

Bioproduction fermentaire de l'isobutène

Enjeu industriel et défi scientifique

Philippe Marlière et Mathieu Allard

Résumé Les alcènes gazeux figurent parmi les molécules qui pourraient se dériver des ressources végétales comme les hydrates de carbone en conservant la plupart de l'énergie accumulée par la photosynthèse. Pour effectuer cette conversion, des réactions chimiques inédites doivent être programmées génétiquement dans le métabolisme des cellules microbiennes. L'élaboration d'une telle filière fermentaire est explicitée dans le cas de l'isobutène, synthon crucial de l'industrie des carburants, des élastomères et des résines.

Mots-clés **Biologie de synthèse, ingénierie métabolique, rétro-biosynthèse, oléfines gazeuses, isobutylène, Global Bioenergies.**

Abstract **Fermentative bioproduction of isobutene: industrial stake and scientific challenge**
Gaseous alkenes represent a large class of compounds which in principle could be derived from renewable resources such as carbohydrates, while retaining most of the energy stored during photosynthesis. In order to achieve such a conversion at the industrial scale, novel chemical reactions will have to be genetically programmed in the metabolism of microbial cells. This review discusses fermentation processes currently elaborated for generating isobutene, a major molecule of petrochemistry that is transformed into fuels, elastomers and resins.

Keywords **Synthetic biology, metabolic engineering, retro-biosynthesis, gaseous olefins, isobutene, Global Bioenergies.**

Les oléfines gazeuses – éthylène, propylène, isobutylène, butylènes, butadiène et isoprène – constituent la catégorie générique de molécules organiques la plus abondante et réactive que fabrique et convertit l'industrie chimique [1].

Produites à l'échelle de dizaines de millions de tonnes par craquage du pétrole, elles servent à la fabrication de carburants, d'élastomères et de résines, occasionnant à l'issue de leur utilisation, de leur combustion ou biodégradation un ajout au cycle géochimique du carbone et à la surcharge de l'atmosphère en CO₂. L'option de produire des oléfines gazeuses à partir de ressources renouvelables présente à la fois un enjeu colossal et un défi technologique pour l'industrie et la biologie de synthèse.

Enjeu colossal, car ce sont des réactions métaboliques, précisément commandées par des instructions génétiques appropriées dans des micro-organismes reprogrammés et confinés, qui seront le mieux à même de maximiser productivité, rendement et pureté des hydrocarbures produits à partir de matière première végétale. Seuls en effet les bioprocédés peuvent faire usage de la prolifération cellulaire et de la sélection génétique pour s'améliorer.

Défi technologique, car les organismes vivants naturels se gardent bien de produire des alcènes gazeux, hormis l'éthylène et l'isoprène émis parcimonieusement par les plantes à des fins de signalisation et de climatisation : la volatilisation massive des flux carbonés entrainerait en effet une déperdition nutritionnelle et énergétique que la sélection naturelle a forcément évitée au cours de l'évolution des espèces. Les filières de bioproduction des oléfines gazeuses devront par conséquent être inventées et implantées de toute pièce dans des cellules microbiennes, bactéries ou levures.



Figure 1 - Usine de démonstration de Leuna, en Allemagne. Équipée d'un bioréacteur de 5 000 L, cette installation représente la dernière étape de montée en échelle du procédé de production d'isobutène de Global Bioenergies avant l'usine commerciale. Cette dernière comprendra une série de fermenteurs de très grande taille, et demandera une nouvelle montée en échelle d'un facteur 50 environ (par fermenteur).

La société Global Bioenergies⁽¹⁾, fondée en 2008 et cotée en bourse depuis 2011, a entrepris de remplacer la provenance fossile du jeu complet des oléfines gazeuses par une ressource renouvelable dans l'industrie.

Le cas le plus abouti est celui de l'isobutène, dont la bioproduction par des bactéries est sur le point de commencer à l'échelle d'une usine de démonstration (Leuna, en Allemagne, *figure 1*) exploitant des voies de biosynthèse inédites dans les écosystèmes terrestres et une diversification

