



HAL
open science

Comportements enzymatiques in vivo dans des voies métaboliques ramifiées: catalyse, métabolisme et régulation

Thomas Lautier

► **To cite this version:**

Thomas Lautier. Comportements enzymatiques in vivo dans des voies métaboliques ramifiées: catalyse, métabolisme et régulation. Biotechnologies. Institut National Polytechnique Toulouse, 2023. tel-04771204

HAL Id: tel-04771204

<https://hal.science/tel-04771204v1>

Submitted on 7 Nov 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Habilitation à diriger des recherches

**Comportements enzymatiques *in vivo* dans des
voies métaboliques ramifiées:
catalyse, métabolisme et régulation**

Thomas Lautier

chargé de recherches CNRS

soutenue le 05 juillet 2023

Jury :

Muriel Gondry	Directrice de recherches CNRS	rapportrice
Vincent Courdavault	Professeur université de Tours	rapporteur
Matthieu Jules	Professeur AgroParisTech	rapporteur
Gilles Truan	Directeur de recherches CNRS	examineur
Mondher Bouzayen	Professeur ENSAT	président

Equipe Ingénierie Moléculaire et Métabolique

Toulouse Biotechnology Institute

UMR CNRS 5504, UMR INRA 792 et INSA Toulouse

135 avenue de rangueil

31077 Toulouse cedex04

Remerciements

Merci aux membres du jury d'avoir accepté de consacrer du temps à lire ce mémoire, à le commenter et à participer à la soutenance : les rapporteurs : Muriel Gondry, Vincent Courdavault et Matthieu Jules ; le correspondant Mondher Bouzayen ; le directeur de TBI Gilles Truan.

Merci à l'équipe Ingénierie Métabolique et Moléculaire. Beaucoup d'échanges, d'idées, de partage du savoir. Certes les discussions peuvent prendre des circonvolutions intemporelles, comme savoir si un électron peut avoir autant de probabilité de rencontrer l'atome de Fer du 2B11 que l'atome de silice de ma paillasse, mais quel parfum précieux. Dans cette époque de l'instantané, n'est-ce pas une bénédiction que de pouvoir échanger sur les lois physiques quasi-intemporelles ? Merci de m'avoir amené dans le monde des cytochromes P450, un voyage moléculaire à la Jules Verne, teinté d'Allan Poe quand les manip virent aux sueurs froides. Bien sûr, Denis Pompon a ouvert plus de portes scientifiques « que le bon dieu peut en bénir ». Gilles Truan m'a accompagné avec humanisme au cours de ces années, d'Hanoi à Brisbane, en passant par Lisbonne et Singapour, un tour du monde en 3650 jours avec comme port d'attache l'ingénierie protéique et comme océan l'ingénierie métabolique. Philippe Urban partagea avec enthousiasme et une gentillesse constante l'histoire de la communauté des P450. Luis Fernando Garcia-Alles partage des interactions aussi simples et essentielles que les liaisons hydrogènes de l'eau. Sara Castano-Cerezo et son énergie hispanique promettent des interactions dynamiques sur les futurs projets. «Le temps dont nous disposons chaque jour est élastique ; les passions que nous ressentons le dilatent, celles que nous inspirons le rétrécissent, et l'habitude le remplit. » écrit Marcel Proust. Avec vous, il n'y avait pas d'habitude, le temps se remplissait de passions et j'essayais d'en capter le plus possible. Et même si ces dernières trois années à 10 000 km m'ont offert des horizons orientaux insoupçonnés, penser que la suite du voyage se fera à bord de cet équipage reste un cap plein de promesses.

Merci à l'ensemble de mes collègues du Toulouse Biotechnology Institute, avec une histoire liée à l'INSA de Toulouse. Le labo a grandi au cours des dernières décennies, s'appuyant sur ses synergies, composant avec ses différends, les axes de recherche se sont structurés et une confiance au long cours s'est établie dans un microcosme Insaïen bienveillant. Au cours de cette décennie passée à Toulouse, je reste particulièrement heureux d'avoir été témoin de certains papiers (le PNAS sur le switch NADH/NADPH de l'équipe métabolisme procaryote, le Nature de l'équipe enzymo sur la dégradation du plastique,...), de la victoire d'iGEM Toulouse en 2021, la montée en puissance de projets tel qu'EcoMet en Synthax ou le continuum TBI-TWB.

Merci à mes collègues singapouriens. Nic Lindley, Simon Congqiang Zhang, Xixian Chen, Dominique Baillargeat. En construisant des labo efficaces et humains, l'expérience singapourienne est riche en apprentissages.

Merci aux collaborateurs extérieurs, fenêtres ouvertes sur d'autres continents scientifiques. Pascal Hersen, Michel Kranendonk, Christophe Léger, Sylvie Dequin, William Nasser.

Merci à mon épouse, rivage du monde macroscopique dans cet océan nanométrique. Merci à mes enfants, qui tolèrent l'envie de comprendre, eux y compris.

Sommaire

I.	<i>Curriculum vitæ</i>	9
II.	Parcours scientifique.....	17
A.	Contexte : Associer les ingénieries protéique et métabolique.....	19
B.	Ingénierie protéique	21
1.	Ingénierie de la spécificité de substrat:	21
a)	Substrats différents pour isoformes différentes : cas des cytochromes 2B6/2B11	21
b)	Substrat identique pour isoformes différentes : cas des cytochromes P450 de la famille CYP97	26
2.	Interaction entre domaines enzymatiques.....	39
C.	Ingénierie métabolique.....	49
1.	Paramètre enzymatique <i>in vivo</i>	49
2.	Projets agencement spatial enzymatique.....	50
a)	Une trifusion pour la synthèse de carotène dans la levure.	55
b)	L'effet de linkers naturels entre deux enzymes.....	58
3.	Projet régulation de voie métabolique <i>in vivo</i>	62
a)	Optogénétique chez la levure	64
b)	Optogénétique et multiplexage chez E. coli	68
III.	Projet de recherche	71
A.	Synthèse et problématique scientifique	71
B.	Objectifs scientifiques.....	73
C.	Modèle métabolique	73
D.	Modèle « optoprotéique ».....	80
E.	Compétences et premières étapes.....	83

Liste des figures

Figure 1 : Les interactions entre une voie synthétique et le métabolisme hôte	20
Figure 2 : Comparaison des séquences primaires des CYP 2B WT et chimériques	22
Figure 3 : Structures des substrats utilisés dans ce travail. La flèche indique le site d'attaque catalysée par des enzymes CYP2B.	22
Figure 4 : Comparaisons des constantes d'affinité pour le cyclophosphamide et pour la 7-éthoxy-4-trifluorométhylcoumarine des enzymes CYP2B chimères et parentales.	23
Figure 5 : Visualisation de la position du segment de séquence échangé (en rose) dans les chimères à faible affinité pour le CPA (entrée pdb CYP2B6 3ua5).....	24
Figure 6 : Cyclisation et hydroxylation du β -carotène impliquant des mono et di-hydroxylases.	29
Figure 7 : Production <i>in vivo</i> de caroténoïdes dans des souches exprimant CYP97H1 et différents partenaires redox ou des fusions entre CYP97H1 et la lycopène cyclase ou des partenaires redox. ...	32
Figure 8 : Production à 24 et 48 heures de caroténoïdes <i>in vivo</i> via une gamme d'induction IPTG ou lactose.	34
Figure 9 : Alignement de membres de la famille CYP97.	36
Figure 10 : Production de caroténoïdes <i>in vivo</i> dans les souches exprimant les troncatures N-terminales de CYP97H1.....	37
Figure 11 : Production <i>in vivo</i> de caroténoïdes sur une échelle logarithmique dans des souches exprimant une chimère CYP97H1 avec des résidus ou des domaines de CYP97A3 (rose), avec des mutants de résidus hydrophobes de l'entrée du canal à substrat (violet), ou exprimant CYP97A3 fusionné avec le domaine N-terminal de CYP97H1.	38
Figure 12 : Structure de la cytochrome P450 réductase.	40
Figure 13 : Les deux états conformationnels de la CPR.	42
Figure 14 : Localisation et choix des mutants dans le domaine charnière de la CPR.	43
Figure 15 : kobs pour la réduction du cytochrome c en fonction de la force ionique pour le WT et les mutants de la forme soluble de CPR humaine.	45
Figure 16 : kobs pour la réduction du cytochrome c en fonction de la force ionique pour le WT et les mutants de la forme membranaire de CPR humaine.	46
Figure 17 : Les micro-compartiments bactériens.	51
Figure 18 : Les assemblages synthétiques entre AtoB, HMGS et HMGR.	53
Figure 19 : Clustering de scaffold AtoB-HMGS-HMGR.....	54
Figure 20 : Reconstruction de la voie des carotènes dans l'hôte <i>S. cerevisiae</i>	56
Figure 21 : Quantification des caroténoïdes produits par la souche portant l'enzyme tripartite.....	57
Figure 22 : classification de la banque de linkers entre CrtY et CrtZ, en fonction de la taille, de la structure hélicoïdale, du degré d'extension et de l'hydrophobicité.	59
Figure 23 : production de zeaxanthine dans des souches exprimant des fusions CrtZ-CrtY via des linkers de taille différente.....	60
Figure 24 : Teneur en caroténoïdes en mg/L des souches exprimant les fusions crtZ-linker-crtY.....	61
Figure 25 : Profil d'accumulation de caroténoïdes en mg/L des souches EAB09, SHS01 et SNI01 au cours du temps.	62
Figure 26 : Souche contrôle de pilotage optogénétique.	66
Figure 27 : ingénierie de souches dans le projet COGEX.	68
Figure 28 : Circuits optogénétiques multiplexés.	69
Figure 29 : Contrôle transcriptionnel du gène rapporteur RFP par le système EL222.	70
Figure 30 : HMGS from <i>S. cerevisiae</i>	76
Figure 31 : cyclisation du lycopène, LCYB : β -cyclases et LCYE : ϵ -cyclases	77
Figure 32 : Les acides ganodériques.	79

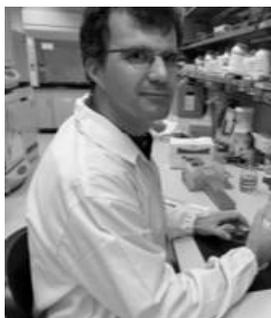
Figure 33 : régulations posttraductionnelles par optoprotéines.....	82
Figure 34 : Synthèse et synergie des projets.	85

I. Curriculum vitae

Thomas Lautier, CNRS researcher, PhD

Metabolic and Molecular Engineering: enzymes *in vivo* behavior in branched metabolisms

Position: permanent CNRS researcher
CNRS@CREATE Ltd.,
1 CREATE Way,
#08-01, CREATE Tower,
Singapore 138602
GSM: +65 90834669
Mail: thomas.lautier@insa-toulouse.fr



French nationality
Married, 3 children
Birthplace and Date of Birth: Castres (France),
September 18th, 1979

RESEARCH FIELD

Professional interests: My interests have always been to try to link the molecular level (natural or chimeric enzymes behavior) with the cellular level (whole population or individual cell behavior). Genetic regulation, physiology, protein engineering and enzymology are fields essential in my research projects. My current researches focus on:

- Quantify the effect of enzyme domain flexibility on the global biochemical parameters of the enzyme (model: the multidomain FAD-FMN cytochrome P450 reductase enzyme)
- The coexistence (and coevolution?) between a synthetic pathway and the endogenous metabolism of the host cell. How a cell can manage its metabolic switch? How can we insert in a “homeostatic” way a synthetic pathway in a cell host metabolism. We’ve chosen as model the carotenoid pathway expressed in *S. cerevisiae*.

Keywords: protein engineering, metabolic engineering, synthetic pathway, chimeric enzymes, yeast

RESEARCH EXPERIENCE

- | | |
|-----------|--|
| 2019-now | CNRS@CREATE CNRS Scientist in Singapore Institute of Food and Biotechnology Innovation, A*Star, Singapore , International Research Program SynBioEco, coPI thrust EcoctTs intracreate project
<i>Metabolic engineering with P450 enzymes, optogenetics</i> |
| 2011-2019 | CNRS researcher , in Dr. Truan’s group, Toulouse Biotechnology Institute, INSA of Toulouse, France |

In the field of synthetic biology, study of chimeric membrane bound enzymes behavior and the interaction between a synthetic metabolic pathway (therapeutic oxysterols, carotenoids) and the endogenous cell metabolism

ANR projects: - enzymatic domain dynamic of chimeric Cytochrome P450 reductase(Dodycoel project)

- enzymology of carotenoids pathway expressed in yeast

- optogenetic regulation in yeast (CoGEx project)

Industrial project: molecular biodiversity generation by engineered yeast

2008-2011 **Postdoctoral position in biochemistry and microbiology**, in Dr. Soucaille's group, Laboratory of Biologic Systems and Process Engineering , INSA of Toulouse, France

Metabolic and Protein engineering: native and mutated hydrogenase gas channels study in the anaerobic bacteria Clostridium acetobutylicum

ANR projects: gas channel in hydrogenase mutants

2003-2007 **PhD in bacterial genetic and microbiology**, in Dr. Nasser's group, Laboratory of Adaptive Microbiology and Pathogeny, INSA of Lyon, France and in Dr. Muskhelishvili's group, Jacobs University, Bremen, Germany

Regulation of the virulence factors expression by the nucleoid associated protein FIS in the phytopathogenic bacteria Erwinia chrysanthemi.

2002-2003 **Research engineer in bacterial genetic**, in Dr. Ritzenthaler's group, Laboratory of Microbiology and Molecular Genetic, University of Toulouse, France

Cell division and chromosome segregation in the lactic bacteria Lactococcus lactis.

TEACHING

2015-16-17-18 Enzymology practical course, 4th year students, 32h, INSA of Toulouse.

2014 Enzymology practical course, 4th year students, 16h, INSA of Toulouse.

2013 - Course on Biocatalysis, 3rd year students, University of Science and Technology of Hanoi (USTH), Vietnam. (30 hours of lectures, 6h of practical course, spread over two weeks)

- Enzymology practical course, 4th year students, 16h, INSA of Toulouse.

2012 Enzymology practical course, 4th year students, 16h, INSA of Toulouse.

2011 Microbiology practical course, 1st and 3rd year students, 50h, University of Toulouse

2010 Microbiology and enzymology practical course, 1st and 4th year students, 50h, INSA of Toulouse

2009 Microbiology practical course, 1st year students, 12 h, INSA of Toulouse.

STUDENT TRAINING

2022 Tiffany Chau, research engineer, co supervisor, EcoCTS CNRS@CREATE
 2021 Ari Dwijayanti, postdoc, main supervisor, EcoCTS CNRS@CREATE
 2020 Aurelie Bouin, PhD student, main supervisor, INRAE-Astar
 2019 Hery Rabeharindranto, PhD co-supervision and jury member
 2019 2mo Guillaume Brulere, Master 1, University of Toulouse
 2018 6mo Rudi Zimmermann, Master 2 AgroParisTech
 2017 6mo Roland Berthomieu, Master 2 Polytechnique-AgroParisTech
 2017 2mo Pierre Gauffre, Master 1, University of Toulouse
 2016 4mo Solène Galinier, Biotechnology Higher National Diploma student, Lycée Saliège Toulouse.
 2015 4mo Ophélie Trameni, Biotechnology Higher National Diploma student, Lycée Saliège Toulouse.
 2014 4mo Nicolas Meyer, Biotechnology Higher National Diploma student, Lycée Saliège Toulouse.
 2014 4mo Rémi Hocq, Master internship, INSA, Lyon.
 2013 5mo Arthur Sarrade-Loucheur, engineer, industrial project
 2013 Susan Hassan, postdoc, industrial project

FUNDING

2020: Main-applying PhD grant Astar (4 years, one Singaporean PhD student allowances)
 2019: involved in the application of the Intracreate EcoCTs project (2.6 millions euros, 3 years)
 2018: Co-applying PhD grant PhD INRAE-Astar (3 years, one French PhD student allowances)
 2016: Co-applying ANR CoGeX (3 years)
 2016: Co-applying ANR Enzinvivo (3 years)
 2012: Amycomb, projet industriel L'Oréal (2 years)

EDUCATION

2007	Microbiology PhD , Supervisor: Dr. William Nasser, INSA of Lyon, France. <i>Dissertation title: Regulation of the virulence factors expression by the nucleoid associated protein FIS in the phytopathogenic bacteria Erwinia chrysanthemi.</i>
2004	M. Sc. in microbial ecology, University of Lyon, France
2003	Research university year in molecular biology, University of Toulouse, France
2000-2002	B. Sc. in cellular biology and physiology, University of Toulouse, France

SCIENTIFIC PUBLICATIONS

Refereed publications

23) Lautier T.*, Smith D.J., Yang L.K., Chen X., Zhang C., Truan G., Lindley N.D. (2023) β -Cryptoxanthin Production in *Escherichia coli* by Optimization of the Cytochrome P450 CYP97H1 Activity. J Agric Food Chem. DOI: [10.1021/acs.jafc.2c08970](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c08970)

- 22) Lautier T.^{*}, Smith D.J., Yang L.K., Chen X., Zhang C., Truan G., Lindley N. D. (2023) Cytochrome P450 Surface Domains Prevent the β -Carotene Monohydroxylase CYP97H1 of *Euglena gracilis* from Acting as a Dihydroxylase. *Biomolecules*. 13(2):366. DOI: [10.3390/biom13020366](https://doi.org/10.3390/biom13020366)
- 21) Pouzet S., Cruz-Ramón J., Le Bec M., Cordier C., Banderas A., Barral S., Castaño-Cerezo S., Lautier T., Truan G., Hersen P. (2023) Optogenetic control of beta-carotene bioproduction in yeast across multiple lab-scales. *Front Bioeng Biotechnol*. 6;11:1085268. DOI: [10.3389/fbioe.2023.1085268](https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1085268)
- 20) Dwijayanti A., Zhang C., Poh C.L., Lautier T. (2022) Toward Multiplexed Optogenetic Circuits. *Front Bioeng Biotechnol*. 9:804563. DOI: [10.3389/fbioe.2021.804563](https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.804563)
- 19) Chen X., Lim X., Bouin A., Lautier T., Zhang, C. (2021) High-level de novo biosynthesis of glycosylated zeaxanthin and astaxanthin in *Escherichia coli*. *Bioresour. Bioprocess*. 8, 67. <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00415-0>
- 18) Pouzet S., Banderas A., Le Bec M., Lautier T., Truan G., Hersen P. (2020) The Promise of Optogenetics for Bioproduction: Dynamic Control Strategies and Scale-Up Instruments. *Bioengineering (Basel)*. 7(4):151. DOI: [10.3390/bioengineering7040151](https://doi.org/10.3390/bioengineering7040151)
- 17) Esteves F., Campelo D., Costa Gomes B., Urban P., Bozonnet S., Lautier T., Rueff J., Truan G. and Kranendonk M. (2020) The role of the FMN-domain of human cytochrome P450 oxidoreductase in its promiscuous interactions with structurally diverse redox partners. *Front. Pharmacol.*, 18 March 2020 | <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00299>
- 16) Rabeharindranto H., Castaño-Cerezo S., Lautier T., Garcia-Alles, L.F., Treitz C., Tholey A., Truan G. (2019) Enzyme-fusion strategies for redirecting and improving carotenoid synthesis in *S. cerevisiae*. *Met. Eng. Comm*. 8, e00086 <https://doi.org/10.1016/j.mec.2019.e00086>
- 15) Esteves F., Campelo D., Urban P., Bozonnet S., Lautier T., Rueff J., Truan G., Kranendonk M. (2018) Human cytochrome P450 expression in bacteria: Whole-cell high-throughput activity assay for CYP1A2, 2A6 and 3A4. *Biochem Pharmacol*. 158:134-140. doi: [10.1016/j.bcp.2018.10.006](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.10.006).
- 14) Campelo D., Esteves F., Brito Palma B., Costa Gomes B., Rueff J., Lautier T., Urban P., Truan G., Kranendonk M. (2018) Probing the Role of the Hinge Segment of Cytochrome P450 Oxidoreductase in the Interaction with Cytochrome P450. *Int J Mol Sci*. 19(12). pii: E3914. doi: [10.3390/ijms19123914](https://doi.org/10.3390/ijms19123914)..
- 13) Urban P., Lautier T., Pompon D., Truan G. (2018) Ligand Access Channels in Cytochrome P450 Enzymes: A Review. *Int J Mol Sci*. 19(6). pii: E1617. doi: [10.3390/ijms19061617](https://doi.org/10.3390/ijms19061617). Review.
- 12) Lautier T.[§], Campelo D.[§], Urban P., Esteves F., Bozonnet S., Truan G., Kranendonk M. (2017) The hinge segment of human NADPH-cytochrome P450 reductase in conformational switching: the critical role of ionic strength. *Frontiers in Pharmacology* <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00755>.[§]
- : These authors have contributed equally to this work.

- 11) [Lautier T., Urban P., Loeper J., Jezequel L., Pompon D., Truan G. \(2016\) Ordered chimero-genesis applied to CYP2B P450 enzymes. Biochim Biophys Acta. \(7\):1395-403.](#)
- 10) [Fourmond V., Baffert C., Sybirna K., Lautier T., Abou Hamdan A., Dementin S., Soucaille P., Meynial-Salles I., Bottin H., Leger C. \(2013\) Steady-state catalytic wave-shapes for 2-electron reversible electrocatalysts and enzymes. J. Am. Chem. Soc. 135: 3926-3938.](#)
- 9) [Baffert C., Sybirna K., Ezanno P., Lautier T., Hajj V., Meynial-Salles I., Soucaille P., Bottin H., Leger C. \(2012\) Covalent attachment of FeFe hydrogenases to carbon electrodes for direct electron transfer. Anal. Chem. 84: 7999-8005.](#)
- 8) [Ouafa Z. A., Reverchon S., Lautier T., Muskhelishvili G., Nasser W. \(2012\) The nucleoid-associated proteins H-NS and FIS modulate the DNA supercoiling response of the pel genes, the major virulence factors in the plant pathogen bacterium Dickeya dadantii. Nucleic Acids Res. 40: 4306-4319.](#)
- 7) [Baffert C., Bertini L., Lautier T., Greco C., Sybirna K., Ezanno P., Etienne E., Soucaille P., Bertrand P., Bottin H., Meynial-Salles I., De Gioia L., Leger C. \(2011\) CO disrupts the reduced H-cluster of FeFe hydrogenase. A combined DFT and protein film voltammetry study. J. Am. Chem. Soc. 133: 2096-2099.](#)
- 6) [Lautier T., Ezanno P., Baffert C., Fourmond V., Cournac L., Fontecilla-Camps J. C., Soucaille P., Bertrand P., Meynial-Salles I., Leger C. \(2011\) The quest for a functional substrate access tunnel in FeFe hydrogenase. Faraday discussions 148: 385-407; discussion 421-341.](#)
- 5) [Liebgott P. P., Leroux F., Burlat B., Dementin S., Baffert C., Lautier T., Fourmond V., Ceccaldi P., Cavazza C., Meynial-Salles I., Soucaille P., Fontecilla-Camps J. C., Guigliarelli B., Bertrand P., Rousset M., Leger C. \(2010\) Relating diffusion along the substrate tunnel and oxygen sensitivity in hydrogenase. Nat. Chem. Biol. 6: 63-70.](#)
- 4) [Fourmond V., Lautier T., Baffert C., Leroux F., Liebgott P.P., Dementin S., Rousset M., Arnoux P., Pignol D., Meynial-Salles I., Soucaille P., Bertrand P., Léger C. \(2009\) Correcting for electrocatalyst desorption and inactivation in chronoamperometry experiments. Analytical Chemistry 81: 2962-8.](#)
- 3) [Lautier T. and Nasser W. \(2007\) The DNA nucleoid-associated protein Fis coordinates the expression of the main virulence genes in the phytopathogenic bacterium Erwinia chrysanthemi. Molecular Microbiology 66: 1474-90.](#)
- 2) [Lautier T., Blot N., Muskhelishvili G. and Nasser W. \(2007\) Integration of two essential virulence modulating signals at the Erwinia chrysanthemi pel gene promoters: a role for Fis in the growth phase regulation. Molecular Microbiology 66: 1491-505.](#)
- 1) [Le Bourgeois P., Bugarel M., Campo N., Daveran-Mingot M.L., Labonté J., Lanfranchi D., Lautier T., Pagès C. and Ritzenthaler P. \(2007\) The Unconventional Xer Recombination Machinery of Streptococci/ Lactococci. PLoS Genetics 3: e117.](#)

National publications

- Pompon D., Lautier T., Truan G., Urban P. (2013) L'ingénierie combinatoire des génomes: une clé pour la création de voies biosynthétiques artificielles. *L'actualité Chimique* 375-376: 24-29.
- Pompon D., Urban P., Lautier T., Carquet M., Truan G. (2013) Nouvelles approches d'ingénierie pour la biologie de synthèse. *Innovations Agronomiques* 26: 51-66.
- Lautier T. et Nasser W. (2005) Régulation des gènes de virulence par la phase de croissance chez les bactéries à Gram négatif. *Regard sur la Biochimie* 1: 19-28.

Seminars

- Asymmetric functionalization of symmetric metabolite: monohydroxylation of the β -carotene using cytochrome P450 in *Escherichia coli*. T. Lautier, D. Smith, X. Chen, C. Zhang, G. Truan, N. Lindley, September 27 - 30 2022, Bioflavour conference, Dechema-House, Frankfurt/Main, Germany.
- Artificially fused enzymes: how to design them? A. Bouin, G. Truan, N. Lindley, C. Zhang, T. Lautier., "Youth SynbioSG Scientific Symposium (YS3)", June 22, 2022, National University of Singapore, Singapore.
- "Cellular Enzymatic Spatial Organization: Metabolic Railroad Switch" CREATE seminar: <https://cnrssingapore.cnrs.fr/create-webinar-series-with-thomas-lautier/> September 18, 2020, CREATE, Singapore.
- Enzyme-fusion strategies for redirecting carotenoid synthesis in *S. cerevisiae*, invited seminary, Australian Institute for Bioengineering and Nanotechnology (AIBN), The University of Queensland, June 21, 2019, Brisbane, Australia .
- Efficient implementation of the carotenoid synthesis by enzyme-fusion strategies in *Saccharomyces Cerevisiae*, 3rd Symposium Complex Biodynamics & Networks, December 10-12 2018, Singapore .
- Cytochrome P450 reductase chimera: turn around the hinge. 19th International Symposium on Flavins and Flavoproteins, Groningen, July 2-6, 2017.
- Seminary organization and talk: Cytochrome P450 reductase chimera: turn around the hinge. Biocatalysis internal seminary, Toulouse, 2016.
- Ordered chimerogenesis applied to CYP2B P450 enzymes. Biocatalysis internal seminary, Toulouse, 2015.
- Synthetic natural pathway dialog: oxysterol pathways conception in yeast, 2013, INSA Lyon, Lyon.

Posters

- Rabeharindranto H., Castaño-Cerezo S., Lautier T., Garcia-Alles, L.F., Truan G. Enzyme-fusion strategies for redirecting and improving carotenoid synthesis in *S. cerevisiae*, Metabolic Engineering Congress, 24-28 June 2018 (Munich, Germany)

- Lautier T., Truan G., Urban P., Garcia-Alles L., Pompon D. Synthetic-Natural metabolic pathways dialogue: Oxysterols pathways conception in yeast (2013) European Network for Oxysterol Research congress (Swansea, UK).
- Lautier T., Ezanno P., Baffert C., Fourmond V., Cournac L., Fontecilla-Camps J.C., Soucaille P., Bertrand P., Léger, C and Meynial-Salles, I (2010) The quest for a functional gas substrate access tunnel in FeFe hydrogenase from *Clostridium acetobutylicum*. Congrès Clostridium (San Diego, California).
- Ezanno P.; Lautier T.; Baffert C.; Fourmond V.; Cournac L.; Fontecilla-Camps J.C.; Soucaille P.; Bertrand P.; Meynial-Salles I.; Léger, C. (2010) A site-directed mutagenesis study of the [FeFe] hydrogenase HydA of *Clostridium acetobutylicum*. Poster au congrès Hydrogenase (Uppsala, Suède).
- Zghidi-Abouzid, O., Reverchon, S., Lautier, T., Muskhelishvili, G. and Nasser, W. (2010) Expression of the main virulence genes in *Dickeya dadantii* (formely *Erwinia chrysanthemi*) is sensitive to the DNA supercoiling state. Poster au congrès 35TH FEBES (Gothenburg, Suède).
- Lautier T. and Nasser W. (2007) Central regulatory role of the nucleoid associated protein Fis in the virulence of *Erwinia chrysanthemi*. Congrès Molecular Plant Microbe Interactions (Sorrento, Italy).

Science popularization:

One interview in the FrenchLab Singapore (<https://frenchlab.sg/how-does-the-covid-19-pandemic-impact-french-singaporean-collaborations-in-science-and-education/>)

One interview in the CNRS journal (<https://www.cnrs.fr/fr/cnrsinfo/ma-vie-de-chercheur-confine-singapour>)

Design and animation of workshops for:

2018 : fête de la science, ESOF, Toulouse

2017 : nuit des chercheurs + interview radio France Bleu, Toulouse

2016 : nuit des chercheurs, Toulouse

From 2016 to 2022, design and animation of one scientific workshop/year in primary and high school. Topics: microbiology, biodiversity, permaculture, water structure, link between science and literature.

International cooperation :

- student exchange framework INSA Toulouse – National University of Singapore (NUS associated Professor Chueh Loo Poh, involved in the international relationship board). Work in progress linked with the DRI INSA Toulouse.

- 2020 et 2021 : animation event "choose France" INP INSA master Toulouse

II. Parcours scientifique

A la suite d'une année au Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaires de Toulouse en génétique des bactéries lactiques, travaillant sur un sujet portant sur la résolution des dimères de chromosomes (Le Bourgeois P. *et al.*, 2007), j'ai effectué une thèse en génétique bactérienne à l'unité Microbiologie Adaptation Pathogénie de l'INSA de Lyon portant sur la régulation des facteurs de virulence d'une bactérie phytopathogène, *Dickeya dadantii*. Ce travail de génétique moléculaire et de physiologie a montré le rôle du régulateur transcriptionnel Fis dans la coordination de la synthèse des fonctions de virulence du pathogène, permettant de coupler état métabolique et déclenchement de la virulence. (Lautier T. *et al.*, 2007a et 2007b; Ouafa Z. A. *et al.*, 2012). J'ai ensuite réalisé un séjour post-doctoral au Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, devenu le Toulouse Biotechnology Institute, où j'ai recherché la présence de canaux à substrats gazeux dans l'hydrogénase de la bactérie anaérobie *Clostridium acetobutylicum* (Lautier T. *et al.*, 2011) puis étudié l'activité d'enzymes évoluées impliquées dans une voie artificielle de synthèse de la méthionine.

Je ne détaillerai pas dans ce rapport les travaux menés dans cette première partie de mon parcours, malgré l'importance que je leur accorde. Aussi bien sur le plan scientifique qu'institutionnel, ces expériences ont été diverses dans leurs spécificités (six systèmes enzymatiques et cinq microorganismes différents, sept équipes dans cinq différents laboratoires) tout en nourrissant une même ligne directrice qui se clarifia au fur et à mesure: l'étude de mécanismes enzymatiques à différentes échelles de processus cellulaires, dans des laboratoires académiques.

