical}/μ: ethanol concentration at which growth stopped; “growth phase”: fermentation phase of yeast growth; “production phase”: fermentation phase after yeast growth stopped but ethanol production continued.

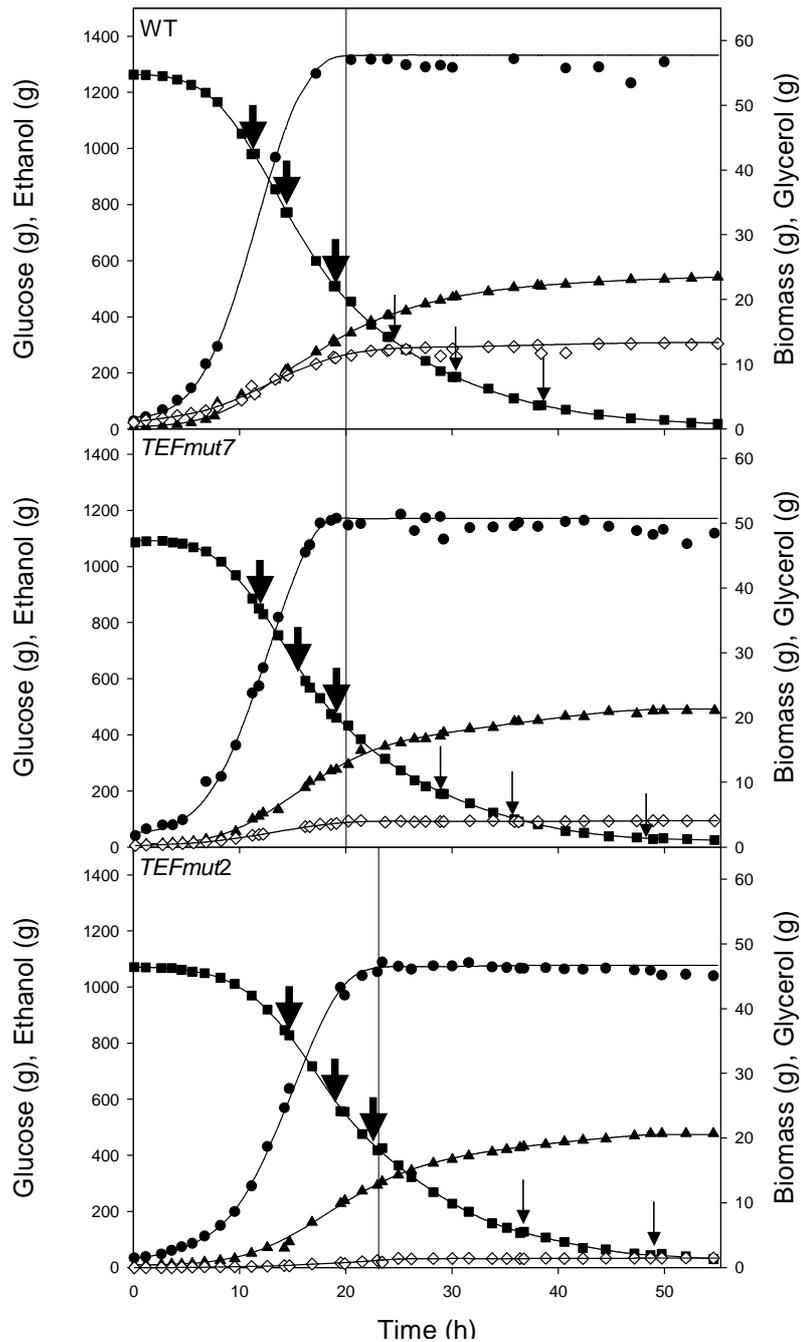


Figure 2 - Substrate and products masses evolutions during the wild type and the mutants fermentations

Mass of glucose (black square), ethanol (black triangle), biomass (black circle) and glycerol (white diamond). Period 1 corresponds to the “growth/production phase” and period 2 to the “production phase”. Thick arrows indicate the time points when glucose feeding was carried out in order to adjust glucose concentration in the fermenter up to 100 g L^{-1} , thin arrows correspond to glucose feeding up to a concentration of 50 g L^{-1} .

Impact of reduced GPDH activity on fermentation kinetic parameters

The reduction of GPDH activity in the engineered strains led to a decrease in the maximum specific glycerol production rate from $0.083 \text{ g g}_{\text{DCW}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ in the wild type to $0.023 \text{ g g}_{\text{DCW}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ and $0.004 \text{ g g}_{\text{DCW}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ in *TEFmut7* and *TEFmut2*, respectively. This corresponds to 28 and 5 % residual rates in *TEFmut7* and *TEFmut2* compared to the wild type, respectively. However, the maximum specific growth rate and the maximum specific ethanol production rates were also reduced in the strains engineered for lower GPDH activity. The μ_{max} was 0.35 h^{-1} for the wild type, 0.28 h^{-1} for *TEFmut7* and 0.24 h^{-1} for *TEFmut2*. The maximum specific ethanol production rates were $1.31 \text{ g}_{\text{ethanol}} \text{ g}_{\text{DCW}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ in the wild type, $1.10 \text{ g}_{\text{ethanol}} \text{ g}_{\text{DCW}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ in *TEFmut7* and $0.98 \text{ g}_{\text{ethanol}} \text{ g}_{\text{DCW}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ in *TEFmut2* corresponding to 16 % and 25 % reduction in the strains *TEFmut7* and *TEFmut2*, respectively. Nevertheless, the overall volumetric ethanol productivity was hardly affected in *TEFmut7* and *TEFmut2*, i.e. 2.2 ± 0.1 and $2.3 \pm 0.1 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectively compared to $2.1 \pm 0.15 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ for the wild type.

Impact of reduced GPDH activity on yields

Glycerol yield based on consumed glucose was 0.0051 g g^{-1} and 0.0016 g g^{-1} for *TEFmut7* and *TEFmut2*, respectively, corresponding to 39 % in *TEFmut7* and 12 % in *TEFmut2* compared to the wild type strain (0.013 g g^{-1}). The glycerol yields per g of biomass during the growth phase were also much lower for *TEFmut7* and *TEFmut2* (i.e. 0.06 and $0.02 \text{ g g}_{\text{DCW}}^{-1}$) respectively, compared to $0.14 \text{ g g}_{\text{DCW}}^{-1}$ for the wild type.

The biomass yields on glucose in *TEFmut7* and *TEFmut2* were slightly lower in the strains with the reduced GPDH activity, i.e. $0.091 \text{ g}_{\text{DCW}} \text{ g}_{\text{glucose}}^{-1}$ for *TEFmut7* and $0.087 \text{ g}_{\text{DCW}} \text{ g}_{\text{glucose}}^{-1}$ for *TEFmut2* compared to $0.093 \text{ g}_{\text{DCW}} \text{ g}_{\text{glucose}}^{-1}$ for the wild type. The overall acetate yields based on consumed glucose were similar for all three strains and reached 0.017 g g^{-1} .

As a result, the overall ethanol production yield on glucose was increased in the two engineered strains. While the wild-type strain produced 0.43 g g^{-1} , *TEFmut7* formed 0.44 g g^{-1} and *TEFmut2* 0.45 g g^{-1} . As visible from Table 3, the strain differences in the overall ethanol yields were solely due to the differences observed during the growth phase. In this phase, ethanol yields reached 0.41 g g^{-1} for the wild type, 0.42 g g^{-1} for *TEFmut7* and 0.44 g g^{-1} for *TEFmut2*. During the “production phase”, no significant variation of ethanol yield could be observed between the wild type and the two engineered strains (0.47 g g^{-1}).

We also calculated oxygen to biomass yield for all three strains. The average oxygen to biomass yield during the growth phase of the wild type was $6 \text{ mmolO}_2 \text{ g}_{\text{DCW}}^{-1}$. While there was no significant difference compared to *TEFmut7* ($7 \text{ mmolO}_2 \text{ g}_{\text{DCW}}^{-1}$), the strain *TEFmut2* showed a significantly higher yield of $10 \text{ mmolO}_2 \text{ g}_{\text{DCW}}^{-1}$.

Impact of reduced GPDH activity on ethanol tolerance

Figure 3 shows the evolution of both the specific growth and ethanol production rates as a function of the actual ethanol concentration in the bioreactor for each strain. The ethanol concentration at which uncoupling between growth and ethanol production occurs is usually referred to as P_{critical}/μ . This parameter characterizes the strain-dependent growth inhibition by ethanol. P_{critical}/μ was about 87 g L^{-1} for the wild type, 85 g L^{-1} and 86 g L^{-1} for *TEFmut7* and *TEFmut2*, respectively. Evaluation of cell viability by the methylene blue method indicated that ethanol tolerance of the *GPD*-engineered strains was only slightly reduced compared to the wild type (Figure. 4).

Comparative flux analysis of the strains

In order to better understand the metabolic reorganization upon the modulation of the glycerol synthesis pathway at the cell level, metabolic flux calculations were carried out for each strain. However in order to take into account the differences in μ_{max} between the strains, the experimentally obtained specific consumption and production rates were chosen at μ_{max} and normalized to a biomass production rate of $1 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$. The results of this calculation are reported in Figure. 5. It shows that the DHAP-to-G3P flux at μ_{max} was only 39 % and 11 % in *TEFmut7* and *TEFmut2*, respectively compared to the level observed in the wild type. Moreover flux calculation also indicated that the modulation of the glycerol pathway led to a global metabolic reorganization pointed out by the increased normalized rates of ethanol production, glycolysis, NADH mitochondrial shuttles and respiration.

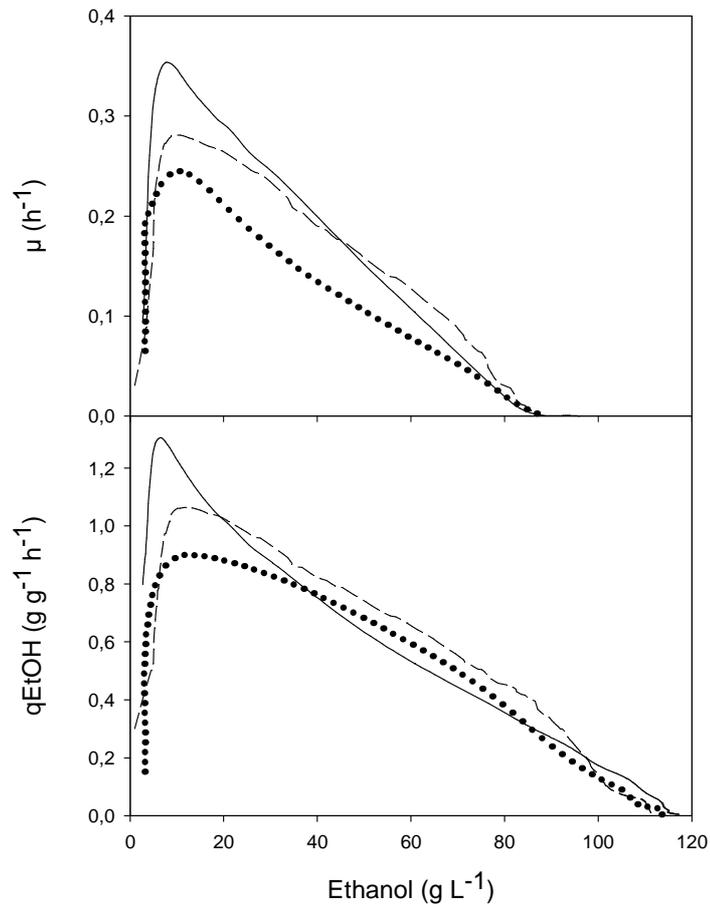


Figure 3 - Specific growth rates (μ) and specific ethanol production rate (q_{EtOH}) as functions of ethanol concentration

Strains: wild type CEN.PK 113-7D (—), *TEFmut7* (---), *TEFmut2* (.....).

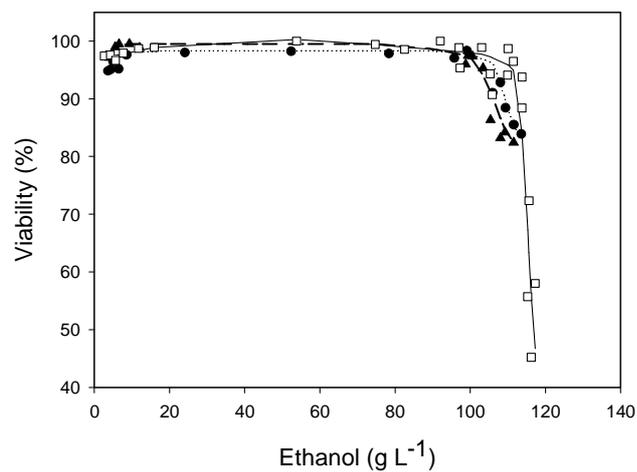


Figure 4 - Cell viability as a function of ethanol concentration

Strains: wild type CEN.PK 113-7D (white square), *TEFmut7* (black triangle), *TEFmut2* (black circle).

V.2.5 Discussion

Aiming at determining to what extent glycerol formation may be reduced without affecting drastically the strain robustness in a VHEP fed-batch process, the modulation of glycerol synthesis capacity of *S. cerevisiae* was obtained by replacing the native promoter of *GPD1* with promoters of significantly lower activities in a CEN.PK113-7D *gpd2Δ* background resulting in the strains *TEFmut7* and *TEFmut2*.

Fine-tuning of the glycerol synthesis pathway led to improved ethanol yield

The two engineered strains led to a reduction of glycerol yield on glucose by 61 % for *TEFmut7* and 88 % in *TEFmut2* compared to the wild type strain. The metabolic flux calculation from the experimental data set of *TEFmut7* and *TEFmut2*, respectively, showed that the DHAP-to-G3P flux was evaluated at 39 and 11 % of the one calculated in the wild type (Figure. 5). The reduction of the glycerol production in the two engineered strains was accompanied by a slightly increased ethanol yield on glucose (2.3 % for *TEFmut7* and 4.6 % for *TEFmut2*). For comparison, in aerobic conditions, simple deletion mutants *gpd1Δ* and *gpd2Δ* of TN1 strain showed respectively a 2.2 % and 3.3 % yield improvement, whereas double deletion *gpd1Δgpd2Δ* strain showed a 12 % improvement (0.39 g g⁻¹) [Nissen, Hamann et al. 2000]. A 10% ethanol yield improvement was also obtained in a double deletion *gpd1Δ gpd2Δ* strain of W303-1A but was accompanied by a drastic loss of robustness towards ethanol stress [Boulahya 2005].

In terms of carbon balance (Figure. 6), the reduction of the glycerol production could not completely explain the gain in the ethanol yield. Obviously, a decrease in biomass production also contributed to this improvement. Metabolic flux calculations pointed out a decrease in the ATP-to-biomass yield ($Y_{X,ATP}$) concomitantly with the decrease in the biomass production yield. The $Y_{X,ATP}$ value was 9.7, 9.1 and 7.8 g_{DCW} mol_{ATP}⁻¹, in the wt, the *TEFmut7* and the *TEFmut2*, respectively. A decrease in the ATP yield related to the decrease in glycerol production was already observed in RQ controlled fermentation experiment [Bideaux, Alfenore et al. 2006]. This diminution of the biomass and ATP yield could be linked to the deficit of cytosolic NADH oxidation (discussion see below) and to the stress management. The cell stress management may cost more energy to the mutant strains under VHEP conditions due to high glucose and ethanol concentrations and high osmolarity (rise from 0.7 to 2.9 Osm kg⁻¹ during the whole cultivation). For transport systems energetically related to the proton gradient, the cost in “equivalent” ATP may be higher in the strains producing less glycerol, known as the main compatible solute in yeast. For instance, osmoregulatory mechanisms such as K⁺ homeostasis, glycerol exporter (*fps1*) and compatible solute synthesis requiring appreciable ATP turnover [Olz, Larsson et al. 1993] may be more requested in strains

impaired in glycerol formation. Metabolic flux calculation showed that the mutant strains generated more energy than the wt to produce a similar amount of biomass (Figure. 5) through a higher flux in the central carbon metabolism. Higher maintenance coefficients and higher TCA cycle flux were already reported in the literature during osmoregulation in *S. cerevisiae* [Olz, Larsson et al. 1993; Heyland, Fu et al. 2009].

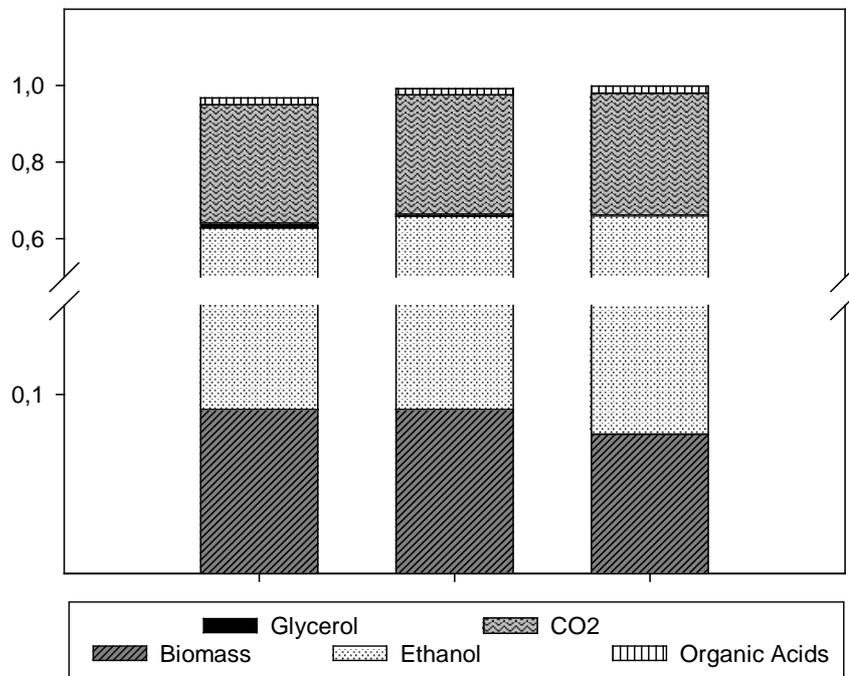


Figure 6 - Carbon balances for the *S. cerevisiae* wild-type strain and the two mutants
Carbon balances and are expressed as C-mol ratio between the amount of metabolites produced (based on final masses at the end of fermentation) and glucose consumed.

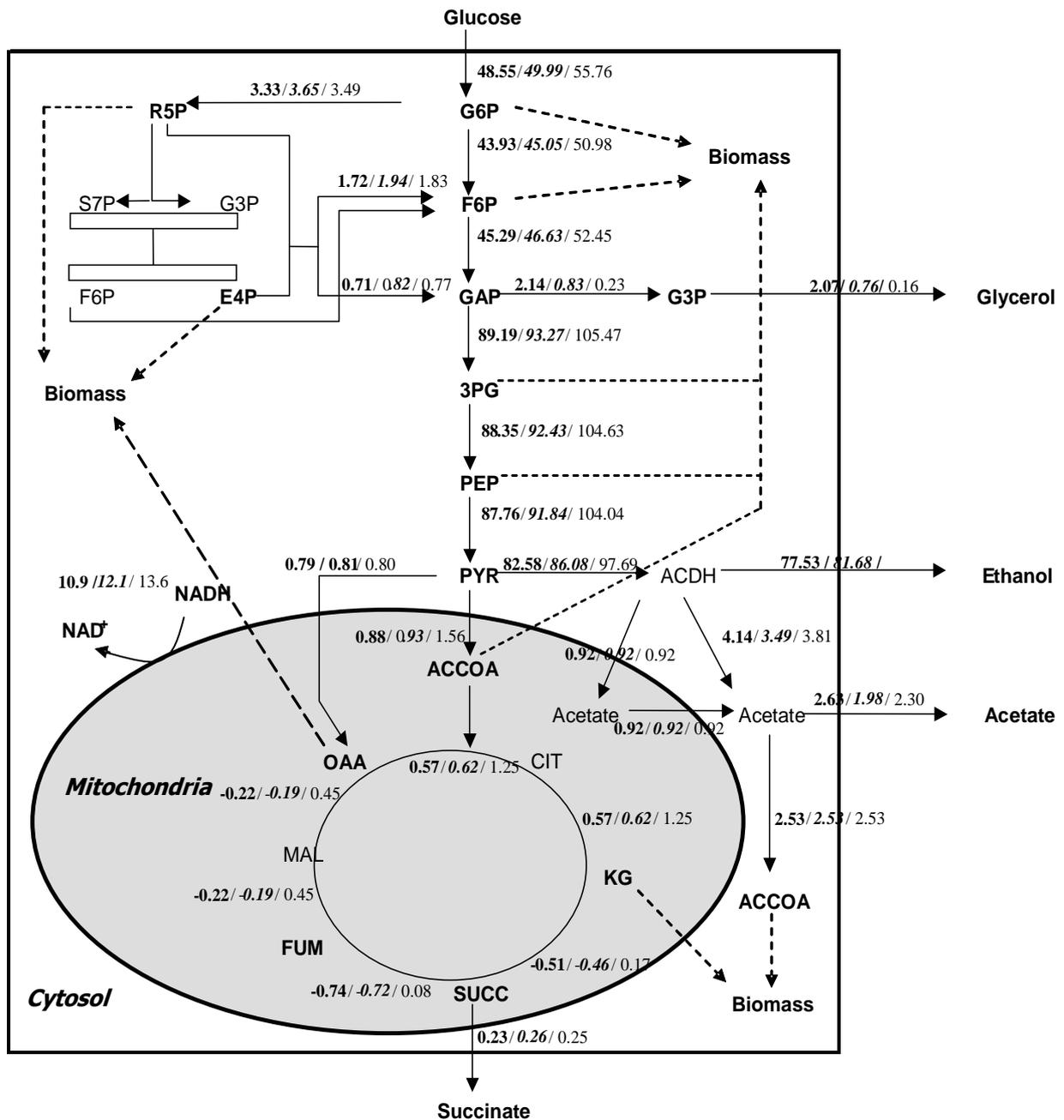


Figure 5 - Metabolic flux repartition

Metabolic flux repartition within the central carbon metabolism for the *S. cerevisiae* CEN.PK 113-7D wild type and the two strains engineered for reduced GPDH activity. Metabolic fluxes were calculated as $\text{mmol g}_{\text{DCW}}^{-1} \text{h}^{-1}$ from experimental data obtained at μ_{max} and then normalized to a biomass production rate of $1 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (WT/ *TEFmut7*/ *TEFmut2*). TCA cycle fluxes were found highly sensitive to low variation of q_{etoh}/μ ratio and therefore should be taken with caution.

Fine-tuning of the glycerol synthesis pathway altered the growth rate but not the ethanol tolerance in VHEP

The reduction of the glycerol formation in the two mutant strains led to a concomitant decrease in the maximal specific growth rate (μ_{\max}), 20 % and 31 % lower in the strains *TEFmut7* and *TEFmut2*, respectively, comparatively to the wt strain. Nevertheless, based on the metabolic flux calculation, the DHAP-to-G3P rate should have been high enough for both strains to sustain the μ_{\max} of the wild type. Similarly a 55 % decrease in the μ_{\max} was reported in *gpd1Δ gpd2Δ* strain under aerobic conditions, explained by the limited ability to reoxidize NADH to NAD⁺ in the cytosolic compartment [Nissen, Hamman et al. 2000]. The deficit of cytosolic NADH oxidation due to the decrease in glycerol formation capacity could be partly compensated by the increase in the oxygen consumption through the respiration, observed in the mutant strains. Figure 7 indeed shows the increased participation of ethanol biosynthesis and respiration to the NADH balance. The metabolic flux calculation revealed also an increased participation of the mitochondrial shuttles.

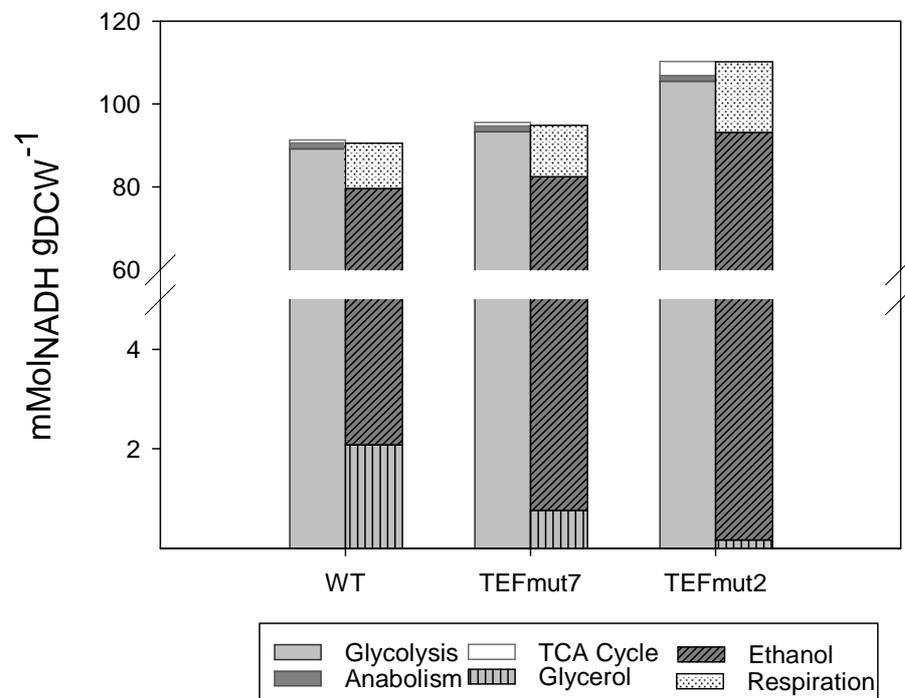


Figure 7 - NADH balances for the *S. cerevisiae* wild-type and the two mutants (*TEFmut7* and *TEFmut2*)

NADH balances were calculated for each strain at the time point when μ_{\max} was reached, respectively. Left bars correspond to generated NADH (by glycolysis, anabolism and TCA cycle); right bars correspond to the oxidized NADH (by glycerol and ethanol formation pathways and respiration).

The mitochondrial shuttles were represented in the model by the glycerol-3-phosphate shuttle, but either an increased participation of the external NADH dehydrogenases (*NDE1/2*) or the glycerol-3-phosphate shuttle could take over the excess of cytosolic NADH [Rigoulet, Aguilaniu et al. 2004; Pahlman, Larsson et al. 2002]. Therefore both systems likely participated to the transfer of cytosolic NADH into the mitochondria to be oxidised by the respiratory chain leading to the increase in the O₂ consumption. However the reduction of the GPDH rate may have reduced the activity of the glycerol-3-phosphate shuttle compared to the NDEs in our engineered strains. As the glycerol-3-phosphate shuttle was reported to have a higher ATP/O ratio compared to the external NDEs, the reduction of the glycerol-3-phosphate shuttle activity could partly explain the reduction in Y_{x,ATP} in our mutant strains [Rigoulet, Aguilaniu et al. 2004].

One alternate explanation for growth rate reduction might be that the reduction in the glycerol phosphate dehydrogenase rate created a competition for the L-G3P between the anabolic requirement in this metabolite and glycerol synthesis within the cell. L-G3P produced by the reduction of DHAP is indeed either dephosphorylated into glycerol by the glycerol phosphate phosphatases (GPP) or enters into the phospholipid synthesis pathway via the phosphatidic acid (Figure.1). The rate of dephosphorylation of L-G3P being far higher than the rate of its conversion into phosphatidic acid, this latter reaction might limit the growth rate.

No relevant reduction of the maximum specific growth rate was observed in single *gpdΔ* deletion mutants in previous studies in aerobic conditions [Nissen, Hamman et al. 2000]. However ethanol production capacities of these strains were studied under experimental conditions where the cells did not face high glucose and high ethanol concentration as encountered in VHEP conditions. Glycerol is known to play a role in stress resistance, such as osmotic stress [Hohmann 2002, Nevoigt and Stahl 1997], ethanol and temperature stress [Aldiguier, Alfenore et al. 2004]. Glycerol is the major compatible solute accumulated in yeast to increase cell turgor pressure to face hyper-osmotic stress. Modifying the glycerol synthesis pathway should alter the ability of the cell to regulate its turgor pressure. However authors have suggested through the surface stress theory that a fine tuned turgor pressure is necessary for yeast growth [Slaughter and Li 2005, Koch 1983]. Thus an impact of the osmotic stress on the μ_{\max} of our strains under our conditions cannot be completely excluded.

Despite the impact on the growth rate and in clear contrast to the *gpd1Δgpd2Δ* double deletion strain [Boulahya 2005], ethanol tolerance was not affected by the genetic modifications carried out in the current study even though the fermentation conditions were exactly the same

Finally we concluded that the two mutant strains were able to sustain a similar ethanol concentration than the wild type strain but with a higher energy expense. This higher energy demand

increased the relative weight of energy production reactions over biomass synthesis in the metabolism of the mutants leading to an improved ethanol yield.

V.2.6 Conclusions

A prominent feature here is that fine-tuning the glycerol synthesis pathway (within the range 11-39 % of the wild-type capacity) allows the strains to keep their initial ethanol tolerance. Both engineered strains showed indeed a similar behaviour in terms of ethanol inhibition on growth quantified by a $P_{critical} / \mu$ value at $86 \pm 1 \text{ g L}^{-1}$ and viability. Therefore we conclude that reducing the glycerol synthesis down to 11 % of the wild type capacity did not affect the strain robustness in terms of ethanol tolerance, ethanol titer and productivity.

Abbreviations

α_i : Stoichiometric coefficient of metabolite x in reaction i; q_i^y : Rate of reaction i belonging to metabolic pathway y; *Ana*: Anabolism; *Gly*: Glycolysis; *OP*: Oxidative Phosphorylation; *TCA*: Tricarboxylic acid cycle; *Glyce*: Glycerol; *Eto*: Ethanol; *NADHcon*: NADH consumed; *NADHpro*: NADH produced

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

JP, SG and CB contributed to the metabolic model set-up and flux calculation. GH carried out the genetic work., GH, JP, SG, and CB contributed to the fermentations experiments, SG, EN, CB, and SA conceived of the study, and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the P2R Program (French Ministry of Foreign Affairs, CNRS and DAAD) and from the ANR program (ANR-05-BIOE-007). J. Pagliardini gratefully acknowledges financial doctoral support by the ADEME and Danisco France.

Chapitre VI : Analyse de l'impact de la régulation fine en condition anaérobie

VI.1 Résumé

Ce chapitre est rédigé sous forme de projet de publication. Il décrit les résultats obtenus lors de la culture des souches génétiquement modifiées en condition anaérobie. Il présente l'impact des modifications sur les cinétiques de croissance et de production de métabolites des souches. Il s'attache aussi à donner une interprétation physiologique des phénomènes observés.

Les capacités fermentaires de ces deux souches ont été évaluées dans un procédé anaérobie, identique à celui utilisé pour la caractérisation de la souche sauvage (cf. Chapitre III).

L'ajustement de l'activité de la voie du glycérol, grâce aux promoteurs mutés, a permis de réduire le rendement glycérol de 44 % chez *TEFmut7* et de 61 % chez *TEFmut2*. Cette diminution de la production de glycérol s'est accompagnée d'une augmentation du rendement éthanol de 0,45 g.g⁻¹ chez la souche sauvage, 0,46 g.g⁻¹ chez *TEFmut7* et 0,47 g.g⁻¹ chez *TEFmut2*. Cependant, contrairement à ce qui a été observé en condition aérobie, les modifications de la voie du glycérol ont eu un sévère impact sur la croissance.

Ainsi, les cinétiques de fermentation sont fortement réduites en condition anaérobie, le μ_{\max} étant réduit de 57 % pour la souche *TEFmut7* et de 85 % pour la souche *TEFmut2* par rapport à la souche sauvage. De même, la viabilité de la biomasse et la tolérance des souches à l'éthanol sont très affectées par la limitation de la réduction de la production de glycérol : ainsi, la concentration critique en éthanol à laquelle la croissance s'arrête et la concentration finale en éthanol sont réduites respectivement de 13 et de 40 % chez la souche *TEFmut7* et de 24 et de 60 % chez la souche *TEFmut2*.

En absence d'oxygène les modifications du métabolisme du glycérol entraînent aussi une réorganisation globale du métabolisme oxydo-réductif, avec un effet négatif sur les voies métaboliques produisant du NADH et un effet stimulant sur les voies métaboliques consommant du NADH. Ainsi, chez les mutants, les productions d'acétate et de pyruvate sont largement diminuées.

Comme en condition aérobie, une augmentation du rendement ATP est observée, expression de l'accroissement de la part d'énergie consacrée à la maintenance.

Enfin, l'arrêt précoce de la croissance des mutants et leur faible tolérance envers l'éthanol ont pu être expliqués par l'accroissement des besoins énergétiques des cellules, mais aussi par une réduction de la capacité cellulaire à produire de l'énergie, liée à l'inhibition probable de la glycolyse par un ratio NADH/NAD⁺ élevé.

VI.2 Publication : “Use of fine-tuning metabolic engineering for improvement of ethanol yield and minimisation of glycerol yield in *Saccharomyces cerevisiae* anaerobiosis fermentation.”

