

Un microorganisme (biocatalyseur) pour fabriquer des synthons biosourcés

Avec la prise de conscience de la raréfaction progressive des ressources fossiles ainsi que de l'impact environnemental de leur exploitation, substituer ces ressources par des alternatives renouvelables est devenu un enjeu important dans le contexte de la transition énergétique. Une première voie, la synthèse d'éthanol par fermentation de sucres issus de ressources renouvelables, s'est déjà illustrée dans un schéma à faible impact carbone. Aujourd'hui, ce bioéthanol est largement employé en tant que biocarburant pour les moteurs à essence.

De façon similaire, la chimie biosourcée pourrait se substituer à la pétrochimie. Le propylène est une molécule phare de la pétrochimie, produite chaque année à plus de 100 Mt à l'échelle mondiale. La synthèse de ce composé chimique par une voie « verte » est envisagée par de nombreuses entités publiques et privées. L'isopropanol peut être facilement converti en propylène par déshydratation [1].

Par exemple, la société française Global Bioenergies a testé en 2018 son procédé C3 visant la production d'acétone et d'isopropanol puis de polypropylène en fermenteur de 4 m³ [2]. Certaines souches bactériennes dites « solvantogènes » et appartenant au genre *Clostridium* sont quant à elles naturellement capables de produire par fermentation différents solvants, et notamment l'isopropanol. Elles ont par ailleurs déjà prouvé leur compatibilité avec l'industrie : la fermentation ABE (acétone-butanol-éthanol) a occupé une part majeure du secteur des biotechnologies dans la première moitié du XX^e siècle, uniquement surpassée en volume par la fermentation éthanolique. Ce procédé fermentaire a fait l'objet de nombreuses études scientifiques [3], mais qui se sont focalisées, jusque dans les années 2000, quasi exclusivement sur l'amélioration d'une souche particulière : *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. Des études plus récentes, menées notamment par IFP Energies nouvelles (IFPEN), ont montré le potentiel de souches de *Clostridium* naturellement capables de réaliser une fermentation isopropanol/n-butanol/éthanol [4]. IFPEN développe un procédé associé, visant à exploiter ces souches pour produire de l'isopropanol et du n-butanol biosourcés pour les besoins de l'industrie chimique. Le procédé développé arrive à un stade d'extrapolation industrielle. L'objectif est de confirmer les performances à plus grande échelle d'une production d'isopropanol et de butanol biosourcés à partir d'un procédé anaérobie optimisé à productivité élevée. En parallèle de cette phase d'extrapolation, IFPEN évalue des souches (ou biocatalyseurs) de *Clostridium* naturellement productrices d'isopropanol ou génétiquement modifiées pour en produire de manière performante dans ce procédé fermentaire industriel.

Performances fermentaires et optimisation génétique de souches de *Clostridium beijerinckii*

Des travaux au sein du Département Biotechnologie d'IFPEN ont permis d'étudier plus en profondeur la souche *Clostridium*

beijerinckii DSM 6423, naturellement productrice d'un mix isopropanol/butanol/éthanol [5]. Disposant de premières données sur les performances de cette souche sur un substrat modèle, les travaux se sont ensuite focalisés sur l'évaluation de ses capacités à fermenter différents substrats issus de l'industrie sucrière. Les bilans fermentaires décrits en figure 1 démontrent les aptitudes de ce microorganisme à fermenter efficacement différents types de substrats industriels, plus particulièrement des mélasses de canne à sucre ou de betterave [6].

Ces fermentations ont été couplées à une analyse du métabolisme via différentes techniques à haut débit dites « omiques ». L'objectif était ici d'identifier des gènes d'importance pour la production d'isopropanol en fonction de chaque type de substrats. L'utilisation d'une approche nommée « capp-switch sequencing » a été appliquée à trois souches solvantogènes modèles, dont *C. beijerinckii* DSM 6423 [7]. L'approche a permis d'étudier la répartition des sites physiques d'initiation de la transcription (TSS : « transcription start site ») présents en amont des gènes et permettant leur expression. Elle a ainsi dévoilé des différences, notamment pour certains gènes indispensables à la production de ces alcools, ouvrant la voie à des optimisations génétiques permettant d'augmenter la proportion de ces différents alcools, dont l'isopropanol. Nos travaux ont ensuite permis de mieux comprendre le rôle d'un gène important pour la régulation de la production d'alcools en général et d'isopropanol en particulier : le facteur de transcription sigma 54 [8].