Tout en gardant à l'esprit ces premières expériences, ce rapport décrit mes travaux de recherche à partir des projets impliquant la famille enzymatique des cytochromes P450, enzymes clefs de l'équipe que j'ai intégré à la suite de ma prise de fonction en tant que chargé de recherche CNRS au Toulouse Biotechnology Institute en 2011. Ces projets furent le point de départ des travaux de recherche qui ont suivi impliquant les cytochromes P450 et l'intégration d'une voie métabolique artificielle au sein du métabolisme hôte, nécessitant une synergie entre ingénierie protéique et ingénierie métabolique. Depuis 2019, en lien avec

l'équipe toulousaine, je conduis mes travaux de recherche au sein du Singapore Institute of Food and Biotechnology Innovation (SIFBI) à Singapour, dans le cadre de l'IRP SynBioEco établi entre TBI, TWB et SIFBI et l'université nationale de Singapour (NUS). Je suis affecté à l'unité UAR2001 intitulée «Singapore Partnership with CNRS for Excellence in Sciences» (SPICES). Cette unité fait partie de l'écosystème de recherche CREATE, regroupant des universités internationales comme le Massachusetts Institute of Technology, the Technical University of Munich, l'Imperial College of London,... Dans cet écosystème CREATE, SPICES est couramment dénommée CNRS@CREATE, première filiale internationale du CNRS. CNRS@CREATE abrite différents projets impliquant le CNRS (nanomatériaux, quantique, intelligence artificielle, biomécanique,...). Parmi ceux-là, EcoCTs est le projet impliquant TBI et les partenaires de l'IRP SynbioEco. EcoCTs cible les verrous actuels à différentes étapes du processus biotechnologique. Dans une optique de continuité, le projet de recherche développé dans ce rapport se nourrit de ces expériences, tout en y identifiant des synergies permettant d'adresser de nouvelles directions scientifiques.

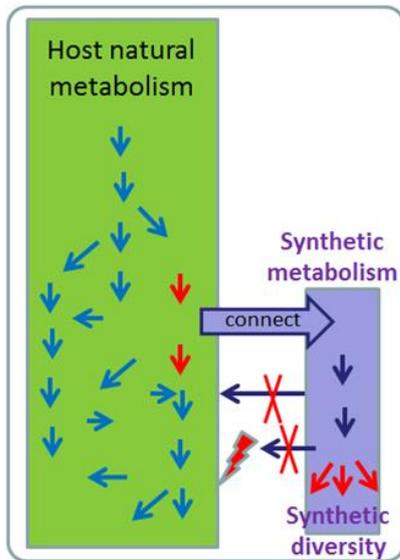
A. Contexte : Associer les ingénieries protéique et métabolique

Une cellule regroupe l'ensemble de réactions biochimiques nécessaires à la vie et ces réactions sont catalysées pour avoir des vitesses compatibles avec l'échelle de temps du vivant. Comment fonctionne et comment modifier une voie métabolique dans une cellule vivante ? Cette question biologique générale est la base de mon travail qui porte sur l'ingénierie protéique et métabolique chez les microorganismes.

Comprendre une voie métabolique peut être abordé en première approche par l'étude du fonctionnement interne de ou des enzymes impliquées. La première partie de ce rapport porte sur l'ingénierie protéique. Elle se focalise d'abord sur la spécificité de substrat à l'échelle d'une enzyme, puis sur les interactions entre domaines catalytiques d'une même enzyme et celles entre enzymes différentes. Le volet ingénierie protéique a été abordé via deux modèles riches et complémentaires: les cytochromes P450 et la cytochrome P450 réductase.

A une échelle supérieure, les interactions entre enzymes créent les engrenages métaboliques nécessaires à l'ensemble de la voie métabolique. Comprendre un réseau métabolique, c'est en comprendre les règles de circulation et les outils d'aiguillage au sein d'une cellule vivante. La thématique d'ingénierie métabolique adresse cet aspect en prenant comme modèle de voie métabolique la voie des carotènes.

Ce travail porte donc sur la compréhension des mécanismes enzymatiques à différentes échelles du fonctionnement cellulaire. Ces deux niveaux d'analyse (ingénierie protéique et ingénierie métabolique) sont complémentaires pour développer une vision la plus synergique possible du fonctionnement d'une voie métabolique, naturelle ou artificielle (Figure 1).



In metabolic engineering,
 Focused on the synthetic pathway connection:
How a cell switch in alternative pathways?

Questions:

- Direct the flux into the synthetic pathway?
- Order of the steps?
- Isolation of efficient pathway?
- Gene function identification?
- Pathway optimization and evolution?
- Ramified metabolism plasticity: How to deal with a biodiversity inside one organism?

**Combinatorial biology approach:
 metabolic pathway libraries**

Figure 1 : Les interactions entre une voie synthétique et le métabolisme hôte

B. Ingénierie protéique

1. Ingénierie de la spécificité de substrat:

a) Substrats différents pour isoformes différentes : cas des cytochromes 2B6/2B11

Ce premier projet se situe à l'échelle de l'enzyme elle-même, *in vitro*, sans analyser ses interactions avec ses partenaires enzymatiques naturels ou l'effet de son contexte cellulaire. Il se focalise sur la spécificité de substrat chez une famille d'enzymes: les cytochromes P450. Ces enzymes membranaires catalysent de multiples réactions d'oxydoreduction et sont impliqués dans les voies métaboliques que nous étudions, tels que la fonctionnalisation des terpènes et carotènes. Approfondir ma compréhension sur ces systèmes enzymatiques était donc essentiel. Nous avons travaillé sur une famille modèle des P450 : la famille CYP2B. Les cytochromes P450 de la famille CYP2B, présents chez les mammifères, ont des propriétés catalytiques très distinctes entre les espèces. Les structures cristallines du CYP2B obtenues en présence de différentes molécules (inhibiteurs) ont révélé des variations de la structure tridimensionnelle, témoignant d'un degré élevé de plasticité de ces enzymes. Notamment, le site actif et plusieurs éléments de structures secondaires présentent un degré de mobilité permettant d'accueillir des ligands de tailles différentes. L'isoforme humaine CYP2B6 est impliqué dans le métabolisme de 5% des médicaments disponibles et est inhibé par plusieurs petites molécules organiques et pharmaceutiques cliniquement importante [1]. Parmi eux, le cyclophosphamide (CPA) nécessite une étape de bioactivation par le CYP2B6 humain pour exercer son effet antitumoral. Le CYP2B6 présente une affinité très faible pour le CPA en contraste net avec le CYP2B11 canin qui démontre une affinité relativement élevée pour la même molécule (le K_M du CYP2B6 pour le CPA est 50 fois supérieur à celui du CYP2B11).

Nous nous sommes intéressés à l'identification des éléments de séquence qui contrôlent la spécificité des CYP2B. Pour ce faire, une combinatoire ordonnée de protéines chimériques entre les CYP mammifères CYP2B6 (humain) et CYP2B11 (canin) a été conçue. Des parties de séquence CYP2B6 (de 17 à 58 acides aminés) ont remplacé leur séquence

homologue dans un gène CYP2B11 conduisant à créer des chimères dont la séquence est essentiellement du type CYP2B11 (Figure 2). Quinze chimères 2B6-2B11 ont été exprimées chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, dans la souche W (R) qui surexprime la cytochrome P450 réductase, partenaire red/ox essentiel à l'activité des cytochromes P450. Les propriétés biochimiques des chimères ont été caractérisées sur deux substrats typiques des CYP2B, le cyclophosphamide (CPA), dont l'affinité par le CYP2B11 est supérieure à celle du CYP2B6 et la 7-éthoxy-4-trifluorométhyl-coumarine (EFC), pour laquelle les deux isoformes ont une affinité équivalente, servant de référence (Figure 3). L'objectif était d'observer un basculement de spécificité dans les chimères à squelette 2B11 : Est-ce que la spécificité du 2B11 pour le CPA est conférée par une région particulière de l'enzyme. Le cas échéant, lorsque le domaine impliqué dans la spécificité est remplacé par son équivalent 2B6, cette chimère devrait avoir un comportement biochimique plus proche du 2B6 que du 2B11.

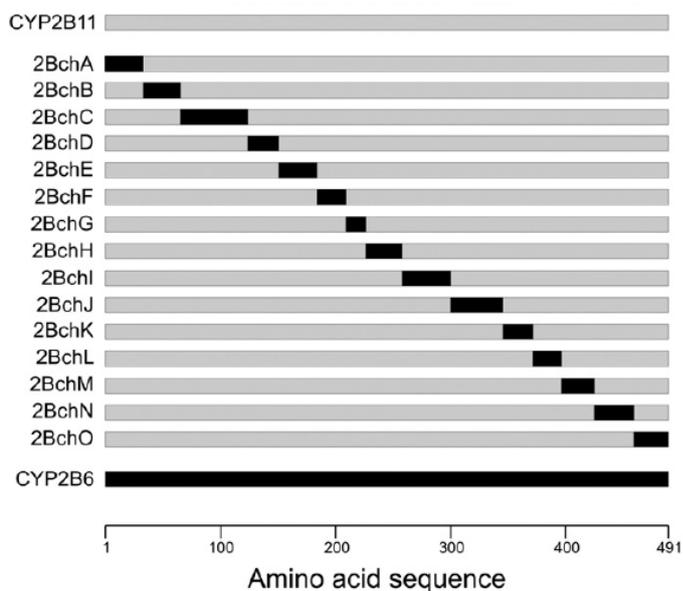


Figure 2 : Comparaison des séquences primaires des CYP 2B WT et chimériques, les barres pleines représentent la séquence humaine CYP2B6, les barres grises représentent la séquence canine 2B11

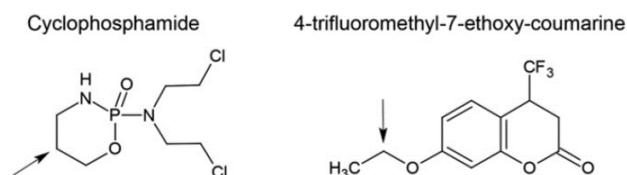


Figure 3 : Structures des substrats utilisés dans ce travail. La flèche indique le site d'attaque catalysée par des enzymes CYP2B.

Les valeurs de K_M pour le CPA ont été mesurées avec les chimères et sont, pour la plupart, assez similaires à celles du CYP2B11 sauvage, résultat cohérent avec le fait que les chimères ont majoritairement un squelette issu de la séquence CYP2B11. Cependant, quatre des quinze chimères présentent une affinité modifiée pour le CPA (Figure 4). Les chimères G et, dans une moindre mesure, B, H et M présentent une augmentation de la valeur K_M pour le CPA (K_M 25, 7 et 4 fois plus élevé respectivement) par rapport au K_M du CYP2B11 sauvage. La modification d'affinité induit par l'échange de séquences est plus prononcée pour la chimère G que pour les autres chimères. Malgré l'effet sur l'affinité pour le CPA, ces quatre chimères présentent une activité spécifique d'hydroxylation du CPA restant dans la même gamme que les enzymes parentales.

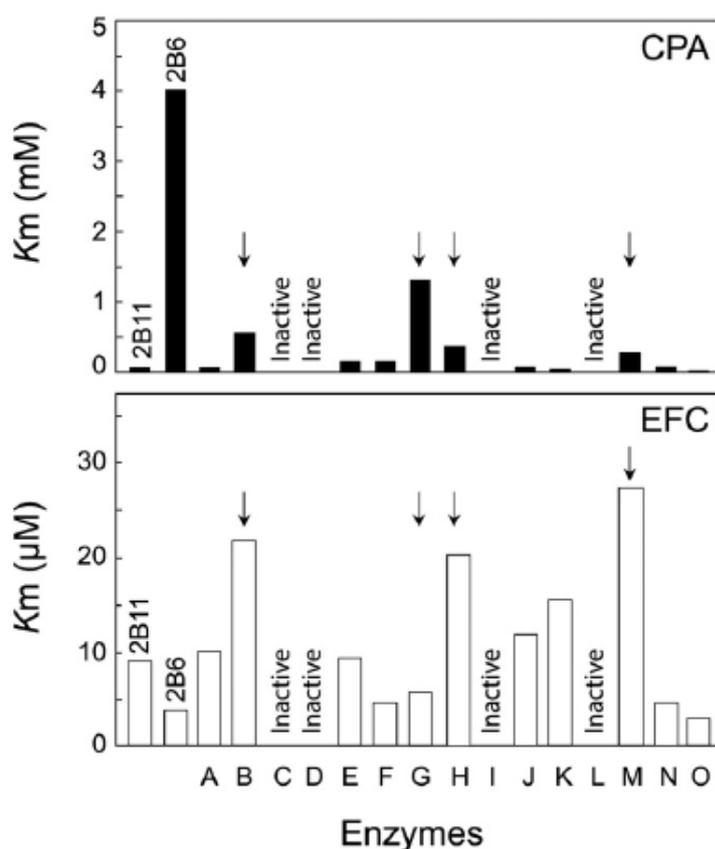


Figure 4 : Comparaisons des constantes d'affinité pour le cyclophosphamide et pour la 7-éthoxy-4-trifluorométhylcoumarine des enzymes CYP2B chimères et parentales (barres pleines, CPA; Barres évidées, EFC). Les flèches indiquent les quatre chimères qui présentent une modification importante.

Les paramètres biochimiques avec l'EFC, substrat pour lesquels les deux isoformes sauvages 2B6 et 2B11 ont une affinité équivalente, ont également été déterminés. Les enzymes parentales CYP2B6 et CYP2B11 présentent bien un K_M similaire pour la réaction de o-déthylation (3,5 μM et 8,2 μM respectivement), contrairement à ce qui a été observé avec le CPA. Les K_M pour l'EFC varient d'un facteur 11 entre les chimères (de 2,4 μM pour la chimère O jusqu'à 26,7 μM pour la chimère M), une valeur assez faible par rapport au facteur 65 obtenu avec le CPA comme substrat. Sur la Figure 4, les quatre chimères B, G, H et M représentent un profil d'activité typique de CYP2B6. La chimère G présente une affinité ($K_M = 5,8 \mu\text{M}$) similaire à celle des enzymes parentales de type sauvage avec l'EFC mais pas avec le CPA. Par conséquent, le changement d'affinité observé pour le CPA avec la chimère G est très spécifique.

Les différents segments de séquence échangés dans les chimères B, G, H et M ont été positionnés sur la structure cristalline du CYP2B6 humain (Figure 5). Les quatre segments échangés se situent à la périphérie de la protéine. Les segments de séquence échangés dans les chimères B (englobant l'hélice A), G (englobant les deux hélices F' et G') et H (englobant l'hélice G) sont situés côte à côte et sur le même côté de la surface du CYP2B6. Aucun d'entre eux ne participe à la paroi de la cavité catalytique et donc aucun d'entre eux n'est impliqué directement dans la liaison du substrat au site actif.

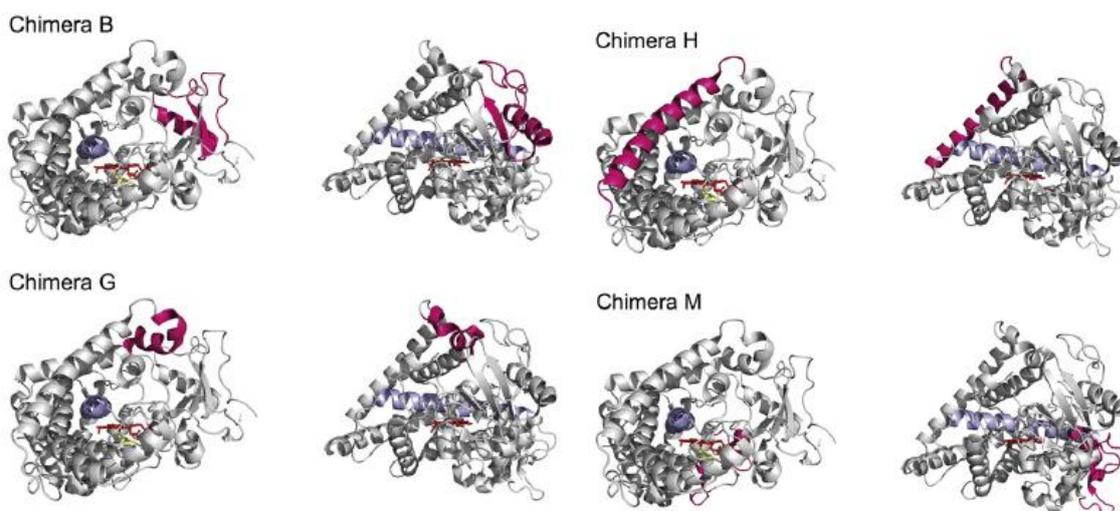


Figure 5 : Visualisation de la position du segment de séquence échangé (en rose) dans les chimères à faible affinité pour le CPA (entrée pdb CYP2B6 3ua5). La vue de droite est tournée de 90 ° autour d'un axe vertical. L'hélice I, élément structural clef des P450, est colorée en

gris-bleu. L'hème est représenté en bâtonnets rouges, la cystéine liée à l'hème est représentée en bâtonnets jaunes.

La chimère G est d'un grand intérêt car elle présente une affinité nettement plus faible pour le CPA que l'enzyme CYP2B11 parentale. Elle présente plutôt un comportement proche du CYP2B6, étant pourtant constituée d'un squelette CYP2B11 ne contenant que 6 résidus de CYP2B6. Positionnés sur la structure tridimensionnelle de CYP2B6, les acides aminés échangés sont localisés au niveau des hélices F' et G' ainsi que de la boucle F'/G'. La cassette F/G forme le plafond de la cavité catalytique des CYP2B et peut s'éloigner du cœur de l'enzyme et de l'hélice B' [2]. Il a également été montré que dans un mutant F297A de CYP2B4 (isoforme du lapin) cristallisé en présence d'un inhibiteur, l'hélice I est déplacée vers le site actif par rapport à la structure CYP2B sans ligand [3]. Ceci illustre que la flexibilité des enzymes de la famille CYP2B ne se propage pas vers l'ensemble de la structure tertiaire de l'enzyme, mais plutôt sur deux éléments structuraux bien définis: i) l'hélice I proche du résidu F297 et ii) la cassette F/G qui se déplace dans son ensemble pour adapter la cavité catalytique de l'enzyme au ligand. Cette flexibilité structurelle dans les enzymes CYP2B a été nommée repositionnement α -hélicoïdal [4]. Le contrôle de l'affinité vis-à-vis du CPA dans les enzymes CYP2B dépend donc de la cassette F'/G' et, dans une moindre mesure, de l'hélice A située dans la partie N-terminale de la protéine. Aucun des segments échangés qui sont localisés au cœur de la protéine ont entraîné un changement d'affinité. Notre analyse structurale souligne l'importance d'un court segment flexible situé à la surface de l'enzyme et faisant face à la membrane du réticulum endoplasmique, loin du site actif. Nos résultats démontrent que la cassette F'/G' est fortement impliquée dans la reconnaissance et la liaison du CPA, en accord avec de nombreuses études cristallographiques réalisées sur des enzymes CYP2B. Le fait que les approches biochimiques et cristallographiques donnent la même conclusion souligne le rôle de la cassette F'/G' dans le contrôle de la spécificité du substrat dans les enzymes CYP2B. Ce travail donne un éclairage sur la complexité de la plasticité conformationnelle des cytochromes P450 pour permettre l'accès aux substrats lipophiles qui résident dans la membrane du réticulum endoplasmique.

b) Substrat identique pour isoformes différentes : cas des cytochromes P450 de la famille CYP97

Cette partie du travail se focalise sur le rôle de la spécificité des enzymes au sein des métabolismes branchés. Le choix de voie métabolique est en lien avec le cœur de l'équipe : la voie des carotènes. En mobilité au laboratoire Singapore Institute of Food and Biotechnology Innovaiton, à Singapour, partenaire de l'IRP SynBioEco, la synergie était alors d'associer mes compétences dans l'ingénierie des P450 à celles de mes collègues singapouriens en ingénierie métabolique, notamment procaryote.

Parmi la vaste famille des terpènes, les caroténoïdes présentent des doubles liaisons conjuguées, qui leur confèrent leurs propriétés biologiques. Dans les organes photosynthétiques des plantes, les caroténoïdes récoltent la lumière et transfèrent cette énergie aux chlorophylles par transfert d'excitation singulet-singulet. En cas d'excès de lumière, conduisant à un excès d'énergie pour la chlorophylle, les caroténoïdes protègent l'antenne chlorophyllienne du photosystème en absorbant cette énergie par transfert inverse et en la libérant par la vibration du polyène terpénique [5]. Dans les organes non photosynthétiques, les caroténoïdes jouent le rôle de photo-protecteurs, d'antioxydants, de colorants et de précurseurs d'hormones végétales. [6]. Même s'ils ne sont généralement pas produits *de novo* chez les animaux, les caroténoïdes sont des effecteurs importants, tels que le groupe prosthétique absorbant la lumière de la rhodopsine dans la rétine, les antioxydants et les photoprotecteurs, ou les signaux pour les communications intra-espèces (sexuelles, statut social ou signalisation entre parents et progéniture) et inter-espèces (reconnaissance des espèces ou camouflage, coloration d'avertissement,...) [6]. Les micro-organismes non photosynthétiques, tels que les champignons ou les levures rouges, produisent également des caroténoïdes impliqués dans différentes fonctions non essentielles, telles que la tolérance à la lumière et au stress oxydatif, la communication intraspécifique ou les fonctions écologiques. [7]. En raison de ces propriétés, les caroténoïdes ont suscité un intérêt pour les applications industrielles. Plus de 1100 caroténoïdes naturels ont été identifiés et se répartissent entre les carotènes qui sont non-oxygénés et les xanthophylles, oxygénés [8]. Ces différents xanthophylles possèdent des propriétés antioxydantes et colorantes spécifiques, alimentant des chimiothèques utiles pour des applications spécifiques. Par exemple, le β -carotène monohydroxylé, appelé β -cryptoxanthine, est l'un des six caroténoïdes présents dans le sérum sanguin humain et l'un des principaux caroténoïdes s'accumulant dans les

érythrocytes [9], [10]. Avec les α - , β - et γ - carotènes, la β -cryptoxanthine est le précurseur des rétinoïdes, appelés pro-vitamine A. En plus de ses activités antioxydantes, la β -cryptoxanthine semble être associée à une diminution des risques de certains cancers et maladies dégénératives. De nombreuses études *in vitro*, sur des modèles animaux et chez l'homme suggèrent que les aliments riches en β -cryptoxanthine pourraient avoir un effet anabolique sur les os et, ainsi, contribuer à retarder l'ostéoporose [11].

Les caroténoïdes peuvent être produits de trois façons : par synthèse chimique, par extraction à partir de plantes ou par des procédés biotechnologiques. La production industrielle a été principalement réalisée par synthèse chimique ou par extraction à partir de plantes. Cependant, la synthèse chimique conduit à des mélanges racémiques alors que la bioactivité des caroténoïdes exige une composition spécifique de stéréoisomères, sans compter les préoccupations croissantes concernant l'utilisation d'additifs chimiques dans les aliments [12]. Dans le cadre du biosourcing naturel, les teneurs cellulaires en caroténoïdes sont souvent faibles, ce qui nécessite de grandes surfaces de culture, soumises à des variations géographiques et saisonnières. De plus, les processus de récolte et d'extraction peuvent endommager les métabolites, ce qui rend le processus global coûteux [13]. Les caroténoïdes produits par voie microbienne peuvent être obtenus rapidement et à tout moment de l'année, via un procédé peu polluant pour l'environnement. Ils présentent l'avantage de pouvoir être fonctionnalisés, par exemple par estérification [14], [15]. Cette modularité dans l'approche biotechnologique est précieuse pour ajouter de nouvelles branches sur des bioprocédés existants, en capitalisant sur le design métabolique précédent. A titre d'exemple, les estérifications modifient la stabilité et l'assimilation des carotènes : les caroténoïdes naturels sont principalement sous la forme estérifiée que l'on trouve dans les plantes, ce qui augmente leur stabilité, alors que l'homme assimile la forme caroténoïde libre. Lorsque cela est nécessaire, le processus biologique permet l'ajout d'une estérase pour produire la forme estérifiée des caroténoïdes [16], [17]. Des approches de biologie synthétique, impliquant de l'ingénierie enzymatique, ont été utilisées avec succès pour la production de caroténoïdes emblématiques, tels que le β -carotène (39,5 g/L dans *Yarrowia lipolytica*), et cette récente percée souligne l'importance de l'ingénierie des protéines couplée à l'ingénierie métabolique pour parvenir à une production industrielle pertinente. [18].

Outre les caroténoïdes en bout de voies métaboliques, les chimiothèques de biodiversité moléculaire peuvent être enrichies avec les intermédiaires des voies, mais leur accès est difficile. Les approches chimiques ne sont pas facilement régiosélectives pour synthétiser un métabolite intermédiaire spécifique. Dans le biosourcing naturel, les intermédiaires spécifiques sont accumulés à un niveau inférieur à celui des caroténoïdes finaux, intégrés dans un métabolisme complexe et ramifié, avec divers intermédiaires similaires, ce qui complique l'extraction et la pureté du produit. Dans le cas de la β -cryptoxanthine décrite ci-dessus, son précurseur, le β -carotène, présente deux β -cycles terminaux identiques, mais un seul doit être hydroxylé. Concevoir une synthèse chimique régiosélective sur une molécule offrant deux sites modifiables identiques conduit à des stratégies de protection/déprotection difficiles à équilibrer. En ce qui concerne l'approche du biosourcing, bien que le β -carotène soit présent en grande quantité dans de nombreux fruits et légumes, la β -cryptoxanthine n'est présente que dans un petit nombre de plantes, telles que *Citrus unshiu*, *Citrus reticulata*, *Cucurbita maxima*, *Diospyros oleifera* Cheng, *Capsicum annuum*, *Carica papaya* et peut difficilement être extraite en grande quantité en raison de sa faible accumulation [19]. La dernière option par biotechnologie représente un défi, car la plupart des β -carotène hydroxylases utilisées dans les procédés biotechnologiques sont biterminales et produisent la zéaxanthine, le β -carotène doublement hydroxylé. En effet, la β -cryptoxanthine est régulièrement co-synthétisée en tant que produit mineur en raison de sa position intermédiaire dans la voie de synthèse, et les efforts pour augmenter sa production en tant que produit unique de β -carotène oxygéné n'ont jamais été faits [20].

Afin d'implémenter une voie de biosynthèse de la β -cryptoxanthine chez un microorganisme, il est nécessaire de comprendre ses différentes étapes et d'en identifier les enzymes clés. La famille des caroténoïdes est construite par l'addition itérative de blocs à base d'isoprène. Atteignant une chaîne aliphatique de quarante carbones, le phytoène subit une succession de désaturations internes et/ou de cyclisations des extrémités. Ces deux types de réactions sont compétitives, ce qui conduit à une voie métabolique ramifiée. En raison de la symétrie centrale de la chaîne du carotène, certains intermédiaires offrent deux extrémités identiques aux enzymes, qui sont alors capables d'agir plusieurs fois sur le même squelette initial (Figure 6).

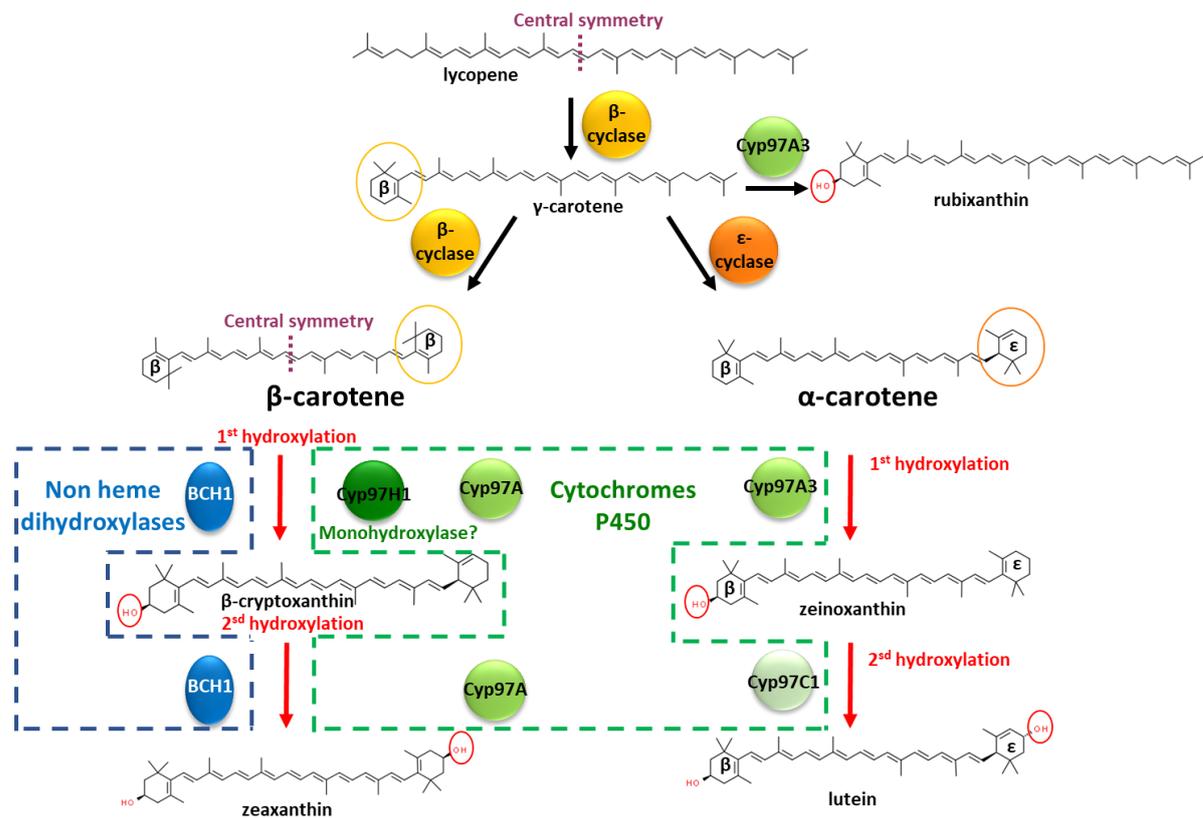


Figure 6 : Cyclisation et hydroxylation du β -carotène impliquant des mono et dihydroxylases.

L'extrémité linéaire restante du γ -carotène peut alors être cyclisée par la même lycopène cyclase, conduisant à un double lycopène β -cyclisé, c'est-à-dire le β -carotène. Il existe différentes lycopènes cyclases et l'extrémité linéaire restante peut être cyclisée par une ϵ -cyclase, conduisant à l' α -carotène, portant un cycle β et un cycle ϵ . Les cycles α - et β -carotène peuvent être le substrat de diverses hydroxylases et kétolases, provenant d'hydroxylases non hémiques ou de familles de cytochromes P450, principalement de la famille CYP97 [21].

Les hydroxylases non hémiques, telles que CrtZ ou BHC1 sont décrites comme des dihydroxylases sur le β -carotène. Elles produisent principalement de la zéaxanthine, composée de deux β -cycles hydroxylés identiques ; l'intermédiaire monohydroxylé, la β -cryptoxanthine, est presque indétectable [22]. L'oxydation enzymatique se produit d'abord sur l'un des deux cycles, en position 3 (ou 3'). Les extrémités de la molécule étant symétriques, le β -carotène monohydroxylé peut se retourner et entrer une seconde fois dans le canal à substrat de l'hydroxylase, offrant son cycle opposé pour une seconde hydroxylation,

produisant la zéaxanthine. Une autre hypothèse est que l'hydroxylase agisse comme un dimère, chaque monomère assumant simultanément une hydroxylation. Dans l'hydroxylase non hémique BCH1 d'*Arabidopsis thaliana*, la troncature des 129 premiers acides aminés du domaine N-terminal favorise l'accumulation de β -carotène monohydroxylé. Ce domaine a été pourrait être impliqué dans une homodimérisation, mais la démonstration biochimique n'a pas encore été établie [22].