Pagliardini J.¹, Hubmann G.^{2,3}, Bideaux C.¹, Alfenore S.¹, Nevoigt E.^{2,3,4}, Guillouet S.E.^{1*}

¹Université de Toulouse, INSA, UPS, INP, LISBP, 135 Av. de Rangueil, F-31077 Toulouse, France
INRA, UMR792 Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, F-31400 Toulouse, France; CNRS, UMR5504, F-31400 Toulouse, France

²Department of Microbiology and Genetics, Berlin University of Technology, Seestr. 13, 13353 Berlin, Germany

³Department of Molecular Microbiology, VIB, Kasteelpark Arenberg 31 - bus 2438, B-3001 Heverlee, Flanders, Belgium

⁴ School of Engineering and Science, Jacobs University gGmbH, Campus Ring 1, 27579 Bremen, Germany

*E-Mail : guillouet@insa-toulouse.fr

VI.2.1 Abstract:

Fine-tuning the carbon flow through a metabolic pathway by using engineered promoter to closely control genes activity is a promising breakthrough for metabolic engineering. Strains engineered by this method were used to investigate the possibility of reducing glycerol production of *Saccharomyces cerevisiae* without jeopardising its ability to cope with process stress during ethanol production. The mutant strains were studied in Very High Ethanol Performance (VHEP) fed-batch process under anaerobic conditions industrially relevant.

TEFmut7 and *TEFmut2*, the two strains used, allowed drastic reduction of the glycerol yield, respectively 44 and 61 %, and improvement of ethanol yield, respectively 2 and 7 %. It was also

shown that glycerol/biomass yield was reduced through a change in the metabolite production associated to the growth. Finally it was shown that under anaerobiosis contrarily to what was observed under aerobiosis fine-tuning of the glycerol pathway was not sufficient to provide to the mutant the same ethanol tolerance than the wild type.

VI.2.2 Introduction:

Yield has always been a major issue in industrial low added value production. With a renewed interest for bio fuel, a growing number of studies have recently investigated the possibilities of improving ethanol yield during bio-ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. The main track to obtain substantial yield improvement has been the reduction of glycerol production, in order to redirect the carbon flow to the benefit of ethanol. Glycerol is one of the main by-products in ethanol fermentation, it may account for up to 5% of the carbon in some industrial process (Oura 1977), and as such its reduction may provide substantial yield improvement. This issue has been on the scope for a long time, and both process optimisations (Bideaux, Alfenore et al. 2006) and strain modifications (Nissen, Hamann et al. 2000; Bro, Regenberget al. 2006) have been investigated. Though results of these studies have been mitigated, indeed glycerol plays a major part in the cell metabolism as a central element of cell redox balance, a biomass building block, but also an essential constituent of the cell stress resistance system. Modifying a strain in order to decrease the glycerol yield and improve the ethanol yield requires considering the major physiological part of glycerol in the cell.

Thus glycerol is known for its implication in the redox balance. Glycerol is involved in the transfer of the reducing power from the cytosol to the mitochondria in aerobic condition, but more importantly plays the role of final electron acceptor in anaerobic conditions. Indeed during ethanolic fermentation the coupling of glycolysis and ethanol production presents a null oxydo-reductive balance (van Dijken and Scheffers 1986), but organic acid synthesis and anabolism reactions produce an excess of reduced cofactor (van Dijken and Scheffers 1986; Albers, Larsson et al. 1996). In anaerobiosis reduction of the glycolysis derivative DHAP to G3P at the expense of one, NADH is the only way to balance the cell redox (van Dijken and Scheffers 1986). G3P is then dephosphorylated into glycerol which stands for the final electron acceptor (Gancedo, Gancedo et al. 1968; Bjorkqvist, Ansell et al. 1997).

Glycerol synthesis intermediate G3P was also shown to be essential as it enters in biomass composition through glycerophospholipids and triacylglycerols (Athenstaedt and Daum 1999).

Finally, glycerol is also known for its broad implication in stress resistance (Hohmann 2002). Thus, in condition of osmotic stress, glycerol is the main compatible solute accumulated in

Saccharomyces cerevisiae (Blomberg and Adler 1989). This contributes to maintain turgor pressure in the cell and prevent it from losing its water. This accumulation has been shown to be under the control of both the High Osmotic Pathway (Hohmann 2002) which will enhance glycerol synthesis and the plasma aquaporin Fps1, which dictates the rate of glycerol leakage in the medium (Luyten, Albertyn et al. 1995). Apart from osmotic stress, a potential role of glycerol in resistance to a wide range of stress like heat stress, thawing, or oxidative stress (Hohmann 2002), and ethanol stress has been suggested in literature.

These broad implications in central metabolic functions explain the difficulties encountered in the creation of mutant strains, showing reduced glycerol synthesis and robust enough for being used in industrial process. Most direct solutions investigated were to alter the genes of the main glycerol synthesis pathway. Glycerol synthesis from DHAP occurs through two successive reactions. First DHAP is reduced to G3P under the catalytic effect of the enzymes Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPD), G3P is then dephosphorylated into glycerol under the effect of the enzyme glycerol phosphate phosphatase (GPP). Both enzymes exist in two iso-forms with highly similar sequences and properties, but different physiological role. Thus Gpd1p is involved in the response to osmotic stress (Albertyn, Hohmann et al. 1994), its activity is increased in condition of osmotic stress and strains deleted for this enzyme have trouble to cope with osmotic stress (Albertyn, Hohmann et al. 1994). Gpd2p is involved in the response to anaerobiosis; strains deleted for this enzyme show an altered growth in anaerobic conditions and its activity was found increased in absence of oxygen (Ansell, Granath et al. 1997). Gpp1 and Gpp2 are both equally involved in osmotic stress, but strains deleted for Gpp1 are not able to grow under anaerobic stress.

Mutants being deleted for one or both of the two enzymes GPD were constructed in different background (Ansell, Granath et al. 1997; Bjorkqvist, Ansell et al. 1997; Michnick, Roustan et al. 1997; Valadi, Larsson et al. 1998; Nissen, Hamann et al. 2000; Guo, Zhang et al. 2009). Most interesting results were obtained by Nissen et al. in 2000 who assessed the improvement of ethanol yield obtained in mutant deleted for either one or both of the two genes GPD1/GPD2. In anaerobic conditions, simple deletion mutants Δ gpd1 and Δ gpd2 showed respectively a 2.8 % and a 4.7% ethanol yield improvement, while the double deletion strain was not able to grow. In aerobic conditions, Δ gpd1 and Δ gpd2 showed respectively 2.2 % and 3.3 % ethanol yield increase, while the double deletion mutant showed a 12.7 % ethanol yield improvement, but also showed a 28.8 % reduction of the biomass yield. Moreover, the assessment of the ethanol production capacity of the

double mutant in an aerobic high ethanol production showed that its tolerance to ethanol was reduced (Boulahya 2005).

A recent study targeted the enzymes of the glycerol synthesis second step, glycerol-phosphate-dehydrogenase *gpp1p* and *gpp2p*. This study showed that, in aerobic conditions, deletion of one of the two genes did not affect the growth or the glycerol production, but deletion of both genes lead only to a 50% decrease in the glycerol synthesis, suggesting for unspecific glycerol dephosphorylation, or activation and reversion of the catabolic glycerol pathway (Boulahya 2005).

Another strategy investigated, in order to minimise glycerol, is to decrease the need for NADH re-oxidation in the cell, by engineering the redox metabolism. This could be done, either by decreasing the NADH produced in the cell, or by introducing new reaction consuming NADH. Thus Nissen (Nissen, Kielland-Brandt et al. 2000) modified the ammonium assimilation, by deleting the gene *GDH1* encoding the NADPH-dependant glutamate dehydrogenase and over-expressing the genes of the *GLN1/GLT1* NADH dependant ammonium assimilation pathway. This allowed decreasing the need for NADH re-oxidation in the cell. The strain obtained showed a 38 % reduction of glycerol yield and a 10 % improvement of ethanol yield (Nissen, Kielland-Brandt et al. 2000). Another attempt to modify the redox metabolism was made by by-passing the NAD dependant glycolytic conversion of glyceraldehyde to glycerate through the heterologous expression of a NADP⁺-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. This strategy, replacing a NADH production reaction by a NADPH production reaction, allowed obtaining a strain, showing a 40 % reduction of the glycerol yield a 3 % increase in the ethanol yield and no reduction of the growth yield (Nissen, Kielland-Brandt et al. 2000).

Recent studies mixed both glycerol synthesis pathway genes deletion and redox metabolism engineering together with modification of yeast glycerol transport systems. Thus, *GLT1* was over-expressed in both Δ *gpd1* and Δ *gpd2* mutants (Kong, Cao et al. 2007; Kong, Zhang et al. 2007). Zhang studied the effect of the glycerol transport facilitator *FPS1* deletion on ethanolic fermentation (Zhang, Kong et al. 2007). *FPS1* was deleted in a mutant deleted over-expressing *GLT1* (Kong, Gu et al. 2006). *FPS1* was deleted in a mutant deleted for *GPD* genes and over-expressing *GLT1* (Cao, Zhang et al. 2007). The best results were obtained by deletion of *FPS1* and *GPD1* and over-expression of *GLT1*; the strain showing a 39.7 % reduction of glycerol yield concomitant to a 12.3 % ethanol yield increase (Cao, Zhang et al. 2007). Though, those results were obtained on rich medium, which does not allow a close monitoring of carbon fate during the fermentation and may false growth capacities assessment.

Although interesting results were obtained, these different strategies of metabolic engineering were all suffering of the lack of precision in the gene regulation, as it was only possible to knock-out or over-expressed them. Advances in yeast promoters engineering have recently allowed to set-up fine-tuning regulation strategy. Thus, Hubmann et al (Hubmann et al 2010), using a collection of engineered yeast promoter, were able to build strains deleted for GPD2, in which GPD1 promoter was replaced by mutated promoters showing different levels of activity (Hubmann et al 2010; Nevoigt, Kohnke et al. 2006). Some of these strains, selected thanks to a metabolic model, were used to carry high performing ethanolic fermentation in aerobic conditions and well controlled environment (Pagliardini, Hubmann et al. 2010). Flux calculation based on the metabolic model (Bideaux, Alfenore et al. 2006; Bideaux, Goma et al. 2008; Pagliardini, Hubmann et al. 2010); showed that the carbon flux through the glycerol pathway was sufficient to provide enough G3P as biomass precursor to sustain the maximal growth yield, observed in the wild type strain and fully aerated conditions, alleviated the negative impact of low glycerol production upon the redox balance. Results showed that, in such conditions, it was possible to widely decrease the glycerol yield, increase the ethanol yield and limit the negative impact of the deletion in regards of biomass viability and tolerance to ethanol (Pagliardini, Hubmann et al. 2010).

In this study we evaluated, under anaerobic conditions, the ethanol production capacities and the ability to deal with process stress of the mutant strains fine-tuned for glycerol production previously studied under aerobic condition (Pagliardini, Hubmann et al. 2010). Validation of the strains capacities was made in highly performing anaerobic ethanol fermentation and well controlled environment. Kinetic study of these strains and evaluation of their capacities under anaerobic conditions aims to study the impact of the fine tuning of the glycerol pathway on the cell metabolism, but also to obtain reliable data to evaluate the potentiality of such mutants, as ethanol producers in a low productivity SSF process.

VI.2.3 Material And Method

Strains, media and growth conditions

All *Saccharomyces cerevisiae* strains used in this study are listed in Table 1 and were used in a previous study [163].

Tableau 1 : Saccharomyces cerevisiae strains used in this study

Strain	Genotype	Source or reference
CEN.PK 113-7D	<i>Wild Type</i>	van Dijken (2000) (van Dijken, Bauer et al.
<i>TEFmut7*</i>	<i>gpd2Δ::loxP-ble^R-loxP</i> <i>GPD1pΔ::loxP-KanMX4-loxP-TEF1p mutant 7</i>	Pagliardini (2010) [163]
<i>TEFmut2*</i>	<i>gpd2Δ::loxP-ble^R-loxP</i> <i>GPD1pΔ::loxP-KanMX4-loxP-TEF1p mutant 2</i>	Pagliardini (2010) [163]

*** These strains are isogenic to CEN.PK 113-7D.**

For initial pre-cultivations, yeast strains were grown on YPD plates (2 g L⁻¹ glucose, 1 g L⁻¹ yeast extract, 1 g L⁻¹ bacto peptone, 0.9 g L⁻¹ NaCl, 1.5 g L⁻¹ agar) and stored in 30 % glycerol at -80 °C. All yeast strains used in this study are prototrophic, allowing the use of minimum mineral media without any amino acid supplementation. All subsequent pre-cultures and fermentation experiments were carried out in synthetic mineral medium previously described (Alfenore, Molina-Jouve et al. 2002). Three steps of propagation with increasing culture volumes (5 mL, 30 mL, 300 mL) were carried out before inoculating the reactor for the VHEP fed-batch fermentations. Each pre-culture was grown for 12 hours and used as the inoculum for the next step at a 10% v/v ratio.

Measurement of specific GPD activity

In order to determine the specific activity of glycerol 3-phosphate dehydrogenase (GPD), yeast strains were aerobically grown in shake flask cultures, using the synthetic minimal medium as described above supplemented with 2% [w/v] glucose. The GPD activity was measured in logarithmically growing cells (i.e. when OD₆₀₀ reached about 1) according to a previously described method (Gancedo, Gancedo et al. 1968; Nevoigt and Stahl 1996).

Anaerobic fed-batch protocol

Anaerobic fed-batch fermentations were carried on in 5 L bioreactors B DCU B.BRAUN (SARTORIUS) with a starting volume of 3 L. Temperature was set at 30 °C and pH regulated at 4 by adding 14 % (vol/vol) NH₃ solution. A sequential vitamin feeding strategy based on the growth profile (Alfenore, Molina-Jouve et al. 2002) was applied. The fermentations were started with an

initial glucose concentration of 100 g L⁻¹. Whenever the residual glucose concentration was lower than 20 g L⁻¹, glucose feeding was carried out with a 700 g L⁻¹ glucose solution. In the early stage of growth glucose concentration was restored at 100 g.L⁻¹, in the latter stage of growth and after growth stopped glucose feeding adjusted the concentration to 50 g.L⁻¹.

Gas analysis

Reactors were flushed with a constant 0.5 L/mn N₂ flux all along the fermentation. Aeration started 1 hour after the inoculation in order to accumulate CO₂ in the medium and prevent growth limitation due to CO₂ stripping phenomenon. Outlet gas analysis was performed on the outlet flow of the reactor using a mass spectrometer Proline Dycor^{2a} (Ametek Process Instrument) every 5 minutes. The CO₂ production rate was calculated from the differences between the inlet and outlet gas compositions, taking into account the evolution of the liquid volume in the reactor, the inlet airflow (regulated by a mass flowmeter), the temperature and the pressure.

Analytical methods

Yeast growth was evaluated by spectrophotometric measurements at 620 nm in a spectrophotometer Libra S4 (Biochrom) and calibrated against cell dry weight measurements. Cells were harvested by filtration on 0.45- μ m-pore-size polyamide membranes (Sartorius Biolab Product) and dried to a constant weight at 60 °C under a partial vacuum (200 mm Hg \sim 26.7 kPa) for 24 hours.

Rapid determination of glucose and ethanol concentrations from broth supernatants during fermentation was performed with an YSI analyser (YSI model 27 A; Yellow Springs Instruments).

Determination of ethanol, organic acids and glucose from supernatants was performed by HPLC using an Aminex HPX-87H+ column (300 mm \times 7.8 mm) and dual detection (refractometer and UV at 210 nm) at 50 °C with 5 mM H₂SO₄ as an eluent (flow rate of 0.5 mL min⁻¹). Three independent metabolite quantifications (taking into account sampling, separation and HPLC quantification) showed that the measurement was reproducible; typically standard deviation was lower than 1% of the mean value for ethanol and glucose and lower than 5% for glycerol and acetate.

Determination of cell 'viability':

To determine cells viability, the methylene blue technique was used as previously described (Alfenore, Molina-Jouve et al. 2002).

Assessment of ethanol evaporation:

When balancing ethanolic fermentation experiments, there is commonly a lack in carbon due to evaporation of ethanol. In fact, this may account for more than 20 % of the total carbon (Duboc and Stockar 1998; Nissen, Hamann et al. 2000). To assess the part of evaporated ethanol, evaporation experiments were carried out under the same cultivation conditions as performed in this study but without yeast. The bioreactor was filled with 3 litres of the synthetic mineral medium used in this study and ethanol was added up to a concentration of 150 g L⁻¹. Decrease in the ethanol concentration was recorded over time by taking regular liquid samples and HPLC quantification. The rate of evaporation was found to be dependent on ethanol concentration, N₂ flushing rate and liquid volume. No significant impact of stirring on evaporation was observed which is in accordance to a previous study (Duboc and Stockar 1998). Based on this data and for a given N₂ flushing rate, an evaporation rate was attributed to each ethanol liquid concentration. Integration of this evaporation rate over time and liquid volume allowed calculating the evaporated ethanol in our yeast fermentations. The fact that the measured ethanol evaporation during the period of fermentation when cells had stopped producing ethanol exactly matched the calculated ethanol evaporation validated the method.

Metabolic flux calculations

Metabolic fluxes were calculated using a MFA based model extrapolated from a previously described Metabolic Descriptor (Bideaux, Alfenore et al. 2006; Bideaux, Goma et al. 2008). The metabolic network was modified by adding mitochondrial compartmentation. Repartition of the reactions between cytosol and mitochondria was made according literature and previously described models (Ryan and Kohlhaw 1974; Brandriss and Magasanik 1981; Kispal, Steiner et al. 1996; Maaheimo, Fiaux et al. 2001; Förster, Famili et al. 2003; Duarte, Herrgard et al. 2004). Glycolysis, pentose phosphate pathway, synthesis of amino-acid precursors and nitrogen bases as well as formation of ethanol and glycerol were attributed to the cytosol. TCA cycle and respiratory chain were attributed to the mitochondria. Acetate and acetyl-coA synthesis were assumed to be localized in both cytosol and mitochondria. Segregation of amino acids synthesis between cytosol and mitochondria was inserted into the model according to the literature cited above. All transport reactions between the cytosol and the mitochondria were assumed to be simple transport reactions except for redox equivalent translocation via the glycerol shuttle. Our final metabolic network consists in 142 reactions, including 14 exchange reactions between the cell and external medium, 88 cytosolic reactions, 24 transport reactions between mitochondria and cytosol, and 16 mitochondrial reactions. Validity of the model was assessed using published data based on ¹³C labelling experiments (Gombert, Moreira dos Santos et al. 2001; Fiaux, Cakar et al. 2003).

Chemicals

All chemicals were of the highest analytical grade available.

VI.2.4 Results

Impact of the fine-tuning strategy on fermentation parameters

Glucose consumption, biomass, ethanol and glycerol productions of the three cultures are shown in Figure 1. Growth and metabolites production are summed-up in Table 2. Cultures of the two mutant strains were performed in the same conditions as the wild-type. The three fermentations occurred in two phases, in a first phase biomass was produced concomitantly with ethanol, then growth stopped but cells kept on producing ethanol. Growth of the wild type ended after about 24 hours, growth of mutants *TEFmut7* and *TEFmut2* ended after respectively 60 and 133 hours. Ethanol production stopped after about 70 hours for the wild type, 146 hours and 167 hours for *TEFmut7* and *TEFmut2* respectively. Noteworthy the uncoupled ethanol production phase was very short in the case of the mutant *TEFmut2*. Production phase represented about 66 % of the overall fermentation time for wt, 59 % for *TEFmut7* and only 20 % for *TEFmut2*. Hence 61 % of the total ethanol was produced during the growth for the wt, 59 % for *TEFmut7* and 89 % in the case of *TEFmut2*.

Carbon balance closed to 95 % for the wild type, 88 % for *TEFmut7*, 87 % for *TEFmut2*. Degree of reduction closed to 93 % for the wild type, 85 % for *TEFmut7*, 79 % *TEFmut2*. The degree of reduction found for the missing carbon was 6.2 for the wild type, 5 for *TEFmut7*, 6.44 for *TEFmut2* pointing for missing ethanol. Carbon missing was more important in the longer fermentations due to the importance of evaporation. Evaluation of evaporated ethanol brought the carbon and degree of reduction balances of the three fermentations above 95 %. A home-made software of datas reconstruction developed according to the principles described by van Heijden et al was used to confirm the relevance of the evaporation evaluation (van der Heijden, Heijnen et al. 1994; van der Heijden, Romein et al. 1994).

The maximum biomass concentration established at 12 g L⁻¹ for the wt, 8 g L⁻¹ for *TEFmut7* and 3.8 g L⁻¹ for *TEFmut2*. Final glycerol concentration established at 9 g L⁻¹ for the wt strain compared to 5.4 g L⁻¹ for *TEFmut7* and 2.8 g L⁻¹ for *TEFmut2*. Final ethanol concentration reached was reduced to 106 g L⁻¹ for *TEFmut7* and 57 g L⁻¹ for *TEFmut2* compared to 139 g L⁻¹ for the wild type. Fermentation parameters are summed up in Table 2.

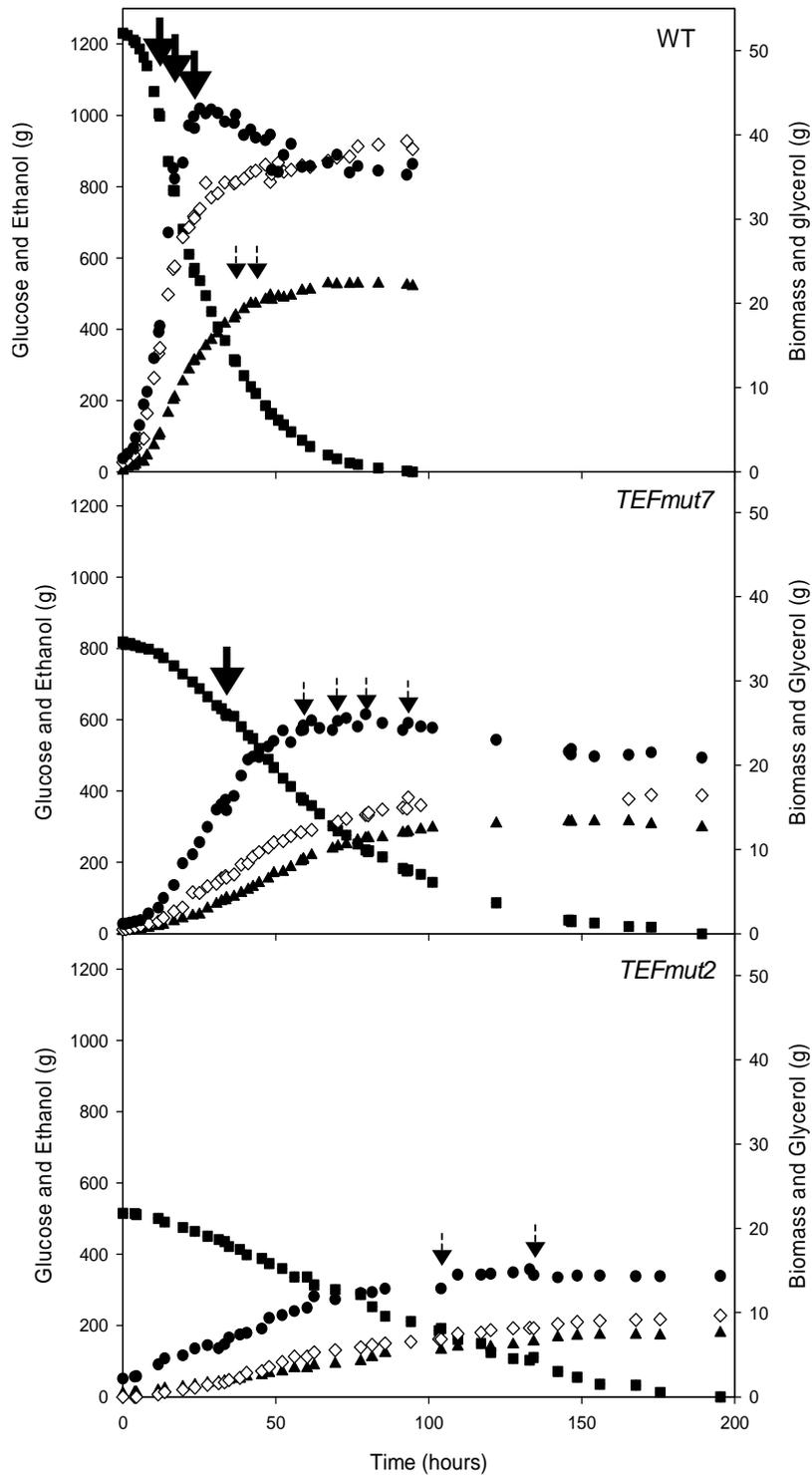


Figure 1 : Evolution of substrate and products masses along the fermentation
 Evolution of the mass of glucose (■), ethanol (▲), biomass (●) and glycerol (◇) in the VHEP fed-batch cultivations of the Wild Type CENPK113-7D (WT), TEFmut7(Tef7), TEFmut2 (Tef2) strains. Full line Arrow correspond to 100 g L⁻¹ glucose adding, dash arrow correspond to 50 g L⁻¹

Table 2 : Effect of fine-tuning strategy on biomass, ethanol and glycerol production during fed-batch fermentation at 30°C. μ_{\max} : maximum specific growth rate, X_{\max} maximum cell concentration, $Y_{i/j}$ yield factors of constituent i: X biomass, ETOH ethanol, gly glycerol and S glucose. Yields, concentrations, and specific rates are average values of 2 independent fermentations. Final volume, productivity and fermentation time correspond to the experiments shown in the publication.

	WT	Tef7	Tef2
Fermentation Time (h)	70	146	167
Growth Time (h)	24	60	133
μ_{\max} (h ⁻¹)	0.3±0.01	0.13±0.01	0.046±0.001
DCW _{max} (g L ⁻¹)	12±0.5	8±0.5	3.8±0.2
YDCW/glucose g g ⁻¹	0.076±0.001 [0-16 h]	0.074±0.003 [0-30 h]	0.055±0.001 [0-44 h]
Y glycerol/glucose g g ⁻¹	0.056±0.001 [0-16 h]	0.0314±0.003 [0-30 h]	0.022±0.004 [0-44 h]
Y glycerol/DCW g g ⁻¹	0.74±0.03 [0-16 h]	0.42±0.02 [0-30 h]	0.40±0.04 [0-44 h]
Y acetate/ glucose g g ⁻¹	0.005±0.001	0	0
Y pyruvate/ glucose g g ⁻¹	0.003±0.001	0	0
Y succinate/ glucose g g ⁻¹	0.004±0.001	0.013±0.001	0.026±0.001
Y ethanol/glucose g g ⁻¹ (growth)	0.45±0.003	0.46±0.008	0.48 ±0.005
Y ethanol/glucose g g ⁻¹ (overall)	0.47±0.001	0.48±0.003	0.48 ±0.005
Cethanol final (g L ⁻¹)	139±1	106±0.5	57±2
Cglycerol final (g L ⁻¹)	9±0.3	5.4±0.1	2.8±0.2
Ethanol Productivity (g L ⁻¹ h ⁻¹)	1.97	0.73	0.33
Pcritical (g L ⁻¹)	90±2	78±1	54±2

Impact of the fine-tuning strategy on fermentation kinetic parameters

Specific growth rate and specific ethanol production rate as function of ethanol concentration are shown in Figure 2. Maximum ethanol production rate was reduced of 37 % for TEFmut7 and 82 % for TEFmut2, maximum specific growth rate was reduced of 57 % for TEFmut7 and 85 % for TEFmut2. Ethanol productivity established at 1.97 g L⁻¹ h⁻¹ for the wt compared to 0.73 and 0.33 for TEFmut7 and TEFmut2, respectively. The fine tuning strategy led to a decrease in the maximum specific glycerol production rate of 64 and 92 % in the TEFmut7 and TEFmut2 strains, respectively (cf. Figure 2).

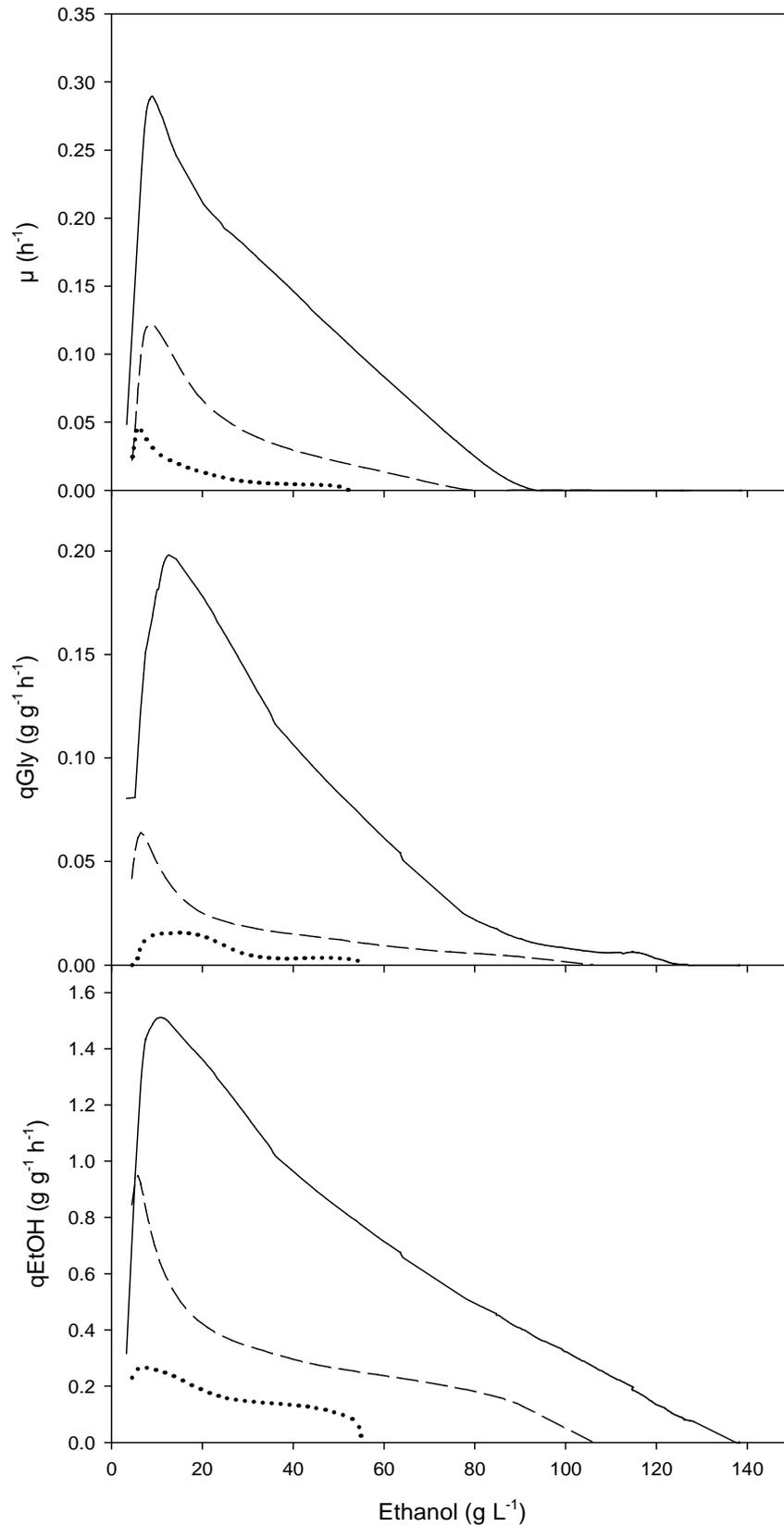


Figure 2 : Specific rate evolution as function of ethanol concentration

Specific growth rate (μ), specific glycerol production rate (q_{gly}) and specific ethanol production rate (q_{EtOH}) versus ethanol concentration in the fed-batch fermentation of wild type CENPK113-7D (—), TEFmut7(Tef7) (- - -), TEFmut2 (Tef2) (.....).

Impact of the fine-tuning strategy on production yields

The fine-tuning strategy led to a reduction of the glycerol yield on glucose of 44 % for TEFmut7 and 61 % in TEFmut2 compared to the wt strain. The glycerol production yield per g of biomass was equal to 0.74 g g⁻¹_{DCW} for the wild type and 0.42 g g⁻¹_{DCW} for TEFmut7. Surprisingly no relevant reduction of the glycerol production yield per g of biomass was observed between TEFmut7 and TEFmut2 around 0.40 g g⁻¹_{DCW}. The overall ethanol production yield on glucose established at 0.48 g g⁻¹ for TEFmut7 and TEFmut2 compared to 0.47 g g⁻¹ for the wt strain. Differences in the ethanol yields were due to the growth phase during which yields established at 0.45 g g⁻¹ for the wt, 0.46 g g⁻¹ for TEFmut7 and 0.48 g g⁻¹ for TEFmut2. After the growth stopped no sensitive variation of ethanol yield could be observed between the wild type and the two mutants (0.50 g g⁻¹). Concomitantly, the biomass production yield on glucose in TEFmut7 and TEFmut2 were respectively 0.074 g_{DCW} g_{glucose}⁻¹ and 0.055 g_{DCW} g_{glucose}⁻¹ compared to 0.076 g_{DCW} g_{glucose}⁻¹ for the wt. Acetate and pyruvate yield were reduced in the mutant and succinate yield were increased (cf. table 2).