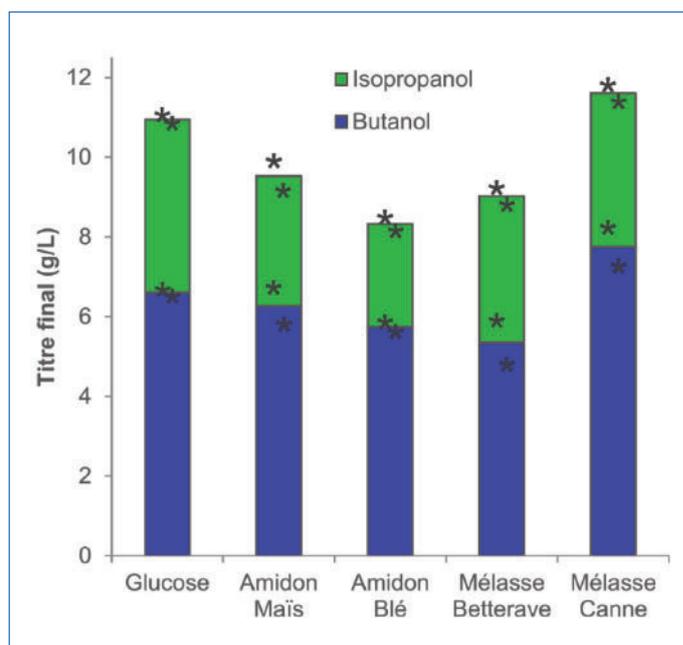


Figure 1 - Production d'isopropanol et de butanol de la souche DSM 6423 à partir de différents substrats industriels représentatifs, en comparaison à un milieu de base de laboratoire (glucose). Les valeurs correspondent à des moyennes d'expériences menées en double ; les astérisques représentent les valeurs mesurées.

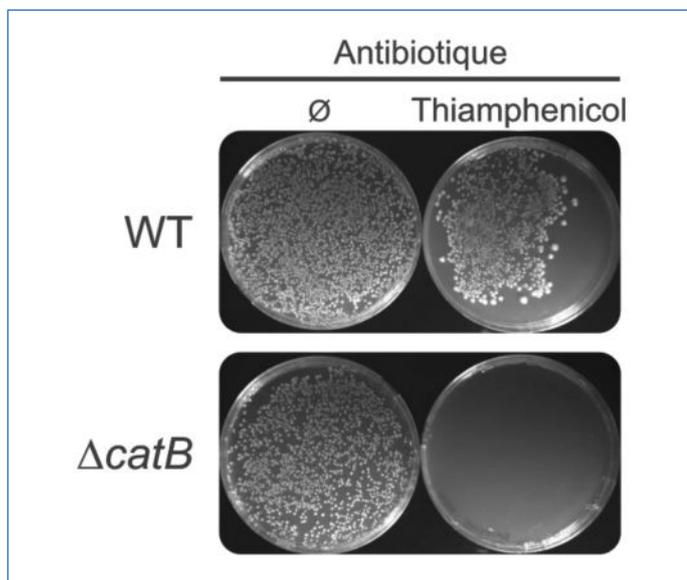


Figure 2 - Exemple d'application de l'outil CRISPR développé par IFPEN pour modifier génétiquement des souches de *Clostridium*. Un test de croissance de la souche *C. beijerinckii* DSM 6423 est réalisé sur milieux gélosés contenant ou non du thiamphénicol. Au contraire de la souche non modifiée (WT : « wild type »), la souche modifiée ($\Delta catB$) est incapable de croître en présence de thiamphénicol.

De telles informations peuvent permettre d'optimiser le génome de ces souches microbiennes pour en améliorer les performances fermentaires et disposer d'un procédé industriel compétitif. L'optimisation métabolique d'un microorganisme nécessite cependant de disposer d'outils de modifications génétiques permettant d'obtenir des souches industrielles, ce qui n'était pas le cas pour les souches de *Clostridium*.