Outre les dihydroxylases non hémique active sur le β -carotène, les cytochromes P450 de la famille CYP97 sont principalement impliquées dans la double hydroxylation séquentielle de l' α -carotène, composé d'un cycle ϵ et d'un cycle β . Les CYP carotène hydroxylases sont divisés en deux classes, actives soit sur le β -cycle du carotène, soit sur le ϵ -cycle du carotène. Dans la voie de la lutéine, dont le squelette carboné est l' α -carotène, deux types de P450 sont impliqués et agissent de concert : chez *Daucus carota*, CYP97A3 hydroxyle l' α -carotène sur le cycle β , conduisant à la zéinoxanthine, puis CYP97C1 hydroxyle le cycle ϵ de la zéinoxanthine pour produire la lutéine [23]. Si la dimérisation reste également une question dans le cas des cytochromes P450, la longueur du canal du substrat dans le CYP97A3 d'*Arabidopsis thaliana* est suffisante pour que la totalité du C40 α -carotène soit incluse dans une seule enzyme [24], suggérant que des hydroxylations simultanées sur chaque extrémité du carotène n'est pas une hypothèse favorable et que les deux hydroxylations se produisent séquentiellement. En ce qui concerne l'activité des cytochromes P450 sur le β -carotène, plusieurs cytochromes de la famille CYP97 agiraient en tant que β -carotène dihydroxylases, tels que le CYP97A3 d'*A. thaliana* ou le CYP97A4 d'*Oriza sativa* [25], [26]. Parmi la famille des CYP97, un cas intéressant est CYP97H1 de l'algue photosynthétique *Euglena gracilis*, car il a été décrit agissant comme une β -carotène monohydroxylase, produisant de la β -cryptoxanthine. [27].

Pour mettre en œuvre une production microbienne de β -cryptoxanthine, l'optimisation de l'activité d'une monohydroxylase du carotène appartenant aux cytochromes P450s est l'option la plus favorable et nous avons employé un procédé générique axé sur l'expression de P450s dans *Escherichia coli*. Les étapes d'ingénierie pour l'expression d'un P450 dans un hôte hétérologue sont, par ordre d'importance : (i) choisir la meilleure isoforme CYP parmi un arbre phylogénétique fonctionnel, (ii) réaliser une ingénierie N-terminale appropriée pour la localisation intracellulaire et une expression favorable, (iii) cribler une gamme de partenaires redox, représentatifs des différents compartiments cellulaires, (iv) définir la souche hôte

optimale, (v) ajuster les conditions de culture et d'induction. Cette séquence d'ingénierie peut être adaptée à n'importe quel P450 d'intérêt, en profitant notamment de la boîte à outils des partenaires redox construite dans cette étude.

L'ingénierie s'est concentrée sur CYP97H1 d'*E. gracilis* car après criblage de plusieurs membres de la famille CYP97, CYP97H1 est apparu comme la meilleure isoforme pour une monohydroxylation du β -carotène. Pour l'expression hétérologue d'un cytochrome P450 eucaryote dans *E. coli*, une approche classique consiste à supprimer une partie du domaine N-terminal, contenant un signal d'adressage peptidique ou d'ancrage membranaire. En effet, l'expression de la longueur totale du CYP97H1 a produit une petite quantité de β -cryptoxanthine par rapport à la version tronquée des 116 premiers résidus [27]. Par rapport à la forme tronquée en N-terminal, nous avons observé que l'ancrage du CYP97H1 à la membrane bactérienne par l'ajout d'étiquettes N-terminales, connues pour améliorer l'expression de CYPs chez *E. coli*, a eu un effet plutôt neutre sur la production de β -cryptoxanthine. Les membres de la famille CYP97 sont associés à la périphérie des membranes des plastes par une région hydrophobe [28]. Sachant que la fluctuation des P450 dans la membrane joue un rôle dans la catalyse, un domaine transmembranaire complet pourrait introduire un contact trop rigide entre CYP97H1 et la membrane [29].

Une étape clé a été l'identification d'un partenaire redox efficace (Figure 7).

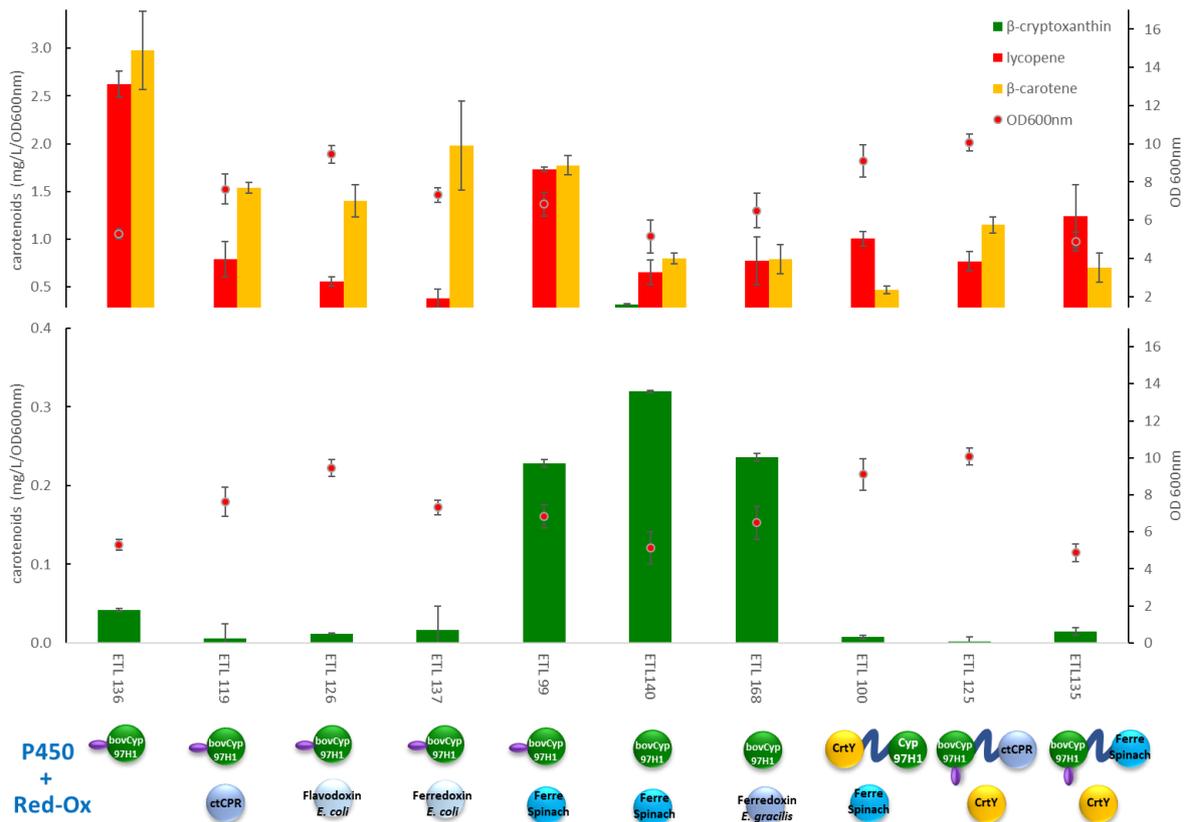


Figure 7 : Production *in vivo* de caroténoïdes dans des souches exprimant CYP97H1 et différents partenaires redox ou des fusions entre CYP97H1 et la lycopène cyclase ou des partenaires redox.

L'expression de deux variants de CYP97H1 ancrés différemment dans la membrane avec deux cytochrome P450 réductases liées à la membrane n'a pas permis d'augmenter la production de β -cryptoxanthine. Les partenaires redox généralement décrits des membres de la famille CYP97 sont les ferrédoxines, ce qui peut expliquer le faible couplage avec les précédentes cytochrome P450 réductases. Cependant, des contre-exemples existent, comme le couplage entre CYP97C27 et une cytochrome P450 réductase, tous deux issus de *Croton stellatopilosus Ohba* [30]. Cette variabilité des partenaires redox des P450s justifie l'utilisation dans une première approche de la boîte à outils de partenaires redox construite dans cette étude. Elle contient un ensemble représentatif de partenaires redox provenant de chaque type de compartiment cellulaire (cytoplasme bactérien, réticulum endoplasmique, mitochondrie et chloroplaste). Ainsi, CYP97H1 a ensuite été coexprimé avec des ferrédoxines ou des flavodoxines bactériennes, végétales ou algales. La coexpression de CYP97H1 avec PetF, la ferrédoxine putative d'*Euglena gracilis*, et avec la ferrédoxine réductase de *Spinacia*

oleracea améliore la production de β -cryptoxanthine. Il s'agit également de la première validation expérimentale que PetF, naturellement exprimé dans les chloroplastes de *E. gracilis*, est une ferrédoxine. La meilleure production de β -cryptoxanthine a été obtenue en utilisant la forme tronquée de CYP97H1 avec la ferrédoxine de *Spinacia oleracea* couplée à sa propre ferrédoxine réductase, ce qui souligne l'importance d'un relais homogène entre le transporteur d'électrons, la ferrédoxine, et son réducteur, la ferrédoxine réductase.

Ayant identifié un partenaire redox efficace, nous avons ensuite porté nos efforts sur la souche d'expression et les conditions de culture. Le meilleur châssis semble être la souche BL21 co-exprimant les chaperones GroESL, qui peuvent aider à replier les 18 enzymes hétérologues de la voie de synthèse. En ce qui concerne les conditions de culture, CYP97H1 reste principalement une monohydroxylase dans la gamme de température testée, avec une accumulation optimale de β -cryptoxanthine à 25°C. Contrairement à CYP97A4 de *O. sativa*, dans lequel le rapport β -carotène/ β -cryptoxanthine/zeaxanthine se déplace en faveur de la β -cryptoxanthine à basse température [26], CYP97H1 conserve le même ratio de production de caroténoïdes indépendamment de la température.

En utilisant le meilleur couple hydroxylase-redox, c'est-à-dire CYP97H1 avec la ferredoxine/ferredoxine réductase de *S. oleracea*, exprimée dans BL21 avec les chaperones GroESL à 25°C, la condition d'induction optimale, c'est-à-dire un milieu autoinducteur (10 mM de lactose), a été déterminée afin d'équilibrer l'expression de la voie de synthèse avec la croissance métabolique. Ainsi, ces optimisations ont permis de produire $0,68 \pm 0,06$ mg de β -cryptoxanthine /L de culture/OD600nm. Cela correspond à un titre de $2,7 \pm 0,25$ mg/L en culture en tube (Figure 8). La production de la souche finale a été améliorée de 400 fois par rapport à la souche initiale.

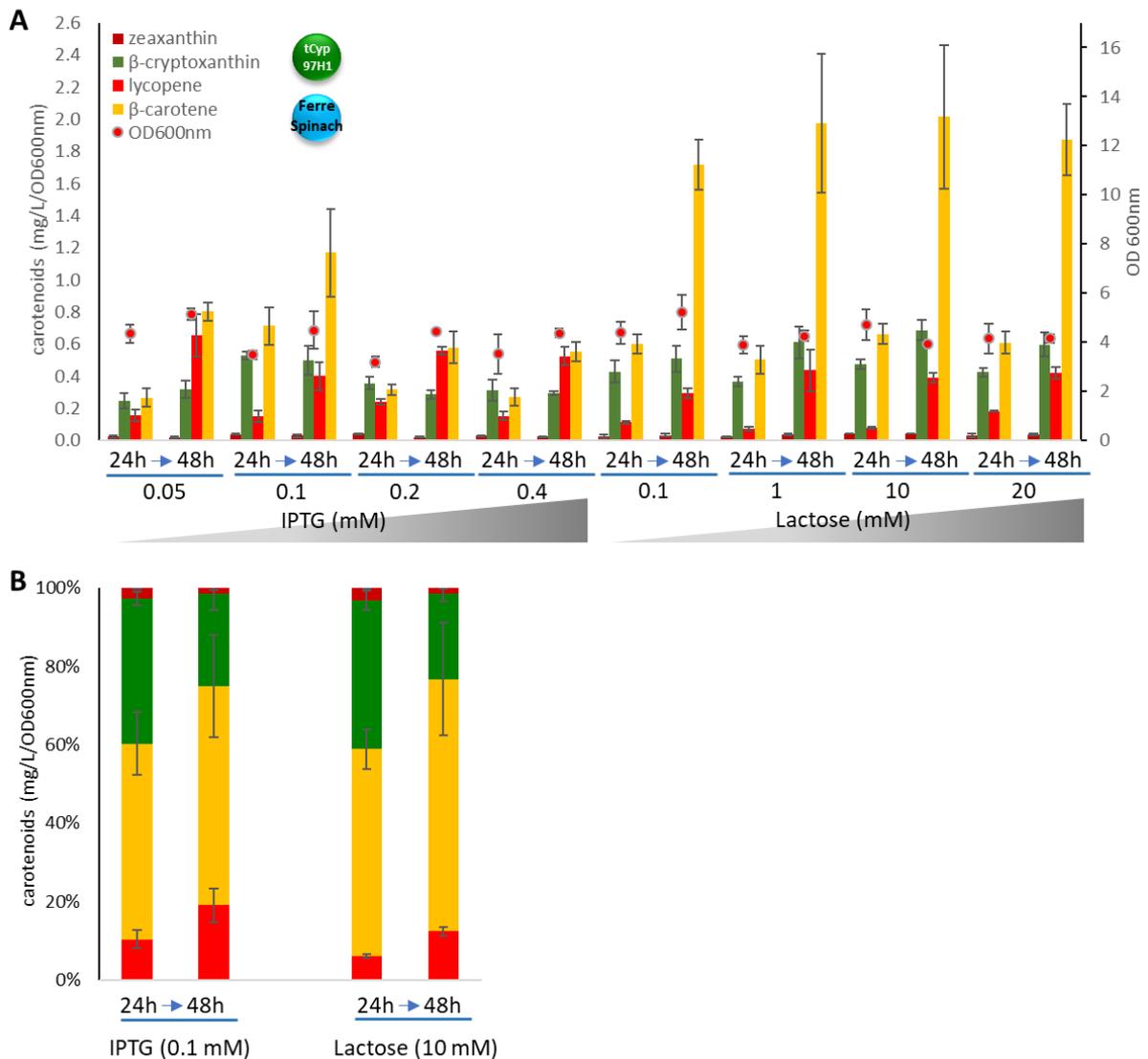


Figure 8 : **A**: Production à 24 et 48 heures de caroténoïdes *in vivo* via une gamme d'induction IPTG ou lactose. **B**: ratio de caroténoïdes à 24 et 48 heures avec une induction à 0,1 mM d'IPTG ou 10 mM de lactose.

A notre connaissance, c'est la première fois que la β -cryptoxanthine a été produite à une échelle >1mg/L. La β -cryptoxanthine représente 22% des carotènes totaux. Néanmoins, l'évolution du ratio des caroténoïdes au cours du temps (la β -cryptoxanthine représente 40% du carotène total à 24h mais 22% à 48h) et l'accumulation de β -carotène (65% des carotènes totaux à 48h) indique que l'activité hydroxylase est un goulot d'étranglement en fin de voie. Pour vérifier si le cytochrome P450 est principalement exprimé sous sa forme active, des expériences de spectres de CO sur cellules entières ont été menées [31]. L'hème contenu dans

la poche catalytique d'un cytochrome P450 est capable de fixer le monoxyde de carbone lorsque l'atome de fer est sous forme réduite. La différence de spectre CO-Fe(II) versus Fe(II) à 450 nm fournit un moyen sensible et spécifique de quantifier le cytochrome P450 dans les cellules. A 24 ou 48 heures, une signature spectrale du P450 n'a pas été détectée même dans une souche exprimant seulement trois gènes hétérologues avec le gène CYP97H1 pour favoriser l'expression du CYP97H1 par rapport au système complet de 18 gènes hétérologues. Même s'il est clair que CYP97H1 s'exprime sous une forme active puisque la β -cryptoxanthine est produite, ces expériences de spectres CO suggèrent que la quantité de CYP97H1 est assez faible. Une option pourrait être de contrôler l'expression du CYP97H1 sous un système d'induction spécifique, comme un promoteur inductible à l'arabinose, indépendamment de l'induction du reste de la voie de synthèse, afin de surreprésenter l'ARNm du CYP97H1. En parallèle, des efforts pour améliorer un repliement correct pourraient être explorés, comme l'ajout d'un domaine N-terminal connu pour favoriser l'expression de protéines solubles, tel qu'un tag Maltose Binding Protein (MBP) ou le tag 8 RP [32].

D'autre part, comprendre la spécificité du CYP97H1 pourrait permettre de la transposer vers des P450 plus actifs. Quelles sont les caractéristiques structurelles du CYP97H1 par rapport aux autres P450 qui confèrent à cette enzyme une fonction principalement monoterminale ? Cela donne-t-il des indices sur d'autres enzymes biterminales plus actives et sur la manière de les transformer en monohydroxylases ?

Ainsi, une étude d'ingénierie des protéines a été menée pour définir les domaines structurels clés de l'activité monohydroxylase de CYP97H1. En se concentrant sur les domaines structuraux idiosyncrasiques du CYP97H1, nous avons observé que cette enzyme présente trois régions spécifiques parmi la famille CYP97 : une boucle F'-G' plus courte, une extension de l'extrémité N-terminale et un patch hydrophobe à l'entrée du canal du substrat (Figure 9).

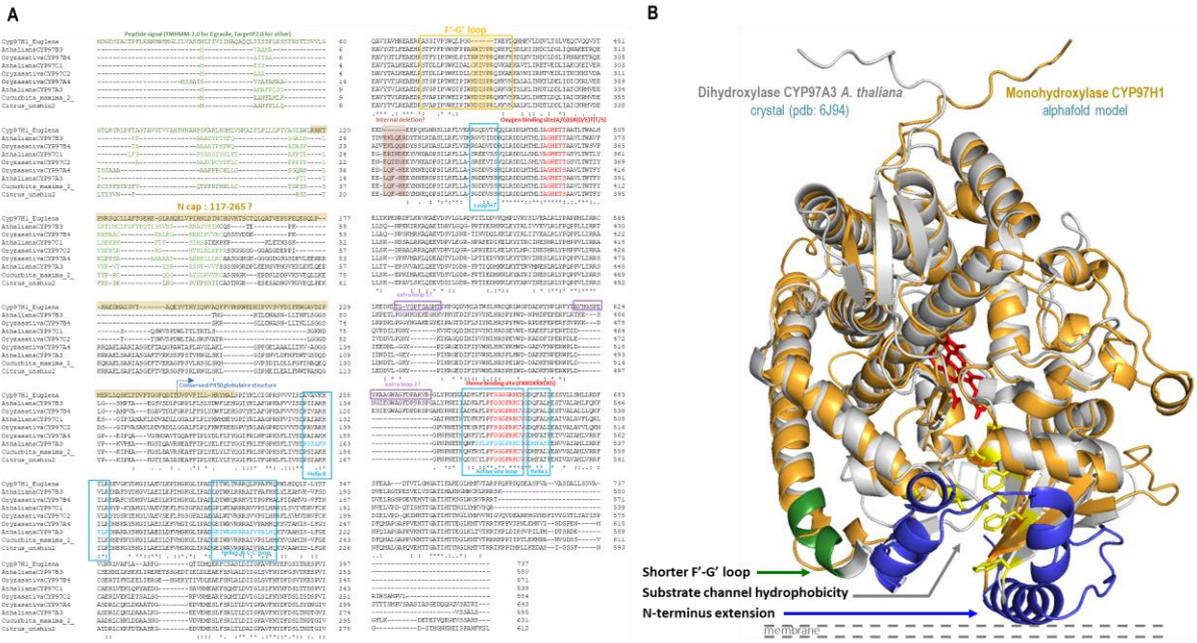


Figure 9 : **A** : Alignement de membres de la famille CYP97 : CYP97H1 de *E. gracilis*, CYP97A3, CYP97B3, CYP97C1 de *A. thaliana*, CYP97A4, CYP97B4, CYP97C2 de *O. sativa*, CtCYP97 de *C. unshiu* et CYP97 K15747 de *C. maxima*. **B** : Alignement tridimensionnel de CYP97A3 de *A. thaliana* (gris, hème en rouge) et CYP97H1 de *E. gracilis* (orange). Les trois régions spécifiques de CYP97H1 sont mises en évidence : la boucle F'-G' (vert), l'hydrophobie du canal du substrat (jaune) et l'extension N-terminale (bleu).

La boucle F'-G' d'un P450 est classiquement impliquée dans la spécificité du substrat. La présence d'un boucle F'-G' raccourcie est spécifique à CYP97H1 parmi les 102 membres de la famille CYP97 de la base de données Uniprot. Une réversion partielle ou totale en remplaçant les résidus de la boucle F'-G' de CYP97H1 par ceux de CYP97A3At écroule la production de β -cryptoxanthine, ce qui souligne la sensibilité de cette région pour l'expression ou l'activité correcte du P450. Une insertion plus progressive des 6 résidus manquants pourrait aider à identifier le point de rupture. Concernant la partie N-terminale spécifique au CYP97H1, les tronçatures progressives conduisent à une diminution graduelle de la production de β -cryptoxanthine (Figure 10).

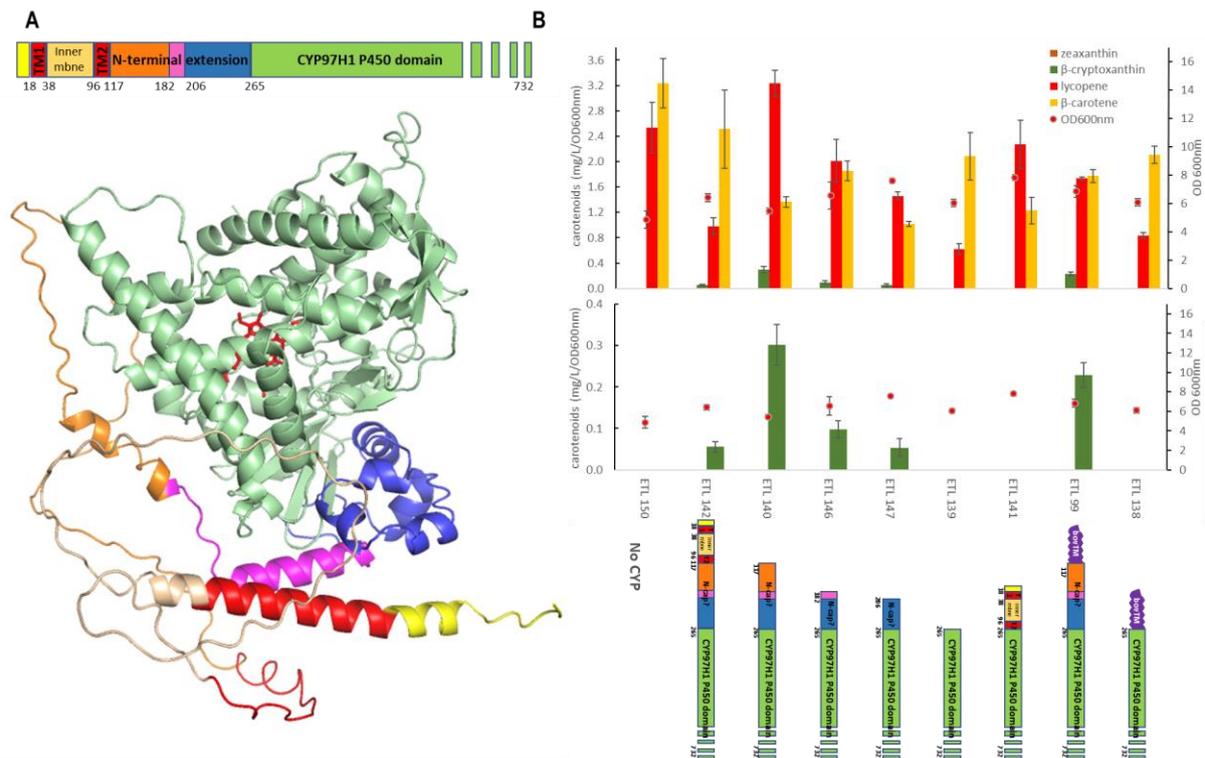


Figure 10 : **A** : Modélisation de CYP97H1 pleine taille, présentant une modélisation pauvre du domaine N-terminal. Le modèle a été tourné horizontalement de 90°C par rapport au modèle CYP97H1 de la Figure 9B, l'hème du cristal CYP97A3 est représenté en rouge. La coloration N-terminale représente les troncatures séquentielles testées. **B** : Production de caroténoïdes *in vivo* dans les souches exprimant les troncatures N-terminales de CYP97H1.

A l'entrée du canal de substrat, identifié en comparant avec la structure cristalline du CYP97A3, modifier la composition du patch de phénylalanine présent uniquement dans CYP97H1 conduit à diminuer la production de β -cryptoxanthine et, dans le cas du mutant F105A, tend à favoriser le ratio vers une activité dihydroxylase (Figure 11). Afin de vérifier si l'extension N-terminale de CYP97H1 peut favoriser l'activité de CYP97A3 vers la monohydroxylation du β -carotène, une chimère entre la partie N-terminale de CYP97H1 et le domaine globulaire de CYP97A3 a été construite. La chimère Nterm97H1-CYP97A3 atteint une production similaire de β -cryptoxanthine mais présente une production réduite de zéaxanthine. Ce résultat indique que la coiffe N-terminale du CYP97H1 peut être transposée sur un autre domaine globulaire P450 et tend à favoriser l'activité monohydroxylase sur le β -carotène.

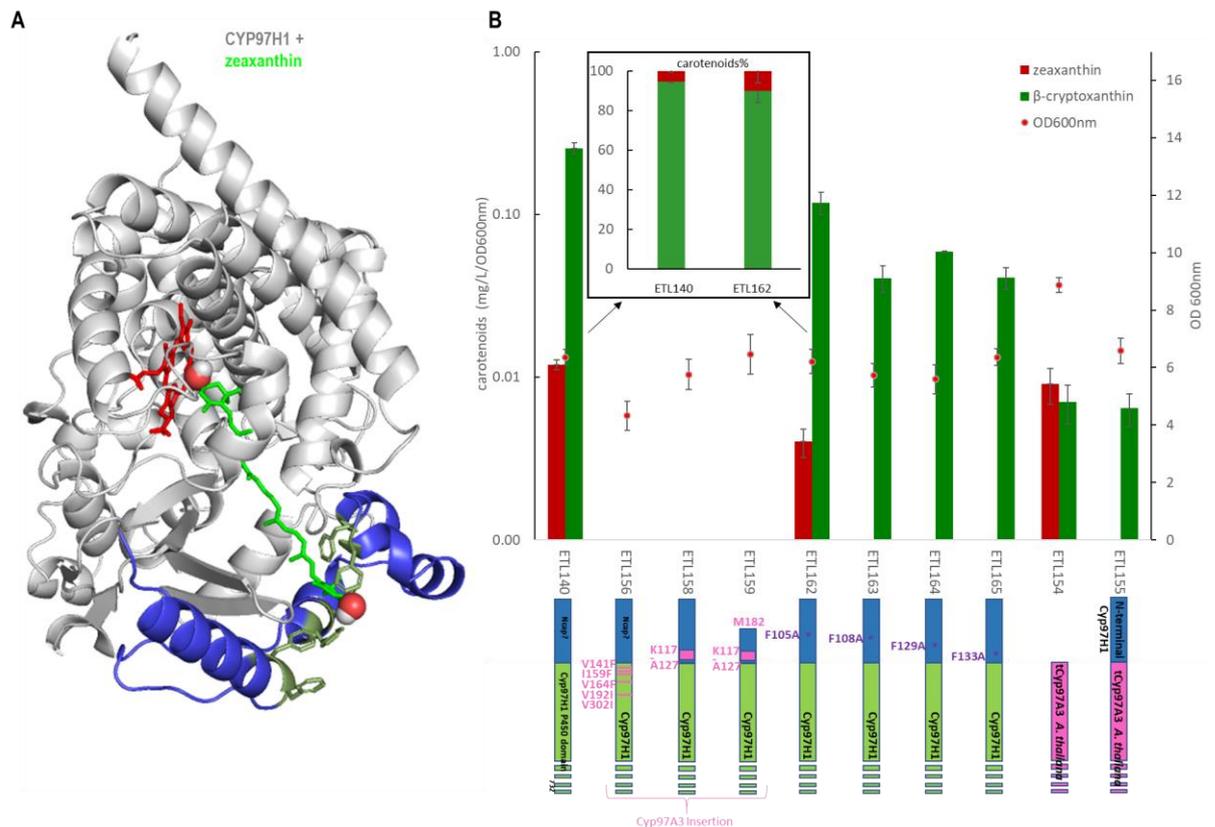


Figure 11 : **A** : Docking de la zéaxanthine (vert) dans CYP97H1. Les résidus N-terminaux spécifiques du CYP97H1 (bleu) créent une extension du canal de substrat entourée de résidus hydrophobes (vert foncé), où le second hydroxyl de la zéaxanthine est également situé. Le domaine P450 globulaire de CYP97H1 (gris) contient un hème catalytique de CYP97A3 (rouge) **B** : Production *in vivo* de caroténoïdes sur une échelle logarithmique dans des souches exprimant une chimère CYP97H1 avec des résidus ou des domaines de CYP97A3 (rose), avec des mutants de résidus hydrophobes de l'entrée du canal à substrat (violet), ou exprimant CYP97A3 fusionné avec le domaine N-terminal de CYP97H1. Encart : ratio de la zéaxanthine et de la β -cryptoxanthine dans CYP97H1 et le mutant F105A, moyenne de 3 expériences, chacune comprenant 3 reliquats biologiques.

Ainsi, en complément de l'ingénierie du site actif, l'ingénierie enzymatique peut se concentrer aussi sur les parties non catalytiques, telles que la surface de l'enzyme, comme l'illustre le rôle du domaine N-terminal de CYP97H1. En effet, la surface enzymatique est la première partie en contact avec le métabolite, impliquée dans l'entrée du substrat et jouant un rôle dans les interactions des complexes enzymatiques ou avec les constituants cellulaires

tels que les membranes. La prise en compte de cette partie non catalytique peut nous aider à caractériser des comportements enzymatiques originaux qui se produisent dans un contexte *in vivo*. Associé au volet ingénierie protéique, le processus d'ingénierie métabolique décrit pour la production de β -cryptoxanthine peut être adapté à n'importe quel P450 d'intérêt, en profitant notamment de la boîte à outils des partenaires redox construite dans ce travail. Des percées majeures ont été réalisées dans l'ingénierie métabolique en utilisant le domaine post omique pour cartographier les voies métaboliques. Les constructions génétiques dans des hôtes classiques tels que *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae* ou *Pichia pastoris* sont en constante accélération, grâce à des stratégies telles que CRISPR couplées à des plateformes robotisées telles que dans les biofounderies. Ces évolutions ouvrent désormais la voie à des châssis non classiques, tels que les levures rouges ou les champignons filamenteux, potentiellement plus favorables à l'expression de certains P450s spécifiques. En transférant la stratégie développée dans ce travail, l'incorporation de cytochromes P450 dans ces hôtes pourrait permettre d'implémenter efficacement des voies métaboliques originales

2. Interaction entre domaines enzymatiques

Le deuxième niveau hiérarchique dans le fonctionnement d'une voie métabolique est l'interaction entre enzymes. Pour adresser ce point, je me suis focalisé sur la cytochrome P450 réductase, le partenaire red ox central des différents cytochromes P450 via le projet Dodycoel. Ce projet ANR franco-portugais est développé avec l'équipe de Michel Kranendonk, Center for Toxicogenomics & Human Health (ToxOmics) , Genetics, Oncology and Human Toxicology, NOVA Medical School / Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa. Tout comme le projet CYP97H1, ce projet a l'avantage d'être composé de deux volets : un volet ingénierie protéique et un volet ingénierie métabolique, dans le sens fonctionnement de l'enzyme *in vivo*. Ce travail est le pont entre l'étude d'enzymes *in vitro*, comme ce fut le cas pour les chimères 2B6-2B11 et les projets suivant, beaucoup plus axés sur le fonctionnement *in vivo* d'une voie métabolique.