Impact of the fine-tuning strategy on ethanol tolerance

Figure 2 shows the evolution of both the growth rate and ethanol specific production rates as a function of the produced ethanol for each strain. It can be observed that the fermentations occurred in two phases : a first phase characterized by a concomitant growth and ethanol production and a second phase where growth stopped but cells kept producing ethanol. This uncoupling phenomenon occurred at the critical ethanol concentration ($P_{critical/\mu}$), which commonly characterizes the growth inhibition by the ethanol. $P_{critical/\mu}$ was about 96 g L⁻¹ for the wild type, 78 g L⁻¹ and 54 g L⁻¹ for TEFmut7 and TEFmut2, respectively. Estimation of the cell viability by the methylene blue method showed that tolerance to ethanol of the mutants was harshly reduced compared to the wild type. Mutants' viability started indeed to decrease far earlier and viability decrease did not follow the same pattern as the wild type (Figure 3). The wt showed a long phase where viability was stable and close to 100 %, then viability started to decrease slowly at about 100 g L⁻¹ ethanol and finally dropped suddenly when ethanol concentration reached 138 g L⁻¹. On the contrary viability of the mutant started to decrease straight after the switch to anaerobic conditions. Two phases could be observed in the mutants' viability decrease, in the first phase viability decreases slowly with the increasing ethanol concentration, then as for the wt strain a drop of viability was observed. Viability drop occurred around 45 g L⁻¹ for TEFmut2 and around 95 g L⁻¹ for TEFmut7, however the slope of the viability drop was smoother in the case of the mutants than for the wt. As a result of the early viability drop, at the time when the growth stopped viability was 95 % for the WT, 87 % for TEFmut7 and only 30 % for TEFmut2.

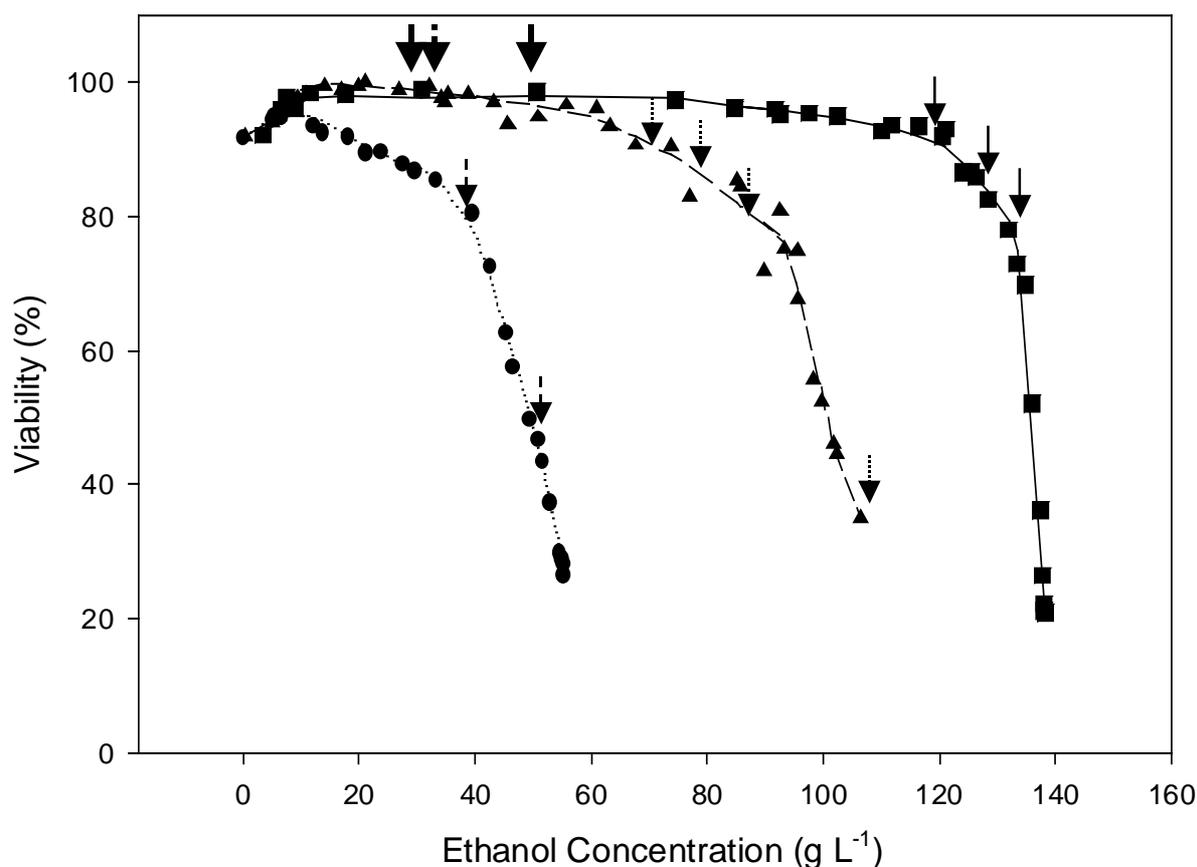


Figure 3 : Evolution of the viability as a function of Ethanol concentration

Evolution of the viability as a function of Ethanol concentration in the VHEP fed-batch of wild type CENPK113-7D (■), *TEFmut7*(Tef7) (▲), *TEFmut2* (Tef2) (●). Large Arrows correspond to 100 g L⁻¹ glucose addition thin arrows correspond to 50 g L⁻¹ glucose addition. Full line arrows correspond to wild type CENPK113-7D (■), dut arrows correspond *TEFmut7* and dash arrows to *TEFmut2*.

VI.2.5 Discussion:

This work aimed to assess the possibility of modulating the glycerol synthesis capacity of *S. cerevisiae*, by replacing the native promoter of *GPD1* by a calibrated TEF engineered promoter in a CENPK113-7D Δ gpd2 background, in order to (i) redirect the carbon flow from glycerol to ethanol and (ii) to find the best compromise between reduction of glycerol production, ethanol yield improvement and robustness of the strains. In order to precisely quantify (i) the redirection of the carbon flux from glycerol to ethanol, (ii) the effect of the mutation on ethanol yield and growth capacities and (iii) the robustness of the strains, experiments were carried out in a mineral medium with high glucose concentration under anaerobic conditions.

Fine-tuning of the glycerol synthesis pathway led to improved ethanol yield

The two selected strains lead to 44 and 61 % reduction of the glycerol yield, for *TEFmut7* and *TEFmut2* respectively compared to the wt. This reduction of glycerol production was accompanied by an improvement in the ethanol yield. Ethanol yield increase during the biomass production was 2 % for *TEFmut7* and 7 % for *TEFmut2*, which is relevant in regards to the standard deviation. Decrease in glycerol yield was sufficient to explain ethanol yield increase for *TEFmut7*, but only explained 60 % of ethanol yield increase in *TEFmut2* fermentation. Ethanol yield improvement in *TEFmut2* was also linked to acetate, pyruvate and biomass yield decrease. No relevant ethanol yield difference between the wt and the two mutants could be observed after the growth stopped, what was expected as glycerol synthesis is highly correlated with biomass production. Noteworthy due to the short length of the production phase in the *TEFmut2* strain fermentation, the difference observed in the ethanol yield of the two mutants during the growth phase could not be seen anymore on the overall yield. Overall, ethanol yield improvement was 2 % both in the case of the *TEFmut7* and *TEFmut2* strain.

Fine-tuning of the glycerol synthesis pathway altered growth rate, biomass yield and viability in anaerobic fermentation

The total suppression of the cells ability to produce glycerol is known to suppress the growth under anaerobic conditions (Bjorkqvist, Ansell et al. 1997; Nissen, Hamann et al. 2000). This was checked by growing the double deletion strain CENPK113-7D Δ gpd1/ Δ gpd2 in the same condition as the two *TEF* mutants and the wt (Data not shown). The fine tuning of the glycerol production with the help of the mutant promoters allowed the growth under anaerobic conditions. However, reduction of the glycerol yield had harsh effect both on the biomass growth rate and the cell viability. Thus, maximum specific growth rate was reduced of 57 % for *TEFmut7* and 85 % for *TEFmut2* (cf. Figure 2). Despite its low maximum growth rate, the biomass yield of *TEFmut7* was not significantly affected by the genetic modification, contrary to *TEFmut2* which showed a biomass yield reduced of 28 %, compared to the wild type during the growth phase (0.055 gDCW/g_{glucose} versus 0.076 gDCW/g_{glucose}). Cell viability and ability to cope with ethanol stress were also deeply altered by the mutation with lower $P_{critical}$, lower final ethanol concentration and earlier viability drop for the mutants. For the three strains viability drop happened shortly after a glucose addition (cf. Figure 3), thus earlier viability drop for the mutants may be linked to a reduce ability to cope with osmotic shock.

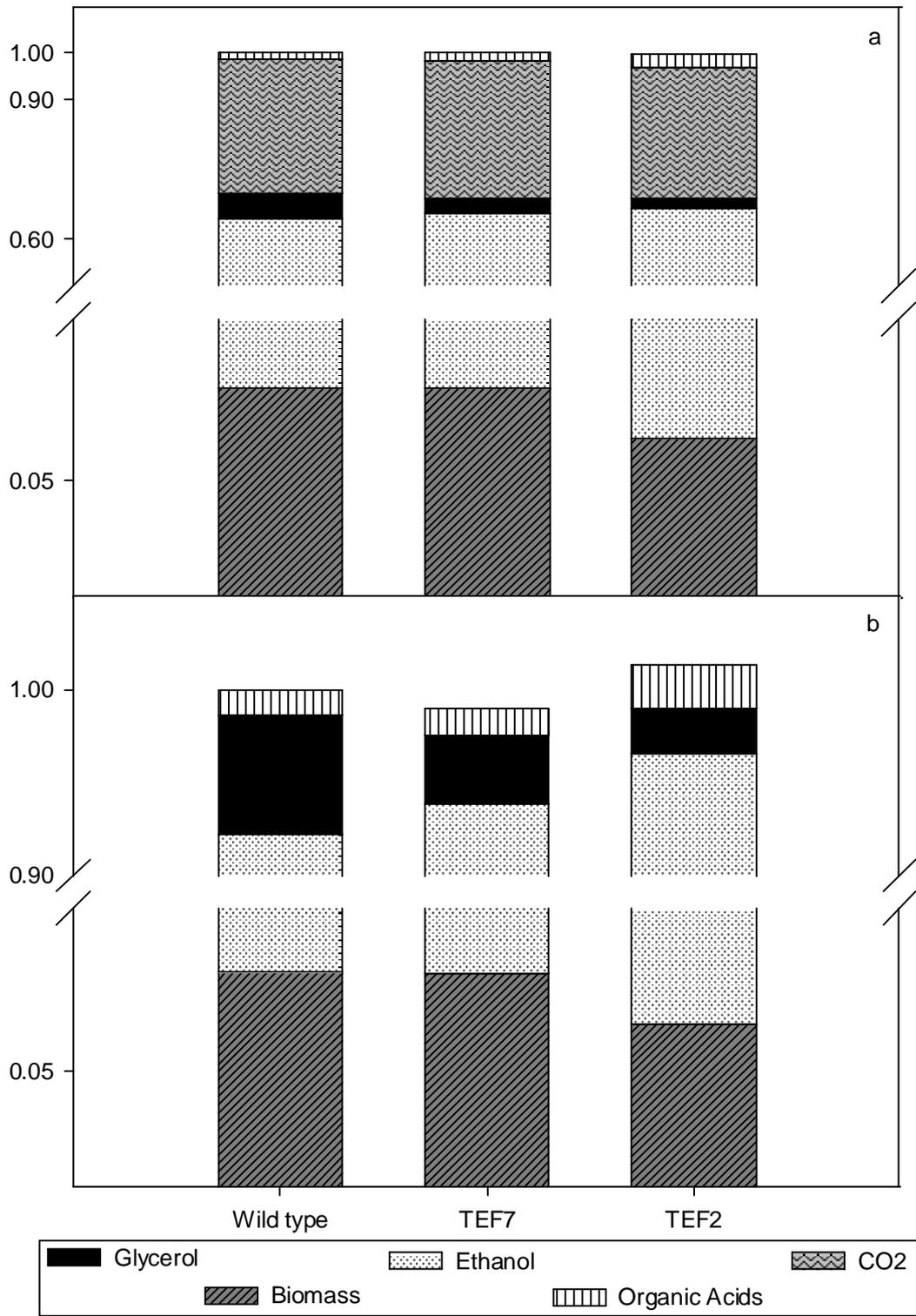


Figure 4 : Carbon (a) and degree of reduction (b) balance during the fermentation of the wild type strain and the two mutants.

Fine-tuning of the glycerol synthesis pathway led to change in the redox balance and reorganisation of the cell metabolism

Repartition of carbon and degree of reduction among the different products is shown Figure 4. Increased participation of ethanol production and decreased participation of glycerol production to both carbon and degree of reduction balance were the main features. However the increase in ethanol production could not compensate for the decrease in glycerol production since the coupling of the glycolysis and the ethanol production has a redox neutral balance. Thus, in the absence of an external electron acceptor, the decrease in the Glycerol/Biomass yield, observed in the mutant strains, necessarily implies metabolic rearrangements decreasing the amount of NADH associated to the biomass and organic acids production (cf. Figure 5).

This modification was experimentally observed by a shift in the secretion of the organic acids associated to the growth. Indeed, compared to the wild type, in the mutant strains acetate and pyruvate yields were reduced and succinate yield was increased. Production of pyruvate and acetate from 1 mole glucose generates 1 and 2 moles of NADH, respectively (cf. Figure 5). On the contrary under anaerobic conditions succinate is produced *via* the reductive branch of the TCA cycle and its production from 1 mole glucose requires a net reoxidation of 1 mole of FADH₂ (cf. Figure 5). This net FADH₂ consumption has been previously suggested as being a way to reoxidize a part of the NADH excess under anaerobic condition .

When considering the growth phase (cf. Table 2), in the case of *TEFmut7*, the glycerol yield was decreased by 0.32 g/g_{DCW} compared to the wild type. Acetate yield was decreased of 0.05 g/g_{DCW} what may decrease of 40 % the requirement for NADH excess reoxidation (cf. figure 7). The pyruvate was reduced of 0.04 g/g_{DCW} compared to the wild type which reduced of 20 % the requirement for NADH excess reoxidation. Finally, the increase in the succinate production would be sufficient to reoxidise 43 % of the NADH excess linked to the glycerol reduction. Overall these modifications were sufficient to counterbalance the decrease in the glycerol yield.

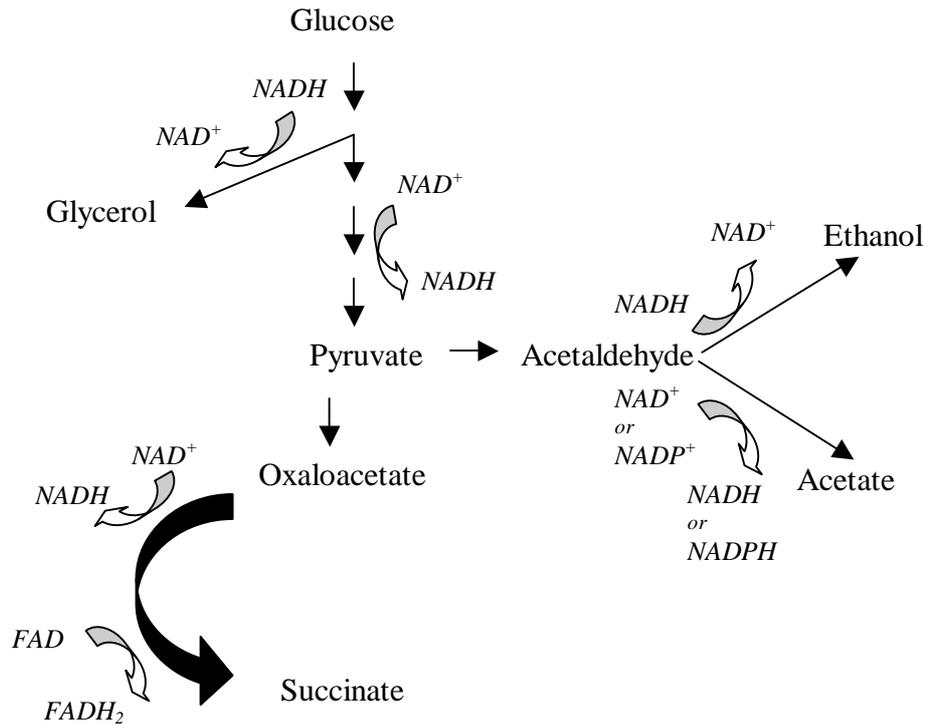


Figure 5 : Involvement of Acetate Pyruvate and succinate production in the redox metabolism under anaerobic condition.

In the case of *TEFmut2* the same reduction of glycerol and acetate rate was observed, but the succinate production was further increased and may be sufficient to reoxidise around 96 % of the $NADH$ excess linked to the glycerol decrease (cf. Figure 6). In this latter strain the increase in $NADH$ production was then not only linked to the glycerol reduction but also translated further rearrangement of the yeast metabolism.

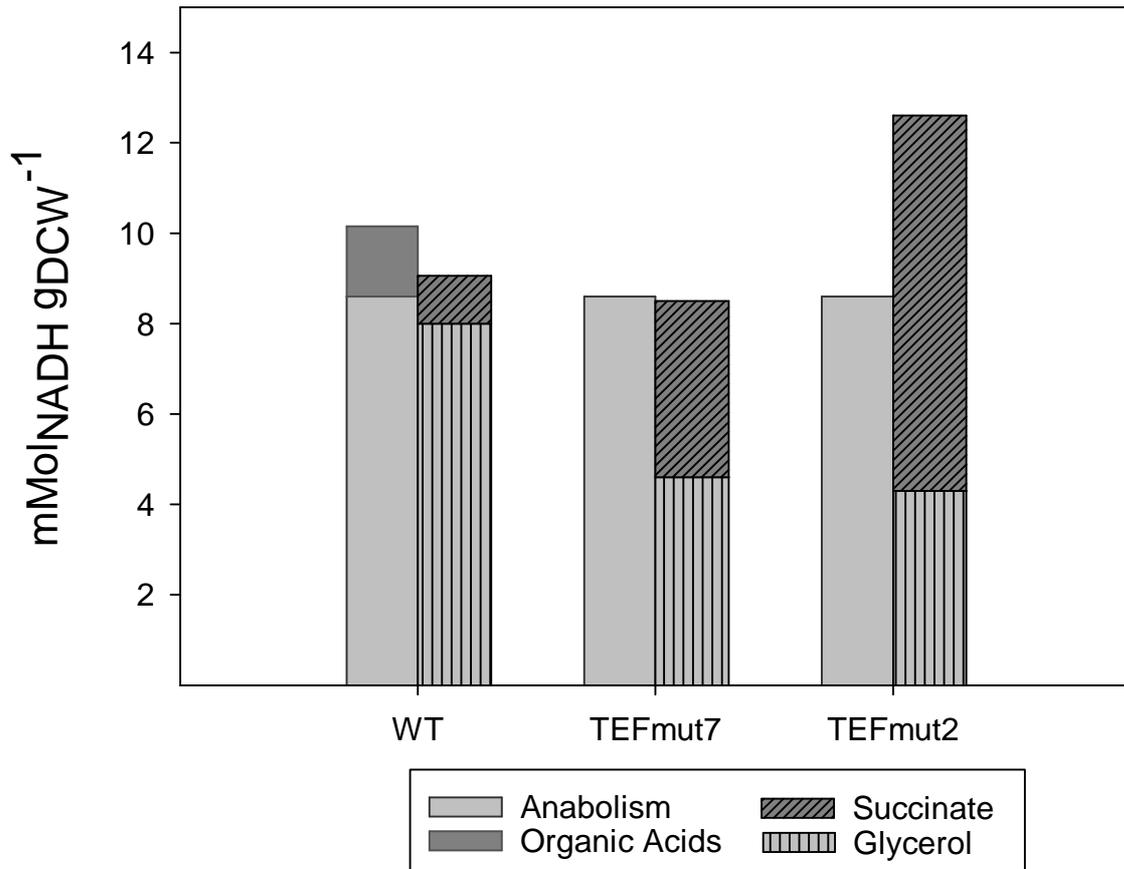


Figure 6 : NADH produced by anabolism and organic acids synthesis versus NADH consumed by glycerol and succinate production in the wild type strain and the two mutants.

This reorganisation of the metabolism could be due to an increase in the NADH/NAD⁺ ratio in the mutant strains compared to the wild type. This higher NADH/NAD⁺ ratio would hamper the reactions producing NADH and requiring NAD⁺, and on the contrary favour the reactions consuming the redox power in the cell.

Noteworthy at the beginning of the growth in the mutants' fermentation the acetate brought in the medium with the inoculum was consumed by the yeasts. This may translate the low capacity of these strains to produce acetate linked to the high NADH/NAD⁺ ratio. This higher ratio may hamper the conversion of acetaldehyde to acetate to the benefit of ethanol production. Thus mutant strains would use acetate from the medium to synthesize acetyl-coA in their cytosol.

Interestingly, despite the fact that the promoter used to control *GPD1* activity in *TEFmut7* was more than twice stronger than the one in *TEFmut2* (16 % versus 7% of the wild type TEF promoter activity), no relevant reduction in the glycerol yield on biomass could be observed between the two strains. Indeed, the mutants *TEFmut7* and *TEFmut2* showed respectively a 43 and 46 % reduction of glycerol/biomass yield. This may suggest that the glycerol/biomass yield observed in *TEFmut2* corresponds to the minimum required to maintain cells' growth and viability.

Fine-tuning of the glycerol synthesis pathway disturbed energetic metabolism in the cell

We previously showed under aerobic conditions that the reduction of the glycerol synthesis increased the energy necessary for the growth decreasing the $Y_{ATP/Biomass}$ ratio (Pagliardini, Hubmann et al. 2010). This was attributed to higher energy requirements for the active transport systems involved in the control of the cell homeostasis. We noticed here a similar phenomenon under anaerobic conditions with an increase carbon flow through energy production reactions (cf. Figure 7). The ATP/Biomass yields, calculated with the metabolic model, were lower for the two mutant strains, 3,6 and 2,8 $g_{DCW} \cdot mol_{ATP}^{-1}$ for *TEFmut2* and *TEFmut7* respectively, than for the wild type (3,8 $g_{DCW} \cdot mol_{ATP}^{-1}$). Thus, as for what was observed under aerobic conditions the cost of transport phenomena involved in regulation of homeostasis may have increased.

However, under anaerobic conditions the lower ATP/Biomass yield is also likely due to low growth rate of the strains. ATP/Biomass yield indeed translates the relative weight of cellular maintenance compared to biomass production. Maintenance may be divided in two terms, one associated to growth and linked to the growth rate and another one independant of the growth rate (Tempest and Neijssel 1984). At low growth rate, integration over the time of the cellular ATP expense dedicated to the maintenance not linked to growth, mathematically increase the relative importance of maintenance compared to biomass production (Tempest and Neijssel 1984). It is not possible to make the difference between the actual increase in ATP requirement linked to glycerol reduction and the relative increase of maintenance weight linked to slow growth rate

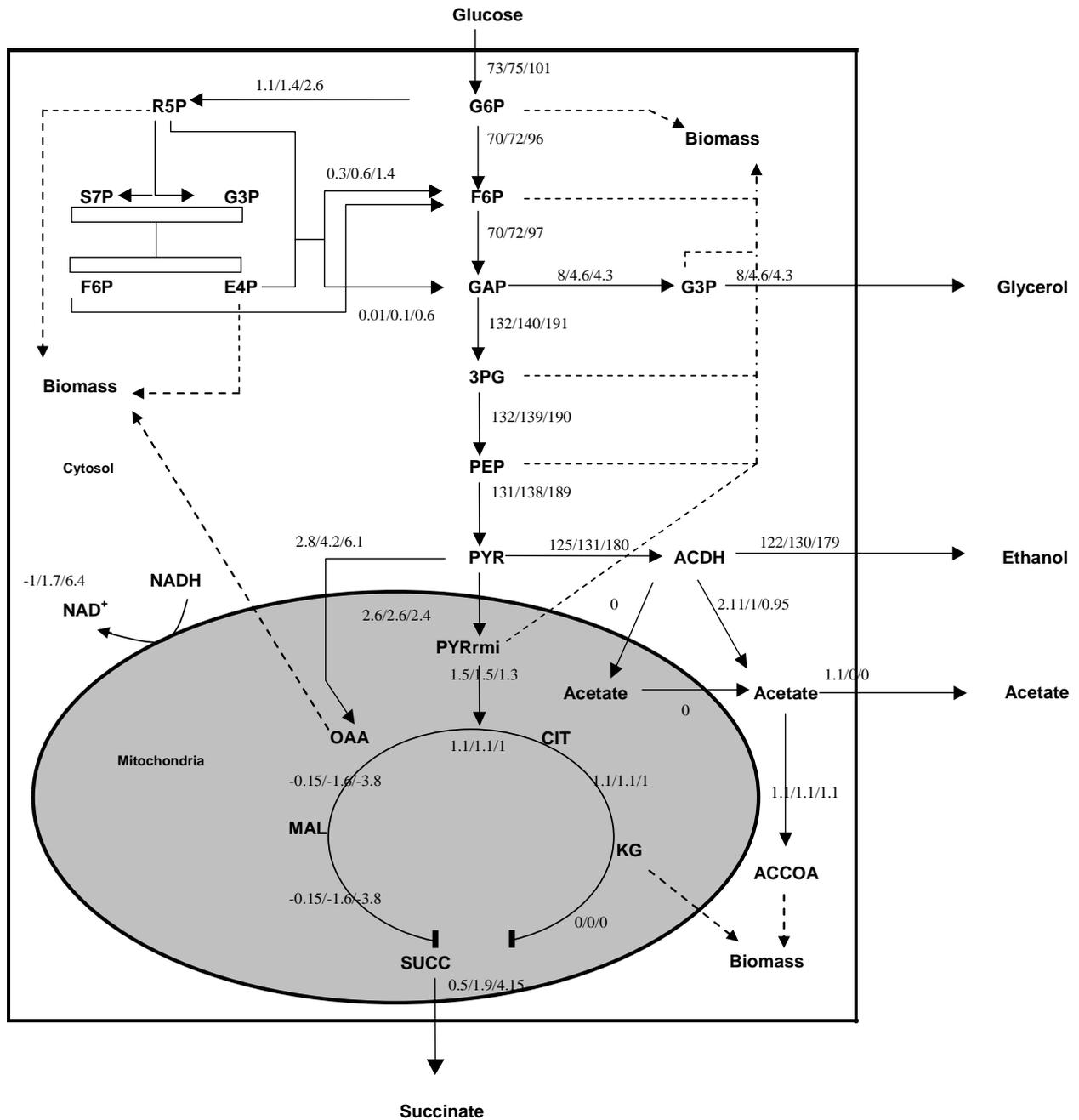


Figure 7 : Metabolic flux repartition

Metabolic flux repartition within the central carbon metabolism for the *S. cerevisiae* CEN.PK 113-7D wild type and the two strains engineered for reduced GPD activity. Metabolic fluxes were calculated as $\text{mmol g}_{\text{DCW}}^{-1} \text{h}^{-1}$ from experimental data obtained at the beginning of growth. Fluxes were then normalized to a biomass production rate of $1 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (WT/TEFmut7/TEFmut2).

Cells energy balance not only explained the reduction in biomass yield but may also likely contribute to explain the reduction of the mutants' tolerance to ethanol. Thus it is commonly admitted that increasing ethanol concentration increase the energy required for growth but also decreased the ability of cells to produce energy by inhibiting the glycolysis (Payot, Guedon et al. 1998). A reduced glycerol production may have increased the negative effect of ethanol by increasing energy requirement to cope with ethanol and osmotic stress. However under aerobic conditions even though glycerol production of the mutant were lower and cellular maintenance energy requirement higher, the ethanol tolerance of the mutants was not reduced (Pagliardini, Hubmann et al. 2010). Also it is very likely that the reduction in ethanol tolerance is not only due to an increased energy requirement but also a reduced capacity to produce energy. Thus the maximum energy production rate were 66 mmol ATP.g_{DCW}⁻¹.h⁻¹ for the wild type and respectively 41 and 12 mmol ATP.g_{DCW}⁻¹.h⁻¹ for *TEFmut7* and *TEFmut2*. As for metabolic rearrangements observed in the cell, explanation of this reduced capacity to produce energy may hold in a shift of NADH/NAD⁺ ratio. Indeed an increased NADH/NAD⁺ ratio is known to impact negatively on glycolysis rate and thus on energy production of micro-organism under anaerobic conditions (Girbal and Soucaille 1994; Payot, Guedon et al. 1998). This reduced energy production rate together with the increased energy requirement due to the loss of glycerol protection may be responsible for the reduced tolerance to ethanol.

Fine-tuning of the glycerol synthesis pathway may lead to potential industrial application

Both mutants showed improved ethanol yields what could improve the profitability of ethanol production process. Though, these mutants also presented reduced kinetics, jeopardizing a potential industrial use. Indeed reduced kinetics of the mutants may be a major drawback for a traditional industrial production. A slow growth would not only decrease the productivity but also increase the risk of contamination by other micro-organisms.

However, despite the fact that the mutant strains *Tefmut2* and *Tefmut7* are not well suited for a classical ethanol production process they could be a good choice for a second generation process. Indeed, as non-alimentary ligno-cellulosic biomass is emerging as the main raw material to fulfill the growing demand of ethanol biofuel, production process have to be adapted to this new carbon source.

Obtained either from food crops residual parts, like straw, or non food culture, like wood, this biomass would mainly consist in highly branched cell-wall sugar. Using these sugars requires to use enzymatic hydrolysis to release fermentable monomeric sugars. To prevent contamination during the hydrolysis reaction the current trend is to develop simultaneous hydrolysis and fermentation

processes (SSF) in which sugar released in the medium would be directly consumed by the yeast reducing this way contamination phenomena. High cost of enzymes implies to work at low enzyme concentration and thus low hydrolysis rate. Therefore in those processes ethanol production becomes controlled by the enzymatic hydrolysis kinetics and not growth kinetics any longer. Therefore drawbacks of a slow growing strain would be alleviated as long growth matches enzymatic hydrolysis rate. It would indeed be possible to adjust the amount of enzymes according to the growth kinetics of the strain.

Another drawback of these modified strains is their lower final ethanol concentration. Indeed a reduced final ethanol titre would increase the cost of downstream ethanol recovery process. This latter point is particularly critical for the strain *Tefmut2* as its final ethanol concentration was at the limit minimal concentration required for process economical viability (8° Gay Lussac). However this study aimed to characterise the fermentative capacities and the kinetic of the strains in complete anaerobic conditions, though it is well known that the presence of even a very low oxygen concentration may widely improve viability of the biomass and its tolerance to ethanol (Alfenore, Cameleyre et al. 2004); thus it is expected that in absence of N₂ flush cells access to oxygen could be sufficient to improve the viability and ethanol tolerance with no major impact on ethanol yield.

VI.2.6 Conclusion:

Mutant strains fine-tuned for there glycerol synthesis capacities showed decreased glycerol yield and improved ethanol yield compared to the wild type strain in anaerobic fermentation. However contrarily to what was previously observed in aerobic VHEP fermentations the reduction of the glycerol yield also lead to severe reduction of the fermentation kinetics, the biomass viability and the final ethanol concentration reached. These differences lead to the conclusion that in anaerobic condition the mutant strains were not able to produce enough energy to face the osmotic stress linked to energy expenditure that was observed in aerobic condition. This reduced ability to increase their energy production could be attributed to a higher NADH/NAD⁺ ratio in the cell limiting the rate of glycolysis ATP production. Despite their drawbacks these mutants revealed promising opportunities for futur second generation ethanol production process.

Chapitre VII : ACIDES ORGANIQUES

Lors de la fermentation de *S. cerevisiae*, en condition aérobie comme en condition anaérobie, les acides organiques figurent parmi les principaux co-produits. La production de ces acides organiques est étroitement liée au métabolisme du glycérol. En effet, la production d'acides organiques par la cellule génère un excès de NADH qui doit être réoxydé à travers la voie métabolique du glycérol (Albers, Larsson et al. 1996). Il a ainsi été observé que des mutants produisant un excès de glycérol produisaient un excès d'acide acétique (Remize, Roustan et al. 1999). Au cours de nos fermentations, trois acides organiques ont pu être détectés dans les milieux de culture en quantités significatives: l'acide acétique, l'acide succinique et l'acide pyruvique.

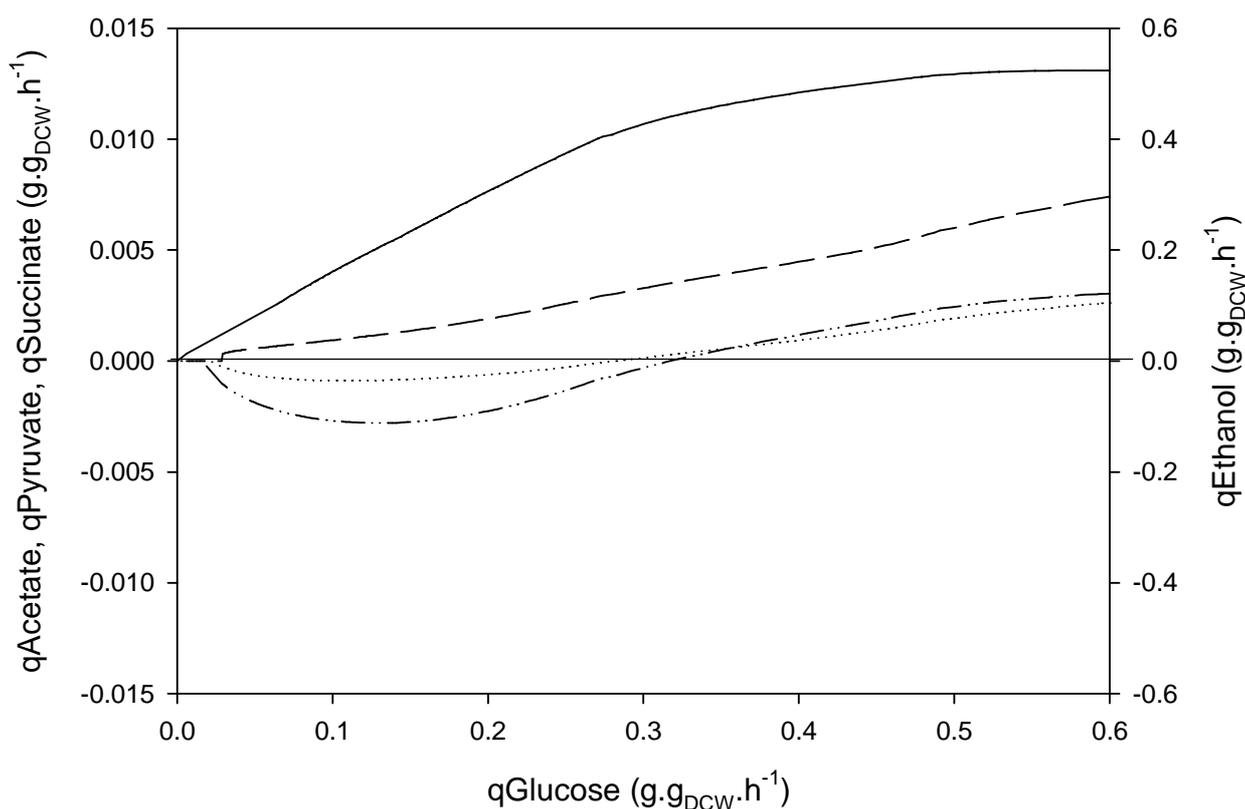


Figure VII-1 Evolution des vitesses spécifiques de production d'acétate (—), de succinate (.....), de pyruvate (-.-.-) et d'éthanol (- - -) en fonction de la vitesse spécifique de consommation de glucose, lors du ralentissement de la fermentation de la souche sauvage, en condition aérobie.