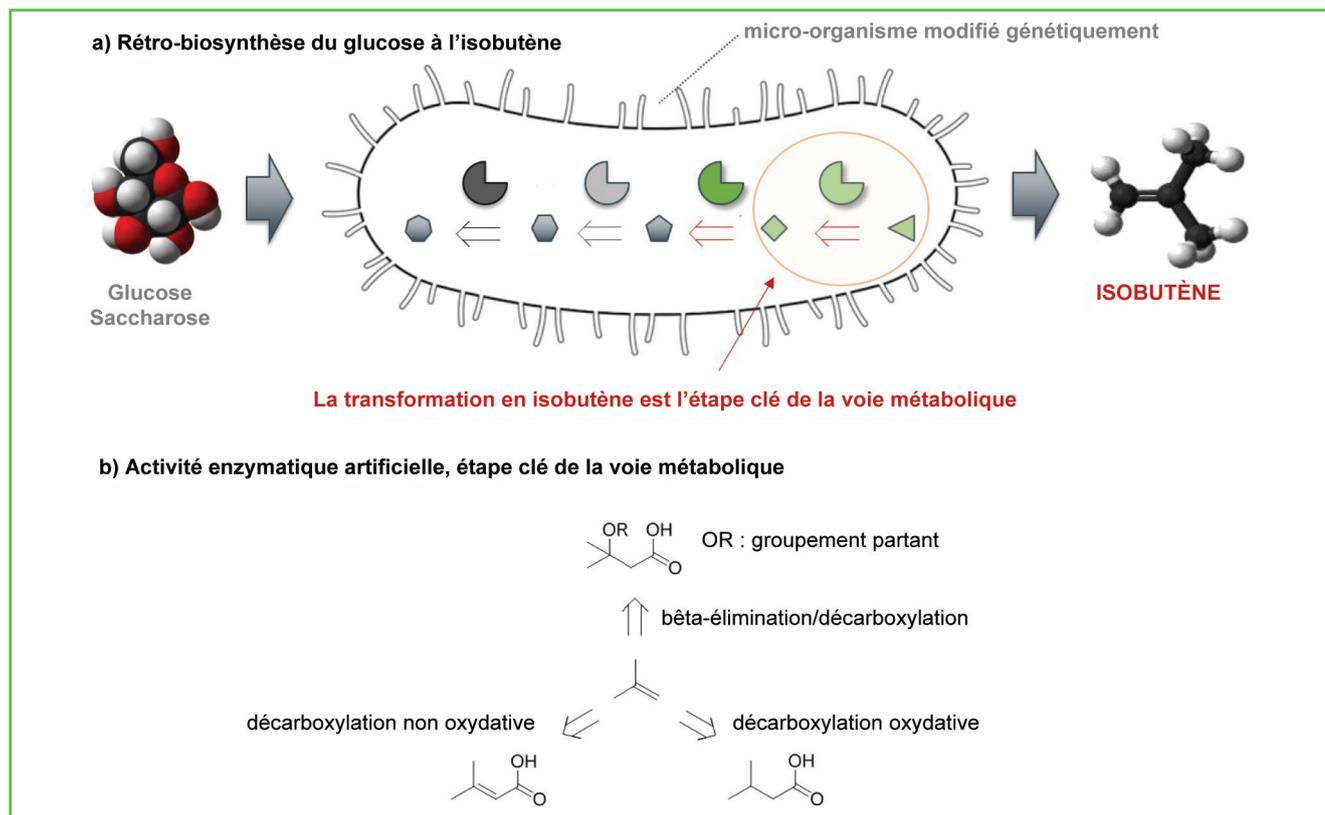


Figure 2 - a) Rétro-biosynthèse et élaboration d'enzymes artificiels pour produire des oléfines légères, en premier lieu l'isobutène. b) Différents mécanismes biocatalytiques envisagés pour convertir un acide carboxylique en isobutène.

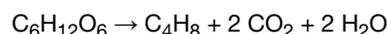
artificielle de différents enzymes naturels pour qu'ils produisent efficacement ce gaz hydrocarbure. Cet article relate la démarche suivie pour y parvenir. L'approvisionnement en isobutène représente un enjeu d'importance primordiale pour l'industrie, car cette oléfine se prête aisément aux réactions de polymérisation et d'alkylation *via* le carbocation tert-butyle. L'isooctane (2,2,4-tri-méthyl-pentane), qui constitue le carburant principal de l'essence, ainsi que l'isododécane (2,2,4,6,6-penta-méthyl-heptane), qui répond aux spécifications d'un kérosène renouvelable pour les turboréacteurs, s'obtiennent ainsi par hydrogénation du dimère et du trimère de l'isobutène. Notons également que la catalyse acide conduit très efficacement à l'alkylation des alcools par l'isobutène [2], ce qui ouvre la perspective de produire, à partir d'éthanol et d'isobutène d'origine végétale, une version entièrement renouvelable de l'éther peu volatil ETBE (éthyl tertio butyl éther). Ce faisant, la proportion de biocarburant dans l'essence pourrait être augmentée tout en évitant les inconvénients de miscibilité, d'évaporation et de corrosion occasionnés par l'éthanol non alkylé.

État de l'art

La formation biologique d'isobutène par la levure *Rhodotorula minuta* a été décrite à la fin des années 1980 comme résultant de la décarboxylation oxydative de l'acide isovalérique catalysée par un enzyme, une hémoprotéine de la famille des cytochromes P450 [3-4]. L'activité infime de cet enzyme (0,001 conversion par enzyme par jour) ne permet pas de l'exploiter dans un procédé industriel. Aucun autre enzyme naturel n'a depuis été identifié qui soit capable de catalyser de manière efficace la formation d'isobutène.

C'est la raison pour laquelle Global Bioenergies a été amenée à concevoir des voies métaboliques produisant de

l'isobutène suivant des réactions non naturelles et mettant en œuvre des biocatalyseurs absents dans la nature. De telles voies métaboliques sont systématiquement conçues de façon à satisfaire une stœchiométrie théorique, une équation de fermentation idéale, par exemple une molécule d'isobutène à partir d'une molécule de glucose :



Chacune de ces voies métaboliques virtuelles se caractérise par le nombre des réactions enzymatiques qu'elle emprunte et qui n'ont pas été décrites, son « horizon prophétique ». Cette démarche s'apparente à celle de la rétrosynthèse, bien connue des organiciens (*figure 2a*). Ce sont principalement les réactions enzymatiques de formation du produit isobutène lui-même et des substrats précurseurs de cet hydrocarbure qui suscitent l'exploration la plus intensive et la plus novatrice. En particulier, les mécanismes de décarboxylation ont fait l'objet d'une étude comparative, à savoir une bêta-élimination couplée à une décarboxylation, une décarboxylation oxydative ainsi qu'une décarboxylation non oxydative (*figure 2b*).