CRISPR-Cas : un outil génétique pour la construction de souches naturellement productrices d'isopropanol

Au cours des travaux de thèse de Rémi Hocq, un outil génétique basé sur la technologie CRISPR-Cas, particulièrement adapté pour caractériser ces souches au travers de modifications génétiques, a ainsi été construit [9]. Le principe de cet outil repose sur l'expression d'éléments génétiques, appelés CRISPR-Cas9, permettant une coupure de son ADN génomique à un site bien précis [10]. Cette coupure étant létale, des systèmes de réparation s'activent et peuvent être

exploités pour introduire les modifications désirées au niveau du site de coupure. À titre d'exemple, il a été possible d'éliminer, grâce à l'outil dédié à ces souches, un gène lui permettant de résister à l'antibiotique thiamphénicol (figure 2). L'élimination ciblée du gène (*catB*) rend le microorganisme sensible à cet antibiotique, donc plus capable de croître sur un milieu contenant du thiamphénicol.

La performance de l'outil a été par la suite significativement améliorée par l'ajout d'un gène codant une protéine anti-CRISPR permettant de contrôler très finement l'action de l'enzyme Cas9. Plusieurs modifications génétiques permettant de construire une souche plateforme ont ainsi pu être obtenues, ce qui facilitera de futures modifications génétiques permettant d'optimiser le métabolisme de cette souche pour produire des alcools biosourcés [11].

L'ensemble de ces résultats et approches de génomique et génie génétique développés à IFPEN participent ainsi à l'établissement de *C. beijerinckii* DSM 6423 comme nouvel organisme de choix pour étudier son potentiel pour la production de molécules biosourcées, et d'isopropanol en particulier.

- [1] J.-L. Dubois, G. Postole, L. Silvester, A. Auroux, Catalytic dehydration of isopropanol to propylene, *Catalysts*, **2022**, 12, 1097.
- [2] Rapport d'activité 2021, p. 209 (www.global-bioenergies.com/rapport-financier-annuel-2021/?lang=en#dearflip-df_9177/19/).
- [3] H.G. Moon *et al.*, One hundred years of clostridial butanol fermentation, *FEMS Microbiol. Lett.*, **2016**, 363(3), fnw001.
- [4] C.F. Dos Santos Vieira, F. Maugeri Filho, R. Maciel Filho, A. Pinto Mariano, Acetone-free biobutanol production: past and recent advances in the isopropanol-butanol-ethanol (IBE) fermentation, *Bioresour. Technol.*, **2019**, 287, 121425.
- [5] H. Maté de Gérand *et al.*, Genome and transcriptome of the natural isopropanol producer *Clostridium beijerinckii* DSM6423, *BMC Genomics*, **2018**, 19(1), 423.
- [6] R. Hocq, Rapport de thèse, **2019**, www.theses.fr/244400784.
- [7] R. Hocq *et al.*, Genome-wide TSS distribution in three related *Clostridia* with normalized capp-switch sequencing, *Microbiol Spectr.*, **2022**, 10(2), e0228821.
- [8] R. Hocq, M. Bouilloux-Lafont, N. Lopes Ferreira, F. Wasels, $\sigma 54$ (σL) plays a central role in carbon metabolism in the industrially relevant *Clostridium beijerinckii*, *Sci. Rep.*, **2019**, 9(1), 7228.
- [9] M. Diallo *et al.*, Adaptation and application of a two-plasmid inducible CRISPR-Cas9 system in *Clostridium beijerinckii*, *Methods*, **2020**, 172, p. 51-60.
- [10] M.R. Bruder, M.E. Pyne, M. Moo-Young, D.A. Chung, C.P. Chou, Extending CRISPR-Cas9 technology from genome editing to transcriptional engineering in the genus *Clostridium*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2016**, 82(20), p. 6109-19.
- [11] F. Wasels, G. Chartier, R. Hocq, N. Lopes Ferreira, A CRISPR/anti-CRISPR genome editing approach underlines the synergy of butanol dehydrogenases in *Clostridium acetobutylicum* DSM 792, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2020**, 86(13), e00408-20.

Cette fiche a été préparée par **Rémi HOCQ**, **François WASELS***, et **Nicolas LOPES FERREIRA**, chercheurs en microbiologie moléculaire, Département Biotechnologie, IFPEN, Reuil-Malmaison (Francois.WASELS@ifpen.fr).

Les fiches « Un point sur » sont coordonnées par Jean-Pierre FOULON (jpfoulon@wanadoo.fr). Elles sont regroupées et en téléchargement libre sur www.lactualitechimique.org.