VII.1 Fermentation en condition aérobie

En condition aérobie, pour les trois souches, les productions de pyruvate et de succinate s'arrêtent après environ trente heures de fermentation, soit dix heures après la fin de la phase de croissance (cf. Figure VII-2). Aucune modification significative des rendements de production de ces deux acides n'a pu être observée entre la souche sauvage et les mutants. Les rendements acide succinique/glucose et acide pyruvique/glucose s'établissent respectivement à 0,003 g/g et 0,004 g/g, pour les trois souches, à la fin de la croissance (cf. Tableau VII-1). Après l'arrêt de la production, on constate que l'acide pyruvique présent dans le milieu de culture est reconstitué, ce phénomène de métabolisation de l'acide pyruvique en présence de fortes concentrations d'éthanol est connu (cf. discussion du chapitre). La masse d'acide succinique diminue, elle aussi, après l'arrêt de la production, mais dans une moindre mesure. Cette diminution pourrait aussi correspondre à une métabolisation, à travers le cycle de Krebs, bien que, à notre connaissance, ce phénomène n'ait pas été décrit.

Contrairement aux acides pyruvique et succinique, l'acide acétique est produit tout au long de la fermentation. Aucune modification significative de la production d'acide acétique n'a pu être observée entre les différentes souches. Ainsi, les rendements acide acétique/glucose, à la fin de la production d'éthanol, s'établissent à $0,017 \pm 0,001$ g.g⁻¹ pour la souche sauvage et respectivement à $0,016 \pm 0,001$ g.g⁻¹ et à $0,015 \pm 0,001$ g.g⁻¹ pour les souches *TEFmut7* et *TEFmut2* (cf. Tableau VII-1). A titre de comparaison, en utilisant la même souche sauvage, en mode discontinu, en condition aérobie, Gombert et al ont trouvé un rendement de 0,022 g/g. Pour les trois souches, même après la fin de la production d'éthanol, la sécrétion d'acide acétique dans le milieu perdure. Dans cette dernière phase, on peut observer que la diminution de la viabilité cellulaire semble corrélée à l'augmentation de la concentration en acide acétique (cf. Figure VII-3). Cette diminution de la viabilité, alors que la concentration en éthanol n'augmente plus, pourrait être liée à l'augmentation de la concentration en acide acétique, comme cela a déjà été évoqué par certains auteurs (Pampulha and Loureiro-Dias 1989; Ludovico, Sousa et al. 2001).

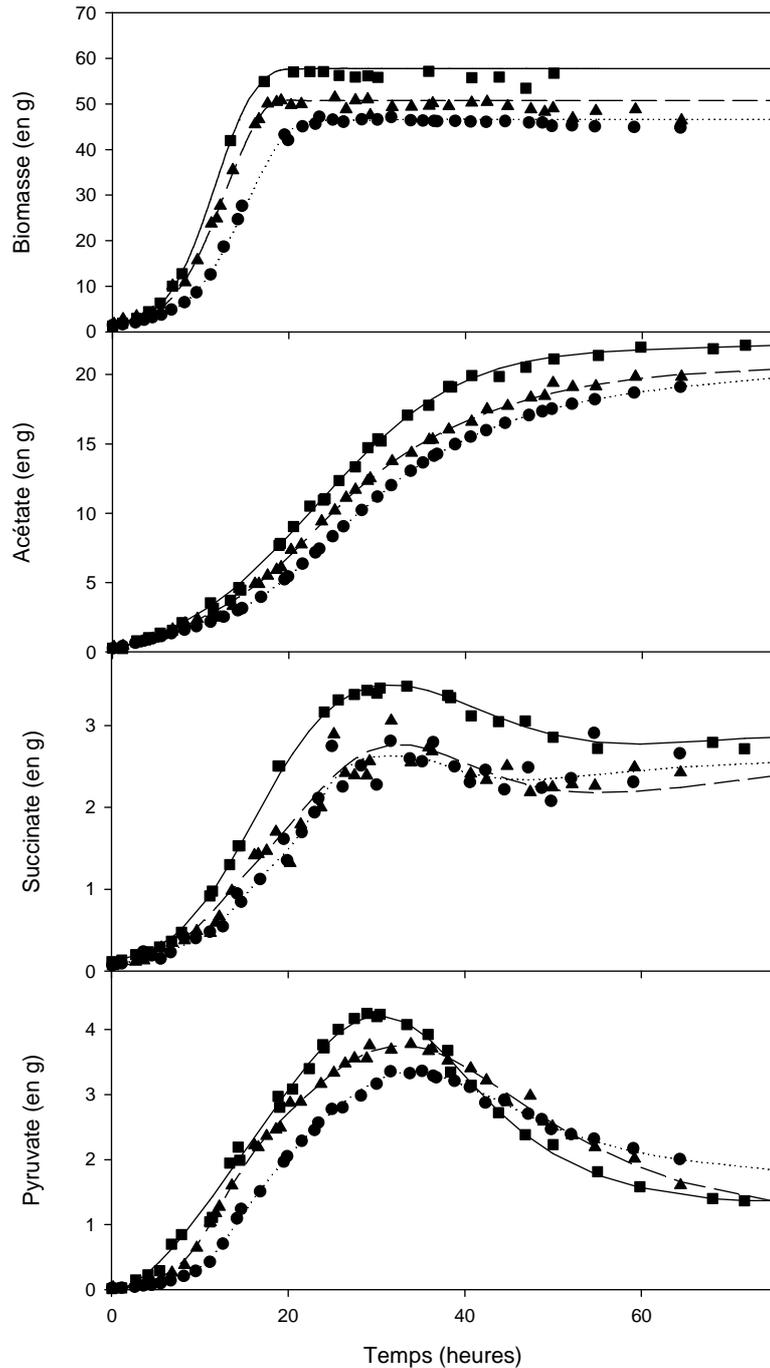


Figure VII-2 Evolution des masses d'acétate, de succinate, de pyruvate et de la biomasse au cours des fermentations, en condition aérobie, de la souche CEN.PK113-7D sauvage (■) et des souches mutantes *TEFmut7* (▲) et *TEFmut2* (●).

Les productions d'acides organiques sont couramment associées à des mécanismes de saturation des voies métaboliques. Ainsi, lorsque le flux glycolytique est trop élevé, les enzymes en aval de celui-ci seraient saturées, aboutissant à l'accumulation de métabolites intermédiaires et à leur sécrétion dans le milieu de culture (cf. Chapitre I). Dans nos expériences, en condition aérobie, la production d'acide succinique pourrait s'expliquer par la saturation de la succinate déshydrogénase, le flux d'entrée dans

le cycle de Krebs étant trop important pour cette enzyme. La production de pyruvate pourrait s'expliquer par la saturation des enzymes, pyruvate carboxylase, pyruvate décarboxylase et pyruvate déshydrogénase au niveau du nœud du pyruvate. Enfin, la production d'acétate pourrait s'expliquer par la saturation de l'acétyl-CoA synthétase.

Tableau VII-1 Rendements en acides organiques au cours des fermentations en condition aérobie

Rendements	WT	<i>TEFmut7</i>	<i>TEFmut2</i>
Acétate/Glucose ($g_{\text{Acétate}}/g_{\text{Glucose}}$) Fermentation Totale	0,017±0,001	0,016±0,001	0,015±0,001
Succinate/Glucose ($g_{\text{Succinate}}/g_{\text{Glucose}}$) Succinate /Biomasse ($g_{\text{Succinate}}/g_{\text{Biomasse}}$) Fin de la croissance	0,003 0,032	0,003 0,031	0,003 0,034
Pyruvate/Glucose ($g_{\text{Pyruvate}}/g_{\text{Glucose}}$) Pyruvate /Biomasse ($g_{\text{Pyruvate}}/g_{\text{Biomasse}}$) Fin de la croissance	0,004 0,051	0,004 0,051	0,004 0,051

Lors du ralentissement de la fermentation, dû à l'effet du stress éthanol, le flux glycolytique diminue progressivement. Durant cette phase, on observe aussi une diminution des vitesses spécifiques de production des acides organiques et de l'éthanol (cf. Figure VII-1). Les productions d'acide pyruvique et d'acide succinique s'arrêtent au même moment, après environ trente heures, pour une vitesse spécifique de consommation de glucose de 0,3 g.g_{DCW}.h⁻¹; puis, la production d'éthanol s'arrête après une durée de 50 à 55 heures, pour une vitesse spécifique de consommation de glucose de 0,03g.g_{DCW}.h⁻¹. La production d'acétate, en revanche, persiste jusqu'à l'arrêt de la consommation de glucose : elle perdure même après la fin de la production d'éthanol. La diminution de la production d'acide succinique pourrait s'expliquer par la désaturation de l'enzyme succinate déshydrogénase dans le cycle de Krebs. La diminution de la production d'acide pyruvique et sa métabolisation après les trente premières heures de culture pourraient s'expliquer par une désaturation des enzymes au niveau du carrefour du pyruvate. .

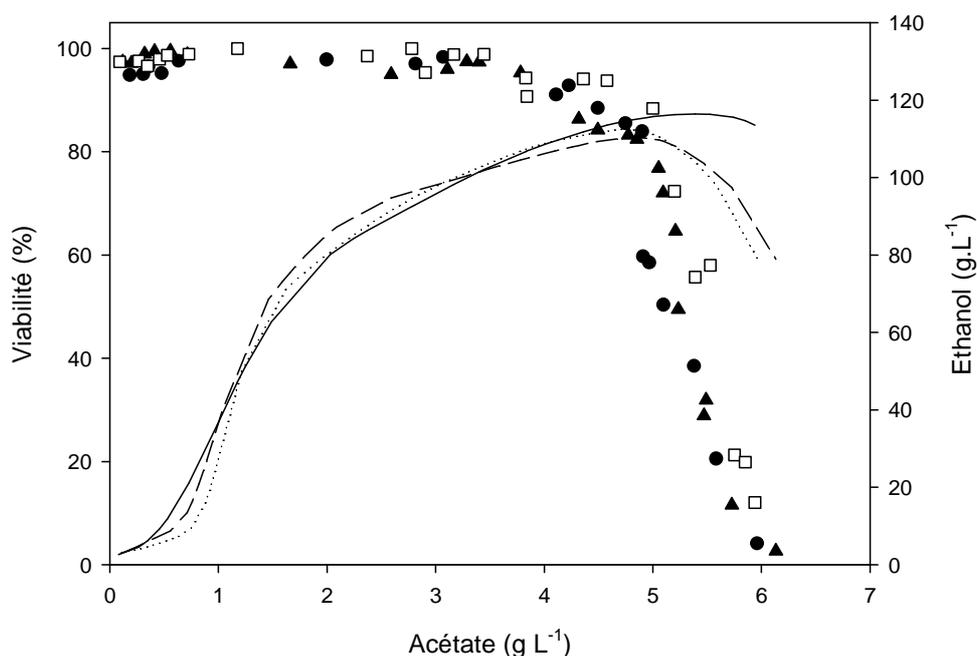


Figure VII-3 Evolution de la viabilité cellulaire, pour la souche sauvage (□) et les souches mutantes *TEFmut7* (▲) et *TEFmut2* (●), et de la concentration en éthanol, pour la souche sauvage (—) et les souches mutantes *TEFmut7* (- -) et *TEFmut2* (. . .), dans le milieu de culture en fonction de la concentration en acétate pour les fermentations en condition aérobie.

VII.2 Fermentation en condition anaérobie

VII.2.1 Souche sauvage

Chez la souche sauvage, aucune différence significative de rendement pyruvate et succinate n'a pu être observée entre les conditions aérobie et anaérobie, les rendements s'établissant respectivement à $0,004 \pm 0,001$ g_{Pyruvate}/g_{Glucose} et à $0,003 \pm 0,001$ g_{Succinate}/g_{Glucose}, en condition aérobie et à $0,003 \pm 0,001$ g_{Pyruvate}/g_{Glucose} et à $0,004 \pm 0,001$ g_{Succinate}/g_{Glucose}, en condition anaérobie (cf. Tableau VII-2). Comme en condition aérobie, un phénomène de métabolisation du pyruvate est observé, mais cette métabolisation démarre dès la fin de la croissance. Aucun phénomène de métabolisation du succinate n'est observé. Enfin, la production d'acide acétique est largement réduite par rapport à ce qui est observé en condition aérobie. Le rendement acétate, en condition anaérobie, s'élève à $0,005$ g_{Acétate}/g_{Glucose} contre $0,017$ g_{Acétate}/g_{Glucose} en condition aérobie, ce qui correspond à une réduction de 70 %.

VII.2.2 Souches mutantes

Contrairement à ce qui a été observé en condition aérobie, les productions d'acides organiques par les souches mutantes sont radicalement différentes de celles obtenues avec la souche sauvage. Ainsi, les mutants *TEFmut2* et *TEFmut7* présentent des productions d'acétate et de pyruvate drastiquement réduites par rapport à celles de la souche sauvage ; inversement, leur production de succinate est fortement augmentée.

Pour les mutants, l'acétate issu des précultures disparaît du milieu de culture (cf. Figure VII-4). Cette disparition de l'acétate correspond probablement à une métabolisation de l'acétate en acétyl-CoA, comme cela a été suggéré par Taherzadeh et al, en 1996 (Taherzadeh, Niklasson et al. 1997).

Après la disparition de l'acétate contenu initialement dans le milieu, celui-ci n'est plus détectable avant les dernières heures de la croissance. Lors de la fermentation de la souche *TEFmut7*, l'acétate est détecté à de faibles niveaux dans le milieu de culture après 30 heures et sa concentration augmente brutalement après 60 heures, à la fin de la croissance. Lors de la fermentation de la souche *TEFmut2*, seules des traces d'acétate apparaissent, dans les toutes dernières heures de la croissance. Une telle influence de la réduction du rendement glycérol sur la production d'acétate a déjà pu être observée (Bjorkqvist, Ansell et al. 1997; Xu, Cao et al. 2008; Zhang and Chen 2008).

Comme pour l'acétate, le pyruvate n'est apparu qu'à la fin de la croissance chez *TEFmut7* et dans les ultimes heures chez *TEFmut2*. Une réduction du rendement pyruvate, comme conséquence de la réduction de la production de glycérol, a déjà pu être observée dans d'autres expériences (Zhang, Kong et al. 2007; Zhang and Chen 2008).

Dans nos trois souches, comme en condition aérobie, la production de succinate est plus importante durant la phase de croissance. De plus une augmentation du rendement succinate a pu être observée chez les mutants. Ainsi, durant les premières heures de croissance, phase considérée pour l'estimation des rendements et durant laquelle ceux-ci varient peu (cf. Tableau VII-2), les rendements succinate/glucose des souches mutantes se sont établis respectivement à 0,013 et à 0,026 $\text{g}_{\text{succinate}}/\text{g}_{\text{glucose}}$ pour les souches *TEFmut 7* et *TEFmut 2* et à 0,004 $\text{g}_{\text{succinate}}/\text{g}_{\text{glucose}}$ pour la souche sauvage. Les rendements succinate/biomasse, durant cette phase de croissance, se sont établis à 0,22 $\text{g}_{\text{succinate}}\cdot\text{g}_{\text{biomass}}^{-1}$ pour la souche *TEFmut7* et à 0,43 $\text{g}_{\text{succinate}}\cdot\text{g}_{\text{biomass}}^{-1}$ pour la souche *TEFmut2*, contre 0,06 $\text{g}_{\text{succinate}}\cdot\text{g}_{\text{biomass}}^{-1}$ pour la souche sauvage.

L'augmentation du rendement succinate, consécutivement à la diminution de la production de glycérol, a déjà été observée dans d'autres expériences, mais dans une proportion moindre. Ainsi, en délétant le gène *GPD2*, Nissen a pu observer une augmentation du rendement succinate sur glucose de 0,003 $\text{g}_{\text{succinate}}/\text{g}_{\text{glucose}}$ à 0,007 $\text{g}_{\text{succinate}}/\text{g}_{\text{glucose}}$.

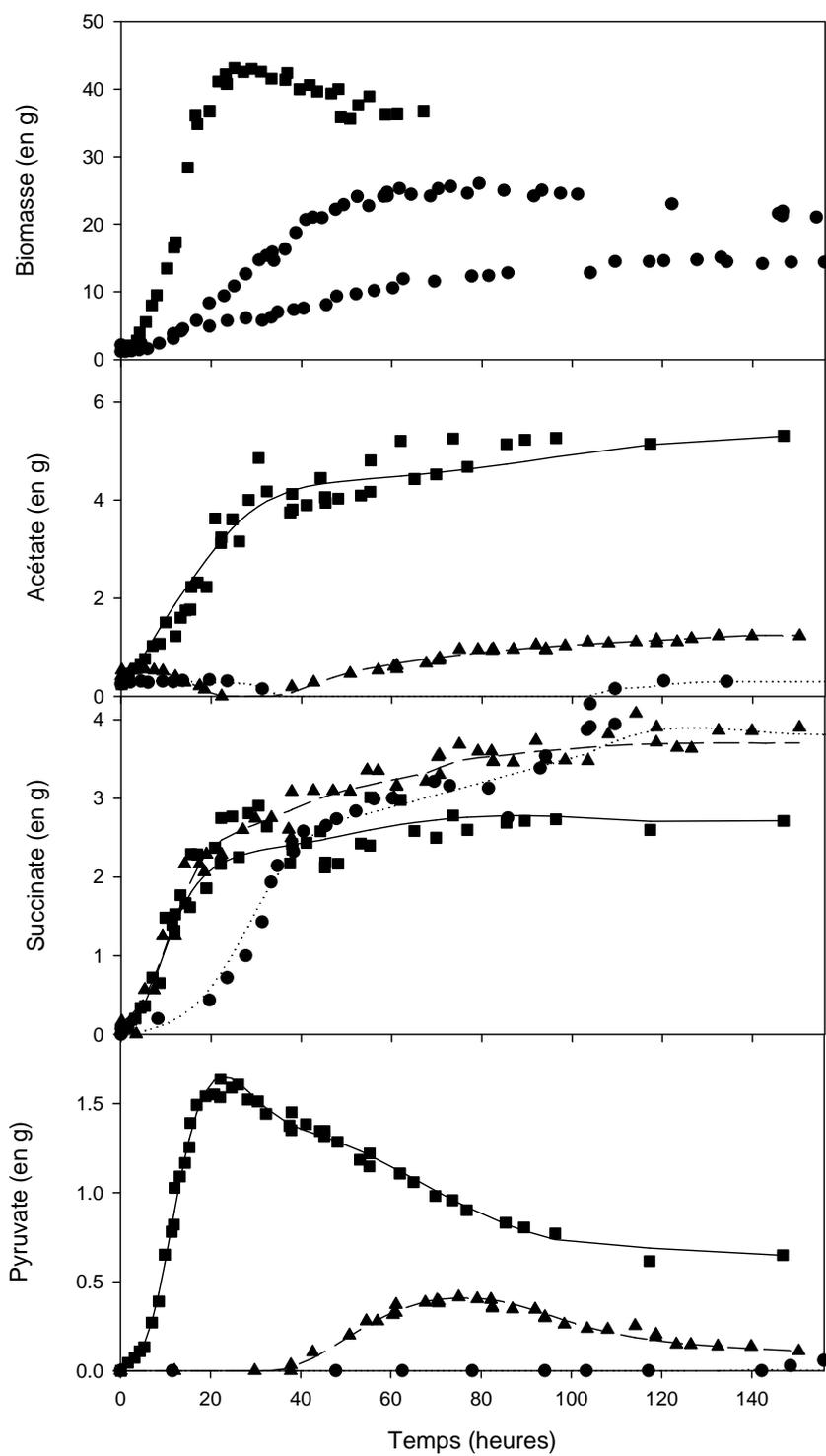


Figure VII-4 Evolution des masses d'acétate, de succinate et de pyruvate au cours des fermentations de la souche CEN.PK113-7D sauvage (■) et des fermentations des souches mutantes *TEFmut7* (▲) et *TEFmut2* (●) en condition anaérobie.

Tableau VII-2 : Rendements en acides organiques au cours des fermentations en condition anaérobie calculés sur la première phase de croissance pour laquelle les rendements varient peu

Rendements	WT	<i>TEFmut7</i>	<i>TEFmut2</i>
Acétate/Glucose ($g_{\text{Acétate}}/g_{\text{Glucose}}$) Acétate/Biomasse ($g_{\text{Acétate}}/g_{\text{Biomasse}}$)	0,005±0,001 0,06 [0-16h]	0 0 [0-30h]	0 0 [0-44h]
Succinate/Glucose ($g_{\text{Succinate}}/g_{\text{Glucose}}$) Succinate /Biomasse ($g_{\text{Succinate}}/g_{\text{Biomasse}}$)	0,004±0,001 0,06 [0-16h]	0,013±0,001 0,22 [0-30h]	0,026±0,001 0,43 [0-44h]
Pyruvate/Glucose ($g_{\text{Pyruvate}}/g_{\text{Biomasse}}$) Pyruvate /Biomasse ($g_{\text{Pyruvate}}/g_{\text{Biomasse}}$)	0,003±0,001 0,027 [0-16h]	0 0 [0-30h]	0 0 [0-44h]

VII.3 Accumulation intracellulaire des acides organiques

VII.3.1 Principe

Les acides organiques peuvent diffuser librement à travers la membrane des levures sous leur forme non dissociée, mais pas sous leur forme dissociée (cf. Chapitre I). A l'équilibre, les concentrations intracellulaire et extracellulaire de la forme non dissociée d'une espèce donnée d'acide sont identiques. Cependant, les pH intracellulaire et extracellulaire étant différents, le pourcentage de dissociation des acides n'est pas le même à l'extérieur et à l'intérieur de la cellule. Ainsi, si le pH intracellulaire est supérieur au pH extracellulaire, la forme dissociée d'un acide peut s'accumuler dans la cellule.

L'utilisation de la loi de Henderson-Hasselbach à l'extérieur de la cellule, associée à l'hypothèse d'équilibre de la forme non dissociée, permet, pour un acide donné, de calculer le facteur d'accumulation en fonction du pH intracellulaire (pHi) et du pH extracellulaire (pHe). Ainsi, pour un acide donné (AH/A⁻) de pH d'équilibre pKa1, on a:

Équation 1

$$pHe = pKai + \text{Log}\left(\frac{[A^-]_e}{[AH]_e}\right)$$

Équation 2

$$pHi = pKai + \text{Log}\left(\frac{[A^-]_i}{[AH]_i}\right)$$

Équation 3 $[AH]_i = [AH]_e$

Ces trois équations permettent de recalculer les facteurs d'accumulation F pour les trois acides principaux détectés dans notre milieu de culture en fonction du pH intracellulaire, en utilisant les deux équations suivantes (Equation 4 pour l'acide acétique et l'acide pyruvique et Equation 5 pour l'acide succinique).

Équation 4 $F = \frac{[A^-]_i + [AH]_i}{[A^-]_e + [AH]_e} = \frac{1 + 10^{(pH_i - pK_a)}}{1 + 10^{(pH_e - pK_a)}}$

Équation 5 $F = \frac{[A^-]_i + [AH]_i + [AH_2]_i}{[A^-]_e + [AH]_e + [AH_2]_e} = \frac{(1 + 10^{(pH_i - pK_{a1})}) + 10^{(2 * pH_i - pK_{a1} - pK_{a2})}}{1 + 10^{(pH_e - pK_{a1})} + 10^{(2 * pH_e - pK_{a1} - pK_{a2})}}$

Le facteur d'accumulation d'un acide organique dépend des pH intracellulaire et extracellulaire et du pKa caractéristique de cet acide. Au cours de la fermentation alcoolique, la plupart des auteurs considèrent que le pH intracellulaire est régulé entre 6,5 et 7 (cf. Chapitre I); pour ces valeurs de pH_i, lorsque le pH extracellulaire est régulé à 4, les facteurs d'accumulation des acides, calculés à l'aide de la méthode décrite, sont très importants (cf. Tableau VII-3). Cependant, les facteurs d'accumulation chutent rapidement à des pH intracellulaires moins élevés (cf. Figure VII-5).

Tableau VII-3 Facteurs d'accumulation intracellulaire de l'acétate, du pyruvate et du succinate pour un pH intracellulaire, respectivement de 7 et de 6,5, le pH extracellulaire étant régulé à 4

Acide Organique	Acide Acétique	Acide Pyruvique	Acide Succinique
pKa	4,76	2,49	4,21/5,64
Accumulation Intracellulaire à pH 7	155	970	9040
Accumulation Intracellulaire à pH 6,5	50	143	986

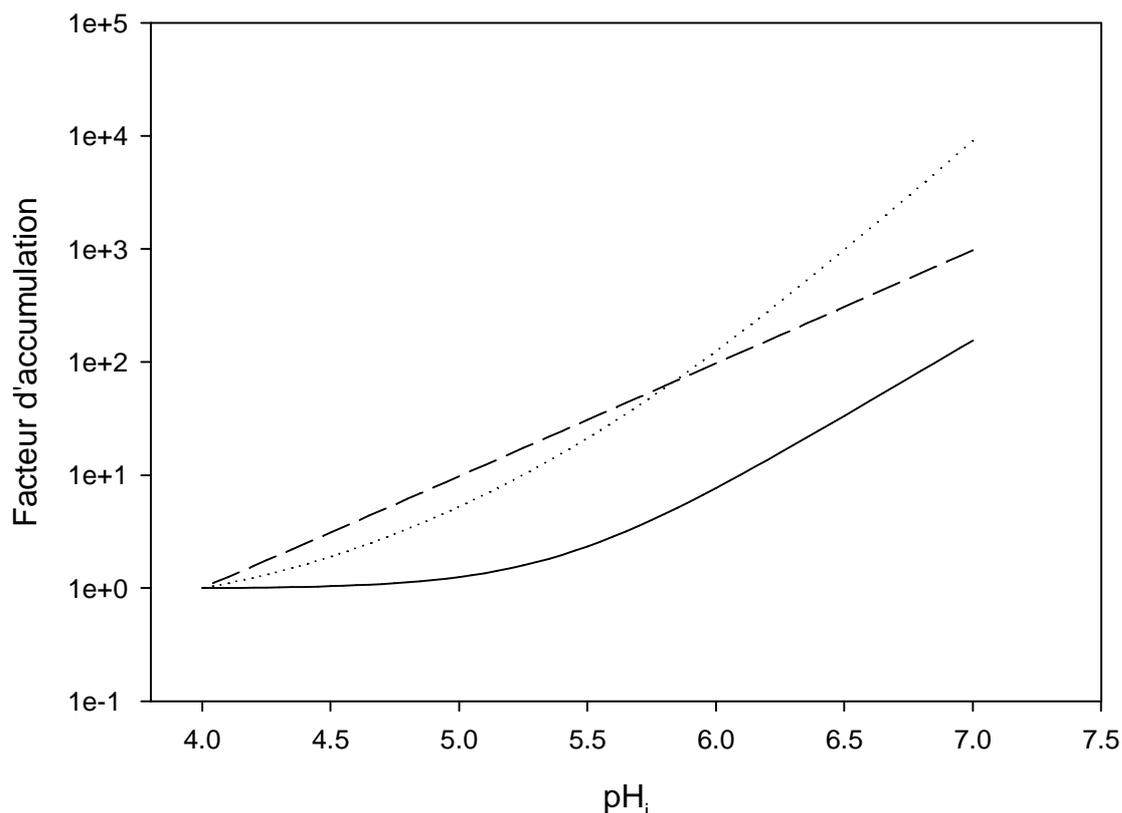


Figure VII-5 Evolution théorique des facteurs d'accumulation du succinate (...), du pyruvate (---) et de l'acétate (___) en fonction du pH intracellulaire, pour un pH extracellulaire réglé à 4

VII.3.2 Limite de la théorie:

La loi de Henderson-Hasselbach est une approximation assimilant l'activité des molécules à leurs concentrations. Cette approximation n'est valide que pour des solutions suffisamment diluées, lorsque les interactions entre les molécules en solution dans le solvant sont faibles et pour lesquelles on peut considérer que les coefficients d'activité ionique sont proches de 1. Les coefficients d'activité ionique, et donc les coefficients d'activité, décrivent l'écart d'une solution par rapport à l'idéalité, cet écart étant dû aux interactions entre les molécules de la solution. Lorsque les concentrations en ions des solutions sont trop élevées, les interactions ioniques augmentent, les coefficients d'activité ionique diminuent et s'écartent de 1. Dans les solutions concentrées, il est donc nécessaire de remplacer, pour

les calculs d'équilibre, les concentrations des différentes espèces par leur activité, qui décrit la quantité de molécules véritablement disponibles pour participer aux réactions (cf. équation 6).

Équation 6 $a_x = m_x * \gamma_x$

a_x : Activité de la molécule x

m_x : Molalité de la molécule x

γ_x : Activité ionique de la molécule x

Les milieux intracellulaire et extracellulaire étant très concentrés en ions lors de nos fermentations, l'utilisation de la loi de Henderson-Hasselbach est susceptible de considérablement biaiser l'estimation des pourcentages de dissociation des acides organiques. Ceci est particulièrement vrai pour le milieu intracellulaire, dans lequel les concentrations ioniques sont très élevées. Un calcul plus précis pourrait être effectué en utilisant le modèle de Debye-Hückel pour le calcul des activités ioniques ; cependant, la composition du milieu intracellulaire n'étant pas connue, ce calcul n'est pas possible.

VII.3.3 Résultats expérimentaux

La différence de composition, entre les milieux intracellulaire et extracellulaire, pour les principaux métabolites a été étudiée en condition anaérobie, pour la souche sauvage et les deux souches mutantes. Pour cela, la composition du surnageant seul a été comparée à la composition du mélange surnageant/milieu intracellulaire (cf. Matériel et méthode). Les concentrations des acides organiques ont été mesurées à l'aide d'une HPLC. Une différence de concentration entre les deux groupes d'échantillons peut être considérée comme significative au-delà de 0,1 g/L. La comparaison des surnageants et des mélanges surnageants/milieu intracellulaire pour les trois souches n'a pas permis d'observer de différence significative de concentration, pour les trois acides organiques considérés (cf. Figure VII-6). Cependant, les calculs théoriques basés sur l'hypothèse d'un pH régulé à 6,5 indiquent que des différences de concentration entre les solutions comparées devraient être détectées très rapidement, dès les premières heures de fermentation (cf. Figure VII-6), ce qui ne correspond pas aux résultats. Ces résultats permettent de conclure que l'accumulation intracellulaire des acides

organiques est peu importante dans nos conditions de fermentation et qu'elle est largement inférieure à ce qui avait été envisagé.

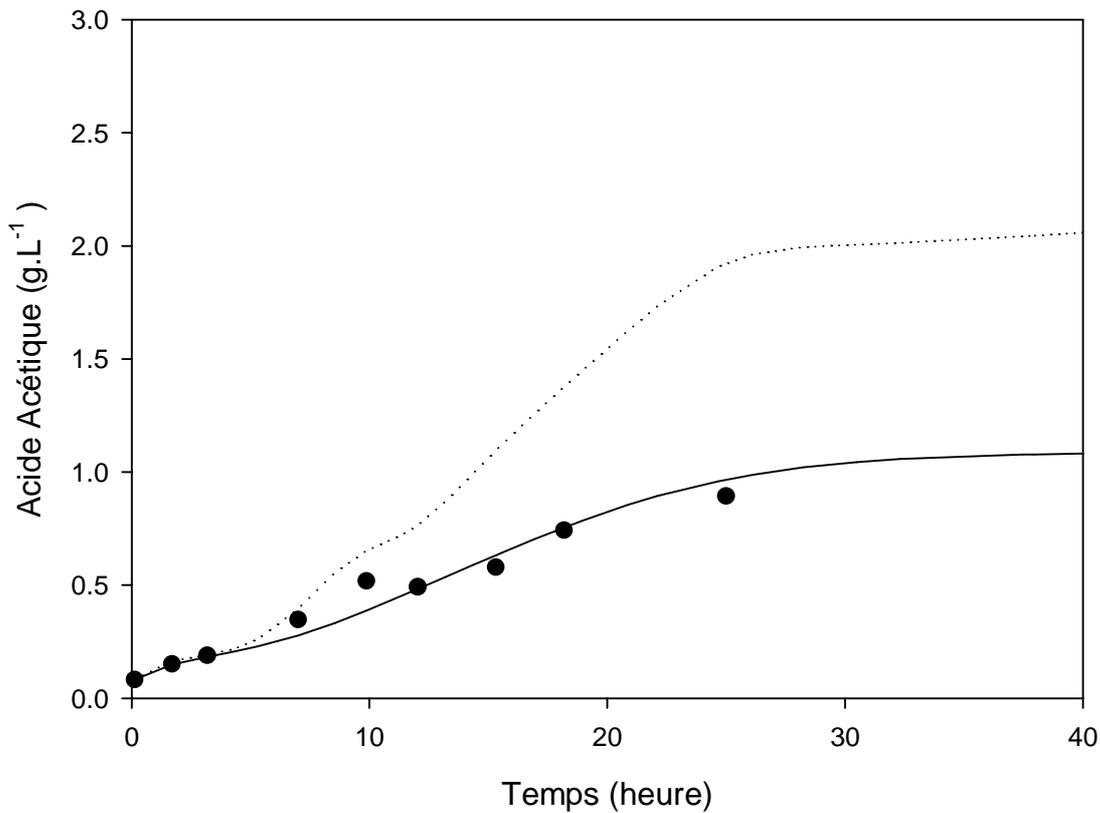


Figure VII-6 Evolution de la concentration d'acide acétique

dans le cas de la souche sauvage, en condition anaérobie: concentration d'acide acétique extracellulaire observée dans le milieu de culture (—) , concentration totale (intracellulaire + extracellulaire) théorique (....) qui devrait être dosée pour un pHi réglé à 6,5, après extraction de l'acétate accumulé dans les cellules, et concentration totale mesurée expérimentalement (•).