Pour ce faire, des enzymes connus pour catalyser la production de molécules comportant un motif structural proche de l'isobutène sont testés pour convertir les substrats appropriés en cet hydrocarbure. Des gènes synthétiques sont assemblés pour exprimer dans des bactéries les enzymes candidats, lesquels sont évalués comparativement par chromatographie en phase gazeuse suivant un protocole automatisé. Même quand sont testés de la sorte de vastes effectifs d'enzymes homologues, c'est-à-dire descendant tous d'un ancêtre commun mais provenant d'espèces distantes généalogiquement, seules de faibles activités catalytiques sont détectées pour de rares candidats. Il est donc nécessaire d'améliorer considérablement les enzymes pour

parvenir à les intégrer dans un procédé de biologie industrielle. À cette fin, Global Bioenergies a développé une plateforme robotisée d'évolution dirigée et de criblage à haut débit des enzymes.

Un bref récapitulatif est offert des catégories d'enzymes naturels découverts pour produire de l'isobutène et destinés à s'améliorer par évolution artificielle, ainsi que des voies métaboliques approvisionnant chaque enzyme en son substrat convertible.

Mévalonate diphosphate décarboxylases (MVD)

Les mévalonate diphosphate décarboxylases ou MVD (EC 4.1.1.33) sont des enzymes essentiels au métabolisme des cellules eucaryotes et de quelques embranchements bactériens. Ces enzymes assurent la biosynthèse des terpénoïdes, au premier rang desquels le cholestérol et l'ubiquinone [5]. Les MVD catalysent la phosphorylation puis la décarboxylation du mévalonate 5-diphosphate en isopentényl-diphosphate (figure 3a). Il s'agit de l'une des rares réactions biochimiques identifiées qui conduisent à la formation d'une insaturation terminale. Ce mécanisme peut formellement s'appliquer à la conversion d'un acide organique, le 3-hydroxy-3-méthyl-butyrate ou β-hydroxy-isovalérate (HIV), en isobutène (figure 3b).

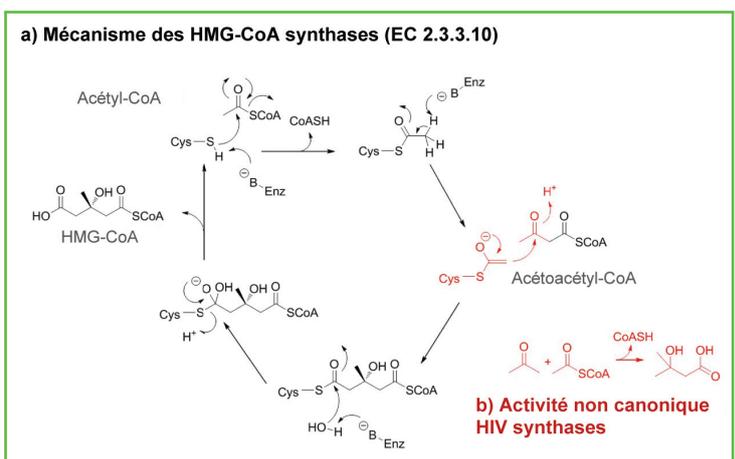


Figure 4 - Activité naturelle et mécanisme catalytique des HMG-CoA synthases pour la formation de β-hydroxy-isovalérate à partir d'acétone et d'acétyl-CoA.

hydroxy-méthyl-glutaryl-coenzyme A synthase ou HMG-CoA synthase (EC 2.3.3.10).

Cet enzyme catalyse la formation de l'hydroxy-méthyl-glutaryl-CoA (HMG-CoA) à partir d'acétyl-CoA et d'acétoacétyl-CoA via un mécanisme de type condensation de Claisen (figure 4). L'acétyl-CoA est un intermédiaire métabolique central chez tous les organismes vivants. En appliquant ce mécanisme à un accepteur non physiologique, l'acétone, au lieu de l'acétoacétyl-CoA, la réaction devrait conduire au HIV (figure 4).

L'acétone est naturellement produite par certains micro-organismes à partir d'acétyl-CoA, dont les plus répandus appartiennent au genre *Clostridium* [6-7]. Les gènes responsables de la biosynthèse de l'acétone ont été identifiés et largement utilisés en biologie industrielle [8]. L'approche rétro-biosynthétique consiste ici à produire l'acétone en tant que précurseur du HIV à partir d'acétyl-CoA par expression hétérologue chez *Escherichia coli* des gènes de *Clostridium* (figure 5).

Une autre voie de biosynthèse du HIV se conçoit à partir de l'acétyl-CoA en empruntant certains enzymes de la biosynthèse de composés myxothiazole chez *Mycococcus xanthus* [9-10]. Cette voie métabolique comporte davantage d'étapes biocatalytiques que celle ayant l'acétone pour intermédiaire, mais elle reste une alternative intéressante puisqu'elle n'implique qu'une seule activité « non naturelle » contrairement à la première voie proposée, diminuant ainsi le travail d'ingénierie enzymatique à réaliser (figure 6). La formation de HMG-CoA à partir d'acétyl-CoA est bien connue dans la voie de biosynthèse de l'isopentényle pyrophosphate

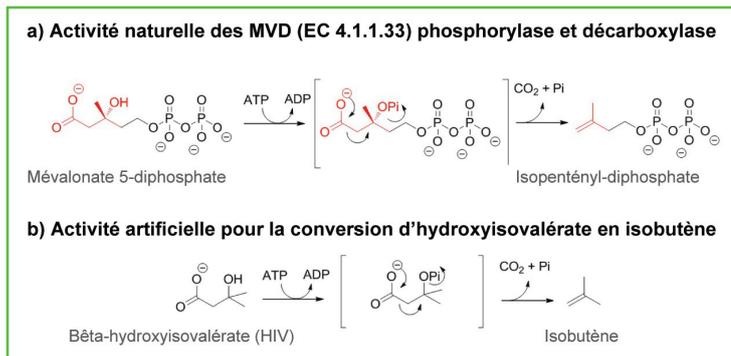


Figure 3 - a) Activité naturelle et mécanisme catalytique des mévalonate diphosphate décarboxylases (MVD), b) appliquée pour la conversion de β-hydroxy-isovalérate en isobutène.