La cytochrome P450 réductase humaine est une diflavine reductase de 78 kDa ancrée à la membrane du réticulum endoplasmique via un domaine transmembranaire à son extrémité N-terminale. Les domaines qui portent les deux cofacteurs sont: un domaine de

liaison FMN de type flavodoxine et un domaine de liaison FAD de type NADP⁺ ferredoxine réductase. Un domaine protéique relie les deux domaines redox : le domaine de connexion. Le dernier domaine, appelé segment charnière, relie le FMN et le domaine de connexion (Figure 12). Les électrons sont transférés à travers la CPR du NADPH vers le FAD oxydé via un transfert d'ions hydrure à l'atome N5 du FAD, puis, un par un, du FAD au FMN, puis de la forme hydroquinone du FMN aux accepteurs externes, avec alternance du FMN entre l'hydroquinone et les états semiquinone [33].

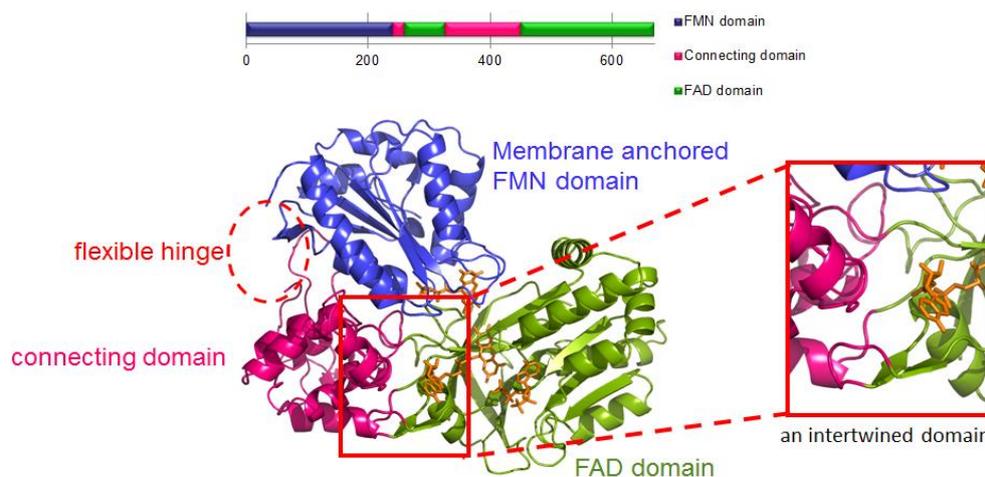


Figure 12 : Structure de la cytochrome P450 réductase (CPR de rat, fichier pdb: 1AMO), le domaine FMN et le domaine FAD sont liés par le domaine de connexion et un domaine charnière hautement flexible.

Les premières études cristallographiques de la CPR sous sa forme soluble (délétion du domaine transmembranaire en N-terminal) ont montré une structure compacte dans laquelle la distance entre le FAD et le FMN était d'environ 4 Å, les deux isoalloxazines étaient presque coplanaires et certaines parties du domaine FMN étaient adossées au reste de la protéine [34]. Cette conformation, référencée par la suite comme état fermé, permet le transfert d'électrons du FAD au FMN. En outre, un mutant CPR dans lequel le domaine FMN était lié au domaine FAD via un pont disulfure était compétent pour le transfert d'électrons à la partie FMN, démontrant que l'état verrouillé est adapté au transfert interne d'électrons de flavine mais ne permet pas de réduire les accepteurs externes, à moins que le pont de disulfure ne soit réduit [35]. Cela a conduit à l'hypothèse que pour remplir son rôle

physiologique de relais électronique, la CPR présente une dynamique interdomaine rendant le domaine FMN accessible aux accepteurs d'électrons.

Afin d'observer cet état ouvert, plusieurs groupes ont analysé différents mutants. Ainsi la structure cristalline d'une CPR dans lequel le segment de charnière a été raccourci par suppression de quatre résidus (Δ TGEE) montre trois conformations différentes. Dans chacune d'elles, le domaine FMN est dans une position différente, de plus en plus éloigné du reste de la protéine, alors que les domaines de connexion et de liaison au FAD sont strictement superposables, démontrant une réorientation marquée du domaine FMN par rapport au domaine FAD [36]. Une autre preuve de la mobilité du domaine provient de l'étude structurale d'une enzyme humaine chimère dans laquelle le domaine de liaison au FMN a été remplacé par son homologue issu de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Cette enzyme chimère, active pour la réduction des cytochromes c et P450 via le NADPH, présente une unique structure cristalline. Dans cette structure, le domaine FMN ne présente plus aucune interface avec les domaines de connexion et FAD. Par conséquent, de grands mouvements de domaine peuvent se produire dans une CPR fonctionnelle (environ 86 Å entre les deux flavines). Les différentes conformations dans lesquelles le domaine FMN n'a plus d'interface avec le domaine FAD représentent un ensemble de structures pouvant être désignées comme l'état déverrouillé. Les études de diffusion des rayons X aux petits angles sur la CPR humaine ont également été essentielles pour démontrer qu'en solution, la CPR humaine est en équilibre entre la conformation fermée et une série de conformations ouvertes et étendues [37]–[39]. La dynamique des deux domaines flavine l'un par rapport à l'autre est donc une condition préalable pour que le domaine FMN puisse interagir avec ses accepteurs physiologiques (forme déverrouillée) (Figure 13). Cependant, les déterminants structurels qui guident cette transition conformationnelle entre les formes ouvertes et fermées ne sont encore pas complètement identifiés. Néanmoins, l'équipe dans laquelle je travaille a également démontré que l'équilibre conformationnel entre les états verrouillé et déverrouillé de la forme soluble de la CPR humaine dépend de la force ionique ; un effet quantifiable sur la réduction du cytochrome c, substrat coloré non physiologique [38]. L'utilisation d'un gradient de force ionique lors d'essais enzymatiques permet donc de balayer une large gamme d'équilibres de CPR « verrouillée/déverrouillée »

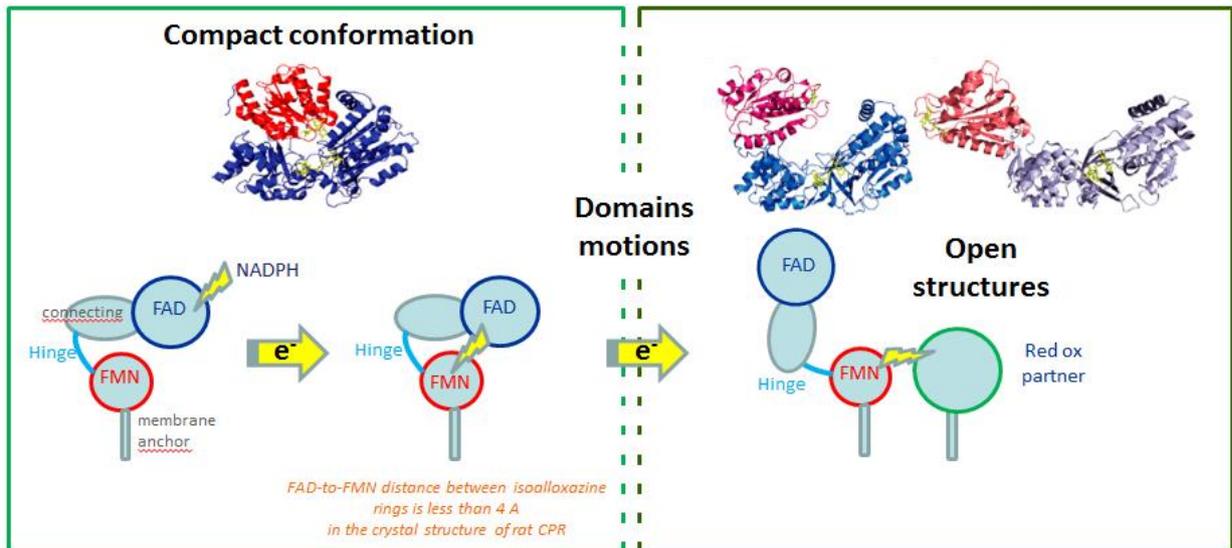


Figure 13 : Les deux états conformationnels de la CPR.

Pour préciser les déterminants structuraux impliqués dans le contrôle de la dynamique de la CPR, nous avons choisi de centrer cette étude sur le rôle de la région charnière. À partir des études structurales de la conformation ouverte observée dans la levure chimère-CPR humaine, deux résidus dans la charnière, G240 et S243, ont été proposés déterminants dans les grands changements conformationnels [40]. A côté de ces deux résidus, I245 et R246 ont également été récemment identifiés, dans une étude de simulation de dynamique moléculaire, comme deux résidus essentiels du segment de charnière impliqués dans un mouvement de rotation du domaine FMN par rapport au reste de la protéine [41]. Dans cette étude, ces quatre résidus du domaine charnière ont été mutés pour évaluer leur rôle potentiel dans l'équilibre conformationnel de la CPR humaine. Les activités cytochrome c réductase de ces mutants ont été analysées en fonction de la force ionique (gamme de concentration de NaCl) et avec soit la forme soluble de la CPR, soit la forme membranaire, afin d'évaluer l'effet de l'environnement membranaire

Le domaine charnière est défini par un ensemble de 14-15 acides aminés qui ne présente aucune structure secondaire particulièrement définie. C'est aussi la seule partie de la structure de la CPR où des changements structuraux évidents peuvent être observés lors de la comparaison des deux conformations ouvertes de la CPR (structures cristallographiques du mutant Δ TGEE et de la chimère levure/humaine) et des autres conformations fermées de la CPR (levure, humaine, rat). Les résidus G240 et S243 correspondent à des positions avec des

angles phi et psi fortement modifiés entre les formes fermées et ouvertes [40]. Ces deux résidus ont donc été mutés en proline afin d’analyser le rôle de contraintes géométriques sur l'équilibre conformationnel de la CPR (Figure 14). Les résidus I245 et R246 ont été sélectionnés en fonction de leur rôle critique décrit par d'autres groupes [36], [41]. Pour ces résidus, nous avons changé le résidu cationique R246 en un acide aminé neutre (alanine ou proline) tandis que pour le résidu I245, nous avons préféré des mutations affectant soit la mobilité/rigidité (alanine ou proline). Deux doubles mutants ont été également construits : le premier consistant à inverser les positions I245 et R246 (mutant I245R/R246I), le deuxième consistait à introduire des changements de flexibilité (I245A/R246A). Enfin, comme la forme physiologique de la CPR est liée à la membrane et que le segment d'ancrage de la membrane peut avoir une influence profonde sur l'équilibre entre les états verrouillés et déverrouillés, nous avons analysé les effets de ces mutations sur une forme membranaire et soluble de la CPR, en délétant les 44 premiers acides aminés impliqués dans le domaine transmembranaire.

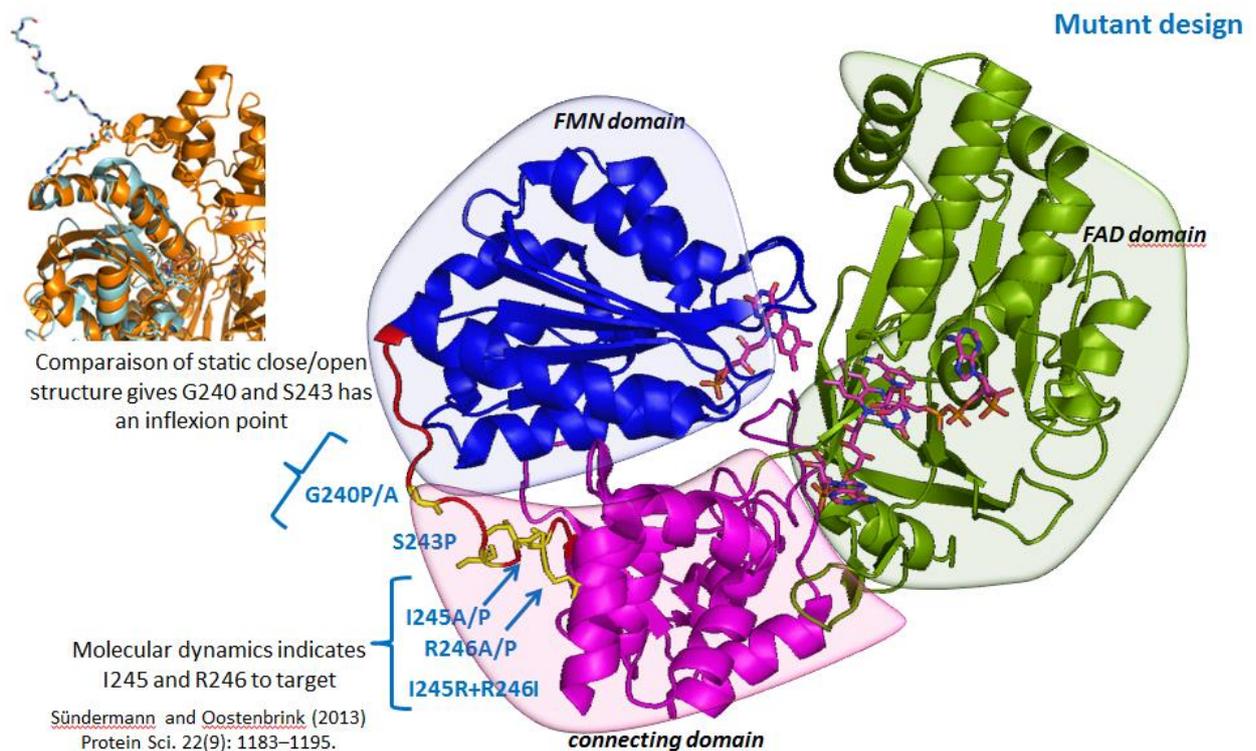


Figure 14 : Localisation et choix des mutants dans le domaine charnière de la CPR.

Ainsi, six mutants ponctuels (G240P, S243P, I245A, I245P, R246A et R246P) et deux doubles mutants (I245A / R246A et I245R / R246I) ont été produits à la fois dans les formes solubles et liées à la membrane (pleine longueur) de la CPR. Tous les mutants ont été

correctement produits, à l'exception du mutant G240P qui n'a pas pu être analysé sous sa forme membranaire en raison d'une faible expression et/ou stabilité.

La réduction du cytochrome c par la CPR dépend de la force ionique et cette dépendance peut être partiellement considérée comme une mesure directe de la proportion des états verrouillés et déverrouillés [38]. La quantification de l'activité de réduction du cytochrome c par les différents mutants a donc été analysée en présence d'une quantité croissante de sel (Figure 15). La Figure 15 A représente, en fonction de la force ionique, les 8 profils d'activités cytochrome c reductase des mutants en regard de celle de l'enzyme parentale. Toutes les courbes présentent le même profil typique en forme de cloche observée avec la CPR WT. À l'exception du mutant S243P, tous les profils de force ionique sont déplacés vers la gauche (concentrations inférieures de NaCl). En outre, presque tous (sauf S243P et I245A) ont des valeurs inférieures de k_{obs} maximales. Ce résultat indique que, même si tous les mutants sont actifs (les k_{obs} les plus bas sont 30% de ceux observés avec WT), les différentes mutations introduites ont des effets prononcés soit sur l'équilibre conformationnel, soit sur l'efficacité du transfert d'électrons.

A partir de la figure Figure 15 A, les valeurs maximales des k_{obs} ont été extraites et utilisées pour générer un graphique comparant les concentrations en sel optimales pour lesquelles les k_{obs} maximaux sont obtenus (Figure 15B). Les points de la figure semblent afficher une tendance générale indiquant que lorsque les profils sont déplacés vers une force ionique inférieure, les valeurs maximales des k_{obs} sont inférieures. Le cas de S243P et I245A est intéressant : les deux ont approximativement les mêmes k_{obs} (légèrement supérieurs au WT pour S243P), cependant, I245A présente une différence nette en terme de force ionique optimale contrairement à S243P et au WT. De toute évidence, il est possible de séparer l'efficacité de la réduction du cytochrome c et l'équilibre conformationnel de la CPR. Un autre exemple est la situation pour I245A, G240P et I245P, pour lesquelles les forces ioniques optimales sont identiques mais les trois mutants ont des valeurs maximales de k_{obs} différentes.

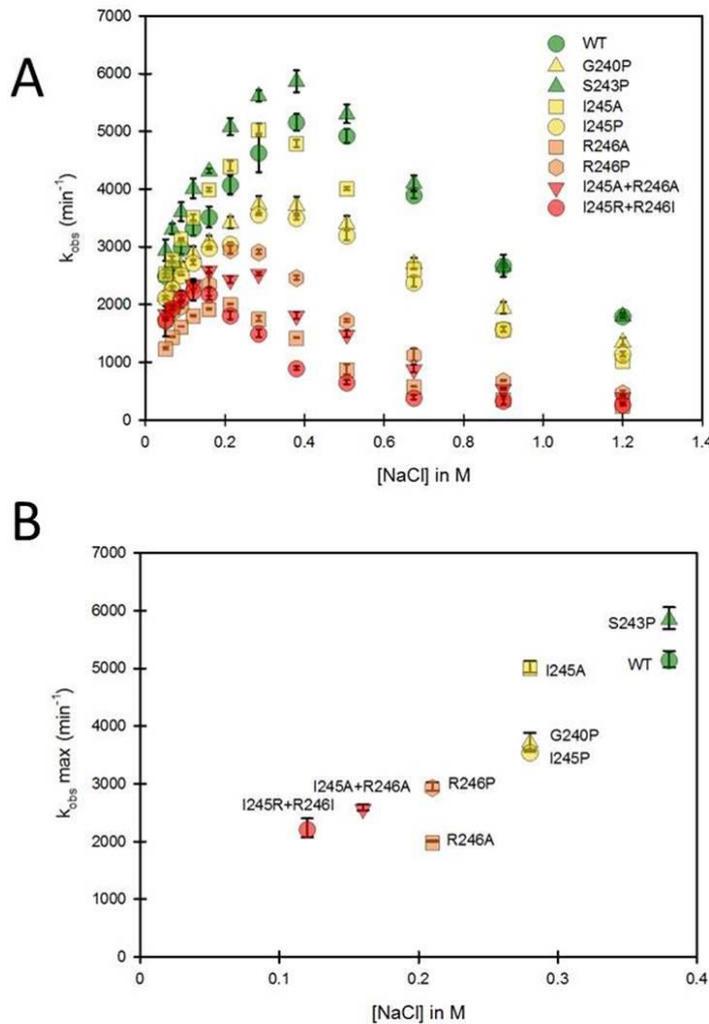


Figure 15 : k_{obs} pour la réduction du cytochrome c en fonction de la force ionique pour le WT et les mutants de la forme soluble de CPR humaine. **A.** Profil des k_{obs} en fonction de la concentration en NaCl. Les symboles représentant les différents mutants sont inclus dans le graphe. **B.** Les valeurs maximales des k_{obs} ont été extraites du graphe A et représentées en fonction de la concentration en sel. Les symboles représentant les différents mutants sont identiques à ceux du graphique A.

Les mutants ont ensuite été étudiés sous leur forme liée à la membrane. La Figure 16 présente l'analyse des k_{obs} en fonction de la force ionique. La Figure 16 A montre que, comme on le voit avec la majorité des formes solubles, tous les mutants ont un profil de sel décalé vers des forces ioniques inférieures par rapport à l'enzyme WT. Ce résultat confirme que les mutants ont une plus grande tendance à favoriser l'état déverrouillé, indépendamment de la présence ou de l'absence de la membrane. Bien que des différences existent entre les mutants individuels en fonction du contexte (formes solubles ou liées à la

membrane), les effets maximaux sont observés avec les mutations R246 et les doubles mutants contenant des mutations aux positions 245 et 246.

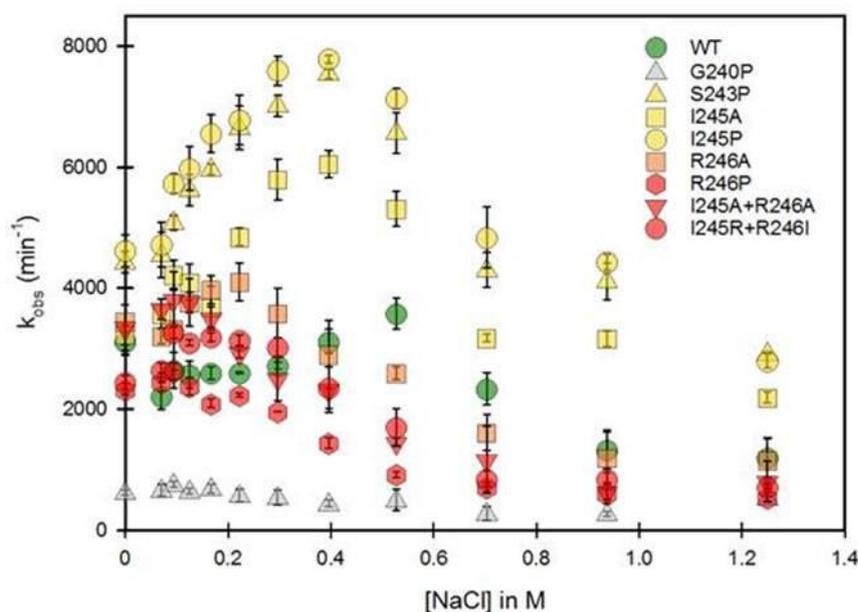


Figure 16 : k_{obs} pour la réduction du cytochrome c en fonction de la force ionique pour le WT et les mutants de la forme membranaire de CPR humaine. Les symboles représentant les différents mutants sont inclus dans le graphe.

Ainsi, à l'exception de S243P sous forme CPR soluble, tous les mutants présentent un équilibre déplacé vers l'état déverrouillé. Ceci n'est pas tout à fait surprenant pour les mutations qui augmentent potentiellement la flexibilité (I245A) ou détruisent des ponts salins entre la charnière et le domaine de connexion (R246A) car elles amélioreraient le nombre de conformations productives de l'état déverrouillé ou accéléreraient l'échange entre elles. En effet l'analyse de la structure de la forme fermée a montré que le résidu R246 est en contact étroit avec deux résidus acides (D445 et E449) présents dans le domaine de connexion. Les mutations à la position 246 suppriment les interactions électrostatiques avec ces deux résidus, qui stabilisent la conformation fermée. Les doubles mutants présentent les déplacements maximaux en termes de profil de sel et la suppression de charge en position 246 ne peut pas être compensée par l'introduction d'une arginine en position 245 (voir le double mutant I245R / R246I). Cependant, pour les mutations introduisant des prolines dans la charnière (G240P, S243P, I245P, R246P), le décalage du profil de force ionique pourrait indiquer que la rigidification de ces positions induit soit la déstabilisation de l'état verrouillé,

si la conformation d'une proline n'est pas compatible avec la conformation fermée, soit la stabilisation de l'état déverrouillé si la présence d'une proline diminue l'énergie potentielle des conformations ouvertes. Cependant, le maintien d'une activité réductase assez efficace dans tous les cas pourrait indiquer que la perte de flexibilité dans les mutants via un résidu proline peut être partiellement compensée par la flexibilité de la charnière impliquant des résidus dans d'autres positions. Enfin, les diminutions des k_{obs} sont la résultante d'une diminution des constantes de vitesse d'une ou de plusieurs étapes du transfert d'électrons. L'équipe avait déjà démontré que l'échange de conformation se produit à un rythme beaucoup plus rapide que le transfert d'électrons (Frances et al., 2015). Par conséquent, la CPR s'ouvre et se ferme plusieurs fois avant que les électrons ne soient transférés du FAD au FMN. Cela signifie que l'état verrouillé pourrait avoir plusieurs conformations fermées, pas toutes productives pour le transfert d'électrons inter-flavine, une caractéristique qui a déjà été décrite (Hay et al., 2010). Par conséquent, les mutants pourraient défavoriser l'apparition de conformations productives à l'état verrouillé, réduisant ainsi la valeur maximale des k_{obs} .

J'ai poursuivi ce travail en essayant de coupler les différents mutants de la cytochrome P450 réductase avec leur partenaire enzymatique naturel : les P450 (et non plus avec le cytochrome c, qui est un accepteur artificiel). Les cytochromes P450 sont des enzymes membranaires et le couplage avec les formes solubles de la CPR (ie partie membranaire de la CPR tronquée) n'a pas été efficace *in vitro* et aucune activité n'a été détectée avec les isoformes CYP1A2 ou CYP3A4. Cependant notre partenaire portugais a construit une banque de mutants d'acides aminés situés à la surface du domaine FMN de la cytochrome P450 réductase et a analysé leur impact *in vivo* sur l'interaction entre cytochromes P450 et la cytochrome P450 réductase. Ils ont montré que les mutations gains de fonction ne semblent pas modifier de manière significative la géométrie du domaine FMN, mais sont susceptibles de provoquer des altérations très subtiles conduisant à une meilleure interaction avec un cytochrome P450 donné, pouvant également induire une exclusivité d'interaction avec un type de cytochrome P450 [42], [43]. L'équipe toulousaine a par la suite développée une stratégie générique permettant d'incorporer dans une protéine, dans ce cas sur chaque domaine de la cytochrome P450 réductase, deux marqueurs fluorescents permettant une analyse de transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET). Cette incorporation à façon utilise des réactions chimiosélectives avec deux acides aminés non canoniques distincts

incorporés simultanément par l'expansion du code génétique chez *Escherichia coli*. Ce double marquage a permis de mettre en évidence l'effet du NADP⁺ sur la modulation de l'équilibre conformationnel de la cytochrome P450 réductase en fonction de la force ionique [44].

C. Ingénierie métabolique

1. Paramètre enzymatique *in vivo*

Les réactions enzymatiques ont longtemps été analysées *in vitro*, en utilisant des enzymes pures. En raison de la grande quantité de données générées et collectées avec des milliers d'enzymes, l'enzymologie a fait d'énormes progrès dans la compréhension des biocatalyseurs. Cependant, les conditions *in vitro* diluées sont loin de l'environnement de la réaction enzymatique naturelle qui a lieu à l'intérieur des cellules. Le milieu cellulaire est décrit comme un gel hétérogène, dense et rempli de macromolécules et d'organites lipidiques qui peuvent entraîner certains effets de partition et des changements de diffusion. Par conséquent, les paramètres enzymatiques déterminés à l'aide l'enzymologie classique peuvent ne pas représenter parfaitement les constantes réelles, *in vivo*, de vitesse et d'équilibre. Le projet ANR ENZINVIVO combine les techniques les plus récentes et les plus avancées en enzymologie, biologie synthétique et biologie des systèmes pour mettre en place un système capable d'imiter *in vivo* la variation de substrat enzymatique en enzymologie classique.

Dans ce projet, j'étais en charge de l'expression, purification de la phytoène synthase puis de mettre au point les essais enzymatiques *in vitro* en présence d'agents mimant l'effet de crowding intracellulaire. L'expression des isoformes de CrtB de *Pantoea ananatis* et de *Capsicum annum* a été réalisée chez *E. coli*, puis les enzymes ont été purifiées par affinité. L'analyse quantitative (bradford) et qualitative (SDS-PAGE) indiquent une production médiocre. Les pistes d'amélioration sont une optimisation des conditions de cultures (température, milieux), la modification de la position du tag (coté Nterm). Malgré une production faible, nous avons tenté de quantifier l'activité enzymatique de production *in vitro* de phytoène via la condensation de GGPP. Lors de ces essais, une synthèse de phytoène a été détectée en utilisant les fractions insolubles des extraits cellulaires (partie membranaire). Il apparait donc qu'en plus d'une faible expression, l'enzyme resterait dans la partie membranaire des extraits. CrtB est supposée être associée à la membrane, afin de relarguer son produit (le phytoène) qui est fortement hydrophobe. Les essais suivants de purification ont inclus une gamme de détergent (triton X100, tween,...) afin de faciliter la solubilisation de l'enzyme, sans succès. Néanmoins, un résultat encourageant a été obtenu avec la fraction

purifiée issue de culture en milieu autoinducteur avec laquelle la production de phytoène a été obtenue. Il s'agit donc à présent d'optimiser les conditions de production/solubilisation afin d'obtenir une quantité d'enzyme suffisante pour en quantifier les paramètres biochimiques (K_M , k_{cat}). Le changement de tag, côté Nterm, a permis une production efficace de l'enzyme. Mais nous n'avons pas retrouvé pour le moment une activité de production de phytoène, aussi bien sur extrait brut, qu'avec ajout de détergents, de phospholipides ou bien d'inhibiteurs de phosphatase (pour protéger le GGPP, substrat phosphorylé)

2. Projets agencement spatial enzymatique

Au niveau intracellulaire, la compartimentation en organites assure une bonne orchestration des fonctions cellulaires. Ainsi, le matériel génétique est transcrit au sein du nucléole ou du nucléoïde, la mitochondrie est le cœur de la chaîne respiratoire cellulaire et le lysosome exprime lipases, peptidases, nucléases : un arsenal d'enzymes dégradatives pour remplir la fonction de digestion intracellulaire. Mais compartimenter nécessite aussi que chaque compartiment puisse échanger, « commercer » avec ses voisins et plusieurs travaux décrivent le reticulum endoplasmique comme un réseau de distribution, interconnectant les différents organites intracellulaires [45]. Les compartiments cellulaires peuvent être structurés par une membrane, comme vu ci-dessus, mais également par une enveloppe protéique, comme les micro compartiments bactériens (MBC). Parmi eux, les carboxysomes contiennent la ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase oxygénase (RuBisCO) et l'anhydrase carbonique, impliqué dans le cycle de Calvin pour la fixation du CO₂ chez les organismes photosynthétiques (Figure 17) [46]. L'enveloppe est constituée de pentamères et d'hexamères, dont certains contiennent des pores dont on pense qu'ils régulent le transport du substrat. Mon collègue Luis Garcia-Alles étudie les protéines de l'enveloppe du carboxysome [47]. Par ailleurs, des compartiments sans enveloppe physique, comme les séparations de phase liquide-liquide, permettent également une compartimentation dynamique de réactions enzymatiques [48].

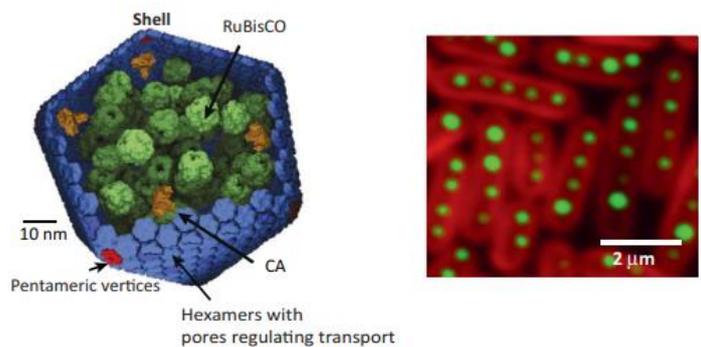


Figure 17 : Les micro-compartiments bactériens comme les carboxysomes sont des structures protéiques qui encapsulent des réactions enzymatiques. (à gauche). Les carboxysomes s'alignent spatialement dans la cellule (à droite). (from Chen & Silver, 2012, [49]).