VII.3.4 Interprétation

Plusieurs hypothèses peuvent permettre d'expliquer la différence entre les résultats observés et les calculs théoriques : d'une part, les phénomènes de transport actif peuvent contribuer à réduire la concentration en acides organiques dissociés dans les cellules ; d'autre part, il est possible que le pH

diminue en fin de croissance ; enfin, l'utilisation de la loi Henderson-Hasselbach pourrait conduire à une large surestimation du pourcentage de dissociation des acides organiques intracellulaires (cf. I.3.2).

VII.3.4.1 Phénomènes de transport

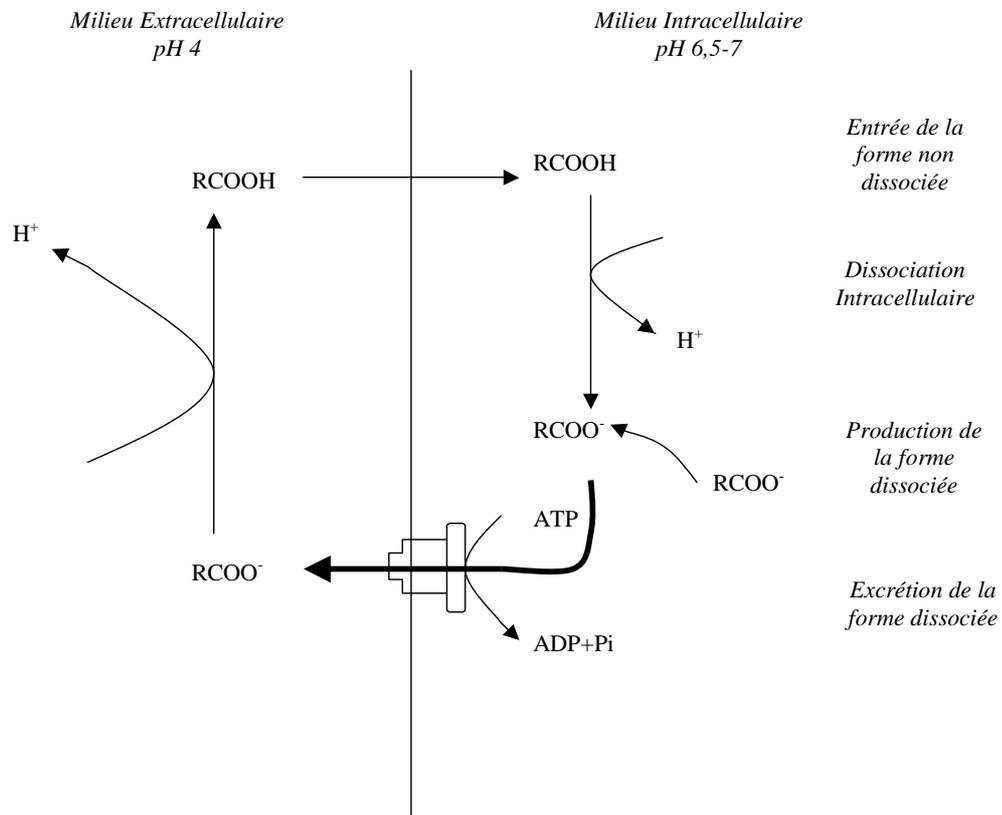
La faible accumulation intracellulaire des acides organiques observée lors de nos expériences peut partiellement s'expliquer par l'équilibre entre les acides organiques produits, les acides organiques exportés hors de la cellule et les acides organiques entrant dans la cellule. Contrairement aux expériences classiquement décrites dans la littérature, où un acide organique exogène est ajouté dans le milieu de culture, pénètre massivement dans la cellule et s'y accumule, il s'agit ici d'étudier l'accumulation des acides organiques issus du métabolisme cellulaire. Il est possible que, dans ces conditions, les phénomènes de transport soient régulés pour réduire l'accumulation intracellulaire.

Le pH intracellulaire étant normalement régulé entre 6,5 et 7 (cf. Chapitre I) le pyruvate, le succinate et l'acétate sont majoritairement produits sous leur forme dissociée et la fraction d'acide non dissocié, pouvant diffuser librement à travers la paroi cellulaire, est très faible dans le cytosol. L'excrétion des acides vers l'extérieur de la cellule se fait donc probablement à travers des transporteurs actifs.

En revanche, le pH extracellulaire étant inférieur au pH intracellulaire, la proportion d'acide organique non dissocié est plus importante à l'extérieur de la cellule. Si la concentration en acide organique du milieu intracellulaire est égale ou inférieure à celle du milieu extracellulaire, la concentration de la forme non dissociée est plus faible dans le milieu intracellulaire. Or, les concentrations en acide non dissocié des milieux intracellulaire et extracellulaire ayant tendance à s'équilibrer par diffusion, un flux entrant d'acides organiques se met en place. Si les capacités de sécrétion des acides organiques de la cellule sont suffisamment importantes pour compenser, à la fois, la production d'acides par le métabolisme et le flux entrant de la forme non dissociée, l'activité des transporteurs peut empêcher l'accumulation des acides organiques dans le cytosol (cf. Figure VII-7).

Les trois acides organiques considérés étant fortement dissociés à l'intérieur de la cellule, leurs flux entrants dépendent principalement de la concentration du milieu extracellulaire de la forme non dissociée et de sa capacité à diffuser à travers la membrane. Ainsi, dans le cas du pyruvate, seulement

3 % du pyruvate du milieu extracellulaire se trouve sous forme non dissociée ; le flux entrant est donc probablement très faible.



FigureVII-7 Mécanisme pouvant permettre la diminution de la concentration intracellulaire de la forme dissociée des acides organiques

VII.3.4.2 Régulation du pH_i

Les valeurs élevées des facteurs d'accumulation calculées indiquent que l'accumulation des acides organiques dans le milieu pourrait rapidement poser un problème de pression osmotique dans les cellules. Cet effet est encore accentué par l'accumulation d'ions potassium K⁺ nécessaires pour contrebalancer les charges négatives des acides organiques dissociés et, ainsi, maintenir le potentiel membranaire (cf. Chapitre I). Cependant, plusieurs auteurs ont suggéré que, lors de l'accumulation des acides organiques, le pH intracellulaire diminue (Valle, Bergillos et al. 1986; Pampulha and Loureiro-Dias 1989; Taipa, Cabral et al. 1993; Taherzadeh, Niklasson et al. 1997). La diminution du pH intracellulaire permettrait de réduire les facteurs d'accumulation des acides organiques (cf. Figure VII-5). La possibilité que le pH intracellulaire des micro-organismes soit diminué afin de minimiser

L'accumulation intracellulaire des acides organiques, pour ne pas perturber la pression de turgescence, a été envisagée par Simoes et ses collaborateurs (Ardaillon Simoes 1994).

VII.3.5 Conclusion

L'analyse de la différence entre le milieu extracellulaire seul et le mélange des milieux intracellulaire et extracellulaire n'a pas permis d'observer une accumulation significative des acides organiques dans le milieu intracellulaire. L'explication la plus vraisemblable est que, dans nos conditions de culture, les mécanismes d'excrétion des acides organiques intracellulaires sont suffisamment efficaces pour limiter cette accumulation qui reste sous le seuil de détection.

VII.4 Discussion

VII.4.1 Impact de l'ajustement de la voie de synthèse du glycérol sur la production d'acides organiques

En condition aérobie, la modification de la voie de production du glycérol n'a eu aucune influence significative sur la production des acides organiques au cours de nos fermentations. Les souches mutantes présentent des cinétiques très proches de la souche sauvage. Les mêmes phénomènes d'overflow que ceux observés chez la souche sauvage apparaissent, aboutissant à des productions d'acides organiques comparables à celles observées pour la souche sauvage. En condition anaérobie, en revanche, les profils et les rendements de production d'acides organiques sont profondément modifiés chez les mutants. Ces différences de comportement peuvent s'expliquer par une réorganisation des flux métaboliques, liée à la diminution de la capacité des souches à produire du glycérol et donc à réoxyder le NADH.

Ainsi, en condition aérobie, la présence d'oxygène permet aux mutants de compenser la limitation de la réoxydation du NADH, à travers la voie de synthèse du glycérol ; les mutants présentent ainsi des comportements proches du comportement de la souche sauvage. En condition anaérobie, en l'absence d'un accepteur exogène d'électrons, les flux métaboliques dans les souches mutantes sont limités par leur capacité à réoxyder le NADH. Ces modifications sont probablement liées à une augmentation du ratio NADH/NAD⁺ dans la cellule, défavorisant les réactions productrices de NADH. Ainsi, l'augmentation du ratio NADH/NAD⁺ est connue pour avoir un effet inhibiteur sur l'enzyme glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase et ainsi limiter le flux glycolytique (Girbal and

Soucaille 1994; Payot, Guedon et al. 1998). Cette limitation de la glycolyse entraînerait une réduction du phénomène de saturation observé au niveau du noeud du pyruvate lorsque le flux glycolytique est trop important. Cette désaturation des enzymes du noeud du pyruvate pourrait expliquer la réduction du rendement pyruvate, observée pendant la phase de croissance. De la même façon, la modification du ratio $NADH/NAD^+$ peut expliquer la réduction du rendement acétate. En effet, l'acétate est principalement produit par l'enzyme acétaldéhyde déshydrogénase, la production d'une mole d'acétate générant une mole de $NADH$ ou une mole de $NADPH$. L'augmentation du ratio $NADH/NAD^+$ pourrait ainsi défavoriser la conversion de l'acétaldéhyde en acétate et, au contraire, favoriser la conversion de l'acétaldéhyde en éthanol, cette réaction étant consommatrice de $NADH$ (cf. Figure VII-8). Une telle réorientation du flux de carbone de l'acétate vers l'éthanol, en raison d'une augmentation du ratio $NADH/NAD^+$, a déjà été observée chez *Escherichia coli* (Berríos-Rivera, Bennett et al. 2002). La production d'acétate étant limitée chez les mutants, tout l'acétate produit serait converti en acétyl-CoA pour les besoins de la croissance, ce qui expliquerait qu'aucune accumulation d'acide acétique n'apparaisse dans le milieu de culture. Une production trop faible d'acide acétique pourrait limiter la production d'acétyl-CoA et contribuer à expliquer la limitation du taux de croissance.

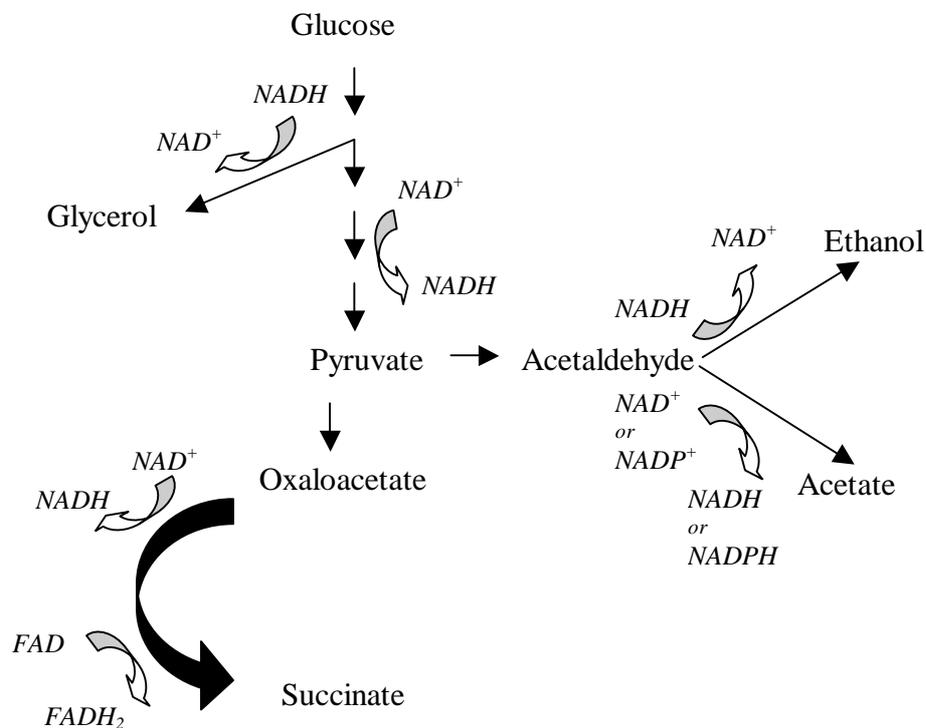


Figure VII-8 Lien entre les productions d'acides organiques et le métabolisme oxydo-réductif.

L'apparition d'acide acétique dans le milieu de culture, à la fin de la croissance, chez les souches mutantes pourrait s'expliquer par l'arrêt de la production d'acétyl-CoA. De même, la diminution de l'utilisation du pyruvate pour les besoins anaboliques entraînerait l'accumulation de pyruvate, ce qui expliquerait l'apparition de pyruvate dans le milieu de culture chez *TEFmut2* et *TEFmut7*, à la fin de la croissance. Après la fin de la croissance, chez *TEFmut7*, on observe que la production de pyruvate cesse rapidement et le pyruvate est réabsorbé, comme cela a été observé chez les trois souches en condition aérobie et chez la souche sauvage en condition anaérobie. La diminution et l'arrêt de la production de pyruvate s'expliqueraient, en outre, aussi, par un réajustement du flux glycolytique aux nouveaux besoins de la souche. Ce phénomène n'a pu être observé chez *TEFmut2*, du fait de l'arrêt rapide de la fermentation après la fin de la croissance.

L'augmentation du rendement succinate pourrait être due à une réorganisation du métabolisme, liée à la diminution de la production de glycérol. En effet, il est communément admis que, en condition anaérobie, le cycle de Krebs ne fonctionne pas comme un cycle, mais comme deux branches distinctes : la branche oxydative et la branche réductive (Atzpodien, Gancedo et al. 1968; Chapman and Bartley 1968; Sols, Gancedo et al. 1971). Dans ces conditions, l'essentiel du succinate est produit à travers la branche réductive du cycle, l'enzyme mitochondriale fumarase permettant la réduction du fumarate en succinate (Camarasa, Faucet et al. 2007). En supposant que du pyruvate soit changé en oxaloacétate, lui-même converti par la suite en fumarate, puis réduit en succinate, la production d'une mole de succinate à partir du pyruvate oxyderait une mole de NADH et une mole de FADH₂ (cf. Figure VII-8). La production d'une mole de succinate à partir de glucose réoxyderait donc une mole de FADH₂. La possibilité que la production de succinate permette à la cellule d'équilibrer son bilan oxydo-réductif a été envisagée par Arikawa et al (Arikawa, Enomoto et al. 1998). Ceci pourrait expliquer l'augmentation du rendement succinate, observée chez les mutants *TEFmut 7* et *TEFmut 2*. Cependant, à ce jour, aucune réaction ne permettant la réduction de flavine oxydée par le NADH n'est connue chez *S. cerevisiae* (Camarasa, Faucet et al. 2007). Aussi, pour Camarasa, la production de succinate sert seulement à réoxyder les flavines réduites, issues des voies de synthèse de la biomasse. Les causes de l'augmentation du rendement succinate restent donc peu claires.

VII.4.2 Reconsommation des acides organiques

La réabsorption de l'acide pyruvique est un phénomène connu dans la préparation du saké. Ainsi, lors de la préparation de cette boisson, la concentration en acide pyruvique augmente dans les premières heures de la fermentation, puis diminue du fait de sa réabsorption (Akita, Nishimori et al. 2000); de plus, l'ajout d'éthanol dans le stade final, pour la fortification du saké, provoque une

réabsorption brutale de l'acide pyruvique restant dans le milieu (Doi, Miyauchi et al. 1974). En 2000, Sato et al ont pu montrer que ce phénomène de réinternalisation de l'acide pyruvique était accompagné d'une augmentation de la concentration en pyruvate intracellulaire, ainsi que d'une augmentation de la production d'acétaldéhyde (Sato, Yoshida et al. 2000). L'origine de ce phénomène de réabsorption de l'acide pyruvique n'est pas claire : il s'agit, pour certains auteurs, d'un phénomène passif lié à la perméabilisation de la membrane cellulaire par la concentration élevée en éthanol (Mizoguchi and Hara 1995), tandis que, pour d'autres, il s'agit d'un transport actif à travers des transporteurs, normalement soumis à la répression glucose, mais qui, au-delà d'une certaine quantité d'éthanol, retrouveraient leur activité (Akita, Nishimori et al. 2000; Tsuboi, Wakisaka et al. 2003). Dans nos expériences, le même phénomène de réabsorption de l'acide pyruvique est observable avec les trois souches en condition aérobie et, également, avec la souche sauvage en condition anaérobie. En condition aérobie, la réabsorption du pyruvate démarre, pour les trois souches, quelques heures après la fin de la croissance, pour une concentration en éthanol de $105 \text{ g.L}^{-1} \pm 2 \text{ g.L}^{-1}$; en condition anaérobie, la réabsorption du pyruvate par la souche sauvage commence pour une concentration en éthanol avoisinant les $90 \text{ g.L}^{-1} \pm 2 \text{ g.L}^{-1}$ et correspond à la fin de la phase de croissance.

Contrairement au pyruvate, pour le succinate, aucune réabsorption n'a pu être observée après l'arrêt de la production, en condition anaérobie, le succinate restant dans le milieu jusqu'à la fin de la fermentation. Cependant, en condition aérobie, une légère diminution de la masse de succinate présente dans le milieu de culture est observée après l'arrêt de sa production. Cette diminution pourrait indiquer qu'une partie du succinate est peut-être reconsommée en condition aérobie.

La possibilité que l'acétate, présent dans le milieu de culture, soit consommé et utilisé pour la production d'acétyl-CoA a été évoquée par Taherzadeh et ses collaborateurs (Taherzadeh, Niklasson et al. 1997). Dans nos fermentations, le phénomène de réabsorption de l'acétate a pu être observé chez les deux mutants en condition anaérobie. Cette réabsorption peut permettre à la cellule de produire de l'acétyl-coA, à partir de l'acétate extra-cellulaire sans générer de cofacteur réduit NADH ou NADPH. Cet acétate pourrait aussi être réduit en acétaldéhyde en consommant du NADH ou du NADPH.

VII.4.3 Origine de l'acide acétique

L'acétate est majoritairement produit à travers l'acétaldéhyde déshydrogénase. Plusieurs isoformes de cette enzyme existent, à la fois dans le cytosol et la mitochondrie (Cf chapitre I...). Ces enzymes se distinguent entre elles par le cofacteur qu'elles utilisent, NAD^+ ou NADP^+ . La littérature indique que l'acétate est majoritairement produit par l'acétaldéhyde NADPH dépendante; la production d'acétate servirait ainsi à fournir une partie du NADPH, nécessaire à la croissance, aussi

bien dans le cytosol que dans la mitochondrie (Saint-Prix, Bonquist et al. 2004). Ce mode de production a été retenu pour notre modèle métabolique, dans lequel les voies de production de l'acétate NADPH dépendante ont été insérées. Cependant, le fait que cette enzyme soit majoritairement NADPH dépendante s'accorde mal avec le fait que la production d'acide acétique se soit maintenue après l'arrêt de la croissance lors de nos fermentations. Ainsi, avec la diminution du taux de croissance, puis avec l'arrêt total de la croissance, le flux de production d'acide acétique génère une production de NADPH dans la cellule, qui devient supérieure aux besoins anaboliques. Dans les calculs de flux, effectués en utilisant notre modèle métabolique, durant la phase de production et en fin de croissance, l'excès de NADPH produit à travers la voie de l'acétate est réoxydé par l'inversion du flux de la voie des pentoses phosphates (cf. Figure VII-9). Les deux formes de l'enzyme étant présentes dans la cellule, il est possible que, lors de la diminution du taux de croissance, la proportion d'acide acétique produite par la voie NADPH dépendante diminue face à la proportion d'acétate produite par la voie NADH dépendante.

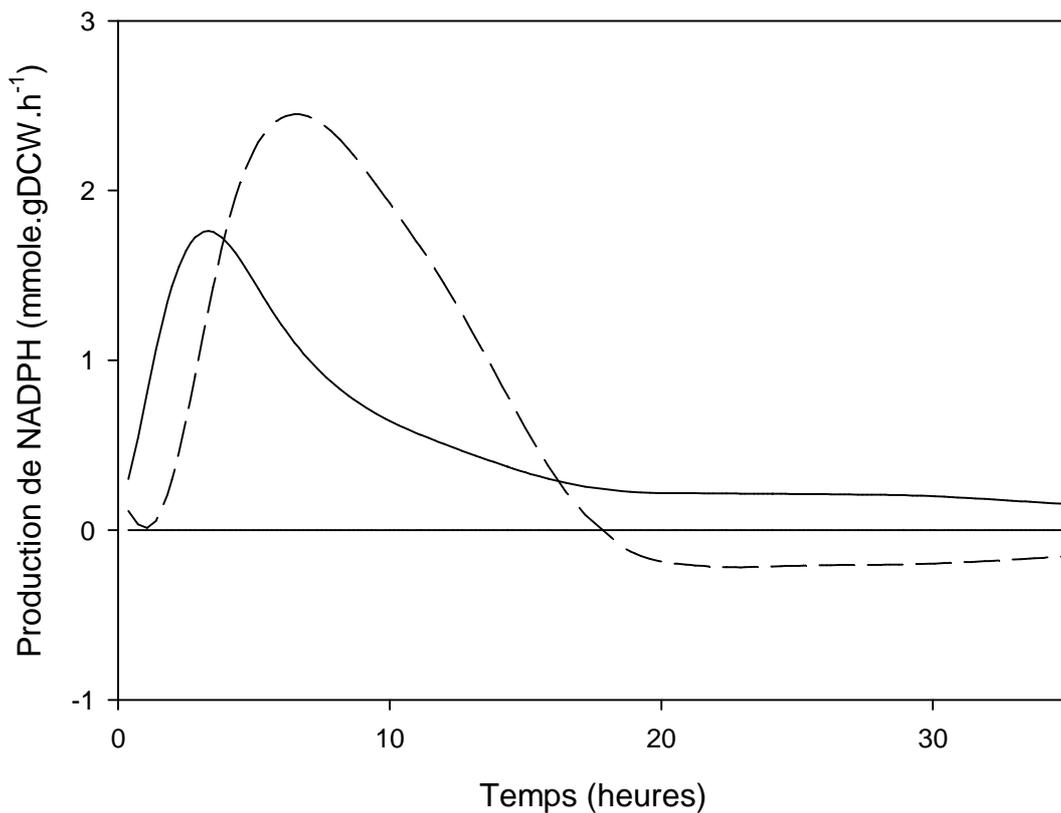


Figure VII-9 Flux calculés, correspondant aux productions de NADPH pour la voie des pentoses phosphates (- - -) et pour la voie de l'acide acétique (—), au cours de la fermentation de la souche sauvage en condition aérobie.

VII.4.4 Effet inhibiteur de l'acide acétique

L'acide acétique est connu pour avoir un effet nocif sur *S. cerevisiae*. Ainsi, l'acide acétique pourrait avoir un effet inhibiteur sur la croissance dès $0,05 \text{ g L}^{-1}$ (Narendranath, Thomas et al. 2001). Cependant, l'impact négatif de l'acide acétique est étroitement lié au pH du milieu de culture. Taherzadeh et al ont montré, en 1996, qu'une concentration de 5 g.L^{-1} de la forme dissociée de l'acide inhibe totalement la croissance (Taherzadeh, Niklasson et al. 1997). L'arrêt de la croissance, lors des fermentations aérobies de la souche sauvage et des deux mutants, intervient pour des concentrations en acide acétique de $1,8 \text{ g L}^{-1}$ à 2 g.L^{-1} , ce qui correspond à des concentrations de $1,5$ à $1,7 \text{ g L}^{-1}$ de la forme non dissociée, et une concentration en éthanol aux alentours de 87 g.L^{-1} . En condition anaérobie, chez la souche sauvage, l'arrêt de la croissance intervient pour une concentration en acide acétique de 1 g.L^{-1} et une concentration en éthanol de 90 g.L^{-1} . La production d'acide acétique, plus importante en condition aérobie, ne semble donc pas affecter de façon significative la concentration critique en éthanol correspondant à l'arrêt de la croissance. Cependant, après l'arrêt de la production d'éthanol, la concentration d'acétate dans le milieu continue à augmenter, tandis que la concentration en éthanol dans le milieu diminue, sous l'effet de l'évaporation. En parallèle, la viabilité de la biomasse diminue. L'observation de la diminution de viabilité de la biomasse, en fonction de la concentration en acide acétique dans le milieu, semble indiquer l'existence d'une corrélation entre les deux phénomènes. Par ailleurs, le fait que l'arrêt de la production d'éthanol, chez la souche sauvage, intervienne pour des concentrations en éthanol plus faibles en condition aérobie qu'en condition anaérobie, va à l'encontre de l'effet protecteur de la présence d'oxygène décrit dans la bibliographie (Alfenore, Cameleyre et al. 2004) : cela pourrait aussi être lié à l'importance de la production d'acétate.

VII.4.5 Lien entre les acides organiques et la balance redox

VII.4.5.1 Différence entre la production d'acide acétique en condition aérobie et en condition anaérobie

Chez la souche sauvage, la production d'acide acétique observée en condition aérobie est largement supérieure à celle observée en condition anaérobie. Ainsi, le rendement en acide acétique durant la phase de croissance est 4,3 fois supérieur en condition aérobie; à titre de comparaison, Alfenore et al ont trouvé, en condition aérobie, un rendement acétate 4,5 fois supérieur à celui obtenu en condition microaérobie (Alfenore, Cameleyre et al. 2004). Ce rendement plus faible en acide acétique, en condition anaérobie, pourrait s'expliquer par une capacité moindre de réoxydation du NADH.

Ainsi, en condition anaérobie ou en microaérobie, les faibles capacités de réoxydation du NADH dans les cellules, peuvent avoir un effet limitant sur la production d'acide acétique; en présence d'oxygène, les capacités de réoxydation du NADH étant largement accrues, la production d'acétate peut être favorisée par un ratio NADH/NAD⁺ moins important.

Le contrôle de la production de NADH par la capacité des souches à réoxyder le NADH est connu chez les levures du genre *Brettanomyces*. Ces levures sont incapables de produire du glycérol et ont tendance à produire beaucoup d'acétate (Wijsman, Dijken et al. 1984). Dans ces levures, l'augmentation de la disponibilité de l'oxygène dans le milieu se traduit par une augmentation de la production d'acétate (Aguilar Uscanga, Délia et al. 2003).

VII.4.5.2 Bilan redox en condition anaérobie

Le glycérol permet de réoxyder le NADH produit à la fois par la biomasse et les productions d'acides organiques. Les modifications observées pour les productions des acides organiques permettent, en partie, d'expliquer la diminution du rendement glycérol/biomasse observée (cf. Figure VII-10).

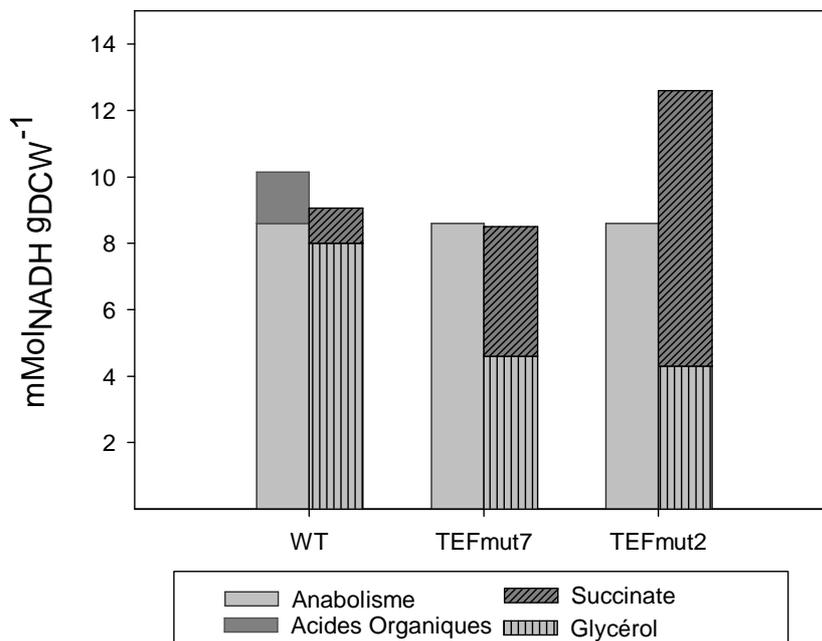


Figure VII-10: NADH généré et consommé par l'anabolisme, les productions d'acides organiques et le glycérol au cours de la première phase de la croissance (sans prendre en compte la consommation d'acétate).

Ainsi, pour compenser la production d'une mole d'acétate, la cellule doit réoxyder une ou deux moles de NADH (selon que l'acétate soit produit par voie NADH ou NADPH dépendante) et pour compenser la production d'une mole de pyruvate, la cellule doit réoxyder une mole de NADH. En revanche, pour produire une mole de succinate, la cellule réoxyde une mole de FADH₂, ce qui peut potentiellement permettre de réoxyder une mole de NADH.

En considérant les premières heures de la croissance (cf. Tableau VII-4), dans le cas de *TEFmut7*, le rendement glycérol diminue de 0,32 g_{glycérol}·g_{biomass}⁻¹ par rapport à celui de la souche sauvage. Le rendement acétate diminue de 0,05 g_{acétate}·g_{biomass}⁻¹, ce qui réduit de 20 à 40 % le besoin de réoxydation du NADH (selon la proportion d'acétate produit par voie NADH ou NADPH dépendante dans la souche sauvage). Le rendement pyruvate est réduit de 0,04 g_{pyruvate}·g_{biomass}⁻¹, ce qui diminue de 20 % le besoin de réoxydation du NADH. Le rendement succinate/biomasse augmente de 0,17 g_{succinate}·g_{biomass}⁻¹, ce qui pourrait être suffisant pour réoxyder jusqu'à 43 % de l'excès de NADH, lié à la diminution du rendement glycérol. Enfin, la consommation d'acétate est de 0,02 g_{acétate}·g_{biomass}⁻¹, réduisant de 8 à 16 % le besoin en réoxydation du NADH.

Tableau VII-4 Evolution des rendements au cours des premières heures de fermentation anaérobie pour la souche sauvage et les deux souches mutantes

	WT	<i>TEFmut7</i>	<i>TEFmut2</i>
YDCW/ glucose g g ⁻¹	0,076±0,001 [0-16 h]	0,074±0,003 [0-30 h]	0,055±0,001 [0-44 h]
Y glycérol/ glucose g g ⁻¹	0,056±0,001 [0-16 h]	0,0314±0,003 [0-30 h]	0,022±0,004 [0-44 h]
Y glycérol/DCW g g ⁻¹	0,74±0,03 [0-16 h]	0,42±0,02 [0-30 h]	0,40±0,04 [0-44 h]
Y acétate/ glucose g g ⁻¹	0,005±0,001	0	0
Y pyruvate/ glucose g g ⁻¹	0,003±0,001	0	0
Y succinate/ glucose g g ⁻¹	0,004±0,001	0,013±0,001	0,026±0,001

Ainsi, les réarrangements observés sont suffisants pour compenser de 91 % (en supposant que tout l'acétate soit produit par voie NADPH dépendante chez la souche sauvage) à 119 % (en supposant que tout l'acétate soit produit par voie NADH dépendante chez la souche sauvage), la diminution du rendement glycérol.

Dans le cas de *TEFmut2*, les mêmes réductions de rendement glycérol, acétate et pyruvate sont observées; cependant, l'augmentation du rendement succinate pourrait être suffisante pour réoxyder jusqu'à 96 % de l'excès de NADH. Dans cette souche, l'augmentation de la production de succinate n'est pas seulement liée à la diminution de la production de glycérol, mais traduit aussi des réarrangements métaboliques plus profonds.

Il est intéressant de noter qu'après les premières heures de croissance le rendement glycérol/biomasse augmente chez les deux mutants, cette augmentation du rendement glycérol/biomasse correspondant à l'apparition, dans le milieu, d'acétate et de pyruvate ainsi qu'à la diminution du rendement succinate.