Le β-hydroxy-isovalérate (HIV) n'est pas naturellement présent chez les micro-organismes utilisés couramment en biologie industrielle, comme *Escherichia coli* ou *Saccharomyces cerevisiae*. Une autre activité artificielle doit donc être implantée pour accéder à cette molécule à partir d'un composé biologique accessible naturellement. Une possibilité est d'appliquer le mécanisme catalytique des

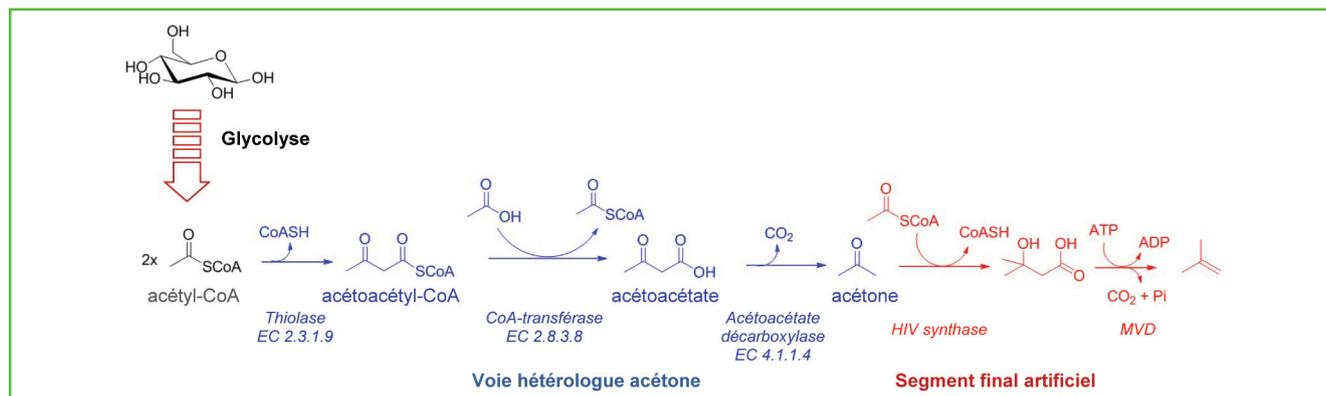


Figure 5 - Voie métabolique pour produire l'isobutène via l'acétone et HIV.

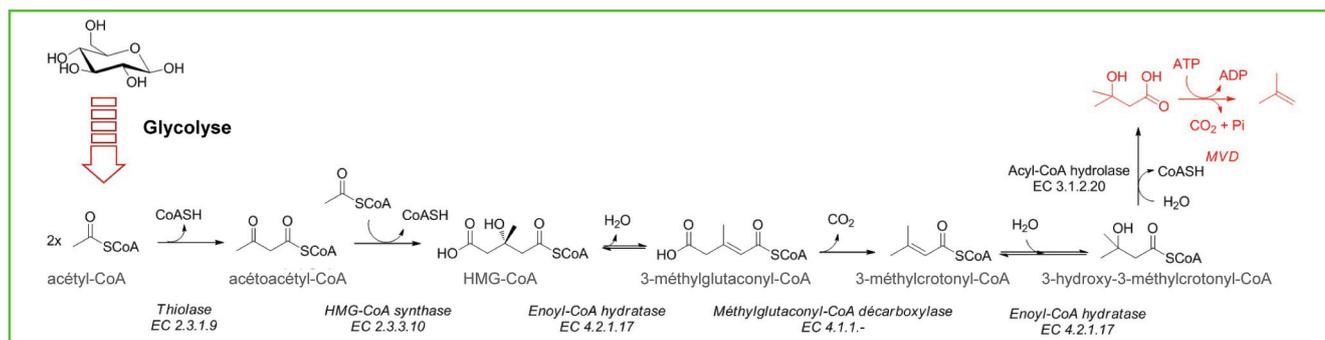


Figure 6 - Voie métabolique pour produire l'isobutène via différents intermédiaires acyl-CoA et HIV.

et du di-méthyl-allyle pyrophosphate, comme expliqué précédemment. L'étape clé est ici la décarboxylation du 3-méthyl-glutaconyl-CoA en 3-méthyl-crotonyl-CoA. Ce type d'activité enzymatique est souvent associé à des enzymes utilisant la biotine comme cofacteur, et impliquant l'ATP comme co-substrat. Toutefois, cette décarboxylase issue de *Myxococcus xanthus* (3-méthylglutaconyl-CoA décarboxylase) n'utilise pas ce type de mécanisme réactionnel et ne dépend pas d'un cofacteur ; il n'interfère donc pas avec le métabolisme énergétique de la souche de production [11]. Ces propriétés en font un enzyme particulièrement intéressant pour élaborer un procédé industriel d'ingénierie métabolique.