En diminuant encore l'échelle d'observation jusqu'au niveau de la protéine, les complexes enzymatiques, sont une stratégie supplémentaire de regroupements de fonction catalytiques à l'échelle moléculaire pour distribuer le travail cellulaire. Parmi les milliers de métabolites intracellulaires, les milliers d'enzymes, dans une solution cytoplasmique non idéale, dense, regrouper des enzymes qui travaillent de concert sur une voie métabolique est une stratégie largement employée dans la Nature. Ainsi certaines enzymes du cycle des acides tricarboxyliques, comme la citrate synthase (CS), la malate dehydrogenase mitochondriale (mMDH) et l'aconitase (Aco) s'associent en métabolon *in vitro* [50]. Un autre type de métabolon implique des cytochromes P450, enzymes membranaires. Dans le sorgho, la dhurrine, un glucoside cyanogène produit à partir de la tyrosine, se décompose en cyanure lorsque les parois cellulaires des plantes sont mâchées, ce qui dissuade les insectes nuisibles. Sa biosynthèse implique deux cytochromes P450 (CYP79A1 and CYP71E1), la cytochrome P450 reductase et l'UDP-glucosyl transferase UGT85B1. Ces enzymes forment un métabolon dans les membranes lipidiques dans lequel la cytochrome P450 reductase distribue les électrons aux P450s l'encerclant, sur lesquels est apposée l'UDP-glucosyl transferase. La nature dynamique de l'assemblage et du désassemblage du métabolon produit la dhurrine en fonction des besoins en canalisant les intermédiaires pour une production efficace [51]. La formation de ces métabolons reste à être pleinement comprise. Dans le cas du métabolisme des flavonoïdes, les métabolons sont associés à la membrane du reticulum endoplasmique,

les cytochromes P450 liés au reticulum endoplasmique étant supposés servir de point de nucléation pour la formation des métabolons [52].

La proximité entre enzymes peut aussi être basée sur une interaction plus forte, utilisant un support biologique dédié, scaffold de type protéique. Ainsi les cellulosomes sont des complexes multienzymes produits par des bactéries cellulolytiques anaérobies pour la dégradation de la biomasse lignocellulosique. Ils sont formés par une sous-unité structurale, un complexe de scaffoldine, et de diverses sous-unités enzymatiques. Les interactions inter sous-unités dans ces complexes multi-enzymes sont médiées par les modules cohésine et dockerine. Le scaffold peut être ramifié, permettant de diversifier les branches catalytiques de la structure enzymatique [53]. En utilisant cette fois la synthèse de lignine comme exemple, il a été montré que les protéines membranaires de liaison aux stéroïdes (MSBP) d'*Arabidopsis* servent de scaffold pour organiser physiquement les monolignol P450 monooxygénases, régulant ainsi le processus de biosynthèse de la lignine [54].

En biologie synthétique, des approches d'ingénieries enzymatiques ont permis de mimer ou de créer des assemblages enzymatiques *in vitro* et *in vivo* [49]. Dans ces designs, les premiers scaffolds furent protéiques, mimant la Nature, puis des scaffolds plus versatiles à base d'acide nucléiques (ADN puis ARN) ont été construits, permettant une structuration plus à façon du support [55].

Les travaux fondateurs sur le design d'assemblage enzymatique en ingénierie métabolique ont été réalisés par le laboratoire de J Keasling et portent sur la voie de biosynthèse de l'acide artémisinique, précurseur de l'artémisinine. Les enzymes acétoacétyl-CoA thiolase (AtoB, *Escherichia coli*), hydroxyl-méthylglutaryl-CoA synthase (HMGS, *Saccharomyces cerevisiae*), et hydroxyl-éthylglutaryl-CoA réductase (HMGR, *S. cerevisiae*) ont été assemblées sur un scaffold répétant les domaines de fixation PDZ, SH3 et GBD (Figure 18). Le ratio de chaque enzyme au sein du scaffold a été modulé afin d'améliorer l'efficacité de la voie, ce qui permettait de diminuer l'expression des enzymes (et donc la charge métabolique) tout en augmentant le titre des métabolites produits. Le scaffold de ces enzymes à un ratio de 1:2:2 a augmenté la production intracellulaire de mévalonate de 77 fois par rapport aux enzymes libres [56].

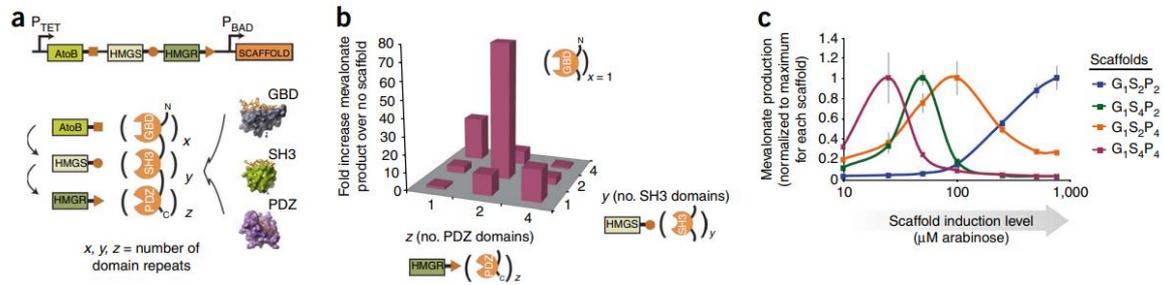


Figure 18 : Les assemblages synthétiques entre AtoB, HMGS et HMGR, construits à partir de domaines d'interaction protéine-protéine modulaires, permettent un contrôle modulaire du flux des voies métaboliques. **A** : Les scaffolds synthétiques ont été construits avec trois domaines d'interaction protéine-protéine (GBD, SH3 et PDZ), où x , y et z représentent le nombre de répétitions de ces domaines, respectivement. **B** : Une matrice de neuf scaffolds a présenté des différences spectaculaires dans les titres de produits de mévalonate. L'optimisation du nombre relatif de domaines de recrutement (GBD1SH32PDZ2 ou G1S2P2) pour un flux maximal de la voie a entraîné une augmentation de 77 fois du titre du produit par rapport à la voie non échafaudée (GOS0P0). **C** : Le niveau d'induction du scaffold pour une production optimale de mévalonate dépend du nombre de domaines d'interaction. Les scaffolds répétant les domaines d'interaction S et P ont montré une production optimale de mévalonate à des concentrations d'inducteur plus faibles (d'après Dueber et al., 2009 [56]).

Dans ce travail, l'assemblage enzymatique bénéficie également du fait que les enzymes sont naturellement multimériques, créant des connexions entre la chaîne primaire scaffoldée artificiellement. Les enzymes AtoB, HMGS et HMGR vont alors s'organiser en cluster (Figure 19). Ce maillage via les multimérisations naturelles augmentent localement la concentration d'enzyme et de substrat, favorisant la voie métabolique *in vivo* (amélioration d'un facteur 77). C'est une réelle plus-value par rapport à un assemblage binaire entre deux enzymes, qui conduit, sauf channeling dédié, à une amélioration en général d'un facteur 2 à 5.

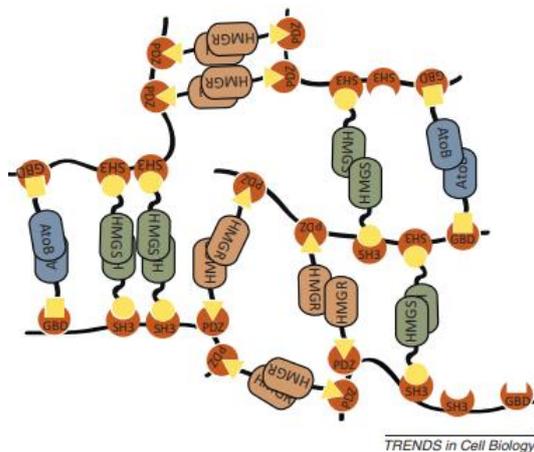


Figure 19 : Clustering de scaffold AtoB-HMGS-HMGR. Les scaffolds sont supposés s'oligomériser en grands complexes qui ressemblent à des microdomaines de métabolites, piégeant les intermédiaires à l'intérieur et les convertissant rapidement en produit avant qu'ils ne s'échappent. (d'après Chen & Silver, 2012).

D'autres approches pour assembler des enzymes *in vivo* sans utiliser un scaffold protéique ont été mises en place, comme une structure basée sur les acides nucléiques [57]. *In vitro*, l'intérêt est de développer des cascades multienzymatiques utilisant des enzymes organisés et immobilisés sur des surfaces, catalyseurs complémentaires aux matériaux organiques ou organométalliques traditionnels pour les procédés chimiques (voir cette revue : [58])

Les assemblages enzymatiques existent aussi sans un réel scaffold. Ainsi, les non ribosomales peptides synthétases (NRPS) et les polykétides synthétases (PKS), n'ont pas de scaffold en soi, les enzymes sont liées par des domaines d'interaction protéine-protéine qui transfèrent les intermédiaires en utilisant un mécanisme de "bras oscillant". Ce mécanisme participe à une catalyse dirigée et minimise les fuites d'intermédiaires, ce qui permet, en fonction de l'agencement enzymatique, d'obtenir un ensemble diversifié de produits naturels [59].

En diminuant encore la granulométrie, on observe l'importance des agencements spatiaux intra protéiques. Ainsi plus de 70 % des enzymes contiennent au moins deux domaines [60]. Une façon relativement simple pour que deux enzymes soient au voisinage

l'une de l'autre est qu'elles soient formées par une seule chaîne polypeptidique. Une protéine de fusion est constituée d'au moins deux domaines codés par des gènes distincts qui ont fusionnés et sont traduits comme une seule unité, produisant un seul polypeptide [61]. Le processus de fusion peut provenir de délétions, de translocations, de duplications de l'ADN et de lecture read-through de l'ARN chez les eucaryotes [62]. Chez les bactéries, la fusion/fission de gènes contribue à au moins 27% de l'évolution des protéines multi-domaines, la fusion de protéines étant quatre fois plus fréquente que la fission de protéines [63]. L'utilisation de linkers entre deux domaines catalytiques s'est alors développée en ingénierie protéique comme un moyen simple pour rapprocher deux activités catalytiques [64].

Ainsi, ces travaux fondateurs mettent en évidence le bénéfice d'un rapprochement spatial pour l'efficacité globale d'une voie métabolique. Ils ouvrent la voie à des questions d'enzymologie « *in vivo* » comme Quels principes d'assemblage favorisent l'obtention d'une fusion enzymatique fonctionnelle dans la Nature ? D'un point de vue métabolique, quel effet provoque une fusion enzymatique sur les ratios de métabolites ? Dans ce rapport, les travaux de deux thèses sur le rôle d'assemblage enzymatiques par linkers dans la voie des carotenes sont décrits dans les deux parties suivantes.

a) Une trifusion pour la synthèse de carotène dans la levure.

Rôle d'encadrement : participation à l'encadrement de la thèse d'Hery Rabeharindranto (soutenue le 08 juillet 2019)

Ce projet se focalise sur le rôle de l'agencement spatial des enzymes au sein d'une cellule. La voie de biosynthèse du β -carotène contient trois étapes enzymatiques à partir du géranyl-géranyl pyrophosphate (GGPP) : une phytoène synthase (CrtB), une phytoène désaturase (CrtI) et une lycopène cyclase (CrtY) (Figure 20).

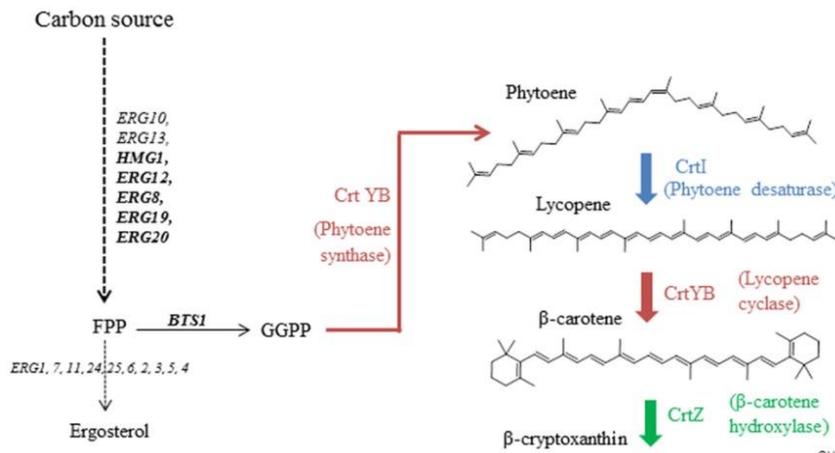


Figure 20 : Reconstruction de la voie des carotènes dans l'hôte *S. cerevisiae* à partir du geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP). Les étapes hétérologues sont colorées individuellement. Reproduit à partir de Carquet *et al.*, 2015 ; [65].

Dans la majorité des organismes qui produisent du β -carotène, les trois enzymes sont exprimées individuellement, mais certaines levures comme *Xanthophyllomyces dendrorhous* possèdent naturellement des fusions entre ces différents enzymes (CrtYB, phytoène synthase/lycopène cyclase). A ce jour, la voie synthétique la plus efficace exprimée chez *S. cerevisiae* est constituée d'un enzyme de *Pantoea ananatis* (CrtE, GGPP synthase) et des deux enzymes de *Xanthophyllomyces dendrorhous* (CrtI et CrtYB). CrtYB est donc un enzyme bifonctionnel qui réalise deux réactions enzymatiques non successives de la voie de synthèse. Nous avons analysé si la fusion des deux enzymes est essentielle et s'il est possible de reconstruire, sur ce même modèle, d'autres fusions entre les différents enzymes de la voie. Ce projet est mené par Hery Rabeharindranto (étudiant en thèse). Nous avons construit une vingtaine de souches de levure produisant différentes fusions entre CrtB et CrtI, dans les deux orientations et avec quatre linkers de taille et de rigidités différentes : le linker naturel présent dans CrtB, le linker issu de la CPR (long et extrêmement flexible) et deux linkers synthétiques, l'un étant court et formant une hélice et l'autre étant court mais mobile. Nous avons également construit des fusions des trois gènes. La séparation des domaines de CrtYB diminue la productivité de β -carotène mais les deux domaines séparés sont encore fonctionnels. La fusion exerce donc un rôle positif, soit par limitation de la diffusion soit via d'autres effets (allostérie, localisation cellulaire etc.). Les fusions entre CrtB et CrtI ont des comportements très différents suivant l'orientation des deux domaines (en N- ou C-terminal) : lorsque CrtB est placé en N-terminal dans la fusion, il y a une altération majeure de l'expression des

protéines mais par contre les fusions sont beaucoup plus actives que lorsque CrtB est placé en C-terminal. La constitution du linker est également importante et les enzymes bi- ou tri-domaines contenant les linkers synthétiques sont les plus efficaces. Certaines fusions entre le domaine CrtB et l'enzyme CrtI sont plus efficaces que la production des deux partenaires seuls : moins d'accumulation d'intermédiaires entre les deux enzymes de la voie et augmentation de la production de lycopène. Lorsque les trois domaines sont fusionnés pour former la trifusion CrtYBekI, la production totale de carotènes reste identique par rapport à la souche parentale, mais deux fois moins de précurseur (phytoène) est accumulé au profit de la production de β -carotène, indiquant une efficacité du complexe enzymatique (Figure 21). Enfin nous avons mis en évidence que certaines fusions produisent des molécules non présentes dans le système naturel, notamment des intermédiaires comportant plus d'insaturations qui pourrait être le signe que l'enzyme CrtI, dans le contexte des fusions, garderait les substrats plus longtemps dans le site actif. J'ai participé aux dernières expériences sur la trifusion enzymatique (validation génétique de la souche, western), à la compilation et l'analyse des résultats, la rédaction de l'article, à la correction du manuscrit de thèse et participer au jury de thèse de H. Rabeharindranto. La souche trifusion CrtYBekI est devenue centrale dans d'autres projets de recherche (voir plus bas).

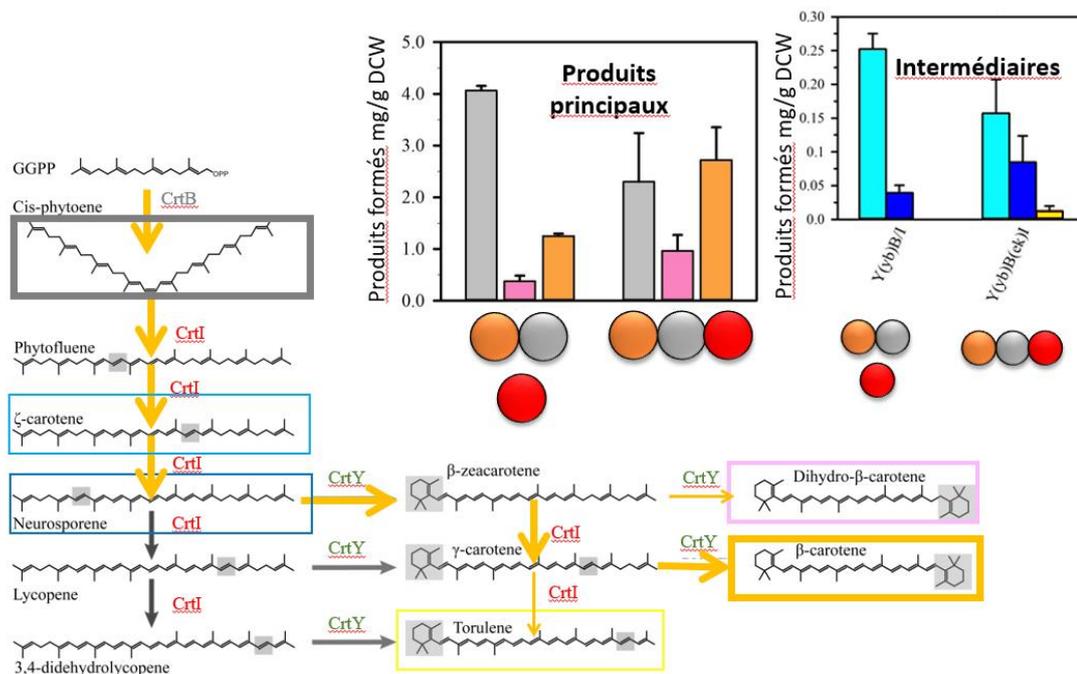


Figure 21 : Quantification des caroténoïdes produits par la souche portant l'enzyme tripartite. Les caroténoïdes majeurs ont été quantifiés dans les souches portant l'enzyme

tripartite. La voie métabolique est montrée. Les valeurs représentent la moyenne \pm S.D. de la quantification de chaque métabolite de trois cultures indépendantes.

b) L'effet de linkers naturels entre deux enzymes.

Rôle d'encadrement : principal encadrant de la thèse d'Aurélié Bouin (décembre 2019-juin 2023)

Dans le cadre de l'IRP SynBioEco, une thèse INRAe-SIFBI Singapour, dont j'assure l'encadrement, se déroule principalement à Singapour et se finira à Toulouse, en juin 2023. Cette thèse porte sur le rôle de la proximité spatiale entre enzymes au sein d'une cellule. Ce travail de thèse se focalise sur l'effet de linkers naturels entre deux enzymes : Quelles sont les règles d'assemblage pour fusionner deux enzymes ? Quels sont les déterminants importants dans la séquence du linker ?

Portant sur la voie métabolique des caroténoïdes, le modèle enzymatique principalement étudié consiste en la fusion de la lycopène cyclase crtY à la carotène non hème hydroxylase crtZ_{Pa} de *Pantoea ananatis* pour la production de zéaxanthine. Cette hydroxylase n'est pas un cytochrome P450, tel que ceux impliqués dans le projet concernant la β -cryptoxanthine décrit précédemment. Nous avons choisi crtZ_{Pa} car cette famille de dihydroxylase est parmi les plus actives dans *E. coli* et amène une diversité dans les familles d'enzymes étudiées au laboratoire pour l'hydroxylation des liaisons carbone.

Parmi une base de données de 1280 linkers, aux propriétés structurales connues [66], 96 linkers ont été sélectionnés pour construire une librairie représentative. Le pool de linkers a été divisé sur la base de quatre critères : la longueur, la structure secondaire, l'extension et l'hydrophobie (Figure 22). Tout d'abord, les linkers ont été divisés en trois groupes selon leur taille : les petits linkers comportent au plus quatre acides aminés, les linkers moyens sont formés par cinq à quatorze acides aminés et les grands linkers ont plus de quatorze acides aminés. La structure secondaire fait référence à des linkers hélicoïdaux (structurés) ou non hélicoïdaux (désorganisés). L'extension du linker est définie par la distance moyenne entre ses acides aminés divisée par le nombre d'acides aminés moins un. Enfin, les linkers sont classés par leur hydrophobicité moyenne.

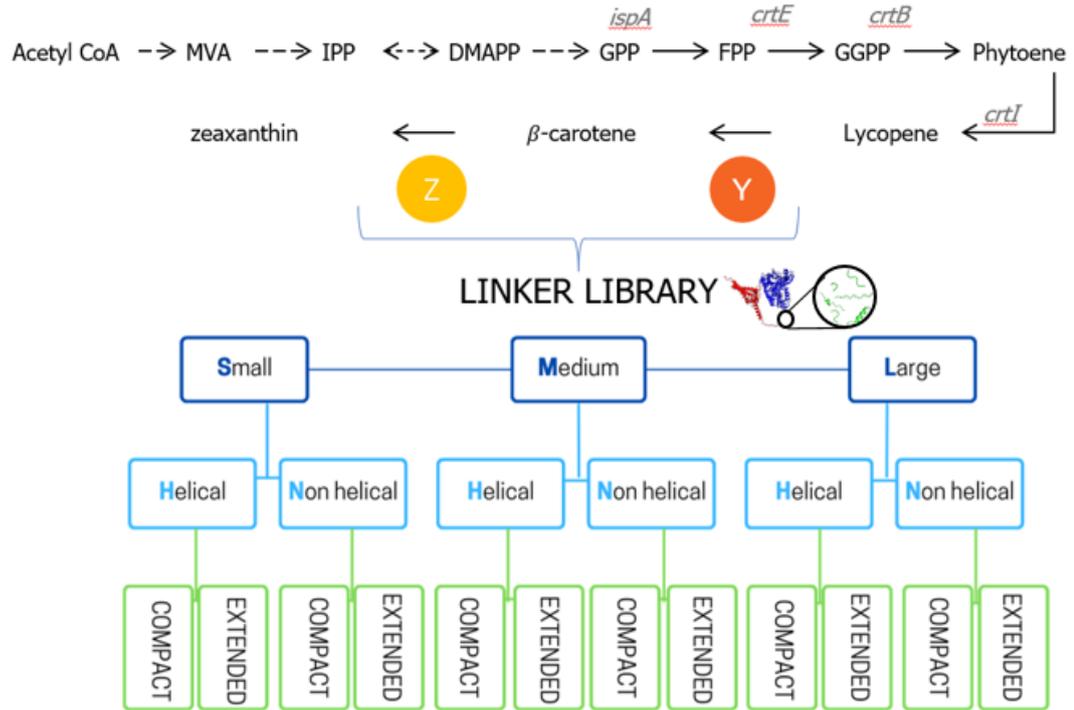


Figure 22 : classification de la banque de linkers entre *CrtY* et *CrtZ*, en fonction de la taille, de la structure hélicoïdale, du degré d'extension et de l'hydrophobicité.

L'orientation de la fusion s'est avérée cruciale puisque seule les fusions avec *CrtZ* en N-terminal et *CrtY* en C-terminal sont actives. Pour étudier l'importance de la taille du linker dans la protéine de fusion *crtZ-crtY*, douze linkers ont été sélectionnés dans la banque de linkers. Quatre petits, moyens et grands linkers ont été clonés entre *crtZ* et *crtY*. Les douze souches résultantes ainsi qu'une souche exprimant les enzymes indépendantes et une souche avec *crtZ* et *crtY* directement fusionnées sans linker ont été analysées pour leur production en carotènes.

Par rapport à la souche exprimant les enzymes indépendantes, les souches exprimant des fusions via des linkers petits et moyens entre *crtZ* et *crtY* montrent un meilleur ratio de zéaxanthine (entre 1,2 et 1,3) que celles exprimant des grands linkers (ratio <1). Les souches exprimant des enzymes fusionnés avec de petits linkers ont une meilleure quantité totale de caroténoïdes que celles exprimant des linkers moyens. Cependant, cette quantité est similaire à celle du contrôle (Figure 23).

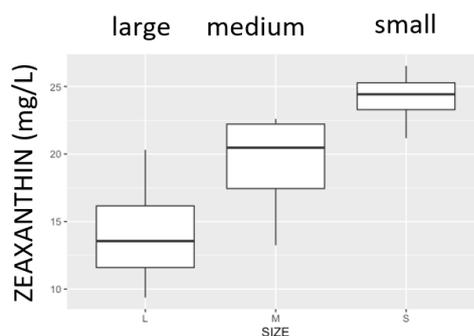


Figure 23 : production de zeaxanthine dans des souches exprimant des fusions CrtZ-CrtY via des linkers de taille différente.

Parmi la banque, des fusions via 20 différents petits linkers ont été exprimées pour explorer davantage les rôles des autres paramètres (Figure 24). Classés en sous-groupe en fonction de la structure hélicoïdale, du degré d'extension ou de l'hydrophobicité, aucun de cette sous classification ne permet d'identifier un paramètre clef influençant les ratios de carotènes. Cependant, quelques linkers se distinguent des autres. Tout d'abord, la souche exprimant le linker SNS06 entre crtZ et crtY accumule principalement du β -carotène, la zéaxanthine et le lycopène sont à peine détectables, ainsi il semble que cette fusion favorise une meilleure activité de la cyclase CrtY. Quelques souches présentent une quantité totale accrue de caroténoïdes. Les souches SNI01 et SHS03 produisent 70 mg/L de caroténoïdes, contre 50 mg/L pour le contrôle, ce qui représente une augmentation de 40% de la quantité totale de caroténoïdes dans la souche. Enfin, une dernière souche qui se démarque est la SHS01, qui exprime le meilleur ratio de zéaxanthine dans l'ensemble malgré une quantité plus faible de caroténoïdes totaux. Le rapport zéaxanthine est 1,4 fois meilleur dans la souche SHS01 que dans la souche témoin avec enzymes indépendantes EAB09. Sachant que la taille de ces linkers est très réduite, inférieure à cinq acides aminés, il est vraiment intéressant de noter qu'avec le même jeu d'enzymes fusionnés, une faible variation de séquence du linker induit des comportements de fusion enzymatique très différents, aussi bien sur la quantité de métabolites (meilleure activité enzymatique ou bien meilleure expression ?) que sur le pattern catalytique (accumulation d'un type de métabolite).

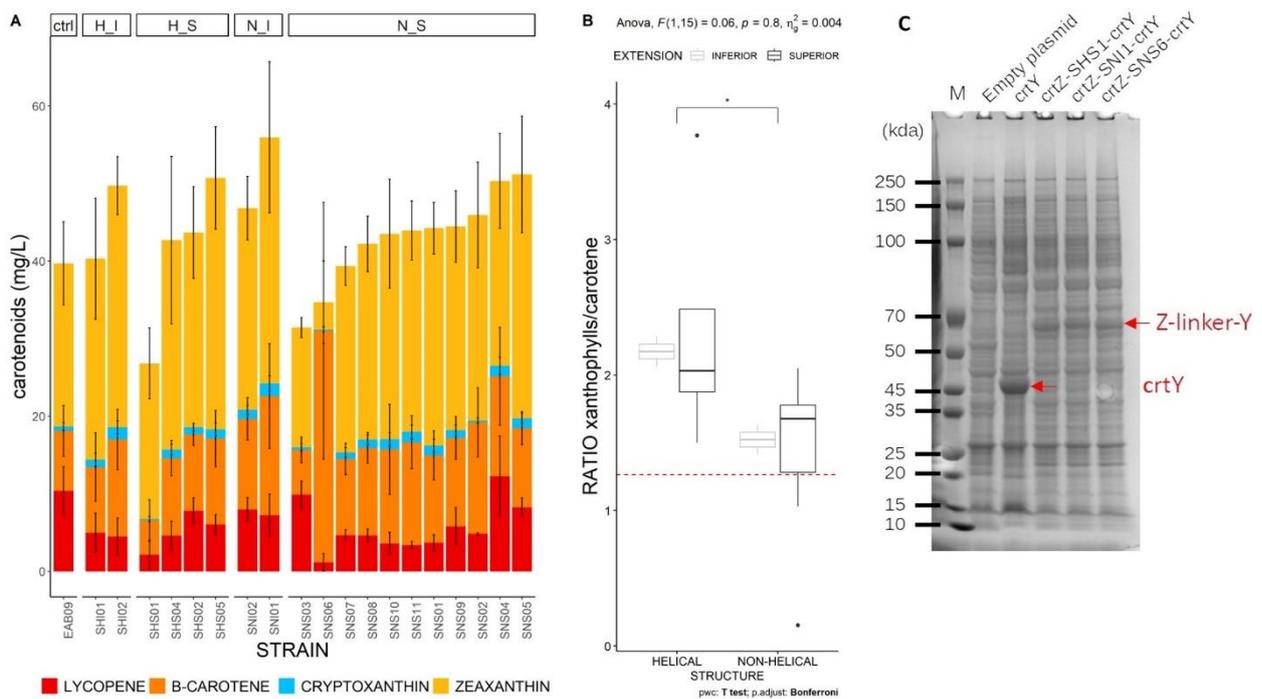


Figure 24 : **A** : Teneur en caroténoïdes en mg/L des souches exprimant les fusions crtZ-linker-crtY avec de petits linkers. EAB09 est la souche de contrôle avec des enzymes non fusionnées. Les barres d'erreur représentent l'écart-type de deux expériences indépendantes. N_I : NON HÉLICOÏDAL_INFÉRIEUR ; H_I : HÉLICOÏDAL_INFÉRIEUR ; H_S : HÉLICOÏDAL_SUPERIEUR ; N_S : NON HÉLICOÏDAL_SUPERIEUR. Les termes "non hélicoïdal" et "hélicoïdal" se réfèrent à la structure secondaire présumée du linker, tandis que les termes "inférieur" et "supérieur" se réfèrent à l'extension du linker. Dans chaque catégorie, les souches sont classées par ordre croissant de la quantité totale de caroténoïdes. **B** : Rapport des xanthophylles aux carotènes avec les souches regroupées en fonction de la structure et de l'extension du linker. La ligne rouge en pointillé représente le rapport entre les xanthophylles et les carotènes dans la souche avec des enzymes indépendantes (souche EAB09). **C** : Analyse par électrophorèse SDS-PAGE des protéines de la souche BL21 contenant le plasmide final de la voie avec : un vecteur vide, l'enzyme crtY, les enzymes de fusion crtZ-SHS1-crtY, crtZ-SNI1-crtY, crtZ-SNS6-crtY.

Pour évaluer l'impact du linker dans l'accumulation des caroténoïdes au cours de la croissance cellulaire, les productions au cours du temps en carotènes de trois souches ont été analysées (Figure 25). Les trois souches étaient EAB09, la souche témoin avec des enzymes non fusionnées, SHS01 qui présente le meilleur ratio de zéaxanthine par rapport aux

précurseurs et SNI01 qui produit une quantité plus élevée de caroténoïdes totaux. La courbe d'accumulation des caroténoïdes totaux semble similaire dans les trois souches, avec une augmentation régulière pendant les 24 heures de l'expérience. Cependant, le rapport entre la zéaxanthine et les précurseurs change avec le temps chez EAB09 (à 9h, la zéaxanthine est le principal caroténoïde accumulé, alors que c'est le lycopène à 24h) alors qu'il est plus stable chez les souches fusionnées SNI01 et SHS01. Les enzymes fusionnées atteignent un état d'équilibre plus rapidement que les enzymes indépendantes, probablement parce que le linker "impose" un rapport constant 1:1 entre les enzymes.