VII.5 Conclusion

Nos expériences ont permis de mettre en évidence plusieurs phénomènes intéressants concernant les productions d'acides organiques au cours de la fermentation éthanolique.

Tout d'abord, nous avons pu montrer qu'en condition aérobie la réduction de la production de glycérol, chez les souches mutantes, ne s'accompagnait pas de modification de la production des acides organiques. Ainsi, des productions similaires d'acides organiques ont pu être observées chez les souches mutantes et chez la souche sauvage. Ces productions sont vraisemblablement liées à des phénomènes de saturation des voies métaboliques. En condition anaérobie, en revanche, les productions d'acides organiques sont drastiquement modifiées par la modification de la voie de synthèse du glycérol : les productions d'acétate et de pyruvate sont réduites tandis que la production de succinate augmente. Ces modifications ont été attribuées à la réduction de la capacité des souches mutantes à réoxyder le NADH, associé à la synthèse de biomasse et à la production de certains acides organiques. Ainsi, cette réduction de la capacité de réoxydation du NADH entraînerait une augmentation du ratio NADH/NAD⁺ dans les cellules. Ce changement dans le ratio NADH/NAD⁺, d'une part, limiterait le flux glycolytique, réduisant ainsi les phénomènes de saturation des voies métaboliques, et, d'autre part, défavoriserait les réactions productrices de NADH pour, au contraire, favoriser les réactions consommatrices de NADH. Ces deux phénomènes aboutiraient à des réarrangements des flux métaboliques, expliquant les changements observés dans les productions d'acides organiques.

Nous avons aussi pu montrer que, en condition anaérobie, la modification de la production des acides organiques permettait d'expliquer la réduction observée du rendement glycérol/biomasse.

DISCUSSION

L'ingénierie métabolique des micro-organismes, pour la production de molécules d'intérêt, peut s'avérer difficile à mettre en œuvre lorsqu'il s'agit de modifier le métabolisme central du carbone. En effet, l'interconnexion importante des différentes voies métaboliques, à travers des couplages énergétique et oxydo-réductif, ne permet pas de modifier l'une d'elles sans influencer l'ensemble du système. Par ailleurs, certaines voies métaboliques aboutissant à la production de molécules possédant des rôles physiologiques fondamentaux, la modification de celles-ci peut altérer le comportement des souches mutantes.

C'est dans ce cadre que se sont inscrits ces travaux. En effet, le problème de la réduction de la production de glycérol chez *S. cerevisiae* illustre parfaitement ces deux phénomènes. Ainsi, le glycérol possède un rôle fondamental dans le métabolisme oxydo-réductif des cellules, mais il participe aussi de façon considérable à la lutte contre les stress rencontrés pendant la croissance, notamment le stress osmotique. Il est ainsi difficile de réduire la production de glycérol sans compromettre les capacités de croissance et de résistance au stress des levures. Les développements récents dans l'ingénierie des promoteurs nous ont permis d'envisager une stratégie d'ingénierie métabolique, basée sur l'ajustement fin de l'activité des gènes de la voie de synthèse du glycérol. L'utilisation d'un modèle métabolique nous a permis de déterminer *in silico* le flux minimum nécessaire, dans la voie de synthèse du glycérol, pour subvenir aux besoins en précurseurs de la synthèse de biomasse. Ces résultats ont été utilisés pour choisir, dans une collection de souches construites à partir de promoteurs mutés, les souches susceptibles de correspondre le mieux aux résultats du modèle. Les capacités fermentaires de ces souches ont ensuite été évaluées dans des procédés de production d'éthanol à haute performance et dans des environnements parfaitement contrôlés. Ces travaux ont permis de répondre aux questions suivantes:

* Est-il possible, en utilisant une stratégie d'ajustement de l'activité des gènes de la voie de synthèse du glycérol, d'obtenir des souches présentant une production de glycérol réduite, un rendement éthanol amélioré et des capacités de résistance au stress compatibles avec des procédés industriels ?

* Quel est l'impact de la minimisation de la production de glycérol sur l'organisation du métabolisme cellulaire et comment cette réorganisation métabolique se traduit-elle en terme de coproduits ?

* Dans quelle mesure est-il possible d'utiliser la modélisation métabolique pour aider à l'élaboration de stratégies de modifications de souches ?

Amélioration des souches:

Les mutants *TEFmut7* et *TEFmut2* présentent respectivement des rendements glycérol réduits de 61 % et de 88 % par rapport au rendement glycérol de la souche sauvage, en condition aérobie, et des rendements réduits de 44 % et de 61 %, en condition anaérobie. En comparaison, dans l'étude la plus précise effectuée sur les souches de délétion des gènes *GPD1* et *GPD2*, Nissen et al ont montré que les mutants de simple délétion des gènes *GPD1* et *GPD2*, construits à partir de la souche TN1, présentent un rendement glycérol réduit de 66 %, en condition aérobie, et de 7 % pour Δ gpd1 et de 30 % pour Δ gpd2, en condition anaérobie. La souche de double délétion Δ gpd1/ Δ gpd2, construite à partir de TN1, présente une réduction du rendement glycérol de presque 100 % en condition aérobie et n'a aucune croissance en condition anaérobie. L'ingénierie métabolique des souches *TEFmut7* et *TEFmut2* a donc bien permis de réduire le rendement glycérol à un niveau intermédiaire, entre ce qui est normalement observé chez les mutants de simple délétion et ce qui est observé chez les mutants de double délétion. Le rendement glycérol est notamment réduit de façon beaucoup plus importante chez les mutants *TEFmut7* et *TEFmut2* que chez les mutants de simple délétion en condition anaérobie. La réduction de la production de glycérol s'est accompagnée, pour les souches *TEFmut7* et *TEFmut2*, d'une augmentation du rendement en éthanol, durant la phase de croissance, de, respectivement, 2,2 % et 5 % en condition aérobie, et 2 % et 7 % en condition anaérobie. Ces gains de rendement éthanol s'expliquent à la fois par la diminution du rendement glycérol et aussi par les diminutions de rendements d'autres produits, comme la biomasse et les acides organiques. En comparaison, les gains de rendement éthanol obtenus avec la souche TN1 s'élèvent respectivement à 2,2 % et à 3,3 % pour les souches Δ gpd1 et Δ gpd2, en condition aérobie et à 2,8 % et à 4,7 %, en condition anaérobie (Nissen, Hamann et al. 2000). Les mutants *TEFmut7* et *TEFmut2* présentent donc une amélioration du rendement éthanol supérieure à celle obtenue avec les mutants de simple délétion.

En condition aérobie, le seul effet négatif observable des mutations est la réduction de la vitesse de croissance maximum et des cinétiques de fermentation. En effet, la tolérance à l'éthanol des souches ne semble pas affectée puisque aussi bien la concentration critique à laquelle la croissance s'arrête que la concentration finale en éthanol atteinte restent inchangées. Ceci constitue un gain considérable, comparé aux mutants de double délétion, qui possèdent une tolérance à l'éthanol

largement réduite (Boulahya 2005). En condition aérobie, les résultats suggèrent, en outre, que la chute de viabilité est en grande partie liée à la production importante d'acétate.

En condition anaérobie, en revanche, la tolérance à l'éthanol des mutants, ainsi que la concentration critique en éthanol à laquelle la croissance s'arrête, sont largement réduites. Les concentrations finales en éthanol sont réduites, respectivement, de 13 % et de 40 %, chez la souche *TEFmut7*, et de 24 % et de 60 %, chez la souche *TEFmut2*. De même, les vitesses spécifiques de croissance des souches mutantes et, donc, leurs cinétiques de fermentation sont largement réduites, le μ_{\max} étant réduit de 57 % pour la souche *TEFmut7* et de 85 % pour la souche *TEFmut2* par rapport à la souche sauvage. Donc, si la régulation fine de la voie du glycérol a permis de conserver les caractéristiques de croissance et de tolérance à l'éthanol de la souche sauvage en condition aérobie, ce n'est pas le cas en condition anaérobie, où la réduction de la production de glycérol altère de façon considérable les cinétiques de croissance et de production d'éthanol ainsi que la tolérance à l'éthanol des souches mutantes. Cependant, ces souches restent capables de croître en condition anaérobie, contrairement aux mutants délétés pour les deux gènes *GPD*.

Perspectives:

Bien que les deux souches *TEFmut7* et *TEFmut2* aient permis d'obtenir des gains de rendement en condition aérobie aussi bien qu'en condition anaérobie, leur faible cinétique de croissance et de production d'éthanol en absence d'oxygène constituent des défauts majeurs dans l'optique d'une éventuelle application industrielle. En effet, ces faibles cinétiques diminueraient la productivité du procédé tout en augmentant le risque de contamination. Cependant, même si ces souches mutantes ne sont pas adaptées à un procédé industriel classique, leur utilisation peut être envisagée dans un procédé de production d'éthanol sur un substrat de deuxième génération. En effet, l'utilisation de la biomasse lignocellulosique par *S. cerevisiae* nécessite au préalable son hydrolyse enzymatique. Pour limiter les phénomènes de contamination lors de la digestion enzymatique, il est probable que la plupart des procédés de production d'éthanol de deuxième génération soient, à l'avenir, des procédés SSF (Simultaneous Saccharification and Fermentation). Dans ce type de procédé, les sucres libérés par la biomasse seraient directement utilisés par les levures. Le coût élevé des enzymes utilisées pour dégrader la biomasse lignocellulosique, impose de travailler à de faibles concentrations et, donc, de faibles vitesses de libération des sucres. Dans ces conditions, les cinétiques de fermentation seraient dictées par les cinétiques d'hydrolyse enzymatique. Les faibles vitesses de croissance des souches mutantes ne seraient donc plus un défaut.

Un autre défaut pour l'industrialisation de ces mutants est leur tolérance réduite à l'éthanol. La souche *TEFmut2*, en particulier, qui présente la meilleure amélioration de rendement, présente aussi une concentration finale en éthanol à la limite de la concentration minimum considérée comme nécessaire pour la viabilité économique des procédés (8° Gay-Lussac). Cependant, des résultats préliminaires sur un substrat industriel de deuxième génération ont montré qu'il était possible dans ces conditions d'augmenter la concentration finale en éthanol, atteinte par la souche *TEFmut2*, jusqu'à 90 g.L⁻¹. De plus, la présence d'oxygène dans le milieu étant connue pour améliorer la viabilité cellulaire et les capacités de résistance au stress des levures (Alfenore, Cameleyre et al. 2004), l'utilisation d'un procédé micro-aérobie permettrait d'augmenter encore la concentration finale atteinte.

Par ailleurs, il a pu être observé qu'en condition anaérobie, les souches *TEFmut2* et *TEFmut7* étaient capables de consommer de l'acétate durant leur fermentation, pour le réoxyder ou produire de l'acétyl-CoA. Cette caractéristique pourrait constituer un atout pour des cultures sur substrat de deuxième génération, de l'acétate étant naturellement présent dans celles-ci (Medina, Almering et al. 2010). Ainsi, la consommation d'acétate pourrait contribuer à améliorer le rendement et surtout diminuer l'impact négatif de la réduction de la production du glycérol, en réduisant l'excès de cofacteurs réduits dans la cellule.

Les souches utilisées ouvrent donc de prometteuses pistes pour d'éventuelles applications industrielles.

Réorganisation du métabolisme des souches mutantes

En condition aérobie, l'excédent de pouvoir réducteur, lié à la réduction de la capacité de production du glycérol, est réoxydé à travers la phosphorylation oxydative. Par ailleurs, une diminution du rendement biomasse/ ATP, de 6 % pour la souche *TEFmut7* et de 20 % pour la souche *TEFmut2*, a pu être observée. Cette diminution a été interprétée comme le signe d'une consommation d'énergie accrue par les processus de maintenance cellulaire, due notamment à un accroissement de la quantité d'énergie nécessaire pour faire face au stress osmotique. Une telle diminution du rendement ATP, en relation avec la diminution du rendement glycérol, a déjà pu être observée (Bideaux, Alfenore et al. 2006). Cette diminution du rendement biomasse/ATP entraîne une

augmentation du ratio flux glycolytique/biomasse, ayant elle-même pour conséquence l'augmentation du rendement éthanol.

En condition anaérobie, en l'absence d'un accepteur exogène d'électrons pouvant réoxyder l'excès de NADH lié à la réduction de la production de glycérol, une réorganisation plus importante du métabolisme est observée. Ainsi, les productions d'acétate et de pyruvate sont largement diminuées, tandis que la production de succinate augmente. La réduction des rendements pyruvate et acétate, en relation avec la réduction de la production de glycérol, avait déjà pu être observée dans d'autres études [(Bjorkqvist, Ansell et al. 1997; Zhang and Chen 2008)]. Ces réorganisations métaboliques ont été attribuées à une augmentation du ratio NADH/NAD⁺ favorisant les réactions consommatrices de NADH et, au contraire, défavorisant les réactions productrices de NADH. La modification des co-produits, en réponse à un changement du ratio NADH/NAD⁺, a déjà pu être observée chez *S. cerevisiae*. Ainsi, en 2006 en exprimant une enzyme oxydase hétérologue chez *S. cerevisiae*, Heux et al ont pu diminuer le ratio NADH/NAD⁺ : ce changement de ratio a réduit la production de glycérol et a augmenté la production d'acétate. Dans le cas des mutants *TEFmut7* et *TEFmut2*, en condition anaérobie, la réduction de la production de glycérol, en réduisant la capacité des souches à réoxyder le NADH, a pu augmenter le ratio NADH/NAD⁺, entraînant les réarrangements métaboliques observés. Ainsi, le ratio NADH/NAD⁺ a pu défavoriser la production d'acétate au profit de la production d'éthanol, au niveau du carrefour de l'acétaldéhyde ; ce phénomène a déjà été observé en condition anaérobie pour d'autres micro-organismes (Berríos-Rivera, Bennett et al. 2002). La reconsommation de l'acétate originaire des précultures, observée lors des fermentations des souches *TEFmut7* et *TEFmut2*, pourrait aussi s'expliquer par le ratio NADH/NAD⁺. En effet, la production d'acétate dans ces souches étant réduite, elle pourrait ne pas être suffisante pour assurer une production suffisante d'acétyl-CoA ; l'acétate du milieu de culture serait ainsi reconsommé par les souches et converti en acétyl-CoA. La diminution du rendement pyruvate pourrait aussi s'expliquer par la réduction du flux glycolytique chez les mutants, désaturant les enzymes du carrefour du pyruvate et réduisant, ainsi, les phénomènes d'accumulation et d'excrétion du pyruvate. Cette réduction du flux glycolytique peut être attribuée à l'inhibition de l'enzyme glycéraldéhyde déshydrogénase, sous l'effet du ratio NADH/NAD⁺ trop élevé. Enfin, l'augmentation de la production de succinate peut s'expliquer par le fait que celui-ci est produit à travers la branche réductrice du cycle de Krebs, en condition anaérobie, et participe, ainsi, à la réoxydation de l'excédent de pouvoir réducteur dans la cellule. Cependant, dans le cas du mutant *TEFmut2*, la production de succinate augmente au-delà de la quantité qui serait nécessaire pour compenser la diminution de la production de glycérol ; ce fait laisse supposer que d'autres réarrangements métaboliques, qui restent inexplicables, interviennent chez ce mutant. Par ailleurs, l'absence de réduction du rendement glycérol/biomasse entre les souches *TEFmut7* et *TEFmut2* en condition anaérobie suggère que la production de glycérol, chez ces deux mutants, pourrait limiter la

croissance. Ainsi, la différence de rendement succinate/biomasse, observée entre les mutants *TEFmut7* et *TEFmut2*, ne peut pas être reliée directement à la réduction de la production de glycérol et au ratio NADH/NAD⁺.

Comme en condition aérobie, un accroissement de l'importance des réactions métaboliques impliquées dans la production d'énergie, est observé. Ainsi, le rendement ATP/biomasse est réduit de 5 % pour la souche *TEFmut7* et de 22 % pour la souche *TEFmut2*. D'autre part, la coïncidence entre la chute de viabilité des souches mutantes et les ajouts de glucose souligne la difficulté des souches à gérer le stress osmotique.

La réduction de la tolérance à l'éthanol des mutants, observée en condition anaérobie, peut être interprétée comme l'effet de la conjonction de deux phénomènes : d'une part, un accroissement de l'énergie nécessaire, pour faire face au stress osmotique et au stress éthanol, et d'autre part, une capacité de production d'énergie limitée par un ratio NADH/ NAD⁺ trop élevé. Ainsi, chez les mutants produisant moins de glycérol, la gestion du stress, provoqué par l'augmentation de la concentration en éthanol dans le milieu de culture et les ajouts de glucose, est plus coûteuse en énergie que chez la souche sauvage. En condition aérobie, les souches mutantes peuvent compenser cette dépense d'énergie en augmentant l'énergie produite par le catabolisme. En condition anaérobie, le ratio NADH/ NAD⁺ étant trop élevé, le flux glycoytique et donc la capacité des souches à produire de l'énergie sont limités ; ainsi, les souches mutantes ne pourraient pas produire assez d'énergie pour faire face à l'augmentation du stress et la croissance s'arrêterait.

Perspectives:

Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer les comportements des mutants, sans être vérifiées expérimentalement. Ainsi, les quantités de NADH présentes dans les cellules au cours des fermentations, de même que les ratios NADH/NAD⁺, n'ont pas été mesurés expérimentalement, ce qui pourrait permettre d'étayer la thèse utilisée pour expliquer la réorganisation du métabolisme en condition anaérobie. Une autre possibilité serait de comparer le comportement d'un mutant dans lequel le ratio NADH serait artificiellement augmenté aux mutants *TEFmut2* et *TEFmut7*. Les mutants pourraient également être cultivés en présence d'acétoïne pour observer leur différence de comportement et tenter de faire la part entre l'inhibition due à l'excès de NADH et l'inhibition liée au rôle protecteur du glycérol contre les stress du procédé. Enfin, il pourrait être intéressant de tester les souches, en condition aérobie, en présence d'un stress osmotique apporté artificiellement, pour observer d'éventuelles différences de comportement chez les mutants.

Par ailleurs, certains phénomènes restent mal expliqués et pourraient être approfondis. Ainsi, l'origine du succinate chez le mutant *TEFmut2* en condition anaérobie n'est pas complètement claire. Il pourrait aussi être intéressant, avec un troisième mutant TEF, dont le promoteur serait plus faible que celui de *TEFmut2*, de vérifier l'existence d'un seuil limite pour le rendement glycérol/biomasse et d'essayer de mieux comprendre ce phénomène.

Modélisation métabolique

Les travaux de modélisation métabolique ont mis en évidence la difficulté, en utilisant la modélisation MFA, d'obtenir un modèle capable de recalculer les métabolites produits par les levures, tout en présentant des flux intracellulaires correspondant aux données de la littérature. L'apparition de linéarités et la nécessité de disposer de mesures de vitesses internes, pour résoudre les systèmes dans lesquels plusieurs réactions parallèles coexistent, mais aussi les incertitudes sur l'activité de certaines enzymes dans nos conditions de culture ont constitué les principales limitations pour la conception de nos modèles. Pour contourner les problèmes inhérents à la structure des modèles MFA, la tendance actuelle est de développer des modèles basés sur les principes de la MFA ; mais intégrant aussi des paramètres de contrôle cinétique des voies métaboliques. Cependant, le développement de tels modèles est lourd et nécessite des moyens humains et matériels considérables. Malgré les défauts des modèles MFA, nos modèles ont été suffisants pour nous permettre d'orienter notre étude, d'une part, et d'appréhender les réorganisations métaboliques apparues dans les souches mutantes, d'autre part.

Perspectives:

L'utilisation de modèles métaboliques seuls a montré ses limites au cours de cette étude. En effet, bien que ces modèles permettent d'appréhender la réorganisation du métabolisme des souches mutantes, ils ne peuvent pas d'informations concernant les cinétiques de fermentation ou les capacités de résistance au stress puisqu'ils ne sont basés que sur la stœchiométrie des voies métaboliques. Ainsi, bien que les mutants *TEFmut2* et *TEFmut7* produisent suffisamment de glycérol pour subvenir à leurs besoins en précurseurs pour la synthèse de biomasse, ces souches présentent des cinétiques réduites en condition aérobie et des altérations importantes de leur capacité de croissance et de résistance au stress en condition anaérobie. Prendre en compte ces paramètres cinétiques et ces phénomènes de résistance au stress du procédé nécessite d'associer un modèle phénoménologique au réseau métabolique, pour pouvoir modéliser l'impact négatif de la réduction de glycérol sur la croissance cellulaire.

Ce modèle phénoménologique permettrait de décrire et de simuler l'évolution de la croissance cellulaire, de la consommation de substrat et de la production de métabolites, au cours des fermentations. Pour cela, il combinerait des équations cinétiques classiques, décrivant le modèle microbien et ses interactions avec son environnement, à des équations bilans traduisant la conservation de la matière. Deux pistes peuvent être envisagées pour prendre en compte l'impact de la réduction du flux de glycérol dans ce modèle phénoménologique:

- soit relier directement la capacité des souches à produire du glycérol à la croissance, à travers l'équation cinétique décrivant celle-ci

- soit modéliser l'impact de la réduction de la capacité à produire du glycérol, à travers un modèle décrivant l'accumulation intracellulaire du glycérol et son lien avec l'effet négatif du stress osmotique

Conclusion

Ces travaux constituent une première étape dans la mise en place d'une démarche rationnelle d'ingénierie métabolique s'appuyant sur des études *in silico* et utilisant des promoteurs calibrés permettant l'ajustement des flux métaboliques. Ils ont abouti à la conception d'un modèle métabolique compartimenté pour *S.cerevisiae* pouvant être utilisé dans d'autres études d'ingénierie métabolique.

Ces travaux ont aussi permis d'approfondir les connaissances théoriques sur le rôle du glycérol dans le métabolisme cellulaire et sur son importance pour la résistance des levures au stress environnementaux.

Enfin ces travaux ont permis de valider la possibilité d'utiliser des souches modifiées pour améliorer les rendements dans des procédés de production d'éthanol de seconde génération.

BIBLIOGRAPHIE :

-
-
1. Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M *et al*: **Life with 6000 Genes**. *Science* 1996, **274**(5287):546-567.
 2. Dujon B: **The yeast genome project: what did we learn?** *Trends in Genetics* 1996, **12**(7):263.
 3. Lin Y, Tanaka S: **Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects**. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2006, **69**(6):627.
 4. van Dijken JP, Bauer J, Brambilla L, Duboc P, Francois JM, Gancedo C, Giuseppin MLF, Heijnen JJ, Hoare M, Lange HC *et al*: **An interlaboratory comparison of physiological and genetic properties of four *Saccharomyces cerevisiae* strains**. *Enzyme and Microbial Technology* 2000, **26**(9-10):706.
 5. Barnett JA: **The utilization of sugars by yeasts**. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* 1976, **32**:125-234.
 6. Käppeli O: **Regulation of carbon metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* and related yeasts**. *Advanced Microbial Physiology* 1986, **28**:181-209.
 7. van Dijken J, Scheffers WA: **Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts**. *FEMS Microbiology Letters* 1986, **32**:199-224.
 8. van Maris AJA, Bakker BM, Brandt M, Boorsma A, Teixeira de Mattos MJ, Grivell LA, Pronk JT, Blom J: **Modulating the distribution of fluxes among respiration and fermentation by overexpression of *HAP4* in *Saccharomyces cerevisiae***. *FEMS Yeast Research* 2001, **1**(2):139-149.
 9. Verduyn C, Postma E, Scheffers WA, Van Dijken J, P.: **Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: A continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation**. *Yeast* 1992, **8**(7):501-517.
 10. Olz R, Larsson K, Adler L, Gustafsson L: **Energy flux and osmoregulation of *Saccharomyces cerevisiae* grown in chemostats under NaCl stress**. *Journal of Bacteriology* 1993, **175**(8):2205-2213.
 11. Vemuri GN, Eiteman MA, McEwen JE, Olsson L, Nielsen J: **Increasing NADH oxidation reduces overflow metabolism in *Saccharomyces cerevisiae***. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2007, **104**(7):2402-2407.
 12. De Deken RH: **The Crabtree Effect: A Regulatory System in Yeast**. *J Gen Microbiol* 1966, **44**(2):149-156.
 13. van Urk H, Schipper D, Breedveld GJ, Mak PR, Alexander Scheffers W, van Dijken JP: **Localization and kinetics of pyruvate-metabolizing enzymes in relation to aerobic alcoholic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* CBS 8066 and *Candida utilis* CBS 621**. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1989, **992**(1):78-86.
 14. Postma E, Verduyn C, Scheffers WA, Van Dijken JP: **Enzymic analysis of the crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae***. *Applied Environmental Microbiology* 1989, **55**(2):468-477.
 15. Feria-Gervasio D, Mouret J-R, Gorret N, Goma G, Guillouet S: **Oleic acid delays and modulates the transition from respiratory to fermentative metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* after exposure to glucose excess**. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2008, **78**(2):319-331.

16. Larsson K, Ansell R, Eriksson P, Adler L: **A gene encoding *sn*-glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) complements an osmosensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Molecular Microbiology* 1993, **10**(5):1101-1111.
17. Albertyn J, Hohmann S, Thevelein JM, Prior BA: **GPD1, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway.** *Molecular and Cellular Biology* 1994, **14**(6):4135-4144.
18. Ansell R, Granath K, Hohmann S, Thevelein JM, Adlerand L: **The two isoenzymes for yeast NAD⁺-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by *GPD1* and *GPD2* have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation.** *The EMBO journal* 1997, **16**:2179-2187.
19. Eriksson P, André L, Ansell R, Blomberg A, Adler L: **Cloning and characterization of *GPD2*, a second gene encoding *sn*-glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) in *Saccharomyces cerevisiae*, and its comparison with *GPD1*.** *Molecular Microbiology* 1995, **17**(1):95-107.
20. Norbeck J, Pahlman A-K, Akhtar N, Blomberg A, Adler L: **Purification and Characterization of Two Isoenzymes of DL-Glycerol-3-phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of the corresponding GPP1 and GPP2 genes and evidence for osmotic regulation of Gpp2p expression by the osmosensing mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway.** *Journal of Biological Chemistry* 1996, **271**(23):13875-13881.
21. Pahlman I-L, Larsson C, Averet N, Bunoust O, Boubekour S, Gustafsson L, Rigoulet M: **Kinetic Regulation of the Mitochondrial Glycerol-3-phosphate Dehydrogenase by the External NADH Dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Journal of Biological Chemistry* 2002, **277**(31):27991-27995.
22. Gancedo C, Gancedo JM, Sols A: **Glycerol Metabolism in Yeasts.** *European Journal of Biochemistry* 1968, **5**(2):165-172.
23. Pavlik P, Simon M, Schuster T, Ruis H: **The glycerol kinase (GUT1) gene of *Saccharomyces cerevisiae*: cloning and characterization.** *Current Genetics* 1993, **24**(1):21.
24. Grauslund M, Rønnow B: **Carbon source-dependent transcriptional regulation of the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene, GUT2, from *Saccharomyces cerevisiae*.** *Canadian Journal of Microbiology* 2000, **46**:1096-1100.
25. Larsson C, Pahlman I-L, Ansell R, Rigoulet M, Adler L, Gustafsson L: **The importance of the glycerol 3-phosphate shuttle during aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Yeast* 1998, **14**(4):347-357.
26. Norbeck J, Blomberg A: **Metabolic and Regulatory Changes Associated with Growth of *Saccharomyces cerevisiae* in 1.4M NaCl. EVIDENCE FOR OSMOTIC INDUCTION OF GLYCEROL DISSIMILATION VIA THE DIHYDROXYACETONE PATHWAY.** *Journal of Biological Chemistry* 1997, **272**(9):5544-5554.
27. Molin M, Norbeck J, Blomberg A: **Dihydroxyacetone Kinases in *Saccharomyces cerevisiae* Are Involved in Detoxification of Dihydroxyacetone.** *Journal of Biological Chemistry* 2003, **278**(3):1415-1423.
28. Athenstaedt K, Daum G: **Phosphatidic acid, a key intermediate in lipid metabolism.** *European Journal Biochemistry* 1999, **266**(1):1-16.
29. Oliveira R, Lages F, Silva-Graça M, Lucas C: **Fps1p channel is the mediator of the major part of glycerol passive diffusion in *Saccharomyces cerevisiae*: artefacts and re-definitions.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 2003, **1613**(1-2):57.
30. Luyten K, Albertyn J, Skibbe WF, Prior BA, Ramos J, Thevelein JM, Hohmann S: **Fps1, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress.** *The EMBO Journal* 1995, **14**:1360-1371.

31. Tamás M, J., Luyten K, Sutherland FCW, Hernandez A, Albertyn J, Valadi H, Li H, Prior B, A., Kilian S, G., Ramos J *et al*: **Fps1p controls the accumulation and release of the compatible solute glycerol in yeast osmoregulation.** *Molecular Microbiology* 1999, **31**(4):1087-1104.
32. Lages F, Lucas C: **Characterization of a glycerol/H⁺ symport in the halotolerant yeast *Pichia sorbitophila*.** *Yeast* 1995, **11**(2):111-119.
33. Zyl P, Kilian S, Prior B: **The role of an active transport mechanism in glycerol accumulation during osmoregulation by *Zygosaccharomyces rouxii*.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 1990, **34**:231-235.
34. Lucas C, Da Costa M, Van Uden N: **Osmoregulatory active sodium-glycerol co-transport in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*.** *Yeast* 1990, **6**(3):187-191.
35. Lages F, Lucas C: **Contribution to the physiological characterization of glycerol active uptake in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1997, **1322**(1):8.
36. Ferreira C, van Voorst F, Martins A, Neves L, Oliveira R, Kielland-Brandt MC, Lucas C, Brandt A: **A Member of the Sugar Transporter Family, Stl1p Is the Glycerol/H⁺ Symporter in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Molecular Biology of the Cell* 2005, **16**(4):2068-2076.
37. Bjorkqvist S, Ansell R, Adler L, Liden G: **Physiological response to anaerobicity of glycerol-3-phosphate dehydrogenase mutants of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Applied Environmental Microbiology* 1997, **63**(1):128-132.
38. Nissen TL, Schulze U, Nielsen J, Villadsen J: **Flux distributions in anaerobic, glucose-limited continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Microbiology* 1997, **143**(1):203-218.
39. Pahlman A-K, Granath K, Ansell R, Hohmann S, Adler L: **The Yeast Glycerol 3-Phosphatases Gpp1p and Gpp2p Are Required for Glycerol Biosynthesis and Differentially Involved in the Cellular Responses to Osmotic, Anaerobic, and Oxidative Stress.** *Journal of Biological Chemistry* 2001, **276**(5):3555-3563.
40. Alfenore S, Cameleyre X, Benbadis L, Bideaux C, Uribebarrea JL, Goma G, Molina-Jouve C, Guillouet SE: **Aeration strategy: a need for very high ethanol performance in *Saccharomyces cerevisiae* fed-batch process.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 2004, **63**(5):537.
41. von Jagow K: **Hydrogen pathways in the mitochondrion of *Saccharomyces carlsbergensis*.** *European Journal of Biochemistry* 1970, **12**:583-832.
42. Geertman J-MA, van Maris AJA, van Dijken JP, Pronk JT: **Physiological and genetic engineering of cytosolic redox metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* for improved glycerol production.** *Metabolic Engineering* 2006, **8**(6):532.
43. Bakker B, Overkamp KM, van Marisa AJA, Kötter P, Luttk MAH, van Dijken JP, Pronka JT: **Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*.** *FEMS Microbiology Reviews* 2001, **25**:15-37.
44. Luttk MAH, Overkamp KM, Kötter P, de Vries S, van Dijken JP, Pronk JT: **The *Saccharomyces cerevisiae* NDE1 and NDE2 Genes Encode Separate Mitochondrial NADH Dehydrogenases Catalyzing the Oxidation of Cytosolic NADH.** *Journal of Biological Chemistry* 1998, **273**(38):24529-24534.
45. Rønnow B, Kielland-Brandt MC: ***GUT2*, a gene for mitochondrial glycerol 3-phosphate dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Yeast* 1993, **9**(10):1121-1130.
46. Rigoulet M, Aguilaniu H, Avéret N, Bunoust O, Camougrand N, Grandier-Vazeille X, Larsson C, Pahlman I-L, Manon S, Gustafsson L: **Organization and regulation of the cytosolic NADH metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** *Molecular and Cellular Biochemistry* 2004, **256-257**(1):73.