Olefin forming enzyme (OleC)

Certaines bactéries sont connues pour produire naturellement des traces d'alcènes à longue chaîne (plus de vingt carbones) chez des bactéries du genre *Burkholderia*, *Shewanella* ou *Micrococcus*. L'opéron (regroupement de gènes aux fonctions liées) responsable de cette voie métabolique comporte quatre gènes OleA, OleB, OleC et OleD. Le gène spécifiant l'enzyme responsable de la conversion finale en alcène (OleC) a été particulièrement étudié [12-13].

L'enzyme OleC appartient à une famille annotée comme « AMP-dependent synthetase and ligase », à l'origine impliquée dans la biosynthèse d'acyl-CoA via un intermédiaire réactionnel acyl-adénylate, activité commune à tout enzyme appelé « adénylate forming enzyme » ou AFE [14]. Cette activité d'adénylation entraîne la conversion d'une molécule d'ATP en pyrophosphate inorganique et la condensation de l'adénylate (AMP) par une liaison phospho-anhydride à l'acide carboxylique, conversion réversible dont l'enthalpie libre n'est que de $-3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ (figure 7). De tels intermédiaires acyl-adénylates sont labiles et réagissent par une attaque nucléophile sur le carbonyle ainsi activé, conduisant habituellement dans le métabolisme à la formation de thioesters.

Il a été démontré que la famille d'enzymes OleC intervenant dans la biosynthèse d'alcènes à longue chaîne est incapable de catalyser la formation d'alcènes à partir de β -hydroxy acides à plus courte chaîne. L'activité de formation de l'acyl-adénylate dépend de la longueur de la chaîne alkyle du substrat, ce qui explique la sélectivité de l'enzyme [15].

L'analyse du mécanisme réactionnel permet donc d'envisager de découpler la réaction catalysée par OleC en deux étapes. La première étape consiste à former l'acyl-adénylate d'un β -hydroxy acide via un mécanisme classique des AFE, et la seconde étape, spécifique à la famille OleC, entraîne la transformation de l'intermédiaire β -hydroxy-acyl-adénylate vers un alcène terminal.

Ainsi, dans l'approche poursuivie par Global Bioenergies, un premier enzyme capable de catalyser la formation du β -hydroxy-isovaléryl-adénylate est utilisé de manière concomitante avec un enzyme appartenant à la famille OleC qui catalyse quant à elle la formation de l'acyl-adénylate formé en alcène. La formation du β -hydroxy-isovaléryl-adénylate est catalysée par un enzyme de type AFE, efficace sur les β -hydroxy-acides à courte chaîne. L'étape d'adénylation étant réversible, l'utilisation de pyrophosphatase permet de déplacer l'équilibre vers la formation de l'intermédiaire acyl-adénylate, et d'empêcher ainsi la réversibilité de la réaction, ce qui améliore grandement l'efficacité du système multi-enzymatique.

L'utilisation concomitante d'un enzyme AFE, d'un enzyme OleC et de pyrophosphatase conduit à une cascade efficace pour convertir le β -hydroxy-isovalérate en isobutène. Un mécanisme réactionnel possible serait le transfert intramoléculaire de l'adénylate sur l'hydroxyle en bêta, entraînant une élimination couplée à une décarboxylation et la formation de l'alcène terminal (figure 7).

Cytochrome P450 et décarboxylation oxydative

Les cytochromes P450 (CYP450) sont des métallo-enzymes à cofacteur hémique (hémoprotéines) impliqués dans de nombreuses réactions d'oxydation sélective comme des hydroxylations ou des époxydations. L'utilisation d'une telle hémoprotéine pour la biosynthèse d'isobutène avait été abordée par l'équipe d'Hideo Fukuda au Kumamoto Institute of Technology [3-4]. Toutefois, le cytochrome P450

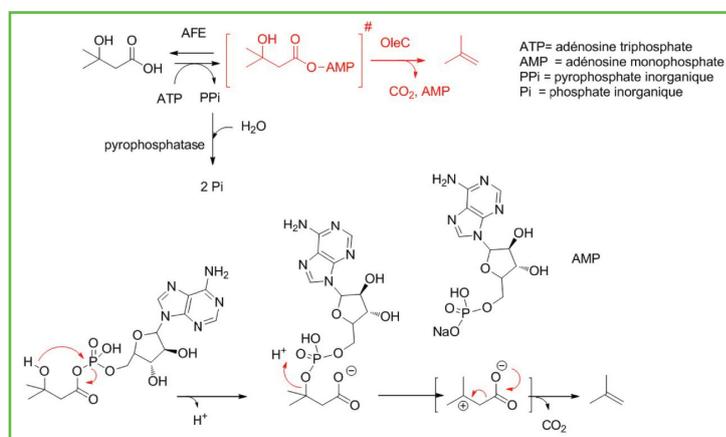


Figure 7 - Système bi-enzymatique AFE/OleC permettant la bioconversion du β -hydroxy-isovalérate en isobutène via un intermédiaire acyl-adénylate et mécanisme réactionnel envisagé d'élimination/décarboxylation.

de *Rhodotorula minuta* semble difficilement exploitable par un procédé de biologie industrielle. Outre le fait que son activité catalytique soit très faible comme expliqué précédemment, ce CYP450 est localisé dans la membrane et donc très difficilement transposable chez des bactéries couramment utilisées en biologie industrielle [3-4].