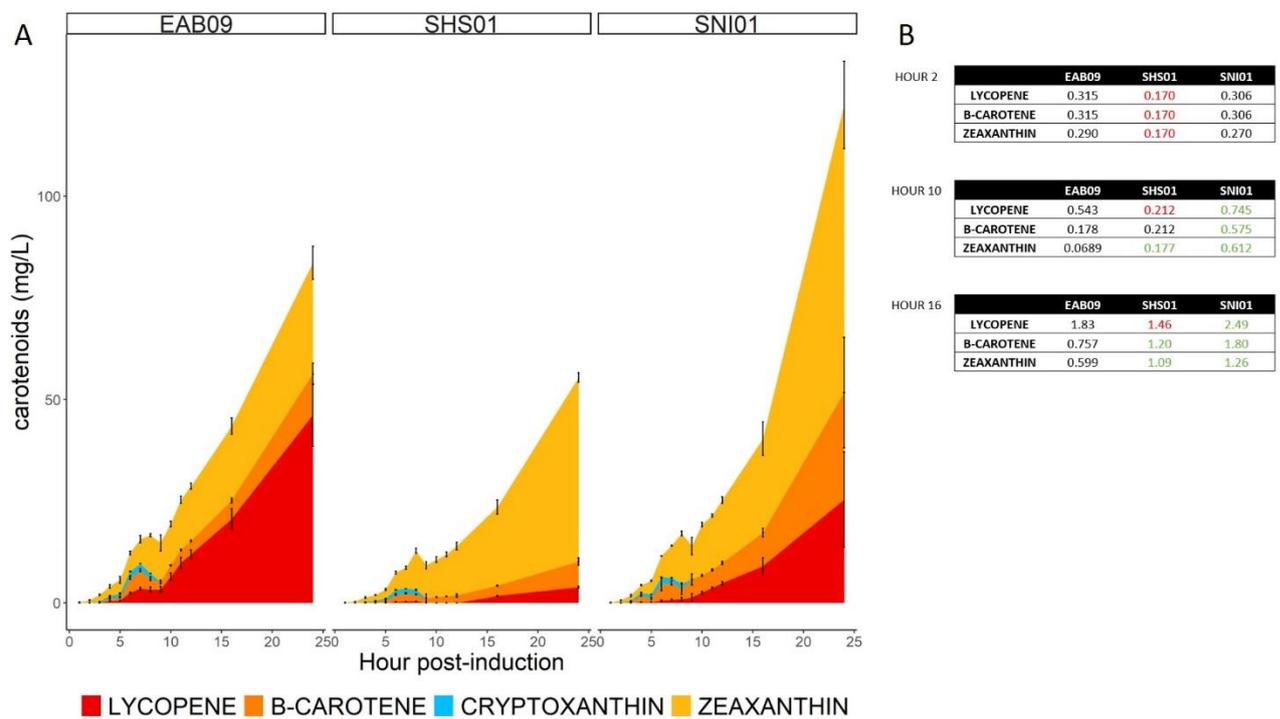


Figure 25 : **A** : Profil d'accumulation de caroténoïdes en mg/L des souches EAB09, SHS01 et SNI01 au cours du temps. Les barres d'erreur représentent l'écart-type de trois expériences indépendantes. **B** : Flux de caroténoïdes exprimés en mg/L/heure/OD600nm. Les nombres en vert sont plus élevés que leur équivalent de contrôle (EAB09). Les chiffres en rouge sont plus faibles que ceux du contrôle (EAB09).

3. Projet régulation de voie métabolique *in vivo*

Au-delà de ses propriétés catalytiques, mieux comprendre le fonctionnement d'une enzyme au sein d'une voie métabolique dans un contexte cellulaire. demande d'étudier les voies de signalisation, le réseau d'expression et les autres processus cellulaires qui impliquent

un grand nombre d'acteurs moléculaires ayant des interactions multiples. Bien que de tels processus soient souvent bien décrits mécaniquement, leurs propriétés quantitatives et dynamiques restent à mieux comprendre et leur contrôle offrirait un pilotage plus précis dans les bioprocédés. Cependant, nous sommes loin d'être en mesure de construire des modèles de processus biologiques aussi prédictifs et robustes qu'en physique ou en génie des procédés. En effet, un défi majeur de la biologie synthétique consiste à concevoir des cellules qui peuvent exécuter de manière fiable un programme dans un large éventail de conditions environnementales et malgré la nature stochastique de l'expression des gènes. Cependant, compte tenu de la nature complexe et bruyante de l'expression des gènes, un contrôle externe est habituellement nécessaire pour générer la perturbation désirée du circuit génétique, par exemple l'induction de l'expression de la voie métabolique d'intérêt. Le principe du contrôle d'un système dynamique avec une boucle de rétroaction a été largement utilisé dans l'ingénierie tout comme dans les circuits génétiques naturels (un métabolite en aval d'une voie métabolique rétroinhibe l'expression de l'enzyme en début de voie métabolique, comme par exemple dans la voie du mévalonate). L'idée de base est simple: surveiller la lecture et opérer une modification du système pour l'ajuster en temps réel afin de suivre un profil cible donné. Cela permet de compenser les fluctuations environnementales et les dynamiques non modélisées. Avoir un moyen de contrôler extérieurement, en temps réel, le niveau d'expression d'un gène d'intérêt constituerait une étape majeure vers une compréhension quantitative de la manière dont fonctionne un circuit métabolique. Cela aurait également des conséquences importantes pour la biotechnologie appliquée.

Comment mettre en place ce type de pilotage dans un système biologique, et si possible via un dispositif générique, transposable quelle que soit la voie métabolique d'intérêt ? Une approche est l'optogénétique, discipline associant le contrôle d'expression génétique à des stimuli lumineux via des facteurs de transcription photosensibles. L'optogénétique permet d'étudier les processus cellulaires dans l'espace et le temps. C'est dans cette optique que s'inscrivent les projet ANR CoGEx, ayant comme partenaires Pascal Hersen (CNRS, Laboratoire MSC) et Grégory Batt (INRIA, Lifeware) et la partie me concernant du projet EcoCts mené au sein de CNRS@CREATE à Singapour (voir détails dans la partie « parcours scientifique »). Sur une perspective à plus long terme, ces projets amènent une synergie avec la thématique de recherche centrale portant sur l'homéostasie d'une voie

métabolique artificielle : comment faire coexister harmonieusement une voie métabolique artificielle avec le reste du métabolisme hôte ?

Parmi les protéines sensibles à la lumière, la majorité des photorécepteurs naturels utilisent le domaine LOV (light-oxygen-voltage) qui est un sous-ensemble de la superfamille Per-ARNT-Sim (PAS) sensibles aux spectres de lumière bleue. En général, le cofacteur utilisé est la flavine adénine dinucléotide (FAD) ou la flavine mononucléotide (FMN), déjà largement distribuées dans la Nature, ne nécessitant pas dans la levure ou *E. coli* de produire un cofacteur spécifique comme la phycocyanobiline dans le cas du système Phy-PIF, sensible à la lumière rouge. Dérivant de flavoprotéines red-ox ancestrales, les photorécepteurs LOV possèdent une structure et un mécanisme évolutif conservés. Sur la base de son mécanisme de médiation de la transduction du signal, le domaine LOV peut être classé en domaines LOV1 et LOV2 [67]. Le mécanisme du photocycle du domaine LOV a été largement étudié chez *Avena sativa* (AsLOV2) [68]. Le domaine LOV est également présent dans une protéine de liaison à l'ADN régulée par la lumière bleue comme EL222, protéine de 222 acides aminés isolée de la bactérie marine *Erythrobacter litoralis* HTCC2594. EL222 fonctionne à l'origine au niveau transcriptionnel puisque l'interaction des domaines LOV et hélice-tour-hélice inhibe la liaison à l'ADN dans l'obscurité. La compréhension des mécanismes sous-jacents des protéines naturellement sensibles à la lumière, combinée à des stratégies avancées d'ingénierie des photorécepteurs, a servi de base pour permettre la découverte et l'expansion plus rapides des boîtes à outils optogénétiques [69].

a) Optogénétique chez la levure

Le laboratoire partenaire du projet a développé une première étape vers la construction d'un tel contrôle par ordinateur de l'expression des gènes dans la population des cellules de levure [70]. Dans ce contexte, ce projet de recherche vise (1) à créer un système de contrôle générique pour piloter l'expression des gènes au niveau de la cellule unique dans la levure; (2) étudier les propriétés de ce contrôle en temps réel et (3) appliquer cette méthode pour contrôler la production d'une biomolécule d'intérêt dans un fermenteur industriel.

En effet l'ingénierie métabolique a besoin de développer de nouveaux procédés pour l'industrialisation des molécules issues de la fermentation. La transposition d'un procédé de l'échelle de laboratoire à un fermenteur industriel nécessite généralement un long

développement, car les conditions de croissance et de production dans les fermentateurs industriels à haut volume ne peuvent pas être efficacement imitées par des expériences de laboratoire. Cela s'explique en partie par le fait que le contrôle de l'expression des gènes dépend fortement des conditions de croissance, de la disponibilité des nutriments et de l'hétérogénéité de la population, ce qui peut être très différent entre les expériences de laboratoire et les fermenteurs. En outre, on sait également que la production de composés étrangers par des cellules microbiennes doit être extrêmement bien contrôlée pour: i) éviter la consommation de ressources métaboliques pendant les phases où la croissance cellulaire est encore efficace et ii) au contraire, favoriser la production des enzymes impliquées dans la voie synthétique ou des molécules précurseurs lors de phases de culture dans lesquelles les cellules peuvent s'adapter à ce nouveau poids métabolique. On peut même envisager qu'un pilotage encore plus fin permettrait d'adapter en temps réel la charge métabolique prélevable du métabolisme naturel vers le synthétique pour maintenir la cellule dans un environnement non stressant, évitant ainsi la mise en place de dérives génétiques adaptatives. Les souches pourraient alors être génétiquement plus stables en fermenteur, la dérive génétique étant un problème actuel des procédés biotechnologiques. Il est donc évident qu'un contrôle strict et adapté de l'expression des gènes, soit pour la voie synthétique, soit pour la production de précurseurs, devrait conduire à une production plus élevée de composés étrangers. À ce jour, il n'existe pas de méthode satisfaisante pour assurer la robustesse et la fidélité d'un circuit synthétique sur une longue période de temps et dans une large gamme de conditions de fonctionnement. Les règles de pilotage qui découleront de ce projet serviront de base à un projet plus vaste et à long terme qui visera à développer des interfaces cellule-machine technologiquement et conceptuellement basées sur la génétique en utilisant la microfluidique, l'optogénétique, la microscopie, la théorie du contrôle, la modélisation et la biologie synthétique.

Dans un premier temps, nous avons construit des souches de levure qui peuvent exprimer un gène d'intérêt lorsqu'il est stimulé par la lumière, via le système optogénétique Phy-PIF. Ce système a déjà été testé dans la levure pour contrôler l'expression des gènes au niveau de la population. C'est donc un excellent candidat à la fois pour le contrôle des cellules uniques et pour le contrôle de la population pour les applications biotechnologiques. Rapidement, le système Phy-PIF est un système photoinductible issu des végétaux. Lorsque les cellules sont cultivées en présence du cofacteur phycocyanobiline (PCB), ces protéines

s'associent sous une lumière rouge (650 nm) et se dissocient lorsqu'elles sont éclairées par une lumière dans le rouge lointain (750nm). Ce système peut être utilisé pour créer un facteur de transcription sensible à la lumière en modifiant les deux protéines afin qu'elles puissent reconnaître une région d'ADN. C'est par exemple le cas du système Phy-PIF utilisé par l'équipe de J. Lygeros pour laquelle les deux protéines ont été fusionnées aux sous-domaines du facteur de transcription GAL4 [71]. Dans la forme dimère (après la stimulation de la lumière rouge), le domaine GAL4, devenu fonctionnel, peut se lier au promoteur GAL1 et permettre la transcription de la séquence d'ADN en aval. Sous le contrôle de ce système optogénétique, nous avons intégré dans la souche de levure CEN.PK2-1C, la plus utilisée en fermentation, un gène rapporteur codant pour la protéine fluorescente YFP afin de calibrer le système (Figure 26).

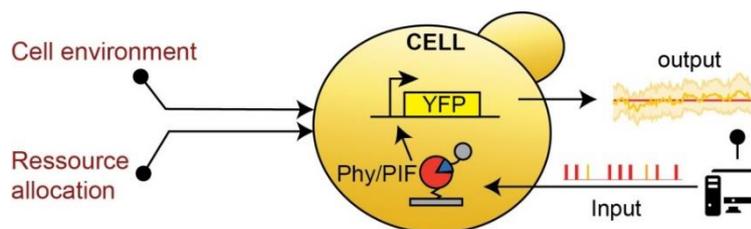


Figure 26 : Souche contrôle de pilotage optogénétique avec lecture et rétrocontrôle en temps réel. L'environnement et la manière dont les ressources sont allouées dans la cellule peuvent modifier à la fois les niveaux de PhyB/PIF et l'efficacité de transcription du rapporteur fluorescent YFP.

Malheureusement ce système s'est avéré peu robuste et n'a pas encore fonctionné au laboratoire, montrant que si l'optogénétique est pleine de promesse, ses systèmes sont encore facétieux. Nous avons alors préparé la souche à répondre au système EL222 plus simple (voir introduction de cette partie).

Pour implémenter le système optogénétique dans une souche d'ingénierie métabolique, nous avons modifié la souche exprimant la voie métabolique produisant le β carotène, modèle d'étude de l'équipe (Figure 20). Un premier design consista à placer sous le contrôle d'un promoteur C120, induit par EL222, l'expression de l'enzyme bifonctionnelle CrtYB, codant pour la lycopène cyclase et la phytoène synthase. En parallèle, une approche

plus générique a visé à placer sous contrôle optogénétique EL222 un système de régulation généralement employé chez la levure. Le système d'induction au galactose, impliquant GAL4 est couramment employé chez *S. cerevisiae* comme moyen d'induire fortement une voie synthétique sous contrôle de promoteurs *gal*. Nous avons placé sous contrôle transcriptionnel EL222 l'expression du facteur de transcription Gal4 lui-même, permettant de contrôler le régulon Gal non plus par la présence de galactose, mais via l'induction lumineuse et EL222. Les gènes de la voie artificielle, comme CrtYB, sont alors placés en aval d'un promoteur Gal, répondant alors dans ce contexte optogénétique à un facteur de transcription GAL4 dont la propre synthèse est induite par la lumière.

Concernant l'ingénierie de la voie synthétique, la molécule précurseur de la voie est le geranyl-geranyl pyrophosphate (GGPP). La concentration normale de GGPP dans la levure est faible; cependant, plusieurs travaux ont déjà bien documenté des étapes contrôlables pour améliorer la production de GGPP: surexpression de la forme tronquée de l'HMG CoA réductase et de la protéine CrtE [72]–[75]. Les gènes codant pour *crtE*, *crtI* et *crtYB* issus de *Xanthophyllomyces dendrorhous* et la forme tronquée de la HMGCoA reductase ont été clonés en aval du promoteur *gal1* ou *gal10* dans des plasmides intégratifs en vue d'une expression plus stable que sur plasmide (Figure 27). Pour éviter une régulation endogène parasite, la souche de levure CEN.PK2-1C a été, au préalable, mutée pour supprimer la régulation endogène par le galactose (disruption du gène codant le régulateur GAL80, délétion du gène codant le régulateur GAL4).

Avec le système EL222, la souche répond bien à la présence de lumière bleue et produit du carotène sous impulsion lumineuse en milieu glucose et d'avantage en milieu glycerol favorisant l'accumulation du précurseur acetylCoA. Nous sommes en train de caractériser cette souche, en particulier via une montée en échelle du volume de culture et différents appareillages optogénétiques permettant une illumination adéquate en plus grand volumes de cultures.

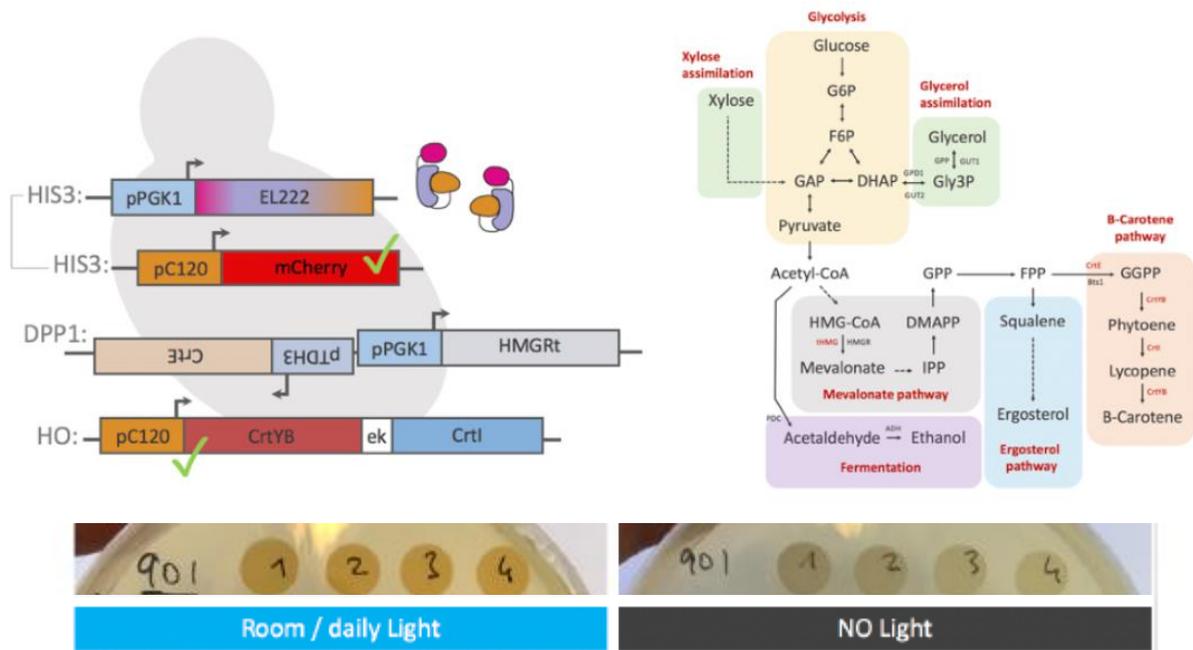


Figure 27 : ingénierie de souches dans le projet COGEX : la souche CoGEx produit du β -carotène sous induction lumineuse.

b) Optogénétique et multiplexage chez *E. coli*

En parallèle du travail effectué dans la levure, le contrôle optogénétique a été implémenté dans la bactérie *Escherichia coli*, dans le cadre du projet en cours EcoCTS au sein de la structure CNRS@CREATE, à Singapour. Le premier objectif était de valider la maîtrise du système EL222 dans un autre hôte, puis d'en optimiser l'utilisation dans un contexte d'ingénierie métabolique, prenant comme modèle la voie des terpènes. Enfin, le travail consiste à rajouter un deuxième système optogénétique, répondant à une longueur d'onde différente de celle du système EL222. En multiplexant les signaux, l'objectif est de pouvoir piloter indépendamment des processus biologiques différents au sein d'une même cellule, comme exemplifié dans différents travaux (Figure 28).

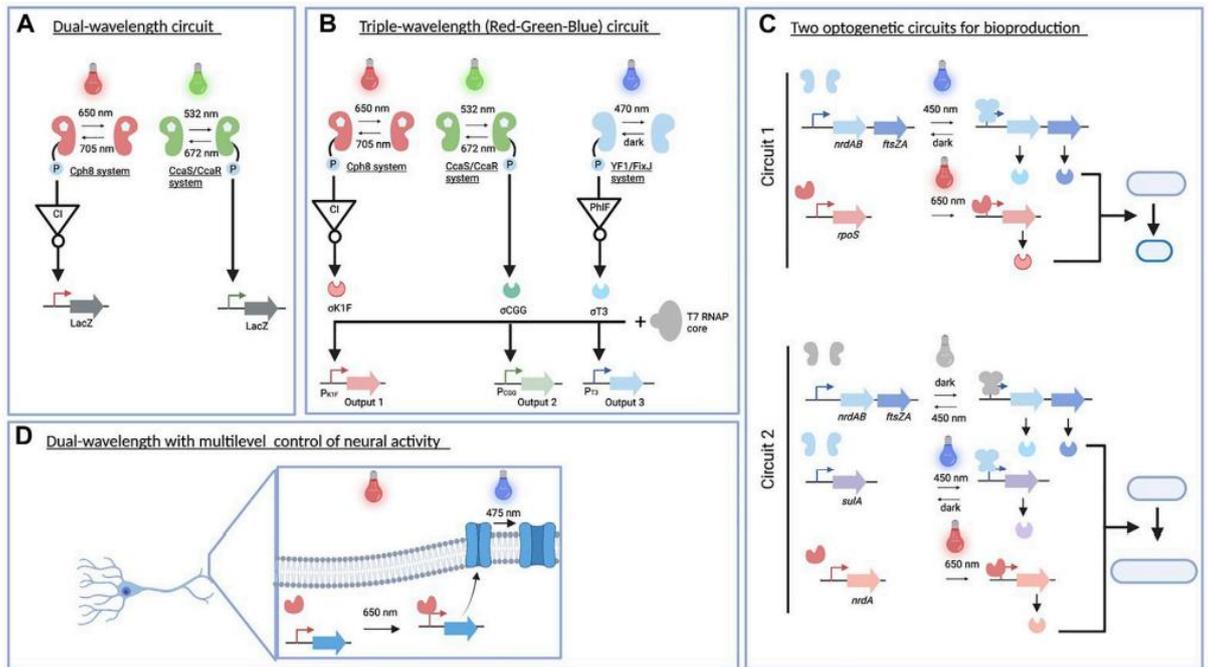


Figure 28 : Circuits optogénétiques multiplexés. **A** : Le circuit optogénétique à double longueur d'onde est utilisé pour créer une photographie bactérienne. **B** : Circuit rouge-vert-bleu mis en œuvre pour une photographie en couleur et une production modulée d'acétate ainsi que la structuration de biofilms dans divers matériaux. **C** : Deux circuits optogénétiques construits pour améliorer la production d'acétoine et de poly(lactate-co-3-hydroxybutyrate). **D** : Un circuit optogénétique à double longueur d'onde pour contrôler l'activité neuronale *in vivo*. Cette figure est issue de la revue que nous avons publié pour structurer notre travail sur le multiplexage (Dwijayanti *et al.*, 2022)

La première partie de ce travail s'est concentrée sur le système EL222. En premier lieu, la contrôle d'une souche optogénétique bactérienne a été validé en utilisant le plasmide pBLind. Ce plasmide héberge un gène rapporteur RFP dont la transcription est contrôlée par EL222, photorécepteur sensible à la lumière bleue [76]. (Figure 29).

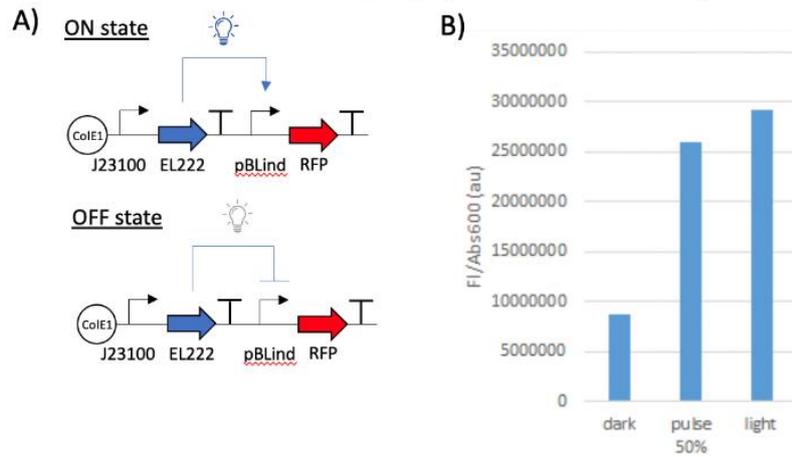


Figure 29 : Contrôle transcriptionnel du gène rapporteur RFP par le système EL222, un photorécepteur sensible à la lumière bleue.

Le système EL222 a alors été implémenté dans une souche productrice de terpènes, en plaçant plusieurs gènes de la voie artificielle sous contrôle de stimuli lumineux. La quantification des métabolites d'intérêt produits suite à une induction lumineuse a montré un niveau d'induction comparable à une souche classiquement induite par un inducteur chimique, type IPTG. Nous sommes en train d'optimiser les cycles d'illumination/obscurité au cours de la croissance pour une régulation sur mesure de la voie artificielle. A terme, un second système optogénétique va être implémenter dans la souche afin de piloter indépendamment des portions de voies métaboliques complémentaire ou antagonistes. Ce projet est en cours et les résultats, à ce stade confidentiels, sont en voie de publication.

III. Projet de recherche

A. Synthèse et problématique scientifique

Dans la première partie de ce rapport, l'ingénierie protéique s'est focalisée sur les déterminants de la spécificité de l'outil enzymatique. La biodiversification moléculaire des squelettes de métabolites permet d'accéder à une palette de métabolites permettant à la cellule de s'adapter aux contraintes de son environnement. La première étape pour fonctionnaliser un composé aliphatique est d'activer une liaison carbone. Dans la Nature, elle est réalisée par plusieurs familles enzymatiques et parmi elles, la famille des cytochromes P450 [77]. En raison de sa grande versatilité, cette famille est un acteur clé dans la biodiversification des métabolites. Au cours des travaux décrits dans ce rapport, différents membres de la famille des cytochromes P450 ont été étudiés et peuvent être classés en fonction de leur spécificité catalytique. Ainsi la sous-famille des P450 2B présente un degré relativement faible de conservation catalytique, ce qui fait de ces enzymes un bon modèle pour l'étude des relations structure-fonction des P450 [78]. Par contre, la recherche d'une grande spécificité catalytique dans les voies métaboliques des stérols, des acides ganodériques, des mono et tétraterpènes a orienté les études vers des P450 hautement spécifiques. Cette partie d'ingénierie enzymatique a mis en évidence la nécessité de régulations de la spécificité enzymatique.

Dans la seconde partie de ce rapport, l'ingénierie métabolique a été axée sur l'intégration d'une activité enzymatique hétérologue dans une cellule hôte. Cette intégration a été de deux sortes : spatiale et temporelle. L'organisation spatiale enzymatique via des linkers entre deux enzymes a montré qu'elle pouvait distribuer différemment les flux de métabolites. Nous avons observé dans les thèses d'Hery Rabeharindranto et d'Aurélien Bouin que la distribution des métabolites varie en fonction de la proximité des enzymes. La localisation intracellulaire des enzymes, notamment avec un ancrage membranaire, est aussi suspectée d'influencer la répartition métabolique. En d'autres termes : les mêmes enzymes placés à des endroits cellulaires différents ne produisent pas les mêmes ratios de métabolites. En complément de cet agencement spatial, une régulation temporelle a été mise en place par optogénétique. L'induction classique consiste à découpler la phase de croissance de la phase de production. En milieu de phase exponentielle de croissance, un inducteur chimique, type IPTG ou

galactose, est ajouté de façon irréversible à la culture pour induire fortement la voie synthétique. Une approche intermédiaire consiste à employer un système d'auto-induction, basé sur une régulation endogène, souvent liée à une source de carbone, comme le lactose. Si ces approches permettent une expression forte de la voie synthétique au moment où la cellule est métaboliquement active, elles présentent l'inconvénient d'être irréversible et trop entières, pouvant causer une surcharge métabolique délétère pour l'ensemble du bioprocédé [79]. L'optogénétique apporte une dimension réversible et a l'avantage de permettre une dynamique et des profils d'induction plus graduels qu'une induction chimique classique. Ainsi une induction de la transcription par pulses, plutôt que par illumination continue, montre une meilleure balance entre le métabolisme endogène et le métabolisme synthétique (amorçage progressif de l'induction par pulses en début de phase exponentielle puis induction entière par éclairage continu); de plus, en utilisant un même système optogénétique, le pattern d'illumination peut être adapté spécifiquement à la voie synthétique exprimée (acide lactique, isobutanol ou naringinine) [80].

Néanmoins, ces régulations ciblent le niveau transcriptionnel alors qu'une régulation au niveau post traductionnel permet de réorienter les flux métaboliques rapidement sans modifier le pool d'enzymes intracellulaire. Dans la Nature, en réponse à un stimulus intra ou extracellulaire, les régulations postraductionnelles jouent un rôle majeur dans les régulations des processus cellulaires. Ces régulations post traductionnelles peuvent moduler l'activité de l'enzyme elle-même, comme les phosphorylations [81]. Concernant les voies métaboliques, certaines enzymes sont assemblées en métabolon, un regroupement d'enzymes d'une voie de biosynthèse, comme celles impliquées dans le cycle des acides tricarboxyliques [82]. Ces assemblages peuvent être réversibles, permettant une adaptation rapide du métabolisme par exemple en cas de carence nutritionnelle [83], d'un besoin soudain d'un métabolite comme dans le purinosome [84], [85] ou de composés de défenses tel que la dhurrin, impliquant des cytochromes P450 [51].

Malgré leur importance dans les systèmes naturels, les exemples de régulations postraductionnelles sont encore rares en ingénierie métabolique [56], [86]–[90]. Développer ces régulations postraductionnelles permettraient une régulation dynamique des voies métaboliques synthétiques conduisant à une meilleure intégration au sein du métabolisme hôte [91].

B. Objectifs scientifiques

Ainsi, aussi bien une régulation temporelle qu'une régulation spatiale assure un contrôle fin du métabolisme. Dans un contexte d'ingénierie métabolique, comment combiner les deux types de régulation? Comment une régulation spatiale dynamique permet de mieux harmoniser une voie métabolique avec le reste du métabolisme? Dans un contexte biotechnologique, est-ce un atout à l'échelle de temps métabolique et à l'échelle du bioprocédé?

Ce projet est centré sur la dynamique du contrôle de voies métaboliques, notamment dans un métabolisme ramifié, dont le précurseur central est substrat dans plusieurs voies aval, car c'est une structure de réseau métabolique fréquemment rencontrée en biotechnologie. Cette problématique d'aiguillage et de temporalité métabolique sera adressée en pilotant la disposition spatiale intracellulaire des enzymes. L'axe du projet de recherche vise à mettre au point un contrôle en temps réel de l'activité enzymatique d'une voie synthétique, via la création d'enzymes photodimérisable dont l'activité est pilotable extérieurement par la lumière. L'originalité de cette approche vient du fait que le pilotage est post traductionnel et se fait sur l'activité enzymatique elle-même, pas sur la synthèse de l'enzyme via une régulation transcriptionnelle, qui induit une inertie de régulation. Combiner la démarche des fusions et scaffold enzymatiques avec les stratégies d'optogénétique est une approche découlant des travaux de recherche présentées dans ce rapport. Ainsi en fonction des pulses lumineux, les enzymes sont associées ou non. La voie est active ou non. Cette approche est innovante dans le sens où la régulation classique d'une voie métabolique se fait au niveau de la transcription : induire la voie équivaut à synthétiser l'enzyme, l'éteindre signifie dégrader l'enzyme. L'approche classique est donc coûteuse en termes de synthèse protéique et peu réactive. L'idée d'une régulation par agencement spatial induit par la lumière permet un contrôle dynamique sans dégradation des enzymes.