47. Overkamp KM, Bakker BM, Kotter P, van Tuijl A, de Vries S, van Dijken JP, Pronk JT: **In Vivo Analysis of the Mechanisms for Oxidation of Cytosolic NADH by *Saccharomyces cerevisiae* Mitochondria.** *Journal of Bacteriology* 2000, **182**(10):2823-2830.
48. Hohmann S: **Osmotic Stress Signaling and Osmoadaptation in Yeasts.** *Microbiology and Molecular Biology Review* 2002, **66**(2):300-372.
49. Rep M, Albertyn J, Thevelein JM, Prior BA, Hohmann S: **Different signalling pathways contribute to the control of GPD1 gene expression by osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Microbiology* 1999, **145**(3):715-727.
50. Thevelein J, M., de Winde J, H.: **Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** *Molecular Microbiology* 1999, **33**(5):904-918.
51. Walter RP, Morris JG, Kell DB: **The Roles of Osmotic Stress and Water Activity in the Inhibition of the Growth, Glycolysis and Glucose Phosphotransferase System of *Clostridium pasteurianum*.** *J Gen Microbiol* 1987, **133**(2):259-266.
52. Gervais P, Beney L: **Osmotic mass transfer in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** *Cellular and molecular biology* 2001, **47**:831-839.
53. Smith AE, Zhang Z, Thomas CR: **Wall material properties of yeast cells: Part 1. Cell measurements and compression experiments.** *Chemical Engineering Science* 2000, **55**(11):2031.
54. Wojda I, Alonso-Monge R, Bebelman J-P, Mager WH, Siderius M: **Response to high osmotic conditions and elevated temperature in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by intracellular glycerol and involves coordinate activity of MAP kinase pathways.** *Microbiology* 2003, **149**(5):1193-1204.
55. Nevoigt E, Stahl U: **Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** *FEMS Microbiology Reviews* 1997, **21**(3):231-241.
56. Brown A: **Compatible solutes and extreme water stress in eukaryotic micro-organisms.** *Advanced Microbial Physiology* 1978, **17**:181-182.
57. Blomberg A, Larsson C, Gustafsson L: **Microcalorimetric monitoring of growth of *Saccharomyces cerevisiae*: osmotolerance in relation to physiological state.** *Journal of Bacteriology* 1988, **170**(10):4562-4568.
58. Edgley M, Brown AD: **Yeast Water Relations: Physiological Changes Induced by Solute Stress in *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces rouxii*.** *Journal of General Microbiology* 1983, **129**(11):3453-3463.
59. André L, Hemming A, Adler L: **Osmoregulation in *Saccharomyces cerevisiae* Studies on the osmotic induction of glycerol production and glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺).** *FEBS Letters* 1991, **286**(1-2):13.
60. Michnick S, Roustan J-L, Remize F, Barre P, Dequin S: **Modulation of Glycerol and Ethanol Yields During Alcoholic Fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* Strains Overexpressed or Disrupted for *GPD1* Encoding Glycerol 3-Phosphate Dehydrogenase.** *Yeast* 1997, **13**(9):783-793.
61. Serrano R: **Effect of ATPase Inhibitors on the Proton Pump of Respiratory-Deficient Yeast.** *European Journal of Biochemistry* 1980, **105**(2):419-424.
62. Norkrans B, Kylin A: **Regulation of the Potassium to Sodium Ratio and of the Osmotic Potential in Relation to Salt Tolerance in Yeasts.** *J Bacteriol* 1969, **100**(2):836-845.
63. Watson TG: **Effects of Sodium Chloride on Steady-state Growth and Metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*.** *J Gen Microbiol* 1970, **64**(1):91-99.
64. Gustafsson L, Larsson C: **Energy budgeting in studying the effect of environmental factors on the energy metabolism of yeasts.** *Thermochimica Acta* 1990, **172**:95.

65. Darley CP, van Wuytswinkel OC, van der Woude K, Mager WH, de Boer AH: **Arabidopsis thaliana and Saccharomyces cerevisiae NHX1 genes encode amiloride sensitive electroneutral Na⁺/H⁺ exchangers.** In.
66. Lichko LP, Okorokov LA, Kulaev IS: **Participation of vacuoles in regulation of levels of K⁺, Mg²⁺ and orthophosphate ions in cytoplasm of the yeast Saccharomyces carlsbergensis.** *Archives of Microbiology* 1982, **132**(3):289.
67. Kinclova-Zimmermannova O, Gaskova D, Sychrova H: **The Na⁺, K⁺/H⁺ antiporter Nha1 influences the plasma membrane potential of Saccharomyces cerevisiae.** *FEMS Yeast Research* 2006, **6**(5):792-800.
68. Koch A: **The surface stress theory of microbial morphogenesis.** *Advances in Microbial Physiology* 1983, **24**:301-366.
69. Nagodawithana TW, Steinkraus KH: **Influence of the rate of ethanol production and accumulation on the viability of Saccharomyces cerevisiae in "rapid fermentation".** *Appl Environ Microbiol* 1976, **31**(2):158-162.
70. Viegas CA, Rosa MF, Sa-Correia I, Novais JM: **Inhibition of Yeast Growth by Octanoic and Decanoic Acids Produced during Ethanol Fermentation.** *Appl Environ Microbiol* 1989, **55**(1):21-28.
71. Casey GP, Magnus CA, Ingledew WM: **High-Gravity Brewing: Effects of Nutrition on Yeast Composition, Fermentative Ability, and Alcohol Production.** *Appl Environ Microbiol* 1984, **48**(3):639-646.
72. Dombek KM, Ingram LO: **Determination of the intracellular concentration of ethanol in Saccharomyces cerevisiae during fermentation.** *Appl Environ Microbiol* 1986, **51**(1):197-200.
73. Beaven MJ, Charpentier C, Rose AH: **Production and Tolerance of Ethanol in Relation to Phospholipid Fatty-acyl Composition in Saccharomyces cerevisiae NCYC 431.** *J Gen Microbiol* 1982, **128**(7):1447-1455.
74. Navarro JM, Durand G: **Fermentation alcoolique: influence de la temperature sur l'accumulation d'alcool dans les cellules de levure.** *Annales de Microbiologie* 1978, **129B**(215-224).
75. Dasari G, Roddick F, Connor MA, Pamment NB: **Factors affecting the estimation of intracellular ethanol concentrations.** *Biotechnology Letters* 1983, **5**(10):715.
76. Guijarro JM, Lagunas R: **Saccharomyces cerevisiae does not accumulate ethanol against a concentration gradient.** *J Bacteriol* 1984, **160**(3):874-878.
77. D'Amore T, Panchal CJ, Stewart GG: **Intracellular ethanol accumulation in Saccharomyces cerevisiae during fermentation.** *Appl Environ Microbiol* 1988, **54**(1):110-114.
78. Hallsworth JE: **Ethanol-induced water stress in yeast.** *Journal of Fermentation and Bioengineering* 1998, **85**(2):125-137.
79. Hallsworth JE, Nomura Y, Iwahara M: **Ethanol-induced water stress and fungal growth.** *Journal of Fermentation and Bioengineering* 1998, **86**(5):451.
80. Millar DG, Griffiths-Smith K, Algar E, Scopes RK: **Activity and stability of glycolytic enzymes in the presence of ethanol.** *Biotechnology Letters* 1982, **4**(9):601.
81. Leao C, Van Uden N: **Effects of ethanol and other alkanols on the glucose transport system of Saccharomyces cerevisiae.** *Biotechnology and Bioengineering* 1982, **24**(11):2601-2604.
82. Ingram LO, Buttke TM: **Effects of alcohols on micro-organisms.** *Advances in Microbial Physiology* 1984, **25**(253-300).

83. Hallsworth JE, Prior BA, Nomura Y, Iwahara M, Timmis KN: **Compatible Solutes Protect against Chaotrope (Ethanol)-Induced, Nonosmotic Water Stress.** *Appl Environ Microbiol* 2003, **69**(12):7032-7034.
84. Zancan P, Sola-Penna M: **Trehalose and glycerol stabilize and renature yeast inorganic pyrophosphatase inactivated by very high temperatures.** *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2005, **444**(1):52.
85. Aldiguier AS, Alfenore S, Cameleyre X, Goma G, Uribealarea JL, Guillouet SE, Molina-Jouve C: **Synergistic temperature and ethanol effect on *Saccharomyces cerevisiae* dynamic behaviour in ethanol bio-fuel production.** *Bioprocess and Biosystems Engineering* 2004, **26**(4):217.
86. Siderius M, Wuytswinkel OV, Reijenga K, A., Kelders M, Mager W, H.: **The control of intracellular glycerol in *Saccharomyces cerevisiae* influences osmotic stress response and resistance to increased temperature.** *Molecular Microbiology* 2000, **36**(6):1381-1390.
87. Winkler A, Arkind C, Mattison CP, Burkholder A, Knoche K, Ota I: **Heat Stress Activates the Yeast High-Osmolarity Glycerol Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway, and Protein Tyrosine Phosphatases Are Essential under Heat Stress.** *Eukaryotic Cell* 2002, **1**(2):163-173.
88. Verduyn C, Postma E, Scheffers WA, van Dijken JP: **Physiology of *Saccharomyces Cerevisiae* in Anaerobic Glucose-Limited Chemostat Cultures.** *J Gen Microbiol* 1990, **136**(3):395-403.
89. Pronk JT, Steensma HY, Van D, Johannes P.: **Pyruvate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Yeast* 1996, **12**(16):1607-1633.
90. Remize F, Andrieu E, Dequin S: **Engineering of the Pyruvate Dehydrogenase Bypass in *Saccharomyces cerevisiae*: Role of the Cytosolic Mg²⁺ and Mitochondrial K⁺ Acetaldehyde Dehydrogenases Ald6p and Ald4p in Acetate Formation during Alcoholic Fermentation.** *Applied Environmental Microbiology* 2000, **66**(8):3151-3159.
91. Saint-Prix F, Bonquist L, Dequin S: **Functional analysis of the ALD gene family of *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic growth on glucose: the NADP⁺-dependent Ald6p and Ald5p isoforms play a major role in acetate formation.** *Microbiology* 2004, **150**(7):2209-2220.
92. Miyagi H, Kawai S, Murata K: **Two Sources of Mitochondrial NADPH in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** *Journal of Biological Chemistry* 2009, **284**(12):7553-7560.
93. Atzpodien W, Gancedo JM, Duntze W, Holzer H: **Isoenzymes of Malate Dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*.** *European Journal of Biochemistry* 1968, **7**(1):58-62.
94. Chapman C, Bartley W: **The kinetics of enzyme changes in yeast under conditions that cause the loss of mitochondria.** *Biochemical Journal* 1968, **107**(4):455-465.
95. Sols A, Gancedo C, de la Fuente G: **Energy-yielding metabolism in yeasts.** *The Yeasts* 1971, **2**:271-307.
96. de Groot MJL, Daran-Lapujade P, van Breukelen B, Knijnenburg TA, de Hulster EAF, Reinders MJT, Pronk JT, Heck AJR, Slijper M: **Quantitative proteomics and transcriptomics of anaerobic and aerobic yeast cultures reveals post-transcriptional regulation of key cellular processes.** *Microbiology* 2007, **153**(11):3864-3878.
97. Camarasa C, Grivet J-P, Dequin S: **Investigation by ¹³C-NMR and tricarboxylic acid (TCA) deletion mutant analysis of pathways for succinate formation in *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic fermentation.** *Microbiology* 2003, **149**(9):2669-2678.
98. Camarasa C, Faucet V, Dequin S: **Role in anaerobiosis of the isoenzymes for *Saccharomyces cerevisiae* fumarate reductase encoded by *OSM1* and *FRDS1*.** *Yeast* 2007, **24**(5):391-401.
99. Zhang A, Chen X: **Improve Ethanol Yield Through Minimizing Glycerol Yield in Ethanol Fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Chinese Journal of Chemical Engineering* 2008, **16**(4):620-625.

100. Remize F, Roustan JL, Sablayrolles JM, Barre P, Dequin S: **Glycerol Overproduction by Engineered *Saccharomyces cerevisiae* Wine Yeast Strains Leads to Substantial Changes in By-Product Formation and to a Stimulation of Fermentation Rate in Stationary Phase.** *Applied Environmental Microbiology* 1999, **65**(1):143-149.
101. Heux S, Cachon R, Dequin S: **Cofactor engineering in *Saccharomyces cerevisiae*: Expression of a H₂O-forming NADH oxidase and impact on redox metabolism.** *Metabolic Engineering* 2006, **8**(4):303.
102. Hou J, Vemuri G: **Using regulatory information to manipulate glycerol metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 2009.
103. Kell DB, Peck MW, Rodger G, Morris JG: **On the permeability to weak acids and bases of the cytoplasmic membrane of.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1981, **99**(1):81.
104. Krebs HA, Wiggins D, Stubbs M, Sols A, Bedoya F: **Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoate.** *Biochem J* 1983, **214**(3):657-663.
105. Russell J: **Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: Anion accumulation versus uncoupling.** *Journal of applied bacteriology* 1992, **73**(5):363-370.
106. Mollapour M, Piper PW: **Hog1 Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphorylation Targets the Yeast Fps1 Aquaglyceroporin for Endocytosis, Thereby Rendering Cells Resistant to Acetic Acid.** *Mol Cell Biol* 2007, **27**(18):6446-6456.
107. Cassio F, Leao C, van Uden N: **Transport of lactate and other short-chain monocarboxylates in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** *Applied Environmental Microbiology* 1987, **53**(3):509-513.
108. Pampulha ME, Loureiro-Dias MC: **Combined effect of acetic acid, pH and ethanol on intracellular pH of fermenting yeast.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 1989, **31**(5):547.
109. Casal M, Cardoso H, Leao C: **Mechanisms regulating the transport of acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Microbiology* 1996, **142**(6):1385-1390.
110. Tsuboi H, Wakisaka Y, Hirotsune M, Akao T, Yamada O, Akita O: **Analysis of the Pyruvate Permease Gene (JEN1) in Glucose Derepression Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) Isolated from a 2-Deoxyglucose-tolerant Mutant, and Its Application to.** *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2003, **67**(4):765.
111. Makuc J, Paiva S, Schauen M, Krämer R, André B, Casal M, Leão C, Boles E: **The putative monocarboxylate permeases of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* do not transport monocarboxylic acids across the plasma membrane.** *Yeast* 2001, **18**(12):1131-1143.
112. Piper P, Mahe Y, Thompson S, Pandjaitan R, Holyoak C, Egner R, Muhlbauer M, Coote P, Kuchler K: **The Pdr12 ABC transporter is required for the development of weak organic acid resistance in yeast.** *EMBO J* 1998, **17**(15):4257.
113. Dombek KM, Ingram LO: **Ethanol production during batch fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*: changes in glycolytic enzymes and internal pH.** *Appl Environ Microbiol* 1987, **53**(6):1286-1291.
114. Ramos J, Haro R, Rodríguez-Navarro A: **Regulation of potassium fluxes in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Biochimica et Biophysica Acta* 1989, **1029**(2):211-217.
115. Ramos S, Balbin M, Raposo M, Valle E, Pardo LA: **The Mechanism of Intracellular Acidification Induced by Glucose in *Saccharomyces cerevisiae*.** *J Gen Microbiol* 1989, **135**(9):2413-2422.
116. Kotyk A, Georghiou G: **Protonmotive force in yeasts--pH, buffer and species dependence.** *Biochemistry international* 1991, **24**(4):641-647.
117. Eraso P, MazÓN MJ, Gancedo JM: **Internal acidification and cAMP increase are not correlated in *Saccharomyces cerevisiae*.** *European Journal of Biochemistry* 1987, **165**(3):671-674.

118. Valle E, Bergillos L, Gascon S, Parra F, Ramos S: **Trehalase activation in yeasts is mediated by an internal acidification.** *European Journal of Biochemistry* 1986, **154**(2):247-251.
119. Taipa MA, Cabral JMS, Santos H: **Comparison of glucose fermentation by suspended and gel-entrapped yeast cells: An in vivo nuclear magnetic resonance study.** *Biotechnology and Bioengineering* 1993, **41**(6):647-653.
120. Taherzadeh MJ, Niklasson C, Lidén G: **Acetic acid--friend or foe in anaerobic batch conversion of glucose to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*?** *Chemical Engineering Science* 1997, **52**(15):2653.
121. Ryan H, Ryan JP, O'Connor WH: **The effect of diffusible acids on potassium ion uptake by yeast.** *Biochemistry Journal* 1971, **125**(4):1081-1085.
122. Ryan JP, Ryan H: **The role of intracellular pH in the regulation of cation exchanges in yeast.** *Biochemistry Journal* 1972, **128**(1):139-146.
123. Macpherson N, Shabala L, Rooney H, Jarman MG, Davies JM: **Plasma membrane H⁺ and K⁺ transporters are involved in the weak-acid preservative response of disparate food spoilage yeasts.** *Microbiology* 2005, **151**(6):1995-2003.
124. Yenush L, Mulet JM, Arino J, Serrano R: **The Ppz protein phosphatases are key regulators of K⁺ and pH homeostasis: implications for salt tolerance, cell wall integrity and cell cycle progression.** *EMBO J* 2002, **21**(5):920.
125. Maiorella B, Blanch HW, Wilke CR: **By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*.** *Biotechnology and Bioengineering* 1983, **25**(1):103-121.
126. Roe AJ, McLaggan D, Davidson I, O'Byrne C, Booth IR: **Perturbation of Anion Balance during Inhibition of Growth of *Escherichia coli* by Weak Acids.** *J Bacteriol* 1998, **180**(4):767-772.
127. Ardaillon Simoes D: **Croissance d'*Escherichia coli* à hautes concentrations cellulaires pour la production et l'excrétion d'une protéine hétérologue.** INSA Toulouse; 1994.
128. Salmond CV, Kroll RG, Booth IR: **The Effect of Food Preservatives on pH Homeostasis in *Escherichia coli*.** *J Gen Microbiol* 1984, **130**(11):2845-2850.
129. Ludovico P, Sousa MJ, Silva MT, Leao C, Corte-Real M: ***Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid.** *Microbiology* 2001, **147**(9):2409-2415.
130. Thomas KC, Ingledew WM: **Production of 21% (v/v) ethanol by fermentation of very high gravity (VHG) wheat mashes.** *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 1992, **10**(1):61.
131. Alfenore S, Molina-Jouve C, Guillouet S, Uribelarrea JL, Goma G, Benbadis L: **Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 2002, **60**(1):67.
132. Ben Chaabane F, Aldiguier A, Alfenore S, Cameleyre X, Blanc P, Bideaux C, Guillouet S, Roux G, Molina-Jouve C: **Very high ethanol productivity in an innovative continuous two-stage bioreactor with cell recycle.** *Bioprocess and Biosystems Engineering* 2006, **29**(1):49.
133. Jones A, Ingledew W: **Fuel alcohol production: Appraisal of nitrogenous yeast foods for very high gravity wheat mash fermentation.** *Process Biochemistry* 1994, **29**:483-488.
134. Birch RM, Walker GM: **Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Enzyme and Microbial Technology* 2000, **26**(9-10):678.
135. Albers E, Larsson C, Lidén G, Niklasson C, Gustafsson L: **Influence of the nitrogen source on *Saccharomyces cerevisiae* anaerobic growth and product formation.** *Applied Environmental Microbiology* 1996, **62**(9):3187-3195.
136. Bideaux C, Alfenore S, Cameleyre X, Molina-Jouve C, Uribelarrea J-L, Guillouet SE: **Minimization of Glycerol Production during the High-Performance Fed-Batch Ethanolic**

- Fermentation Process in *Saccharomyces cerevisiae*, Using a Metabolic Model as a Prediction Tool.** *Applied Environmental Microbiology* 2006, **72**(3):2134-2140.
137. Valadi H, Larsson C, Gustafsson L: **Improved ethanol production by glycerol-3-phosphate dehydrogenase mutants of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 1998, **50**(4):434.
 138. Nissen TL, Hamann CW, Kielland-Brandt M, C., Nielsen J, Villadsen J: **Anaerobic and aerobic batch cultivations of *Saccharomyces cerevisiae* mutants impaired in glycerol synthesis.** *Yeast* 2000, **16**(5):463-474.
 139. Guo Z-p, Zhang L, Ding Z-y, Wang Z-X, Shi G-Y: **Interruption of glycerol pathway in industrial alcoholic yeasts to improve the ethanol production.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 2009, **82**(2):287.
 140. Boulahya K: **Evaluation des potentialités fermentaires de souches mutées de *S. cerevisiae* en vue d'une production nulle de glycérol dans une fermentation éthanolique.** Toulouse: Université de Toulouse, INSA; 2005.
 141. Bro C, Regenbreg B, Förster J, Nielsen J: **In silico aided metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved bioethanol production.** *Metabolic Engineering* 2006, **8**(2):102.
 142. Bruinenberg PM, Van Dijken JP, Scheffers WA: **A Theoretical Analysis of NADPH Production and Consumption in Yeasts.** *J Gen Microbiol* 1983, **129**(4):953-964.
 143. Nissen T, L., Anderlund M, Nielsen J, Villadsen J, Kielland-Brandt M, C.: **Expression of a cytoplasmic transhydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae* results in formation of 2-oxoglutarate due to depletion of the NADPH pool.** *Yeast* 2001, **18**(1):19-32.
 144. Nissen TL, Kielland-Brandt MC, Nielsen J, Villadsen J: **Optimization of Ethanol Production in *Saccharomyces cerevisiae* by Metabolic Engineering of the Ammonium Assimilation.** *Metabolic Engineering* 2000, **2**(1):69-77.
 145. Boyd DA, Cvitkovitch DG, Hamilton IR: **Sequence, expression, and function of the gene for the nonphosphorylating, NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus mutans*.** *Journal of Bacteriology* 1995, **177**(10):2622-2627.
 146. Kong Q-X, Cao L-M, Zhang A-L, Chen X: **Overexpressing GLT1 in *gpd1* Δ mutant to improve the production of ethanol of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 2007, **73**(6):1382.
 147. Kong Q-X, Zhang A-L, Cao L-M, Chen X: **Over-expressing GLT1 in a *gpd2* Δ mutant of *Saccharomyces cerevisiae* to improve ethanol production.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 2007, **75**(6):1361.
 148. Zhang A, Kong Q, Cao L, Chen X: **Effect of *FPS1* deletion on the fermentation properties of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Letters in Applied Microbiology* 2007, **44**(2):212-217.
 149. Kong Q-X, Gu J-G, Cao L-M, Zhang A-L, Chen X, Zhao X-M: **Improved production of ethanol by deleting *FPS1* and over-expressing GLT1 in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Biotechnology Letters* 2006, **28**(24):2033.
 150. Cao L, Zhang A, Kong Q, Xu X, Josine TL, Chen X: **Overexpression of GLT1 in *fps1* Δ *gpd* Δ mutant for optimum ethanol formation by *Saccharomyces cerevisiae*.** *Biomolecular Engineering* 2007, **24**(6):638.
 151. Medina VG, Almering MJH, van Maris AJA, Pronk JT: **Elimination of Glycerol Production in Anaerobic Cultures of a *Saccharomyces cerevisiae* Strain Engineered To Use Acetic Acid as an Electron Acceptor.** *Applied Environmental Microbiology* 2010, **76**(1):190-195.
 152. Nevoigt E, Kohnke J, Fischer CR, Alper H, Stahl U, Stephanopoulos G: **Engineering of Promoter Replacement Cassettes for Fine-Tuning of Gene Expression in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Applied Environmental Microbiology* 2006, **72**(8):5266-5273.

153. Jones KL, Kim S-W, Keasling JD: **Low-Copy Plasmids can Perform as Well as or Better Than High-Copy Plasmids for Metabolic Engineering of Bacteria.** *Metabolic Engineering* 2000, **2**(4):328.
154. Jin Y-S, Ni H, Laplaza JM, Jeffries TW: **Optimal Growth and Ethanol Production from Xylose by Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Require Moderate D-Xylulokinase Activity.** *Appl Environ Microbiol* 2003, **69**(1):495-503.
155. Tao L, Jackson RE, Cheng Q: **Directed evolution of copy number of a broad host range plasmid for metabolic engineering.** *Metabolic Engineering* 2005, **7**(1):10.
156. Patkar A, Vijayasankaran N, Urry DW, Srienc F: **Flow cytometry as a useful tool for process development: rapid evaluation of expression systems.** *Journal of Biotechnology* 2002, **93**(3):217.
157. Yan W, Craig EA: **The Glycine-Phenylalanine-Rich Region Determines the Specificity of the Yeast Hsp40 Sis1.** *Mol Cell Biol* 1999, **19**(11):7751-7758.
158. Jensen PR, Hammer K: **Artificial promoters for metabolic optimization.** *Biotechnology and Bioengineering* 1998, **58**(2-3):191-195.
159. Solem C, Jensen PR: **Modulation of Gene Expression Made Easy.** *Appl Environ Microbiol* 2002, **68**(5):2397-2403.
160. Alper H, Fischer C, Nevoigt E, Stephanopoulos G: **Tuning genetic control through promoter engineering.** *PNAS* 2005, **102**(36):12678-12683.
161. Schirmaier F, Philippsen P: **Identification of two genes coding for the translation elongation factor EF-1 alpha of *S. cerevisiae*.** *EMBO journal* 1984, **3**:3311-3315.
162. Kitamoto N, Matsui J, Kawai Y, Kato A, Yoshino S, Ohmiya K, Tsukagoshi N: **Utilization of the Tef1-alpha gene (TEF1) promoter for expression of polygalacturonase genes, pgaA and pgaB, in *Aspergillus oryzae*.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 1998, **50**:85-92.
163. Pagliardini J, Hubmann G, Bideaux C, Alfenore S, Nevoigt E, Guillouet SE: **Quantitative evaluation of yeast's requirement for glycerol formation in very high ethanol performance fed-batch process.** *Microbial Cell Factories* 2010.
164. Duboc P, Stockar Uv: **Systematic errors in data evaluation due to ethanol stripping and water vaporization.** *Biotechnology and Bioengineering* 1998, **58**(4):428-439.
165. van der Heijden RTJM, Heijnen JJ, Hellinga C, Romein B, Luyben KCAM: **Linear constraint relations in biochemical reaction systems: I. Classification of the calculability and the balanceability of conversion rates.** *Biotechnology and Bioengineering* 1994, **43**(1):3-10.
166. van der Heijden RTJM, Romein B, Heijnen JJ, Hellinga C, Luyben KCAM: **Linear constraint relations in biochemical reaction systems: II. Diagnosis and estimation of gross errors.** *Biotechnology and Bioengineering* 1994, **43**(1):11-20.
167. Bideaux C, Goma G, Urbelarrea J-L, Dahhou B, Roux G: **Stoichiometric modelling approach for microbial cultures monitoring.** *International Journal of Modelling, Identification and Control* 2008, **3**:413.
168. Stephanopoulos G: **Metabolic engineering.** *Biotechnology and Bioengineering* 1998, **58**(2-3):119-120.
169. Vanrolleghem P. A. HJ: **A structured approach for selection among candidate metabolic network models and estimation of unknown stoichiometric coefficients.** *Biotechnology and Bioengineering* 1998, **58**(2-3):133-138.
170. Varma A, Palsson BO: **Stoichiometric flux balance models quantitatively predict growth and metabolic by-product secretion in wild-type *Escherichia coli* W3110.** *Applied Environmental Microbiology* 1994, **60**(10):3724-3731.
171. Gombert AK, Moreira dos Santos M, Christensen B, Nielsen J: **Network Identification and Flux Quantification in the Central Metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* under Different Conditions of Glucose Repression.** *Journal of Bacteriology* 2001, **183**(4):1441-1451.

172. dos Santos MM, Gombert AK, Christensen B, Olsson L, Nielsen J: **Identification of In Vivo Enzyme Activities in the Cometabolism of Glucose and Acetate by *Saccharomyces cerevisiae* by Using ¹³C-Labeled Substrates.** *Eukaryotic Cell* 2003, **2**(3):599-608.
173. Lawson JE, Gawaz M, Klingenberg M, Douglas MG: **Structure-function studies of adenine nucleotide transport in mitochondria. I. Construction and genetic analysis of yeast mutants encoding the ADP/ATP carrier protein of mitochondria.** *Journal of Biological Chemistry* 1990, **265**(24):14195-14201.
174. Gawaz M, Douglas MG, Klingenberg M: **Structure-function studies of adenine nucleotide transport in mitochondria. II. Biochemical analysis of distinct AAC1 and AAC2 proteins in yeast.** *Journal of Biological Chemistry* 1990, **265**(24):14202-14208.
175. Gropp T, Brustovetsky N, Klingenberg M, Müller V, Fendler K, Bamberg E: **Kinetics of Electrogenic Transport by the ADP/ATP Carrier.** *Biophysical Journal* 1999, **77**(2):714.
176. Hamel P, Saint-Georges Y, Pinto B, Lachacinski N, Altamura N, Dujardin G: **Redundancy in the function of mitochondrial phosphate transport in *Saccharomyces cerevisiae* and *Arabidopsis thaliana*.** *Molecular Microbiology* 2004, **51**(2):307-317.
177. Vozza A, Blanco E, Palmieri L, Palmieri F: **Identification of the Mitochondrial GTP/GDP Transporter in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Journal of Biological Chemistry* 2004, **279**(20):20850-20857.
178. Hildyard JCW, Halestrap AP: **Identification of the mitochondrial pyruvate carrier in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Biochem J* 2003, **374**(3):607-611.
179. Palmieri L, Vozza A, Agrimi G, De Marco V, Runswick MJ, Palmieri F, Walker JE: **Identification of the Yeast Mitochondrial Transporter for Oxaloacetate and Sulfate.** *Journal of Biological Chemistry* 1999, **274**(32):22184-22190.
180. Palmieri L, Lasorsa FM, De Palma A, Palmieri F, Runswick MJ, Walker JE: **Identification of the yeast ACR1 gene product as a succinate-fumarate transporter essential for growth on ethanol or acetate.** *FEBS Letters* 1997, **417**(1):114.
181. Bojunga N, Kötter P, Entian KD: **The succinate/fumarate transporter Acr1p of *Saccharomyces cerevisiae* is part of the gluconeogenic pathway and its expression is regulated by Cat8p.** *Molecular and General Genetics MGG* 1998, **260**(5):453.
182. Maaheimo H, Fiaux J, Cakar ZP, Bailey JE, Sauer U, Szyperski T: **Central carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* explored by biosynthetic fractional ¹³C labeling of common amino acids.** *European Journal of Biochemistry* 2001, **268**(8):2464-2479.
183. Kaplan RS, Mayor JA, Gremse DA, Wood DO: **High Level Expression and Characterization of the Mitochondrial Citrate Transport Protein from the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** *Journal of Biological Chemistry* 1995, **270**(8):4108-4114.
184. Palmieri L, Agrimi G, Runswick MJ, Fearnley IM, Palmieri F, Walker JE: **Identification in *Saccharomyces cerevisiae* of Two Isoforms of a Novel Mitochondrial Transporter for 2-Oxoadipate and 2-Oxoglutarate.** *Journal of Biological Chemistry* 2001, **276**(3):1916-1922.
185. Soetens O, Crabeel M, Moulalij BE, Duyckaerts C, Sluse F: **Transport of arginine and ornithine into isolated mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*.** *European Journal of Biochemistry* 1998, **258**(2):702-709.
186. Conover TE: **Does citrate transport supply both acetyl groups and NADPH for cytoplasmic fatty acid synthesis?** *Trends in Biochemistry Sciences* 1987:88-89.
187. Ryan ED, Kohlhaw GB: **Subcellular Localization of Isoleucine-Valine Biosynthetic Enzymes in Yeast.** *Journal of Bacteriology* 1974, **120**(2):631-637.
188. Brandriss MC, Magasanik B: **Subcellular compartmentation in control of converging pathways for proline and arginine metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Journal of Bacteriology* 1981, **145**(3):1359-1364.

189. Kispal G, Steiner H, Court DA, Rolinski B, Lill R: **Mitochondrial and Cytosolic Branched-chain Amino Acid Transaminases from Yeast, Homologs of the myc Oncogene-regulated Eca39 Protein.** *Journal of Biological Chemistry* 1996, **271**(40):24458-24464.
190. Förster J, Famili I, Fu P, Palsson BÅ, Nielsen J: **Genome-Scale Reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* Metabolic Network.** *Genome Research* 2003, **13**(2):244-253.
191. Duarte NC, Herrgard MJ, Palsson BO: **Reconstruction and Validation of *Saccharomyces cerevisiae* iND750, a Fully Compartmentalized Genome-Scale Metabolic Model.** *Genome Research* 2004, **14**:1298-1309.
192. Lagunas R, Gancedo J, M.: **Reduced Pyridine-Nucleotides Balance in Glucose-Growing *Saccharomyces cerevisiae*.** *European Journal of Biochemistry* 1973, **37**(1):90-94.
193. Minard KI, Jennings GT, Loftus TM, Xuan D, McAlister-Henn L: **Sources of NADPH and Expression of Mammalian NADP⁺-specific Isocitrate Dehydrogenases in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Journal of Biological Chemistry* 1998, **273**(47):31486-31493.
194. Wang X, Mann CJ, Bai Y, Ni L, Weiner H: **Molecular Cloning, Characterization, and Potential Roles of Cytosolic and Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenases in Ethanol Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Journal of Bacteriology* 1998, **180**(4):822-830.
195. Grabowska D, Chelstowska A: **The ALD6 Gene Product Is Indispensable for Providing NADPH in Yeast Cells Lacking Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Activity.** *Journal of Biological Chemistry* 2003, **278**(16):13984-13988.
196. Pollak N, Niere M, Ziegler M: **NAD Kinase Levels Control the NADPH Concentration in Human Cells.** *Journal of Biological Chemistry* 2007, **282**(46):33562-33571.
197. Outten C, Culotta V: **A novel NADH kinase is the mitochondrial source of NADPH in *Saccharomyces cerevisiae*.** *The EMBO journal* 2003, **22**(9):2015-2024.
198. Shi F, Kawai S, Mori S, Kono E, Murata K: **Identification of ATP-NADH kinase isozymes and their contribution to supply of NADP(H) in *Saccharomyces cerevisiae*.** *FEBS Journal* 2005, **272**(13):3337-3349.
199. Jo S-H, Son M-K, Koh H-J, Lee S-M, Song I-H, Kim Y-O, Lee Y-S, Jeong K-S, Kim WB, Park J-W *et al.*: **Control of Mitochondrial Redox Balance and Cellular Defense against Oxidative Damage by Mitochondrial NADP⁺-dependent Isocitrate Dehydrogenase.** *Journal of Biological Chemistry* 2001, **276**(19):16168-16176.
200. Rosenfeld E, Beauvoit B: **Role of the non-respiratory pathways in the utilization of molecular oxygen by *Saccharomyces cerevisiae*.** *Yeast* 2003, **20**(13):1115-1144.
201. Andreasen AA, Stier TJB: **Anaerobic nutrition of *Saccharomyces cerevisiae*. I. Ergosterol requirement for growth in a defined medium.** *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 1953, **41**(1):23-36.
202. Macy JM, Miller MW: **Anaerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae* in the absence of oleic acid and ergosterol?** *Archives of Microbiology* 1983, **134**(1):64.
203. Bulder CJEA, Reinink M: **Unsaturated fatty acid composition of wild type and respiratory deficient yeasts after aerobic and anaerobic growth.** *Antonie van Leeuwenhoek* 1974, **40**(3):445.
204. Pilkington BJ, Rose AH: **Incorporation of unsaturated fatty acids by *Saccharomyces cerevisiae*: Conservation of fatty-acyl saturation in phosphatidylinositol.** *Yeast* 1991, **7**(5):489-494.
205. Fiaux J, Cakar ZP, Sonderegger M, Wuthrich K, Szyperski T, Sauer U: **Metabolic-Flux Profiling of the Yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*.** *Eukaryotic Cell* 2003, **2**(1):170-180.
206. Blank L, Kuepfer L, Sauer U: **Large-scale 13C-flux analysis reveals mechanistic principles of metabolic network robustness to null mutations in yeast.** *Genome Biology* 2005, **6**.