Une autre famille de CYP450 capable de catalyser la décarboxylation oxydative d'acide organique en alcène terminal a été découverte par la société LS9 Inc. Cette nouvelle hémoprotéine, dénommée OleT, est issue d'une bactérie halophile, *Jeotgalicoccus* sp., et présente l'avantage d'appartenir à la famille CYP152, constituée par les CYP450 bactériens solubles, localisés dans le cytoplasme. Il semble que OleT ne puisse catalyser que la conversion d'acide aliphatique à longue chaîne carbonée en alcène terminal ($\geq C_{15}$). Seule a été démontrée une activité de type peroxygénase (formation de l'espèce à haut degré d'oxydation par un mécanisme de type « peroxide shunt »). L'analyse phylogénétique suggère que cette nouvelle famille d'hémoprotéines est proche des CYP450 impliqués dans des réactions de β -hydroxylation [16-19], mais un acide aminé de la face distale de l'hème (histidine 85) dirige le mécanisme réactionnel vers la décarboxylation oxydative plutôt que la β -hydroxylation (figure 8a).

La capacité de OleT à catalyser, avec une activité catalytique plus faible, la décarboxylation oxydative d'acides aliphatiques à plus courtes chaînes a été décrite [20]. On peut donc s'attendre à ce que l'évolution dirigée de ce métalloenzyme améliore la production de l'isobutène à partir de l'isovalérate (3-méthyl-butérate), cet acide organique étant facilement accessible dans le métabolisme (figure 8b).

UbiD, décarboxylation non oxydative

Il est connu depuis les années 1990 que certaines espèces de levures ou de moisissures comme *Aspergillus niger* sont capables de convertir l'acide cinnamique en styrène [21]. Les deux gènes commandant cette activité enzymatique ont été identifiés et annotés comme « ferulic acid

decarboxylase » (FDC, parfois annotés UbiD) et « phenylacrylic acid decarboxylase » (PAD, parfois annotés UbiX). Toutefois, le mécanisme exact de ces enzymes restait inconnu. Leurs interactions moléculaires et le mécanisme catalytique formant les alcènes terminaux ont été magistralement élucidés il y a peu par l'équipe de David Leys de l'Université de Manchester [22-23].

Les deux enzymes sont indispensables à l'activité de décarboxylation de l'acide cinnamique en styrène. Par ailleurs, ces deux gènes sont également impliqués dans la biosynthèse de l'ubiquinone, cofacteur que l'on trouve dans les réactions de la chaîne respiratoire.

UbiD (FDC) est l'enzyme responsable de la bioconversion de cinnamate en styrène et constitue donc une véritable décarboxylase. UbiX (PAD) est en réalité une prényl-transférase, responsable de la biosynthèse du coenzyme indispensable à UbiD, lequel dérive de la flavine mononucléotide (FMN). En effet, l'acte catalytique de UbiD proprement dit est assuré par ce coenzyme jusqu'alors inconnu, qui correspond à l'adduction au FMN d'un motif prénylé provenant du diméthylallyl-phosphate. Ce nouveau coenzyme flavonoïde tétracyclique a été dénommé « prenylated flavin cofactor », ou PFC (figure 9a).

Le mécanisme de UbiD a été caractérisé par des études spectroscopiques. Il implique la formation d'un adduit covalent entre le substrat cinnamate et le coenzyme PFC par cycloaddition 1,3 dipolaire, conduisant à une décarboxylation de type Grobe, à la formation de l'alcène et la régénération du coenzyme (figure 9b). La particularité de cette transformation est la réversibilité du mécanisme, permettant sous certaines conditions la carboxylation du styrène en cinnamate. Comme l'a montré Global Bioenergies, ce mécanisme original peut aussi s'appliquer à la conversion d'un acide organique α,β -insaturé en un alcène, en particulier le 3-méthyl-crotonate (3-méthyl-2-buténoate) en isobutène.

Une voie de biosynthèse du 3-méthyl-crotonate découle directement de la voie métabolique produisant l'acide isovalérique, comme précédemment évoquée.