C. Modèle métabolique

Le choix du modèle métabolique doit remplir plusieurs critères pour être adapté à la question biologique posée : comment est régulée une voie métabolique ramifiée ? La voie

métabolique du modèle doit donc être ramifiée, avec des compétitions pour des précurseurs communs. Une compétition de ressources métaboliques (précurseurs ou énergie/balance redox) permettra de mettre plus facilement en lumière les caractéristiques nécessaires d'une régulation dynamique. En parallèle le modèle enzymatique doit être compatible au châssis cellulaire, qui sera *Escherichia coli* ou *Saccharomyces cerevisiae*, afin de bénéficier des données de biologie des systèmes et vu leur intérêt en biotechnologie. A ce stade, il n'est pas utile de rajouter une complexité à la question scientifique en choisissant un châssis cellulaire exotique.

En complément de son adéquation à la question biologique, le modèle enzymatique doit aussi remplir des critères de faisabilité. Concernant le volet ingénierie protéique, les données structurales sont importantes pour aider au design des chimères photoréactives : l'enzyme cible est-elle monomérique, membranaire, dans quel compartiment cellulaire, organisée en métabolon, son mécanisme réactionnel nécessite-il un partenaire protéique ou un cofacteur,... Le volet analytique conditionnera la dimension de l'étude en termes de criblage : est-ce que le métabolite d'intérêt est stable, sécrété, toxique, détectable simplement à haut débit ou nécessite-il un procédé d'extraction complexe ? Enfin, d'un point de vue politique, le choix du modèle doit apporter un intérêt pour d'autres membres de la communauté scientifique, afin de faciliter l'établissement de collaboration ; il doit aussi avoir une valeur économique, pour que les sources de financements, les débouchés applicatifs et la vulgarisation sociétale soient favorisés.

La question d'une intégration catalytique efficace *in vivo* et de la spécificité de substrat est particulièrement intéressante à adresser sur les « molecular gatekeepers » qui sont impliquées non pas sur une fonctionnalisation précise d'une partie de métabolite mais plutôt sur la structure générale de la molécule [92]. Ces enzymes « gardiennes » sont plus spécifiques et logiquement impliquées dans les parties amont d'une voie métabolique qui définit la structure du squelette métabolite. En compétition avec d'autres enzymes « gardiennes » pour un précurseur générique, elles permettent de diriger une partie du flux métabolique vers la voie métabolique aval. Des mécanismes de régulation interne à la voie sont courants, tel un retro contrôle de la première enzyme de la voie par le produit final qui permet d'éviter un emballement du système [18], [72]. Ainsi cibler un « lead compound » en tête de voies ramifiées conduisant à une famille de molécules d'intérêt économique est une

stratégie intéressante, surtout si les parties aval impliquent les enzymes de la famille des P450, développées dans mes activités précédentes.

A ce stade du projet, trois modèles ont émergé, présentés selon leur position dans une voie métabolique, depuis la partie amont précurseur jusqu'à la partie aval fonctionnalisation :

HMGS comme enzyme cible d'une photorégulation

La voie de l'acide mévalonique est la partie amont des voies de biosynthèse de la famille des terpènes tels que le limonène, le lycopène, le squalène et d'autres dérivés, ayant un intérêt économique important [13]. La voie de synthèse implique la hydroxymethylglutaryl-CoA synthase (HMGS, ERG13 de *S. cerevisiae*)[93]. HMGS est une transférase comportant une cystéine conservée médiant la thioesterification qui condense l'acetyl-CoA avec l'acetoacetyl-CoA pour produire l'hydroxymethylglutaryl-CoA, qui sera réduit en mévalonate par la HMG-CoA reductase. En raison de son rôle stratégique en tant que valve métabolique de la voie de l'acide mévalonique, HMGS remplit le critère d'enzyme « gardienne », utile dans le cadre de ce projet. La surexpression de l'HMGS est connue pour entraîner une accumulation d'HMG-CoA dont la concentration intracellulaire élevée provoque une toxicité chez *E. coli*. Dans *S. cerevisiae*, HMGS est impliquée dans la voie de l'ergosterol, voie métabolique importante pour la composition des membranes et le fitness cellulaire. Par conséquent, il est important de réguler son activité pour éviter la toxicité cellulaire et améliorer la productivité. Ainsi dans les deux modèles cellulaires envisagés, HMGS joue un rôle charnière intéressant pour étudier une régulation dynamique. D'un point de vue cinétique, l'étape limitante de la voie métabolique est HMGR et il faudra coordonner la quantité de HMGS avec l'amplitude de réponse possible par le système optogénétique. D'un point de vue structural, HMGS de *S. cerevisiae* n'est pas cristallisée. Chez les vertébrés, deux isoformes existent, la forme I cytosolique, impliqué dans la synthèse du cholestérol, et la forme II mitochondriale, impliquée dans la synthèse de cétones comme le D- β -hydroxybutyrate (Figure 30). Les deux isoformes humaines ont été cristallisées et HMGS-I est décrite comme homodimérique, ce qui peut être important dans le design d'une version photorégulée [94], [95]. Certaines isoformes d'HMGS ont été exprimées en hôte hétérologue, purifiées et l'activité enzymatique *in vitro* a été caractérisée, ce qui est un atout également [96]. HMGS de *S. cerevisiae* a déjà été fusionnée et scaffoldée via un domaine SH3 afin de créer un clustering enzymatique avec l'acetyl-CoA

acetyltransferase AtoB et HMG-R, ou plus récemment via un autoassemblage sur cage protéique (Figure 30) [56], [97]. Ces travaux montrent qu'un assemblage spatial artificiel est possible avec HMGS. Apporter une dynamique temporelle dans cet assemblage pourrait donc être réalisé et constituer un modèle métabolique intéressant.

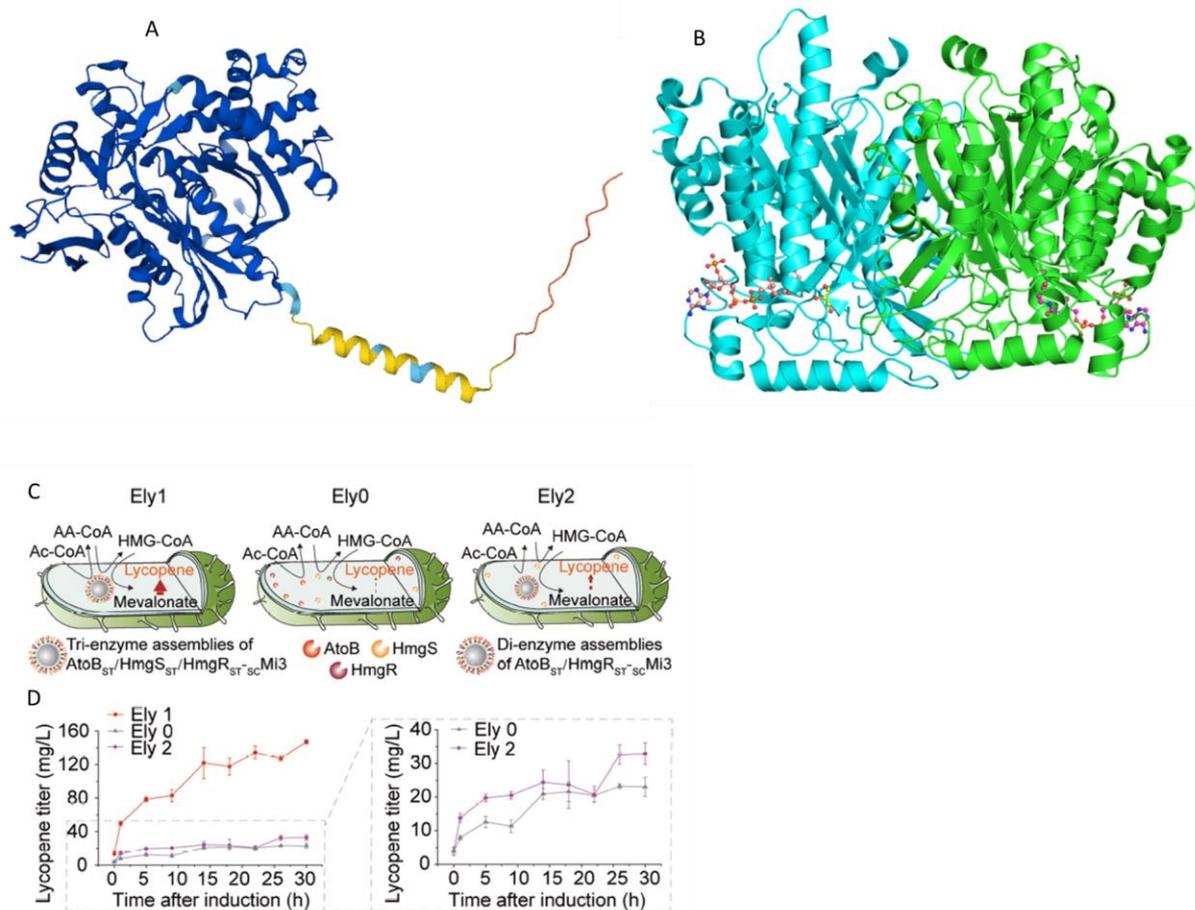


Figure 30 : **A** : HMGS from *S. cerevisiae*, alphafold modelling, (Uniprot entry P54839 · ERG13_YEAST) **B** : Structure d'HMG-CoA synthase I humaine cristallisée (crystal [PDB 2P8U](#)). **C** : Comparaison de la vitesse de réaction entre les assemblages trienzyme et les assemblages de di-enzyme. Ely0 est la souche contrôle contenant uniquement des enzymes indépendantes ; Ely1 contient des assemblages trienzymes d'AtoBST, HmgSST et HmgRST ; Ely2 contient des assemblages dienzymes d'AtoBST avec HMGRST, la deuxième enzyme de la voie métabolique, HMGS, reste libre. **D** : Ely1 contenant des assemblages tri-enzymes est beaucoup plus productif par rapport à à Ely0 et Ely2 *in vivo*. Ely2 montre seulement une augmentation modérée de production de lycopène que celle d'Ely0, issu de Kang *et al.*, 2022 [97].

Les cyclisations du lycopène

Le second modèle d'étude pourrait être la cyclisation des extrémités du lycopène, tetraterpène linéaire. En effet, il existe deux types de cyclases, les β -cyclases et les ϵ -cyclases. Un lycopène ayant subi une double cyclisation par une β -cyclase forme du β -carotène, précurseur de la zeaxanthine. Un lycopène avec une extrémité cyclisée par une β -cyclase et l'autre par une ϵ -cyclase forme du α -carotène, précurseur de la lutéine. Si les β -cyclases sont généralement des dicyclases, les ϵ -cyclases sont des monocyclases et en absence de β -cyclase pour cycliser la deuxième extrémité, le lycopène reste sous forme monocyclique, appelé δ -carotène (Figure 31).

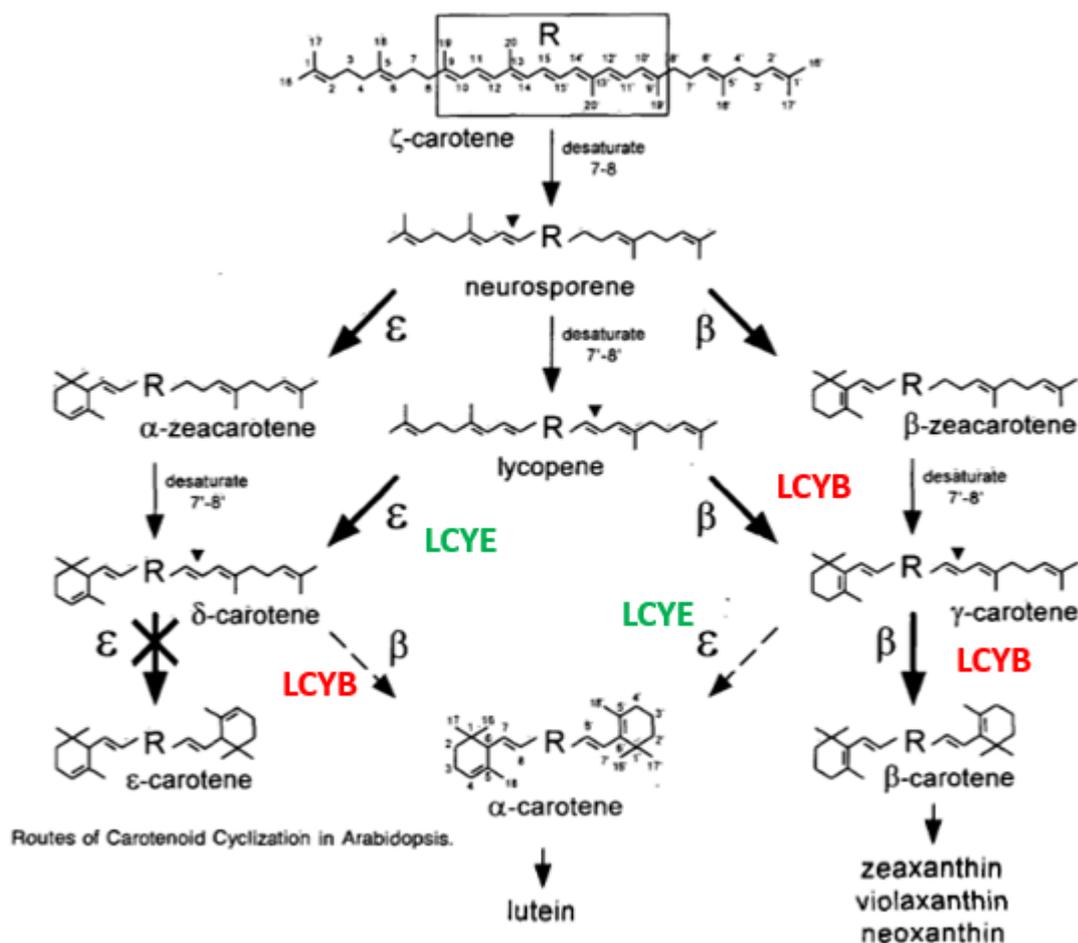


Figure 31 : cyclisation du lycopene, LCYB : β -cyclases et LCYE : ϵ -cyclases. Adapté de Cunningham *et al.*, 1996 [98].

Comment sont régulés les flux de lycopène entre les deux cyclases ? Quels est la chronologie des cyclisations ? Existe-il une organisation spatiale des enzymes type métabolon ? Une première piste montre que dans des fusions ϵ/β -cyclases de l'algue verte *Ostreococcus lucimarinus*, la troncature de l'extrémité C-terminale ou l'altération de la région de liaison entraîne des changements dans les ratios d' α - et de β -carotène produits [99]. En plus d'une compétition entre cyclases, une compétition entre cyclases et désaturase du précurseur du lycopène, le phytoène, permet de compléter le système d'étude. Etudier les stratégies catalytiques dans la distribution des métabolites en amont des voies de biosynthèses restent un champ ouvert et coupler une ingénierie des enzymes « gardiennes » à celle des enzymes de fonctionnalisation fine serait un atout pour étendre la biodiversité moléculaire.

Les hydroxylations du lanosterol en acides ganodériques

Ganoderma Lucidum est un basidiomycète utilisé depuis plus de 2000 ans dans la médecine traditionnelle chinoise et produit une large famille de lanostérol hydroxylés : les acides ganodériques (Figure 32).

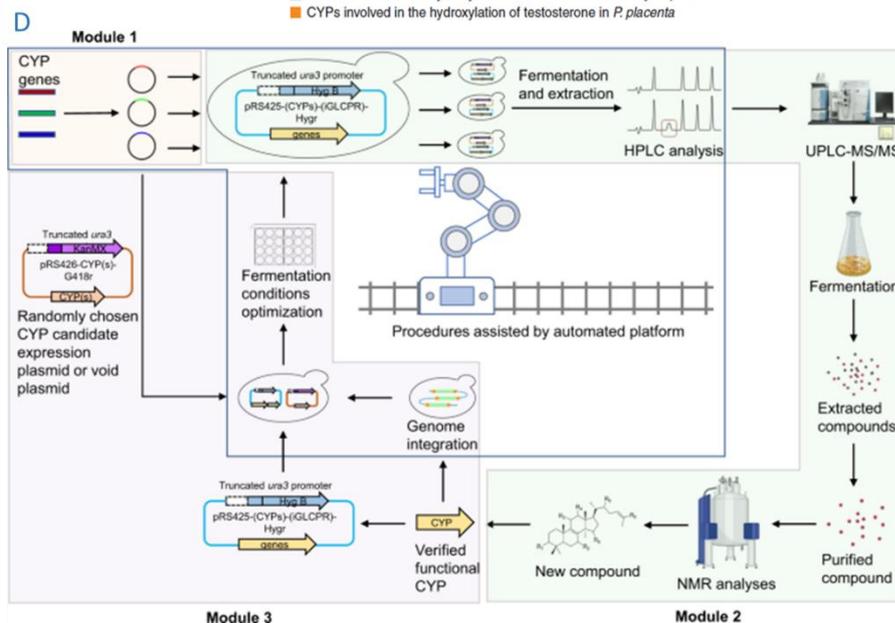
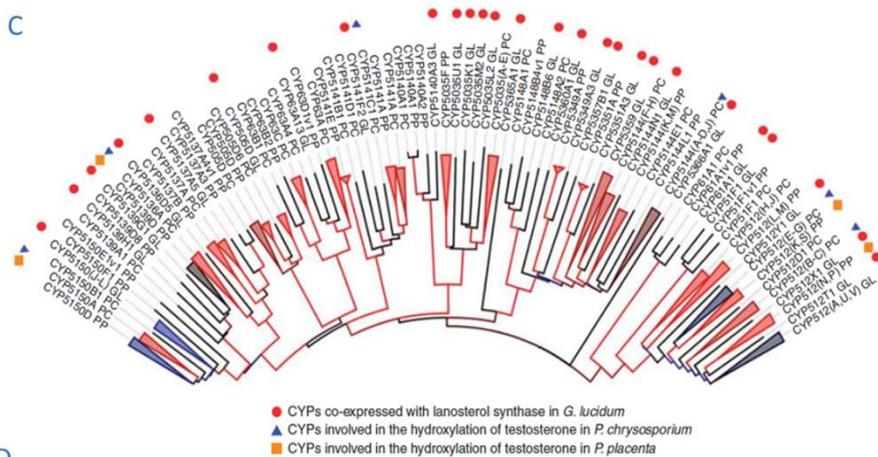
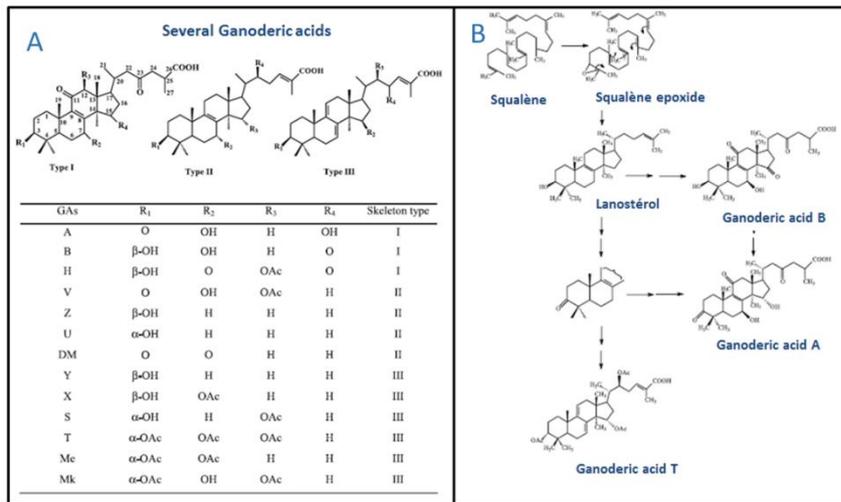


Figure 32 : **A** : Classification des acides ganodériques [100]. **B** : Possible voie de biosynthèse des acides ganodériques. **C** : Séquençage du génome de *Ganoderma lucidum* et classification des cytochromes P450 [101]. **D** : Schéma du criblage itératif de CYP fonctionnels facilité par un système automatisé. [102].

La culture de *G. lucidum* est difficile et longue, une approche de production par biologie de synthèse dans un organisme hétérologue, la levure, apporterait un avantage en termes de quantité produite et de pureté de produit. De plus combiner des enzymes hétérologues actives sur la famille des stérols pourrait permettre de générer une diversité moléculaire autour du squelette des ganodériques. On pourrait par exemple envisager d'hydroxyler des carbones non naturellement hydroxylés par le champignon et analyser le gain en termes d'activité pharmacologique de cette nouvelle classe d'acides ganodériques. Mais dans un premier temps, il faut avoir une vision plus précise des enzymes impliquées dans la biosynthèse naturelle des acides ganodériques. Une partie des enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse est identifiée [102]. Dans cette combinaison de réactions d'hydroxylations, la famille des cytochromes P450 joue un rôle clef et réguler leurs interactions permettrait de comprendre comment un certain type d'acides ganodériques est produit au détriment d'une autre classe. Nous avons identifié la cytochrome P450 reductase de *G. lucidum*. L'ORF de la CPR de *G. lucidum* a été clonée dans un vecteur intégratif de levure puis intégré au génome de la souche BY4742 de *Saccharomyces cerevisiae*, souche utilisée classiquement pour la surexpression de protéines. Couplé à l'optogénétique, cette souche, BY4742-CPRgano, représenterait donc une souche plateforme pour l'expression et la régulation dynamique de cytochromes P450 de *G. lucidum*.

D. Modèle « optoprotéique »

Les difficultés principales de cet axe portent sur la fonctionnalité d'enzymes splittées, la dynamique et l'amplitude d'une réponse médiée par un photorécepteur.

Concernant la stratégie de séparation de l'enzyme, elle est intimement liée à la structure de l'enzyme, d'où le besoin de données structurales auxquelles peuvent s'appuyer des approches de séparation existantes [103]. Splitter une enzyme reste risqué et si cette démarche échoue, l'approche contrôlant le rapprochement spatial de deux enzymes de la voie métabolique semble plus sécurisée. La seconde difficulté porte sur la compatibilité entre les besoins d'une régulation métabolique et les capacités régulatrices du systèmes optogénétique (dynamique, amplitude, réactivité du système). Le répertoire des systèmes optogénétiques s'enrichie et plusieurs systèmes, répondant à une gamme de lumière, sont

caractérisés [104]. Il existe plusieurs systèmes optogénétiques, avec des propriétés cinétiques différentes parmi lesquelles il faudra choisir le système le plus adapté [69]. Des systèmes optogénétiques ont été décrits pour l'hétérodimérisation protéique [105]–[107] ; l'homodimérisation [108], [109]; la dégradation [110]; la translocation cytosol-noyaux [111]–[113] et la séparation protéique par changement de phase liquide-liquide [114]–[116]. Des dimérisations de protéines splitées, contrôlées par médiateur chimique ou lumineux, ont été mises en évidence, mais avec une faible réversibilité [117], [118]. Un système plus réversible a été récemment mis au point, basé sur des nanobodies, qui sont des petites protéines dérivant du domaine variable des anticorps de chameaux, offrant une versatilité de scaffold pour divers épitopes [119]. Jared E. Toettcher et collaborateurs ont réalisés des nanobodies photosensibles, en se basant sur le travail d'ingénierie pour insérer des photodomains light-oxygen-voltage dans des boucles exposées au solvant des protéines d'intérêt [120], [121]. Cette dernière approche est intéressante à explorer pour le design d'une enzyme catalytique photorégulable. Si nécessaire, il faudra concevoir un système de circuit de régulation multicouche, avec amplification ou déstabilisation par exemple (via des boucles d'amplifications ou des étiquettes de dégradation), mais cela devra rester simple pour ne pas perdre la dynamique qu'apporte une régulation post traductionnelle.

Concernant l'efficacité catalytique de l'assemblage, elle doit rester suffisante pour que la voie métabolique fonctionne. L'idée générale est de réassocier des monomères ou des enzymes splitées en les fusionnant à des photodomains dimérisant. Des enzymes photorégulables ont déjà été décrites dans le domaine des protéines de régulation (protéine G, répresseurs,) [122] indiquant que la fusion du domaine photorécepteur à une protéine active est faisable, mais c'est une nouveauté de l'appliquer dans la régulation de l'ingénierie métabolique. De plus, la conception de circuit de régulation dynamique, pouvant aussi modifier la stœchiométrie enzymatique des étapes clés, dirigera le flux métabolique vers des intermédiaires précieux difficilement obtenus par génie chimique ou ingénierie métabolique classique. En contrôlant la voie synthétique, sa charge métabolique sur le reste du métabolisme cellulaire peut être ajustée, conduisant à une intégration homéostatique de la voie synthétique, et par conséquent, à une meilleure stabilité de la souche, des processus de fermentation et facilitant les processus d'extraction en aval.

Si la localisation intracellulaire des enzymes du modèle métabolique est clef, une approche complémentaire sera une photo-localisation, moins stricte pour la structure spatiale de

l'enzyme qu'une enzyme splittée: elle consiste en la création de fusion médiée par photodomaine entre domaine d'ancrage membranaire et domaines catalytiques. Par exemple, les enzymes de la voie des carotènes doivent être à proximité des membranes pour utiliser des substrats hydrophobes. En lien avec les thématiques toulousaines de TBI, la proximité spatiale pourra aussi changer d'échelle et se focaliser sur du clustering enzymatique ou des organites artificiels, assemblé à façon par stimuli lumineux. L'équipe de José Avalos de Princeton, avec qui des discussions de collaboration ont eu lieu, a réalisé un travail sur des compartiments liquide-liquide associés par la lumière et nous pourrions adopter une approche synergique avec son travail [87]. Ce projet vise donc à réguler des voies métaboliques grâce à un assemblage spatial réversible induit par la lumière (Figure 33)

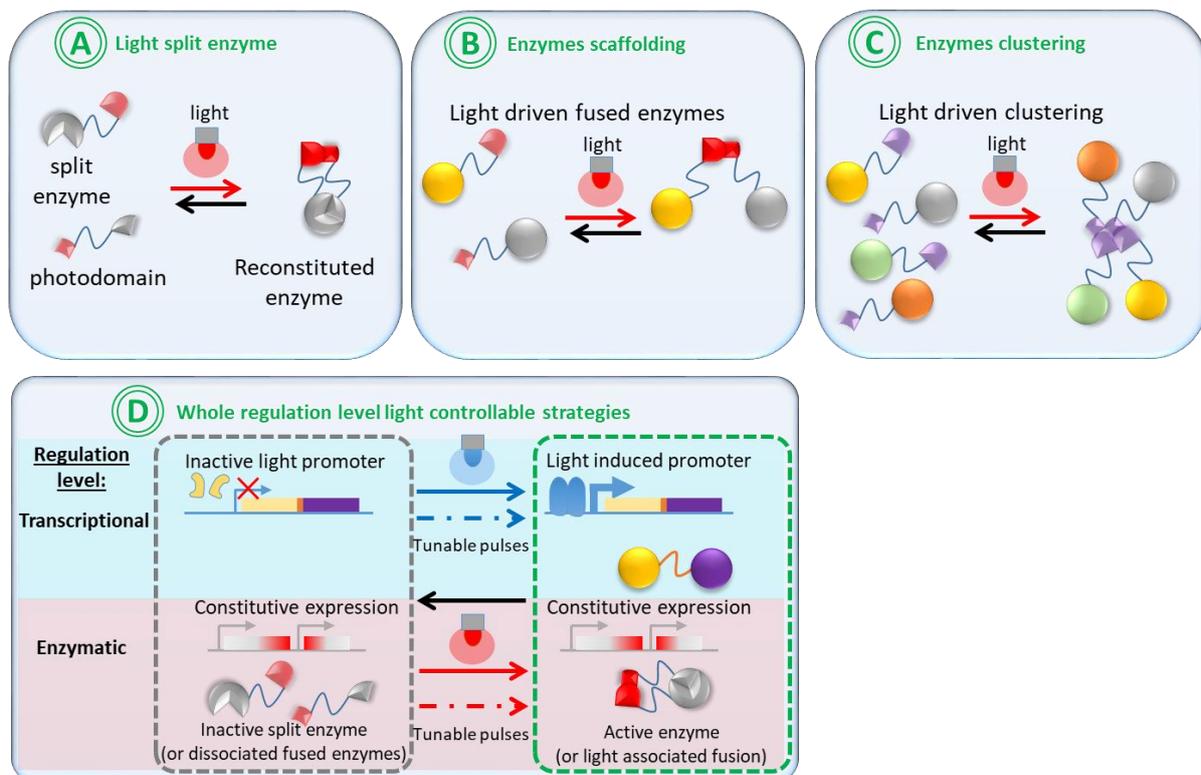


Figure 33 : régulations posttraductionnelles par optoprotéines : **A** : split enzymes **B** : enzymes scaffolding **C** : enzymes clustering. **D** : ingénierie métabolique intégrative avec contrôle optogénétique en temps réel.

E. Compétences et premières étapes

Les compétences à mettre en œuvre dans cet axe sont multiples, certaines internes, d'autres à développer en collaboration :

- Modélisation enzymatique pour le design de la coupure de l'enzyme, design des chimères photodomaine-enzyme
- Ingénierie métabolique et moléculaire pour la construction des souches : système core optoprotéique, enzymes de fonctionnalisation de la voie (P450s)
- Analytique : quantification des métabolites produits, besoin probable de fluxomique
- Modélisation mathématique et intelligence artificielle pour les cycles d'induction et les pulses de métabolismes
- Scale up : design de bioreacteurs adapté à l'optogénétique
- Downstream process : prendre en compte ces besoins pour les inclure dans le design génétique de la souche (par exemple : stockage intracellulaire/extracellulaire pour permettre l'accumulation du métabolite d'intérêt)

La première étape de ce projet à cibler :

Le volet optogénétique et ingénierie métabolique et moléculaire est adressable à mon échelle, ce qui permet déjà de mettre en place le dispositif biologique et d'apporter des premières réponses scientifiques sur la temporalité d'une régulation métabolique. La première étape du projet est le design d'un système enzymatique capable de s'associer via la lumière. En première intention, le système optogénétique sera EL222, pour capitaliser sur l'expertise développée dans les projets optogénétiques en cours. L'objectif à court terme (18 mois) est de construire une enzyme dont l'activité est pilotable par optogénétique, avec une réponse On/Off et de comparer les ratios de métabolites cibles par rapport à ceux produit dans une souche dont la voie synthétique est régulée transcriptionnellement. L'objectif à plus long terme est d'amener une progressivité dans la régulation, d'en modéliser le comportement, puis de complexifier la ramification de la voie et d'en comprendre l'effet sur la régulation de la partie amont (en branchant des enzymes aval par exemple). Cette diversification métabolique permettra aussi d'assurer des thématiques complémentaires, pouvant être sujet de demandes de financement et de sujets de thèse ou de postdoctorats.

A ce stade, il sera également utile d'avoir une quantification de métabolites endogènes clefs, afin de comparer les flux métaboliques dans la voie synthétique et dans ceux des voies endogènes.

Pour les étapes de modélisation mathématique, bioréacteurs et de downstream process, il faudra mettre en œuvre et étoffer mon réseau de collaborateurs, assurant une structure de projet éligible aux appels d'offres nécessitant des partenariats. Pour ce faire, je compte m'appuyer sur les communautés de biologie synthétique, d'ingénierie métabolique et d'optogénétique du réseau français, européen et singapourien.

Conclusion

Les travaux décrits dans ce rapport m'ont permis d'approfondir le travail sur les cytochromes P450, leurs partenaires redox et de m'impliquer sur de nouvelles thématiques d'ingénierie métaboliques (optogénétique, agencement enzymatique). Ces travaux visent à comprendre comment une voie métabolique existe au sein du métabolisme cellulaire, d'un point de vue catalytique et dynamique, depuis l'échelle moléculaire, en passant par les niveaux intra et inter-enzymatiques et jusqu'à la bonne intégration dans la physiologie cellulaire. Au fur et à mesure de leurs avancées, ces travaux ont montré leur complémentarité (Figure 34).