207. Blank LM, Sauer U: **TCA cycle activity in *Saccharomyces cerevisiae* is a function of the environmentally determined specific growth and glucose uptake rates.** *Microbiology* 2004, **150**(4):1085-1093.
208. Cogoni C, Valenzuela L, Gonzalez-Halphen D, Olivera H, Macino G, Ballario P, Gonzalez A: ***Saccharomyces cerevisiae* has a single glutamate synthase gene coding for a plant-like high-molecular-weight polypeptide.** *J Bacteriol* 1995, **177**(3):792-798.
209. Mitchell AP, Magasanik B: **Purification and properties of glutamine synthetase from *Saccharomyces cerevisiae*.** *Journal of Biological Chemistry* 1983, **258**(1):119-124.
210. Oura E: **Reaction products of yeast fermentations.** *Process Biochememistry* 1977, **12**:19-21.
211. Blomberg A, Adler L: **Roles of glycerol and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) in acquired osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Journal of Bacteriology* 1989, **171**(2):1087-1092.
212. Nevoigt E, Stahl U: **Reduced pyruvate decarboxylase and increased glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD⁺] levels enhance glycerol production in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Yeast* 1996, **12**(13):1331-1337.
213. Tempest DW, Neijssel OM: **The Status of YATP and Maintenance Energy as Biologically Interpretable Phenomena.** *Annual Review of Microbiology* 1984, **38**(1):459-513.
214. Payot S, Guedon E, Cailliez C, Gelhaye E, Petitdemange H: **Metabolism of cellobiose by *Clostridium cellulolyticum* growing in continuous culture: evidence for decreased NADH reoxidation as a factor limiting growth.** *Microbiology* 1998, **144**(2):375-384.
215. Girbal L, Soucaille P: **Regulation of *Clostridium acetobutylicum* metabolism as revealed by mixed-substrate steady-state continuous cultures: role of NADH/NAD ratio and ATP pool.** *J Bacteriol* 1994, **176**(21):6433-6438.
216. Xu X, Cao L, Chen X: **Elementary Flux Mode Analysis for Optimized Ethanol Yield in Anaerobic Fermentation of Glucose with *Saccharomyces cerevisiae*.** *Chinese Journal of Chemical Engineering* 2008, **16**(1):135.
217. Berríos-Rivera SJ, Bennett GN, San K-Y: **The Effect of Increasing NADH Availability on the Redistribution of Metabolic Fluxes in *Escherichia coli* Chemostat Cultures.** *Metabolic Engineering* 2002, **4**(3):230-237.
218. Arikawa Y, Enomoto K, Muratsubaki H, Okazaki M: **Soluble fumarate reductase isoenzymes from *Saccharomyces cerevisiae* are required for anaerobic growth.** *FEMS Microbiology Letters* 1998, **165**(1):111-116.
219. Akita O, Nishimori C, Shimamoto T, Fujii T, Iefuji H: **Transport of Pyruvate in *Saccharomyces cerevisiae* and Cloning of the Gene Encoded Pyruvate Permease.** *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2000, **64**(5):980.
220. Doi K, Miyauchi S, Kawamoto M: **Conversion of pyruvic acid to acetaldehyde during mashing-process after the alcoholic fortification in sake brewing. J.** *Journal of Fermentation Technologies* 1974, **52**:416-422.
221. Sato K, Yoshida Y, Hirahara T, Ohba T: **On-line measurement of intracellular ATP of *Saccharomyces cerevisiae* and pyruvate during sake mashing.** *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2000, **90**(3):294.
222. Mizoguchi H, Hara S: **Reduction of pyruvic acid in sake mash by enzymatic reaction of pyruvate decarboxylase in permeabilized cells.** *Journal of Fermentation and Bioengineering* 1995, **73**:37-42.
223. Narendranath NV, Thomas AKC, Ingledew WM: **Acetic acid and lactic acid inhibition of growth of *Saccharomyces cerevisiae* by different mechanisms.** *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 2001, **59**(4):187-194.

224. Wijsman MR, Dijken JP, Scheffers WA: **Effect of oxygen and acetoin on growth and metabolite production by the yeast *Brettanomyces intermedius***. *Antonie van Leeuwenboek* 1984, **50**(1):112-112.
225. Aguilar Uscanga MG, Délia ML, Strehaiano P: ***Brettanomyces bruxellensis*: effect of oxygen on growth and acetic acid production**. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2003, **61**(2):157-162.

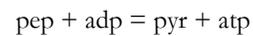
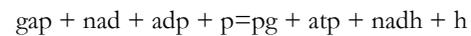
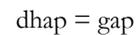
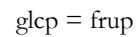
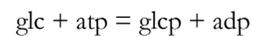
ANNEXES

Réseau métabolique

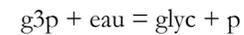
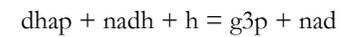
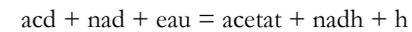
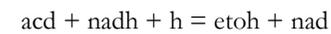
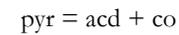
Métabolisme central:

Métabolisme cytoplasmique:

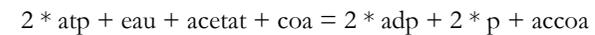
Glycolyse



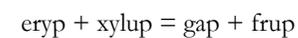
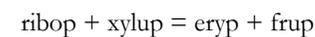
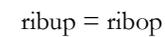
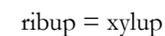
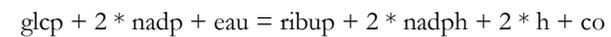
Synthèse d'acétaldéhyde, éthanol, acétate, et glycérol



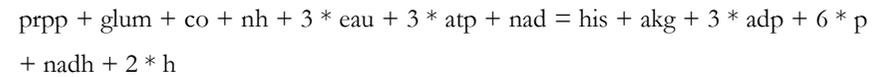
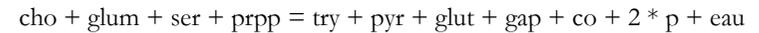
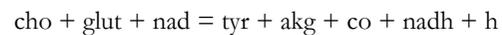
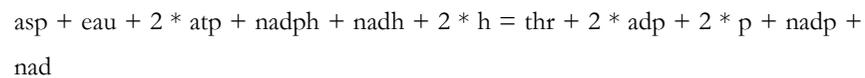
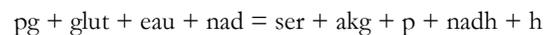
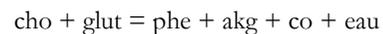
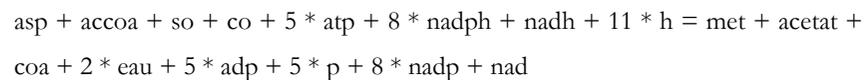
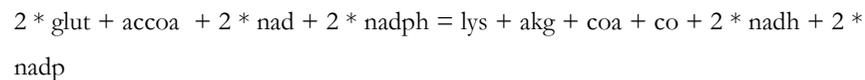
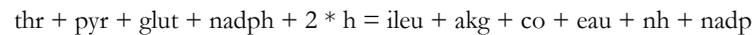
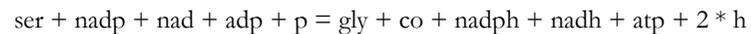
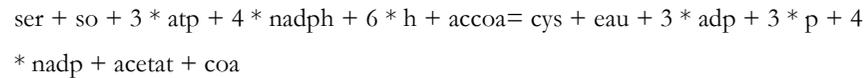
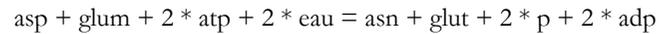
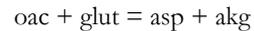
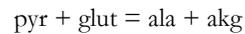
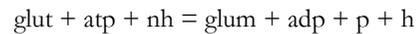
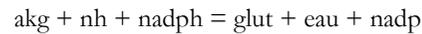
Synthèse d'acétyl-coA



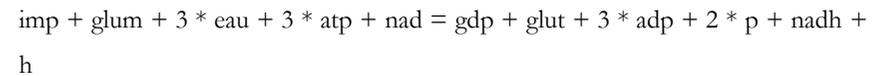
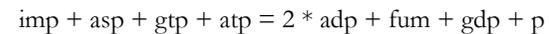
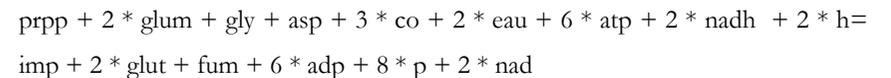
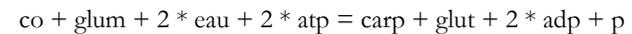
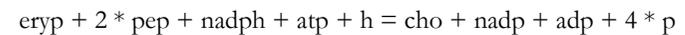
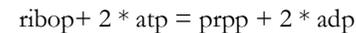
Voie des Pentoses Phosphates



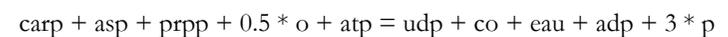
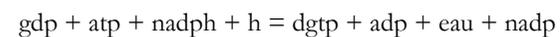
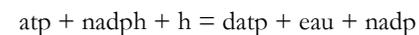
Synthèse des Acides Aminés cytosoliques

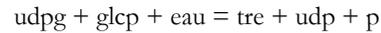
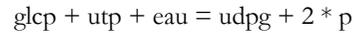
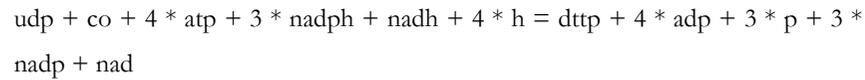
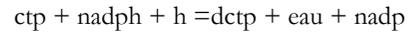
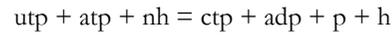
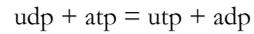


Synthèse des Précurseurs des Acides Aminés

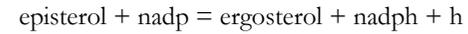
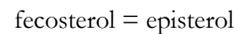
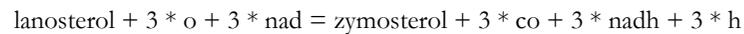
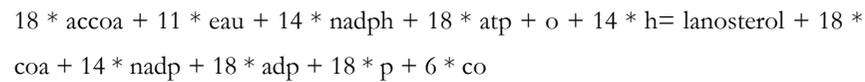
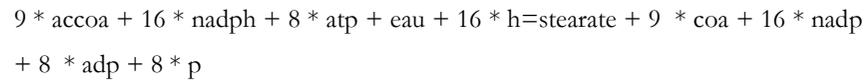
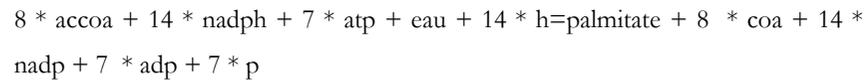


Synthèse des Bases Azotées

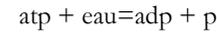
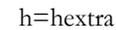
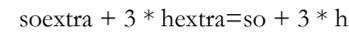
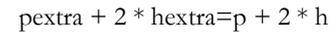




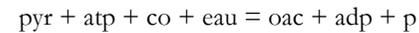
Synthèse des acides gras



Transport au travers de la membrane cytoplasmique



Synthèse d'oxaloacétate



Echanges mitochondrie/cytoplasme:

Echanges d'acides aminés

glut=glutmi

argmi = arg

leumi = leu

promi = pro

valmi = val

carp=carpmi

asp=aspmi

Echanges d'intermédiaires du cycle de Krebs

oac = oacmi

akg = akgmi

pyr = pyrmi

sucmi = suc

fum=fummi

Navette éthanol

etoh=etohmi

acdmi=acd

Navette glycérol

g3p + fadmi = dhap + fadhmi

Echanges de molécules simples

comi = co

eaumi = eau

atpmi = atp

hmi = h

adpmi = adp

pmi= p

accoami=accoa

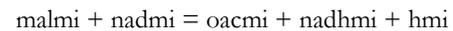
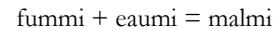
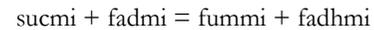
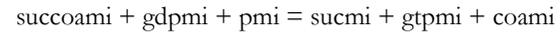
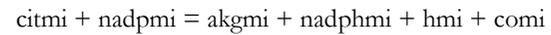
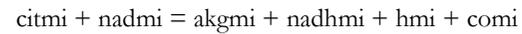
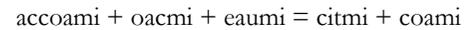
o=omi

gtpmi = gtp

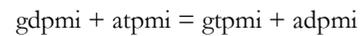
gdp = gdpmi

Cycle de Krebs

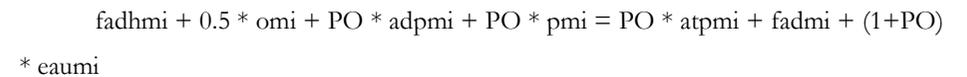
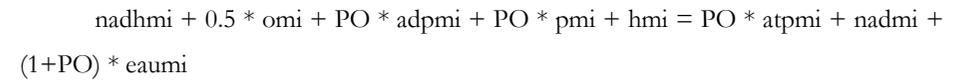
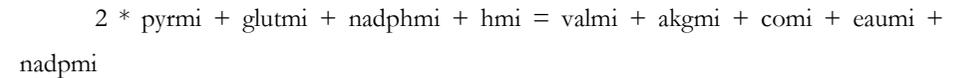
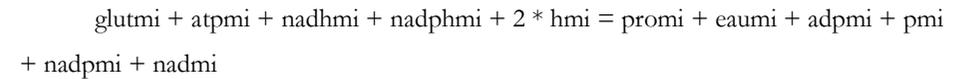
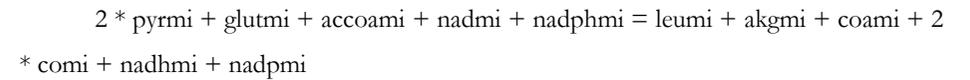
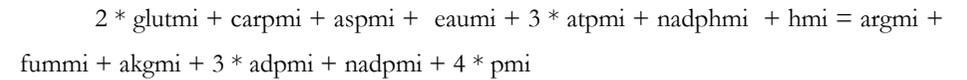
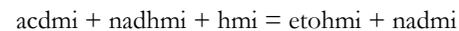
Synthèse des Acides Aminés mitochondriaux



Formation du GTP



Réduction de l'acétaldéhyde



Synthèse des macromolécules :

$\text{coeffglut} * \text{glut} + \text{coeffglum} * \text{glum} + \text{coeffpro} * \text{pro} + \text{coeffarg} * \text{arg} + \text{coefflys} * \text{lys} + \text{coeffser} * \text{ser} + \text{coeffgly} * \text{gly} + \text{coeffcys} * \text{cys} + \text{coeffasp} * \text{asp} + \text{coeffasn} * \text{asn} + \text{coeffthr} * \text{thr} + \text{coeffmet} * \text{met} + \text{coeffileu} * \text{ileu} + \text{coeffala} * \text{ala} + \text{coeffval} * \text{val} + \text{coeffleu} * \text{leu} + \text{coeffphe} * \text{phe} + \text{coefftyr} * \text{tyr} + \text{coefftry} * \text{try} + \text{coeffhis} * \text{his} + (2 * \text{coeffglut} + 2 * \text{coeffglum} + 2 * \text{coeffpro} + 2 * \text{coeffarg} + 2 * \text{coefflys} + 2 * \text{coeffser} + 2 * \text{coeffgly} + 2 * \text{coeffcys} + 2 * \text{coeffasp} + 2 * \text{coeffasn} + 2 * \text{coeffthr} + 2 * \text{coeffmet} + 2 * \text{coeffileu} + 2 * \text{coeffala} + 2 * \text{coeffval} + 2 * \text{coeffleu} + 2 * \text{coeffphe} + 2 * \text{coefftyr} + 2 * \text{coefftry} + 2 * \text{coeffhis} + n + 2 * \text{nb}) * \text{atp} + (2 * \text{coeffglut} + 2 * \text{coeffglum} + 2 * \text{coeffpro} + 2 * \text{coeffarg} + 2 * \text{coefflys} + 2 * \text{coeffser} + 2 * \text{coeffgly} + 2 * \text{coeffcys} + 2 * \text{coeffasp} + 2 * \text{coeffasn} + 2 * \text{coeffthr} + 2 * \text{coeffmet} + 2 * \text{coeffileu} + 2 * \text{coeffala} + 2 * \text{coeffval} + 2 * \text{coeffleu} + 2 * \text{coeffphe} + 2 * \text{coefftyr} + 2 * \text{coefftry} + 2 * \text{coeffhis} + 3 * \text{nb}) * \text{gtp} + (4 * \text{coeffglut} + 4 * \text{coeffglum} + 4 * \text{coeffpro} + 4 * \text{coeffarg} + 4 * \text{coefflys} + 4 * \text{coeffser} + 4 * \text{coeffgly} + 4 * \text{coeffcys} + 4 * \text{coeffasp} + 4 * \text{coeffasn} + 4 * \text{coeffthr} + 4 * \text{coeffmet} + 4 * \text{coeffileu} + 4 * \text{coeffala} + 4 * \text{coeffval} + 4 * \text{coeffleu} + 4 * \text{coeffphe} + 4 * \text{coefftyr} + 4 * \text{coefftry} + 4 * \text{coeffhis} + n + 5 * \text{nb}) * \text{eau} = \text{protein} + (2 * \text{coeffglut} + 2 * \text{coeffglum} + 2 * \text{coeffpro} + 2 * \text{coeffarg} + 2 * \text{coefflys} + 2 * \text{coeffser} + 2 * \text{coeffgly} + 2 * \text{coeffcys} + 2 * \text{coeffasp} + 2 * \text{coeffasn} + 2 * \text{coeffthr} + 2 * \text{coeffmet} + 2 * \text{coeffileu} + 2 * \text{coeffala} + 2 * \text{coeffval} + 2 * \text{coeffleu} + 2 * \text{coeffphe} + 2 * \text{coefftyr} + 2 * \text{coefftry} + 2 * \text{coeffhis} + n + 2 * \text{nb}) * \text{adp} + (2 * \text{coeffglut} + 2 * \text{coeffglum} + 2 * \text{coeffpro} + 2 * \text{coeffarg} + 2 * \text{coefflys} + 2 * \text{coeffser} + 2 * \text{coeffgly} + 2 * \text{coeffcys} + 2 * \text{coeffasp} + 2 * \text{coeffasn} + 2 * \text{coeffthr} + 2 * \text{coeffmet} + 2 * \text{coeffileu} + 2 * \text{coeffala} + 2 * \text{coeffval} + 2 * \text{coeffleu} + 2 * \text{coeffphe} + 2 * \text{coefftyr} + 2 * \text{coefftry} + 2 * \text{coeffhis} + 3 * \text{nb}) * \text{gdp} + (4 * \text{coeffglut} + 4 * \text{coeffglum} + 4 * \text{coeffpro} + 4 * \text{coeffarg} + 4 * \text{coefflys} + 4 * \text{coeffser} + 4 * \text{coeffgly} + 4 * \text{coeffcys} + 4 * \text{coeffasp} + 4 * \text{coeffasn} + 4 * \text{coeffthr} + 4 * \text{coeffmet} + 4 * \text{coeffileu} + 4 * \text{coeffala} + 4 * \text{coeffval} + 4 * \text{coeffleu} + 4 * \text{coeffphe} + 4 * \text{coefftyr} + 4$

$* \text{coefftry} + 4 * \text{coeffhis} + n + 5 * \text{nb}) * \text{p} + (4 * \text{coeffglut} + 4 * \text{coeffglum} + 4 * \text{coeffpro} + 4 * \text{coeffarg} + 4 * \text{coefflys} + 4 * \text{coeffser} + 4 * \text{coeffgly} + 4 * \text{coeffcys} + 4 * \text{coeffasp} + 4 * \text{coeffasn} + 4 * \text{coeffthr} + 4 * \text{coeffmet} + 4 * \text{coeffileu} + 4 * \text{coeffala} + 4 * \text{coeffval} + 4 * \text{coeffleu} + 4 * \text{coeffphe} + 4 * \text{coefftyr} + 4 * \text{coefftry} + 4 * \text{coeffhis} + n + 5 * \text{nb}) * \text{h}$

$\text{coeffatp} * \text{atp} + \text{coeffgtp} * \text{gtp} + \text{coeffutp} * \text{utp} + \text{coeffctp} * \text{ctp} + (\text{coeffatp} + \text{coeffgtp} + \text{coeffutp} + \text{coeffctp}) * \text{eau} = \text{rna} + (2 * \text{coeffatp} + 2 * \text{coeffgtp} + 2 * \text{coeffutp} + 2 * \text{coeffctp}) * \text{p}$

$\text{coeffdatp} * \text{datp} + \text{coeffdgt} * \text{dgtp} + \text{coeffdctp} * \text{dctp} + \text{coeffdttp} * \text{dttp} + (\text{coeffdatp} + \text{coeffdgt} + \text{coeffdctp} + \text{coeffdttp}) * \text{eau} = \text{dna} + (2 * \text{coeffdatp} + 2 * \text{coeffdgt} + 2 * \text{coeffdctp} + 2 * \text{coeffdttp}) * \text{p}$

$(\text{coeffpalpa} / 2 + \text{coeffstepa} / 2) * \text{g3p} + \text{coeffpalpa} * \text{palmitate} + \text{coeffstepa} * \text{stearate} = \text{phosphatidate} + (\text{coeffpalpa} + \text{coeffstepa}) * \text{eau}$

$(\text{coeffpalpi} / 2 + \text{coeffstepi} / 2) * \text{glcp} + (\text{coeffpalpi} / 2 + \text{coeffstepi} / 2) * \text{g3p} + \text{coeffpalpi} * \text{palmitate} + \text{coeffstepi} * \text{stearate} + (\text{coeffpalpi} + \text{coeffstepi}) * \text{atp} = \text{phosphatidylinositol} + (\text{coeffpalpi} + \text{coeffstepi}) * \text{adp} + (\text{coeffpalpi} * 3 / 2 + \text{coeffstepi} * 3 / 2) * \text{p}$

$(\text{coeffpalps} / 2 + \text{coeffsteps} / 2) * \text{ser} + (\text{coeffpalps} / 2 + \text{coeffsteps} / 2) * \text{g3p} + \text{coeffpalps} * \text{palmitate} + \text{coeffsteps} * \text{stearate} + (\text{coeffpalps} + \text{coeffsteps}) * \text{atp}$

=phosphatidylserine + (coeffpalps + coeffsteps) * adp + (coeffpalps + coeffsteps) * p + (coeffpalps / 2 + coeffsteps / 2) * eau

(coeffpalpc/2 + coeffstepc / 2) * ser + (coeffpalpc /2+ coeffstepc / 2) * g3p + coeffpalpc * palmitate + coeffstepc * stearate + (coeffpalpc * 5/2 + coeffstepc * 5/2) * atp + (3*coeffpalpc + coeffstepc * 3) * nadph + (coeffpalpc *3/2+ coeffstepc * 3 / 2) * nadh + (coeffpalpc *6+ coeffstepc * 6) * h+ (coeffpalpc + coeffstepc) * co = phosphatidylcholine + (coeffpalpc * 5/2 + coeffstepc * 5/2) * adp + (coeffpalpc*5/2 + coeffstepc * 5 / 2) * p + (3*coeffpalpc + coeffstepc * 3) * nadp + (coeffpalpc *3/2+ coeffstepc * 3 / 2) * nad + (2*coeffpalpc + coeffstepc * 2) * eau

(coeffpaldpg + coeffstedpg) * g3p + coeffpaldpg * palmitate + coeffstedpg *stearate + (coeffpaldpg + coeffstedpg) * atp = diphosphatidylglycerol + (coeffpaldpg / 4 + coeffstedpg / 4) * glyc + (coeffpaldpg + coeffstedpg) * adp + (coeffpaldpg *6/4+ coeffstedpg * 6 / 4) * p

(coeffpalpe /2+ coeffstepe / 2) * ser + (coeffpalpe /2+ coeffstepe / 2) * g3p + coeffpalpe * palmitate + coeffstepe * stearate + (coeffpalpe + coeffstepe) * atp = phosphatidylethanolamine + (coeffpalpe / 2 + coeffstepe / 2) * co + (coeffpalpe + coeffstepe) * adp + (coeffpalpe + coeffstepe) * p + (coeffpalpe / 2 + coeffstepe / 2) * eau

coeffpa * phosphatidate + coeffpe * phosphatidylethanolamine + coeffps * phosphatidylserine + coeffpi * phosphatidylinositol + coeffdpg * diphosphatidylglycerol + coeffpc * phosphatidylcholine=phospholipids

(coeffpaltag /3+ coeffstetag / 3) * g3p + coeffpaltag * palmitate + coeffstetag * stearate =tag + (2 * coeffpaltag / 3 + 2 * coeffstetag / 3) * eau + (coeffpaltag/3 + coeffstetag/3) * p

coeffpalla * palmitate + coeffstela * stearate + (coeffpalla + coeffstela) * lanosterol + (coeffpalla + coeffstela) * atp = lanosterolester + (coeffpalla + coeffstela) * adp + (coeffpalla + coeffstela) * p

coeffpalzy * palmitate + coeffstezy * stearate + (coeffpalzy + coeffstezy) * zymosterol + (coeffpalzy + coeffstezy) * atp = zymosterolester + (coeffpalzy + coeffstezy) * adp + (coeffpalzy + coeffstezy) * p

coeffpalfe * palmitate + coeffstefe * stearate + (coeffpalfe + coeffstefe) * fecosterol + (coeffpalfe + coeffstefe) * atp = fecosterolester + (coeffpalfe + coeffstefe) * adp + (coeffpalfe + coeffstefe) * p

coeffpalep * palmitate + coeffsteep * stearate + (coeffpalep + coeffsteep) * episterol + (coeffpalep + coeffsteep) * atp = episterolester + (coeffpalep + coeffsteep) * adp + (coeffpalep + coeffsteep) * p

coeffpaler * palmitate + coeffsteer * stearate + (coeffpaler + coeffsteer) * ergosterol + (coeffpaler + coeffsteer) * atp = ergosterolester + (coeffpaler + coeffsteer) * adp + (coeffpaler + coeffsteer) * p

$\text{coefflae} * \text{lanosterolester} + \text{coeffzye} * \text{zymosterolester} + \text{coefffee} * \text{fecosterolester} + \text{coeffepe} * \text{episterolester} + \text{coeffere} * \text{ergosterolester} = \text{se}$

$\text{coefftag} * \text{tag} + \text{coeffpl} * \text{phospholipids} + \text{coeffse} * \text{se} = \text{lipids}$

$(1 / 162) * \text{udpg} = (1 / 162) * \text{udp} + \text{glycogen}$

$(1 / 162) * \text{udpg} = (1 / 162) * \text{udp} + \text{glucan}$

$(1 / 203) * \text{udpacetylglucosamine} = (1 / 203) * \text{udp} + \text{chitin}$

$(1 / 162) * \text{gdpmannose} = (1 / 162) * \text{gdp} + \text{mannan}$

$\text{coeffglycogen} * \text{glycogen} + \text{coeffchitin} * \text{chitin} + \text{coeffglucan} * \text{glucan} + \text{coeffmannan} * \text{mannan} + (\text{coefftre} / 342) * \text{tre} = \text{polysacch}$

Synthèse de la biomasse :

$\text{qttlipids} * \text{lipids} + \text{qttpolysacch} * \text{polysacch} + \text{qttrna} * \text{rna} + \text{qttprotein} * \text{protein} + \text{qttDNA} * \text{DNA} = \text{bio}$

Abbréviation

accoa	Acétyl coenzyme A
acd	Acétaldehyde
acetat	Acétate
adp	Adénosine diphosphate
akg	alpha-cétoglutarate
ala	Alanine
arg	Arginine
asn	Asparagine
asp	Aspartate
atp	Adénosine triphosphate
bio	Biomasse
carp	Carbamoyl-phosphate
chitin	Chitin
cho	Chorismate
cit	Citrate
co	Carbone dioxyde
coa	Coenzyme A

ctp	Cytidine triphosphate
cys	Cystéine
datp	Déoxyadenosine triphosphate
dctp	Déoxycytidine triphosphate
dgtp	Déoxyguanosine triphosphate
dhap	Dihydroxiacétone phosphate
diphosphatidylglycerol	Diphosphatidylglycérol
dna	Déoxyribonucléique acide
dttp	Déoxythymidine triphosphate
eau	Eau
episterol	Epistérol
episterolester	Epistérol ester
ergosterol	Ergostérol
ergosterolester	Ergostérol ester
eryp	Erythrose 4-phosphate
etoh	Ethanol
fad	Flavine adénine dinucléotide
fadh	Flavine adénine dinucléotide réduite
fecosterol	Fécostérol
fecosterolester	Fécostérol ester

frup Fructose 6-phosphate
fum Fumarate
gap Glycéraldéhyde 3-phosphate
gdp Guanosine diphosphate
gdpmannose GDP-Mannose
glc Glucose
glcp Glucose 6-phosphate
glucan Glucane
glum Glutamine
glut Glutamate
gly Glycine
glyc Glycérol
glycogen Glycogène
gtp Guanosine triphosphate
h Proton
hextra Proton Extracellulaire
his Histidine
ileu Isoleucine
imp Inosine monophosphate
lanosterol Lanostérol

lanosterolester Lanostérol ester
leu Leucine
lipids Lipides
lys Lysine
mal Malate
mannan Mannane
met Méthionine
nad Nicotinamide adénine dinucléotide
nadh Nicotinamide adénine dinucléotide
nadp Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
nadph Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
nh Ammoniaque
nhextra Ammoniaque extracellulaire
o Oxygène
oac Oxaloacétate
p Phosphate
palmitate Palmitate
pep Phosphoenolpyruvate
pextra Phosphate extracellulaire
pg Phosphoglycérate

phe Phénylalanine

phosphatidate Phosphatidate

phosphatidylcholine Phosphatidylcholine

phosphatidylethanolamine
Phosphatidyléthanolamine

phosphatidylinositol
Phosphatidylinositol

phosphatidylserine Phosphatidylsérine

phospholipids Phospholipides

polysacch Polysaccharides

pro Proline

protein Protéines

prpp 5-Phosphoribosyl diphosphate

pyr Pyruvate

ribop Ribose 5-phosphate

ribup Ribulose 5-phosphate

rna Acide Ribonucléique

se Stéryl ester

ser Sérine

so Sulfate

soextra Sulfate extracellulaire

stearate Stéarate

suc Succinate

succoa Succinyl coenzyme A

tag Triacylglycérol

thr Thréonine

tre Tréhalose

try Tryptophane

tyr Tyrosine

udp Uridine diphosphate

udpacetylglucosamine
UDP-N-acétylglucosamine

udpg UDP-glucose

utp Uridine triphosphate

val Valine

xylup Xylulose 5-phosphate

zymosterol Zymostérol

zymosterolester Zymostérol ester

accoami Acétyl-coenzyme-A Mitochondrial

acdmi Acétaldéhyde Mitochondrial

acemi	Acétate Mitochondrial	malmi	Malate Mitochondrial
adpmi	Adénosine-diphosphate Mitochondrial	nadhmi	NADH Mitochondrial
akgmi	alpha-céto-glutarate Mitochondrial	nadmi	NAD ⁺ Mitochondrial
argmi	Arginine Mitochondriale	nadphmi	NAPDH Mitochondrial
aspmi	Aspartate Mitochondrial	nadpmi	NAPD ⁺ Mitochondrial
atpmi	Adénosine-triphosphate Mitochondriale	nhmi	Ion ammonium Mitochondrial
carpmi	Carbamoyl-phosphate Mitochondrial	oacmi	Oxalo-acétate Mitochondrial
citmi	Citrate Mitochondrial	omi	Oxygène Mitochondrial
coami	Coenzyme-A Mitochondrial	pmi	Phosphate Mitochondrial
comi	Dioxyde de carbone Mitochondrial	promi	Proline Mitochondriale
eaumi	Eau Mitochondriale	pyrmi	Pyruvate Mitochondrial
etohmi	Ethanol Mitochondrial	succoami	Succinyl-coenzyme-A Mitochondrial
fadhmi	FADH Mitochondrial	sucmi	Succinate Mitochondrial
fadmi	FAD ⁺ Mitochondrial	valmi	Valine Mitochondrial
fummi	Fumarate Mitochondrial		
gdpmi	Guanosine-diphosphate Mitochondriale		
glutmi	Glutamate Mitochondrial		
gtpmi	Guanosine-triphosphate Mitochondrial		
hmi	Ion H ⁺ Mitochondrial		
leumi	Leucine Mitochondriale		