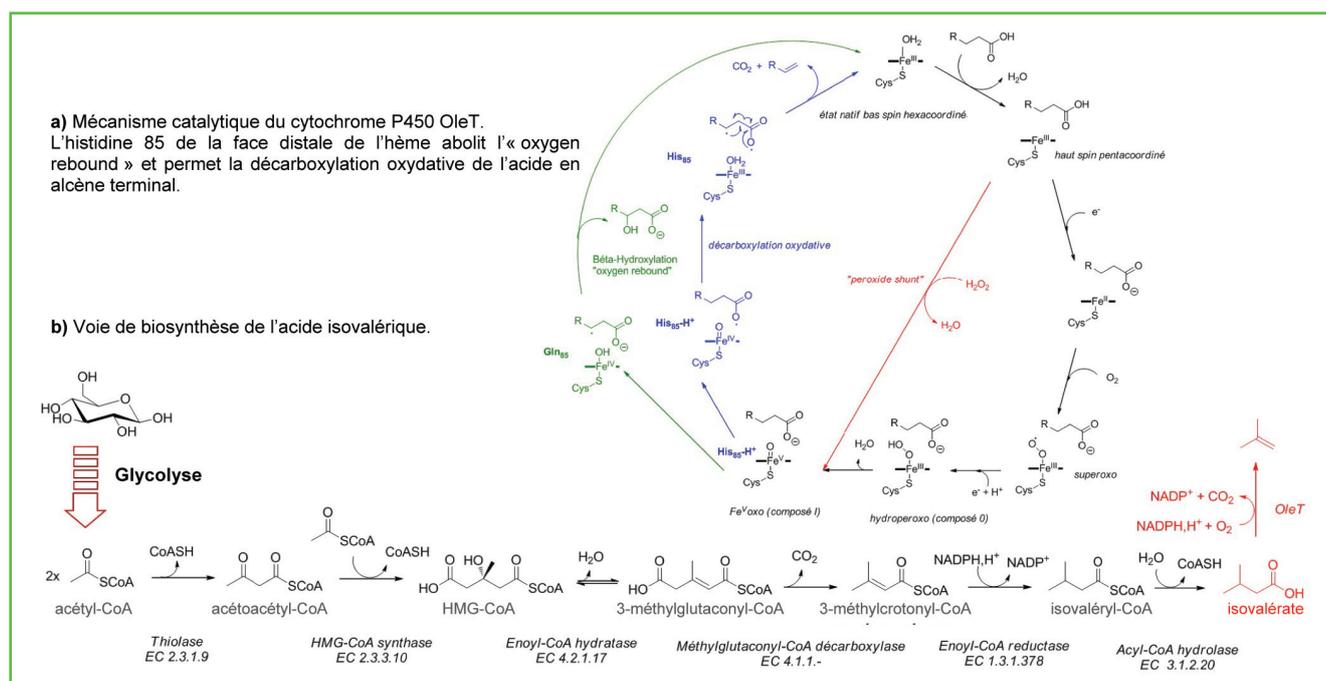


Figure 8 - a) Mécanisme réactionnel et particularité de OleT responsables de l'activité de type décarboxylation oxydative. b) Voie de biosynthèse de l'acide isovalérique.

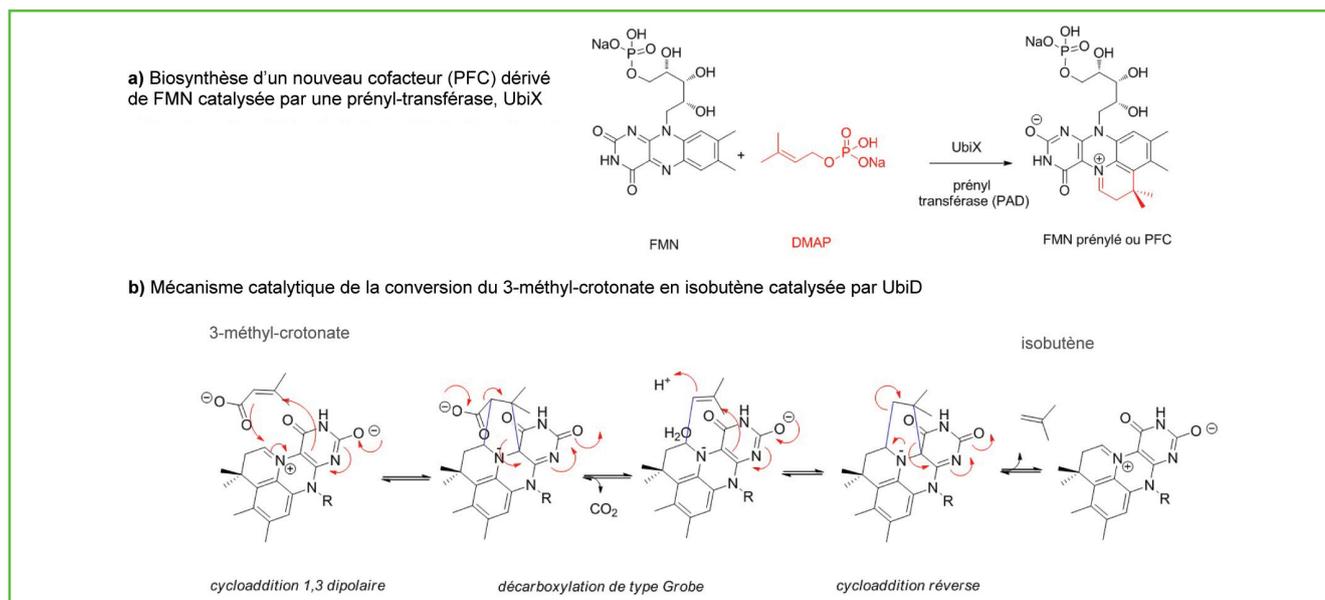


Figure 9 - a) UbiX est responsable de la biosynthèse du coenzyme essentiel à l'activité de décarboxylation de UbiD (« prenylated flavin cofactor », ou PFC). b) Mécanisme catalytique de la conversion du 3-méthyl-crotonate en isobutène catalysée par UbiD et son coenzyme original PFC.

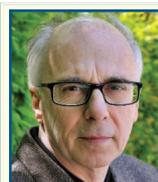
Conclusion

La nature gazeuse de l'isobutène, comme celle des autres oléfines légères ciblées par Global Bioenergies, a constitué une aubaine décisive. En effet, ces molécules sont complètement insolubles dans le milieu aqueux où prolifèrent les bactéries, ce qui permet d'éviter l'intoxication des souches productrices par le produit, comme c'est généralement le cas lors de l'accumulation d'un soluté tel que l'éthanol ou l'isobutanol. La volatilisation de l'isobutène procure aussi des avantages lors de la production industrielle et a donné lieu à l'élaboration de fermenteurs innovants. À l'étape de la R & D, la volatilisation du produit facilite en outre l'analyse quantitative, par chromatographie en phase gazeuse, et qualitative, par spectrométrie de masse, lors de l'évolution dirigée des enzymes produisant des alcènes gazeux ainsi que des voies métaboliques approvisionnant ces enzymes en substrats. Au stade d'efficacité où est parvenu le procédé de bioproduction fermentaire de l'isobutène, on peut désormais aller jusqu'à compter sur la sélection naturelle pour augmenter à la fois la viabilité et la productivité des souches en minimisant le fardeau toxique des intermédiaires métaboliques et en maximisant l'élimination du produit final dans l'effluent gazeux du bioréacteur.

Note et références

- (1) www.global-bioenergies.com
- [1] Boulamanti A., Moya J.A., Production costs of the chemical industry in the EU and other countries: ammonia, methanol and light olefins, *Renew. Sust. Energy Rev.*, **2017**, *68*, p. 1205.
- [2] Mahdi H.I., Muraza O., Conversion of isobutylene to octane-booster compounds after methyl tert-butyl ether phaseout: the role of heterogeneous catalysis, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **2016**, *55*, p. 11193.
- [3] Fujii T., Ogawa T., Fukuda H., Preparation of a cell-free, isobutene-forming system from *Rhodotorula minuta*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **1988**, *54*, p. 583.
- [4] Fukuda H. *et al.*, Purification and characterization of cytochrome P450 from an isobutene-forming microorganism, *Rhodotorula minuta*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **1993**, *57*, p. 1599.
- [5] Lombard J., Moreira D., Origins and early evolution of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis in the three domains of life, *Mol. Biol. Evol.*, **2011**, *28*, p. 87.
- [6] Reinharz J., Science in the service of politics: the case of Chaim Weizmann during the First World War, *Eng. Hist. Rev.*, **1985**, *100*, p. 572.
- [7] Weizmann C., Improvement in the bacterial fermentation of carbohydrates and in bacterial cultures for the same, Brevet UK 4845, **1915**.

- [8] Cornillot E., Soucaille P., Solvent forming genes in *Clostridia*, *Nature*, **1996**, *380*, p. 489.
- [9] Gogerty D.S., Bobik T.A., Formation of isobutene from 3-hydroxy-3-methylbutyrate by diphosphomevalonate decarboxylase, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2010**, *76*, p. 8004.
- [10] Mahmud T. *et al.*, A biosynthetic pathway to isovaleryl-CoA in myxobacteria: the involvement of the mevalonate pathway, *ChemBioChem*, **2005**, *6*, p. 322.
- [11] Li Y., Luxenburger E., Müller R., An alternative isovaleryl CoA biosynthetic pathway involving a previously unknown 3-methylglutaconyl CoA decarboxylase, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, *52*, p. 1304.
- [12] Frias J.A., Richman J.E., Wackett L.P., C29 olefinic hydrocarbons biosynthesized by *Arthrobacter* Species, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2009**, *75*, p. 1774.
- [13] Beller H.R., Goh E.-B., Keasling J.D., Genes involved in long-chain alkene biosynthesis in *Micrococcus luteus*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2010**, *76*, p. 1212.
- [14] Schmelz S., Naismith, J.H., Adenylate-forming enzymes, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2009**, *19*, p. 666.
- [15] Frias J., Microbial synthesis of fuel hydrocarbons: enzymes and metabolic pathways, Thèse de doctorat, Michigan University, **2011**.
- [16] Rude M. *et al.*, Terminal olefin (1-alkene) biosynthesis by a novel P450 fatty acid decarboxylase from *Jeotgalicoccus* Species, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2011**, *77*, p. 1718.
- [17] Liu Y. *et al.*, Hydrogen peroxide-independent production of α -alkenes by OleTJE P450 fatty acid decarboxylase, *Biotechnol. Biofuels*, **2014**, *7*.
- [18] Belcher J. *et al.*, Structure and biochemical properties of the alkene producing cytochrome P450 OleTJE (CYP152L1) from the *Jeotgalicoccus* sp. 8456 bacterium, *J. Biol. Chem.*, **2014**, *289*, p. 6535.
- [19] Grant J.L., Hsieh C.H., Makris T.M., Decarboxylation of fatty acids to terminal alkenes by cytochrome P450 compound I, *J. Am. Chem. Soc.*, **2015**, *137*, p. 4940.
- [20] Dennig A. *et al.*, Oxidative decarboxylation of short-chain fatty acids to 1-alkenes, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, *54*, p. 8819.
- [21] Mukai J. *et al.*, PAD1 and FDC1 are essential for the decarboxylation of phenylacrylic acids in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biosci. Bioeng.*, **2010**, *109*, p. 564.
- [22] Payne K.A.P. *et al.*, New cofactor supports α,β -unsaturated acid decarboxylation via 1,3-dipolar cycloaddition, *Nature*, **2015**, *522*, p. 497.
- [23] White M.D. *et al.*, UbiX is a flavin prenyltransferase required for bacterial ubiquinone biosynthesis, *Nature*, **2015**, *522*, p. 502.



P. Marlière

Philippe Marlière est cofondateur et président du Conseil scientifique de Global Bioenergies* et Mathieu Allard y est chef de projet.



M. Allard

* Global Bioenergies, 5 rue Henri Auguste Desbruères, F-91000 Évry.
Courriels : philippe.marliere@global-bioenergies.com ;
mathieu.allard@global-bioenergies.com