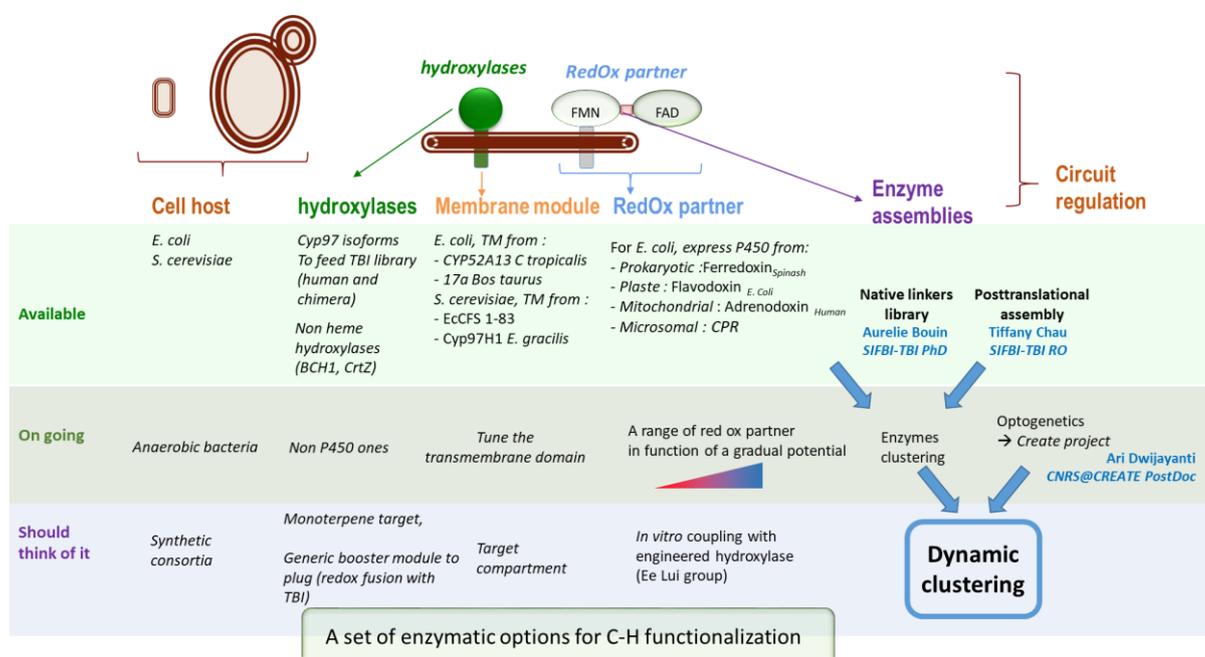


Figure 34 : Synthèse et synergie des projets.

A présent, ma stratégie de recherche s'appuie sur cette expérience pour définir des axes à la croisée des chemins, comme le montre la régulation de voies métaboliques par un agencement spatial réversible. Je me suis fortement engagé au sein de l'IRP SynBioEco notamment pour développer cette thématique, engagement traduit en mobilité internationale à Singapour. Cette mobilité a permis une implication dans la conception et direction d'un projet scientifique (PI WP projet CREATE), encadrement de personnel (une thèse, puis un post doc et un ingénieur de recherche). De plus, du fait du contexte de cette mobilité (IRP SynBioEco et CNRS@CREATE), mon travail s'intègre dans la politique scientifique internationale : rôle de relais entre les laboratoires Toulouse-Singapour, lien avec la

délégation CNRS ASEAN, relation avec les partenaires industriels (travail au sein de l'agence de recherche A*STAR, dépendant du ministère de l'industrie et du commerce singapourien), structuration d'un réseau scientifique international (promotion d'un accord cadre INSA-NUS, liens à développer avec les partenaires académiques de CREATE,...). La construction de ce réseau permettra je l'espère l'établissement et le maintien de collaborations au long cours.

Références bibliographiques

- [1] S. Rendic and F. P. Guengerich, "Survey of Human Oxidoreductases and Cytochrome P450 Enzymes Involved in the Metabolism of Xenobiotic and Natural Chemicals," *Chem Res Toxicol*, vol. 28, no. 1, pp. 38–42, Jan. 2015, doi: 10.1021/tx500444e.
- [2] P. R. Wilderman and J. R. Halpert, "Plasticity of CYP2B Enzymes: Structural and Solution Biophysical Methods," *Curr Drug Metab*, vol. 13, no. 2, pp. 167–176, Feb. 2012.
- [3] M. B. Shah, H.-H. Jang, Q. Zhang, C. David Stout, and J. R. Halpert, "X-ray crystal structure of the cytochrome P450 2B4 active site mutant F297A in complex with clopidogrel: Insights into compensatory rearrangements of the binding pocket," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 530, no. 2, pp. 64–72, Feb. 2013, doi: 10.1016/j.abb.2012.12.016.
- [4] S. C. Gay, L. Sun, K. Maekawa, J. R. Halpert, and C. D. Stout, "Crystal Structures of Cytochrome P450 2B4 in Complex with the Inhibitor 1-Biphenyl-4-methyl-1H-imidazole: Ligand-Induced Structural Response through α -Helical Repositioning," *Biochemistry*, vol. 48, no. 22, pp. 4762–4771, Jun. 2009, doi: 10.1021/bi9003765.
- [5] G. Sandmann, "Diversity and origin of carotenoid biosynthesis: its history of coevolution towards plant photosynthesis," *New Phytologist*, vol. 232, no. 2, pp. 479–493, 2021, doi: 10.1111/nph.17655.
- [6] T. Maoka, "Carotenoids as natural functional pigments," *J Nat Med*, vol. 74, no. 1, pp. 1–16, Jan. 2020, doi: 10.1007/s11418-019-01364-x.
- [7] J. Avalos and M. Carmen Limón, "Biological roles of fungal carotenoids," *Curr Genet*, vol. 61, no. 3, pp. 309–324, Aug. 2015, doi: 10.1007/s00294-014-0454-x.
- [8] "Biosynthesis of Carotenoids and Apocarotenoids by Microorganisms and Their Industrial Potential | IntechOpen." <https://www.intechopen.com/chapters/62140> (accessed Nov. 07, 2022).
- [9] E. Fernández-García, I. Carvajal-Lérida, M. Jarén-Galán, J. Garrido-Fernández, A. Pérez-Gálvez, and D. Hornero-Méndez, "Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments to efficient biological activities," *Food Research International*, vol. 46, no. 2, pp. 438–450, May 2012, doi: 10.1016/j.foodres.2011.06.007.
- [10] A. Nishino *et al.*, "Accumulation of Paprika Carotenoids in Human Plasma and Erythrocytes," *Journal of Oleo Science*, vol. 64, no. 10, pp. 1135–1142, 2015, doi: 10.5650/jos.ess15118.
- [11] "Encyclopedia of Human Nutrition | ScienceDirect." <https://www.sciencedirect.com/referencework/9780122266942/encyclopedia-of-human-nutrition> (accessed Apr. 12, 2022).
- [12] T. W. Snell and J. Carberry, "Astaxanthin Bioactivity Is Determined by Stereoisomer Composition and Extraction Method," *Nutrients*, vol. 14, no. 7, Art. no. 7, Jan. 2022, doi: 10.3390/nu14071522.
- [13] C. Zhang, X. Chen, and H.-P. Too, "Production of carotenoids and apocarotenoids," US20190367928A1, Dec. 05, 2019 Accessed: Oct. 19, 2022. [Online]. Available: <https://patents.google.com/patent/US20190367928A1/en>
- [14] W. S. Igreja, F. de A. Maia, A. S. Lopes, and R. C. Chisté, "Biotechnological Production of Carotenoids Using Low Cost-Substrates Is Influenced by Cultivation Parameters: A Review," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, no. 16, Art. no. 16, Jan. 2021, doi: 10.3390/ijms22168819.
- [15] X. Chen, X. Lim, A. Bouin, T. Lautier, and C. Zhang, "High-level de novo biosynthesis of glycosylated zeaxanthin and astaxanthin in *Escherichia coli*," *Bioresources and Bioprocessing*, vol. 8, no. 1, p. 67, Jul. 2021, doi: 10.1186/s40643-021-00415-0.
- [16] T. Wingerath, H. Sies, and W. Stahl, "Xanthophyll Esters in Human Skin," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 355, no. 2, pp. 271–274, Jul. 1998, doi: 10.1006/abbi.1998.0734.

- [17] A. Pérez-Gálvez and M. I. Mínguez-Mosquera, "Esterification of xanthophylls and its effect on chemical behavior and bioavailability of carotenoids in the human," *Nutrition Research*, vol. 25, no. 7, pp. 631–640, Jul. 2005, doi: 10.1016/j.nutres.2005.07.002.
- [18] Y. Ma *et al.*, "Removal of lycopene substrate inhibition enables high carotenoid productivity in *Yarrowia lipolytica*," *Nat Commun*, vol. 13, no. 1, Art. no. 1, Jan. 2022, doi: 10.1038/s41467-022-28277-w.
- [19] B. J. Burri, M. R. La Frano, and C. Zhu, "Absorption, metabolism, and functions of β -cryptoxanthin," *Nutr Rev*, vol. 74, no. 2, pp. 69–82, Feb. 2016, doi: 10.1093/nutrit/nuv064.
- [20] F.-X. Niu, Q. Lu, Y.-F. Bu, and J.-Z. Liu, "Metabolic engineering for the microbial production of isoprenoids: Carotenoids and isoprenoid-based biofuels," *Synth Syst Biotechnol*, vol. 2, no. 3, pp. 167–175, Aug. 2017, doi: 10.1016/j.synbio.2017.08.001.
- [21] J. Kim, J. J. Smith, L. Tian, and D. Dellapenna, "The evolution and function of carotenoid hydroxylases in *Arabidopsis*," *Plant Cell Physiol*, vol. 50, no. 3, pp. 463–479, Mar. 2009, doi: 10.1093/pcp/pcp005.
- [22] Z. Sun, E. Gantt, and F. X. Cunningham, "Cloning and Functional Analysis of the β -Carotene Hydroxylase of *Arabidopsis thaliana*," *J. Biol. Chem.*, vol. 271, no. 40, pp. 24349–24352, Oct. 1996, doi: 10.1074/jbc.271.40.24349.
- [23] J. Arango, M. Jourdan, E. Geoffriau, P. Beyer, and R. Welsch, "Carotene Hydroxylase Activity Determines the Levels of Both α -Carotene and Total Carotenoids in Orange Carrots," *Plant Cell*, vol. 26, no. 5, pp. 2223–2233, May 2014, doi: 10.1105/tpc.113.122127.
- [24] "Structural basis for plant lutein biosynthesis from α -carotene - PubMed." <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32513704/> (accessed Apr. 19, 2022).
- [25] J. Kim and D. DellaPenna, "Defining the primary route for lutein synthesis in plants: The role of *Arabidopsis* carotenoid β -ring hydroxylase CYP97A3," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 103, no. 9, pp. 3474–3479, Feb. 2006, doi: 10.1073/pnas.0511207103.
- [26] R. F. Quinlan, T. T. Jaradat, and E. T. Wurtzel, "*Escherichia coli* as a platform for functional expression of plant P450 carotene hydroxylases," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 458, no. 2, pp. 146–157, Feb. 2007, doi: 10.1016/j.abb.2006.11.019.
- [27] S. Tamaki, S. Kato, T. Shinomura, T. Ishikawa, and H. Imaishi, "Physiological role of β -carotene monohydroxylase (CYP97H1) in carotenoid biosynthesis in *Euglena gracilis*," *Plant Sci*, vol. 278, pp. 80–87, Jan. 2019, doi: 10.1016/j.plantsci.2018.10.017.
- [28] R. F. Quinlan *et al.*, "Synergistic Interactions between Carotene Ring Hydroxylases Drive Lutein Formation in Plant Carotenoid Biosynthesis," *Plant Physiology*, vol. 160, no. 1, pp. 204–214, Sep. 2012, doi: 10.1104/pp.112.198556.
- [29] G. Mukherjee, P. P. Nandekar, and R. C. Wade, "An electron transfer competent structural ensemble of membrane-bound cytochrome P450 1A1 and cytochrome P450 oxidoreductase," *Commun Biol*, vol. 4, no. 1, Art. no. 1, Jan. 2021, doi: 10.1038/s42003-020-01568-y.
- [30] S. Sintupachee, N. Ngamrojanavanich, W. Sitthithaworn, and W. De-Eknamkul, "Molecular cloning, bacterial expression and functional characterisation of cytochrome P450 monooxygenase, CYP97C27, and NADPH-cytochrome P450 reductase, CPR I, from *Croton stellatopilosus* Ohba," *Plant Science*, vol. 229, pp. 131–141, Dec. 2014, doi: 10.1016/j.plantsci.2014.09.001.
- [31] W. A. Johnston and E. M. J. Gillam, "Measurement of P450 difference spectra using intact cells," *Methods Mol Biol*, vol. 987, pp. 189–204, 2013, doi: 10.1007/978-1-62703-321-3_17.
- [32] A. Zhou, K. Zhou, and Y. Li, "Rational Design Strategies for Functional Reconstitution of Plant Cytochrome P450s in Microbial Systems," *Curr Opin Plant Biol*, vol. 60, p. 102005, Apr. 2021, doi: 10.1016/j.pbi.2021.102005.
- [33] M. B. Murataliev, A. Ariño, V. M. Guzov, and R. Feyereisen, "Kinetic mechanism of cytochrome P450 reductase from the house fly (*Musca domestica*)," *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 29, no. 3, pp. 233–242, Mar. 1999, doi: 10.1016/S0965-1748(98)00131-3.

- [34] M. Wang, D. L. Roberts, R. Paschke, T. M. Shea, B. S. Masters, and J. J. Kim, "Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: prototype for FMN- and FAD-containing enzymes," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 94, no. 16, pp. 8411–8416, Aug. 1997.
- [35] C. Xia *et al.*, "Conformational Changes of NADPH-Cytochrome P450 Oxidoreductase Are Essential for Catalysis and Cofactor Binding," *J Biol Chem*, vol. 286, no. 18, pp. 16246–16260, May 2011, doi: 10.1074/jbc.M111.230532.
- [36] D. Hamdane, C. Xia, S.-C. Im, H. Zhang, J.-J. P. Kim, and L. Waskell, "Structure and function of an NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase in an open conformation capable of reducing cytochrome P450," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 17, pp. 11374–11384, Apr. 2009, doi: 10.1074/jbc.M807868200.
- [37] J. Ellis, A. Gutierrez, I. L. Barsukov, W.-C. Huang, J. G. Grossmann, and G. C. K. Roberts, "Domain motion in cytochrome P450 reductase: conformational equilibria revealed by NMR and small-angle x-ray scattering," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 52, pp. 36628–36637, Dec. 2009, doi: 10.1074/jbc.M109.054304.
- [38] O. Frances *et al.*, "A Well-Balanced Preexisting Equilibrium Governs Electron Flux Efficiency of a Multidomain Diflavin Reductase," *Biophys J*, vol. 108, no. 6, pp. 1527–1536, Mar. 2015, doi: 10.1016/j.bpj.2015.01.032.
- [39] W.-C. Huang, J. Ellis, P. C. E. Moody, E. L. Raven, and G. C. K. Roberts, "Redox-Linked Domain Movements in the Catalytic Cycle of Cytochrome P450 Reductase," *Structure*, vol. 21, no. 9, pp. 1581–1589, Sep. 2013, doi: 10.1016/j.str.2013.06.022.
- [40] L. Aigrain, D. Pompon, S. Moréra, and G. Truan, "Structure of the open conformation of a functional chimeric NADPH cytochrome P450 reductase," *EMBO Rep*, vol. 10, no. 7, pp. 742–747, Jul. 2009, doi: 10.1038/embor.2009.82.
- [41] A. Sündermann and C. Oostenbrink, "Molecular dynamics simulations give insight into the conformational change, complex formation, and electron transfer pathway for cytochrome P450 reductase," *Protein Sci*, vol. 22, no. 9, pp. 1183–1195, Sep. 2013, doi: 10.1002/pro.2307.
- [42] F. Esteves *et al.*, "The Role of the FMN-Domain of Human Cytochrome P450 Oxidoreductase in Its Promiscuous Interactions With Structurally Diverse Redox Partners," *Front. Pharmacol.*, vol. 11, p. 299, Mar. 2020, doi: 10.3389/fphar.2020.00299.
- [43] F. Esteves, P. Urban, J. Rueff, G. Truan, and M. Kranendonk, "Interaction Modes of Microsomal Cytochrome P450s with Its Reductase and the Role of Substrate Binding," *IJMS*, vol. 21, no. 18, p. 6669, Sep. 2020, doi: 10.3390/ijms21186669.
- [44] R. B. Quast, F. Fatemi, M. Kranendonk, E. Margeat, and G. Truan, "Accurate Determination of Human CPR Conformational Equilibrium by smFRET Using Dual Orthogonal Noncanonical Amino Acid Labeling," *ChemBioChem*, vol. 20, no. 5, pp. 659–666, Mar. 2019, doi: 10.1002/cbic.201800607.
- [45] C. Hawes, P. Kiviniemi, and V. Kriechbaumer, "The endoplasmic reticulum: A dynamic and well-connected organelle: ER dynamics," *J. Integr. Plant Biol.*, vol. 57, no. 1, pp. 50–62, Jan. 2015, doi: 10.1111/jipb.12297.
- [46] A. Turmo, C. R. Gonzalez-Esquer, and C. A. Kerfeld, "Carboxysomes: metabolic modules for CO₂ fixation," *FEMS Microbiology Letters*, vol. 364, no. 18, p. fnx176, Oct. 2017, doi: 10.1093/femsle/fnx176.
- [47] L. F. Garcia-Alles *et al.*, "Occurrence and stability of hetero-hexamers formed by β -carboxysome CcmK shell components," *PLOS ONE*, vol. 14, no. 10, p. e0223877, Oct. 2019, doi: 10.1371/journal.pone.0223877.
- [48] S. Alberti, A. Gladfelter, and T. Mittag, "Considerations and Challenges in Studying Liquid-Liquid Phase Separation and Biomolecular Condensates," *Cell*, vol. 176, no. 3, pp. 419–434, Jan. 2019, doi: 10.1016/j.cell.2018.12.035.
- [49] A. H. Chen and P. A. Silver, "Designing biological compartmentalization," *Trends in Cell Biology*, vol. 22, no. 12, pp. 662–670, Dec. 2012, doi: 10.1016/j.tcb.2012.07.002.

- [50] B. Bulutoglu, K. E. Garcia, F. Wu, S. D. Minter, and S. Banta, "Direct Evidence for Metabolon Formation and Substrate Channeling in Recombinant TCA Cycle Enzymes," *ACS Chem. Biol.*, vol. 11, no. 10, pp. 2847–2853, Oct. 2016, doi: 10.1021/acscchembio.6b00523.
- [51] T. Laursen *et al.*, "Characterization of a dynamic metabolon producing the defense compound dhurrin in sorghum," *Science*, vol. 354, no. 6314, pp. 890–893, Nov. 2016, doi: 10.1126/science.aag2347.
- [52] T. Nakayama, S. Takahashi, and T. Waki, "Formation of Flavonoid Metabolons: Functional Significance of Protein-Protein Interactions and Impact on Flavonoid Chemodiversity," *Frontiers in Plant Science*, vol. 10, 2019, Accessed: Apr. 19, 2022. [Online]. Available: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2019.00821>
- [53] L. Artzi, E. A. Bayer, and S. Morais, "Cellulosomes: bacterial nanomachines for dismantling plant polysaccharides," *Nat Rev Microbiol*, vol. 15, no. 2, Art. no. 2, Feb. 2017, doi: 10.1038/nrmicro.2016.164.
- [54] M. Gou, X. Ran, D. W. Martin, and C.-J. Liu, "The scaffold proteins of lignin biosynthetic cytochrome P450 enzymes," *Nature Plants*, vol. 4, no. 5, pp. 299–310, Apr. 2018, doi: 10.1038/s41477-018-0142-9.
- [55] G. Sachdeva, A. Garg, D. Godding, J. C. Way, and P. A. Silver, "In vivo co-localization of enzymes on RNA scaffolds increases metabolic production in a geometrically dependent manner," *Nucleic Acids Res*, vol. 42, no. 14, pp. 9493–9503, Aug. 2014, doi: 10.1093/nar/gku617.
- [56] J. E. Dueber *et al.*, "Synthetic protein scaffolds provide modular control over metabolic flux," *Nat Biotechnol*, vol. 27, no. 8, Art. no. 8, Aug. 2009, doi: 10.1038/nbt.1557.
- [57] C. J. Delebecque, A. B. Lindner, P. A. Silver, and F. A. Aldaye, "Organization of Intracellular Reactions with Rationally Designed RNA Assemblies," *Science*, vol. 333, no. 6041, pp. 470–474, Jul. 2011, doi: 10.1126/science.1206938.
- [58] G. A. Ellis, W. P. Klein, G. Lasarte-Aragonés, M. Thakur, S. A. Walper, and I. L. Medintz, "Artificial Multienzyme Scaffolds: Pursuing in Vitro Substrate Channeling with an Overview of Current Progress," *ACS Catal.*, vol. 9, no. 12, pp. 10812–10869, Dec. 2019, doi: 10.1021/acscatal.9b02413.
- [59] S. Vance *et al.*, "Sticky swinging arm dynamics: studies of an acyl carrier protein domain from the mycolactone polyketide synthase," *Biochem J*, vol. 473, no. 8, pp. 1097–1110, Apr. 2016, doi: 10.1042/BCJ20160041.
- [60] G. Apic, J. Gough, and S. A. Teichmann, "Domain combinations in archaeal, eubacterial and eukaryotic proteomes," *Journal of Molecular Biology*, vol. 310, no. 2, pp. 311–325, Jul. 2001, doi: 10.1006/jmbi.2001.4776.
- [61] P. Riggs, "Fusion Protein," in *Brenner's Encyclopedia of Genetics*, Elsevier, 2013, pp. 134–135. doi: 10.1016/B978-0-12-374984-0.00565-9.
- [62] M. J. Annala, B. C. Parker, W. Zhang, and M. Nykter, "Fusion genes and their discovery using high throughput sequencing," *Cancer Letters*, vol. 340, no. 2, pp. 192–200, Nov. 2013, doi: 10.1016/j.canlet.2013.01.011.
- [63] S. K. Kummerfeld and S. A. Teichmann, "Relative rates of gene fusion and fission in multi-domain proteins," *Trends in Genetics*, vol. 21, no. 1, pp. 25–30, Jan. 2005, doi: 10.1016/j.tig.2004.11.007.
- [64] A. Gräwe and V. Stein, "Linker Engineering in the Context of Synthetic Protein Switches and Sensors," *Trends in Biotechnology*, vol. 39, no. 7, pp. 731–744, Jul. 2021, doi: 10.1016/j.tibtech.2020.11.007.
- [65] M. Carquet, D. Pompon, and G. Truan, "Transcription Interference and ORF Nature Strongly Affect Promoter Strength in a Reconstituted Metabolic Pathway," *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 3, 2015, Accessed: Jan. 18, 2023. [Online]. Available: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2015.00021>

- [66] R. A. George and J. Heringa, "An analysis of protein domain linkers: their classification and role in protein folding," *Protein Engineering, Design and Selection*, vol. 15, no. 11, pp. 871–879, Nov. 2002, doi: 10.1093/protein/15.11.871.
- [67] S. Crosson and K. Moffat, "Structure of a flavin-binding plant photoreceptor domain: Insights into light-mediated signal transduction," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 98, no. 6, pp. 2995–3000, Mar. 2001, doi: 10.1073/pnas.051520298.
- [68] J. P. Zayner and T. R. Sosnick, "Factors That Control the Chemistry of the LOV Domain Photocycle," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 1, p. e87074, Jan. 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0087074.
- [69] A. Dwijayanti, C. Zhang, C. L. Poh, and T. Lautier, "Toward Multiplexed Optogenetic Circuits," *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 9, 2022, Accessed: Jan. 17, 2023. [Online]. Available: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2021.804563>
- [70] J. Uhlenendorf *et al.*, "Long-term model predictive control of gene expression at the population and single-cell levels," *PNAS*, vol. 109, no. 35, pp. 14271–14276, Aug. 2012, doi: 10.1073/pnas.1206810109.
- [71] A. Miliás-Argeitis *et al.*, "In silico feedback for in vivo regulation of a gene expression circuit," *Nat Biotechnol*, vol. 29, no. 12, pp. 1114–1116, Nov. 2011, doi: 10.1038/nbt.2018.
- [72] T. Polakowski, U. Stahl, and C. Lang, "Overexpression of a cytosolic hydroxymethylglutaryl-CoA reductase leads to squalene accumulation in yeast," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 49, no. 1, pp. 66–71, Jan. 1998.
- [73] J. C. Verdoes, K. P. Krubasik, G. Sandmann, and A. J. van Ooyen, "Isolation and functional characterisation of a novel type of carotenoid biosynthetic gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous*," *Mol. Gen. Genet.*, vol. 262, no. 3, pp. 453–461, Oct. 1999.
- [74] J. C. Verdoes, N. Misawa, and A. J. van Ooyen, "Cloning and characterization of the astaxanthin biosynthetic gene encoding phytoene desaturase of *Xanthophyllomyces dendrorhous*," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 63, no. 6, pp. 750–755, Jun. 1999.
- [75] V. M. Ye and S. K. Bhatia, "Pathway engineering strategies for production of beneficial carotenoids in microbial hosts," *Biotechnology Letters*, vol. 34, no. 8, pp. 1405–1414, Aug. 2012, doi: 10.1007/s10529-012-0921-8.
- [76] P. Jayaraman, K. Devarajan, T. K. Chua, H. Zhang, E. Gunawan, and C. L. Poh, "Blue light-mediated transcriptional activation and repression of gene expression in bacteria," *Nucleic Acids Res*, vol. 44, no. 14, pp. 6994–7005, Aug. 2016, doi: 10.1093/nar/gkw548.
- [77] C. C. Hansen, D. R. Nelson, B. L. Møller, and D. Werck-Reichhart, "Plant cytochrome P450 plasticity and evolution," *Molecular Plant*, vol. 14, no. 8, pp. 1244–1265, Aug. 2021, doi: 10.1016/j.molp.2021.06.028.
- [78] Y. Zhao and J. R. Halpert, "Structure–function analysis of cytochromes P450 2B," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, vol. 1770, no. 3, pp. 402–412, Mar. 2007, doi: 10.1016/j.bbagen.2006.07.006.
- [79] G. Wu, Q. Yan, J. A. Jones, Y. J. Tang, S. S. Fong, and M. A. G. Koffas, "Metabolic Burden: Cornerstones in Synthetic Biology and Metabolic Engineering Applications," *Trends in Biotechnology*, vol. 34, no. 8, pp. 652–664, Aug. 2016, doi: 10.1016/j.tibtech.2016.02.010.
- [80] E. M. Zhao, M. A. Lalwani, J.-M. Chen, P. Orillac, J. E. Toettcher, and J. L. Avalos, "Optogenetic Amplification Circuits for Light-Induced Metabolic Control," *ACS Synth. Biol.*, vol. 10, no. 5, pp. 1143–1154, May 2021, doi: 10.1021/acssynbio.0c00642.
- [81] A. P. Oliveira and U. Sauer, "The importance of post-translational modifications in regulating *Saccharomyces cerevisiae* metabolism," *FEMS Yeast Res*, vol. 12, no. 2, pp. 104–117, Mar. 2012, doi: 10.1111/j.1567-1364.2011.00765.x.
- [82] Y. Zhang *et al.*, "Protein-protein interactions and metabolite channelling in the plant tricarboxylic acid cycle," *Nat Commun*, vol. 8, no. 1, p. 15212, May 2017, doi: 10.1038/ncomms15212.

- [83] R. Narayanaswamy *et al.*, “Widespread reorganization of metabolic enzymes into reversible assemblies upon nutrient starvation,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 106, no. 25, pp. 10147–10152, Jun. 2009, doi: 10.1073/pnas.0812771106.
- [84] J. B. French *et al.*, “Spatial colocalization and functional link of purinosomes with mitochondria,” *Science*, vol. 351, no. 6274, pp. 733–737, Feb. 2016, doi: 10.1126/science.aac6054.
- [85] A. M. Pedley and S. J. Benkovic, “A New View into the Regulation of Purine Metabolism: The Purinosome,” *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 42, no. 2, pp. 141–154, Feb. 2017, doi: 10.1016/j.tibs.2016.09.009.
- [86] H. Lee, W. C. DeLoache, and J. E. Dueber, “Spatial organization of enzymes for metabolic engineering,” *Metabolic Engineering*, vol. 14, no. 3, pp. 242–251, May 2012, doi: 10.1016/j.ymben.2011.09.003.
- [87] E. M. Zhao *et al.*, “Light-based control of metabolic flux through assembly of synthetic organelles,” *Nature Chemical Biology*, vol. 15, no. 6, Art. no. 6, Jun. 2019, doi: 10.1038/s41589-019-0284-8.
- [88] T. Thomik, I. Wittig, J. Choe, E. Boles, and M. Oreb, “An artificial transport metabolon facilitates improved substrate utilization in yeast,” *Nat Chem Biol*, vol. 13, no. 11, pp. 1158–1163, Nov. 2017, doi: 10.1038/nchembio.2457.
- [89] I. M. Brockman and K. L. J. Prather, “Dynamic knockdown of *E. coli* central metabolism for redirecting fluxes of primary metabolites,” *Metabolic Engineering*, vol. 28, pp. 104–113, Mar. 2015, doi: 10.1016/j.ymben.2014.12.005.
- [90] J.-L. Lin, J. Zhu, and I. Wheeldon, “Synthetic Protein Scaffolds for Biosynthetic Pathway Colocalization on Lipid Droplet Membranes,” *ACS Synth. Biol.*, vol. 6, no. 8, pp. 1534–1544, Aug. 2017, doi: 10.1021/acssynbio.7b00041.
- [91] S. Z. Tan and K. L. Prather, “Dynamic pathway regulation: recent advances and methods of construction,” *Curr Opin Chem Biol*, vol. 41, pp. 28–35, Dec. 2017, doi: 10.1016/j.cbpa.2017.10.004.
- [92] D. Umeno, A. V. Tobias, and F. H. Arnold, “Diversifying carotenoid biosynthetic pathways by directed evolution,” *Microbiol Mol Biol Rev*, vol. 69, no. 1, pp. 51–78, Mar. 2005, doi: 10.1128/MMBR.69.1.51-78.2005.
- [93] P. Liao *et al.*, “Past achievements, current status and future perspectives of studies on 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase (HMGS) in the mevalonate (MVA) pathway,” *Plant Cell Rep*, vol. 33, no. 7, pp. 1005–1022, Jul. 2014, doi: 10.1007/s00299-014-1592-9.
- [94] F. Pojer *et al.*, “Structural basis for the design of potent and species-specific inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthases,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 103, no. 31, pp. 11491–11496, Aug. 2006, doi: 10.1073/pnas.0604935103.
- [95] N. Shafqat, A. Turnbull, J. Zschocke, U. Oppermann, and W. W. Yue, “Crystal Structures of Human HMG-CoA Synthase Isoforms Provide Insights into Inherited Ketogenesis Disorders and Inhibitor Design,” *Journal of Molecular Biology*, vol. 398, no. 4, pp. 497–506, May 2010, doi: 10.1016/j.jmb.2010.03.034.
- [96] J. Cabañó, C. Buesa, F. G. Hegardt, and P. F. Marrero, “Catalytic properties of recombinant 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Synthase-1 from *Blattella Germanica*,” *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 27, no. 6, pp. 499–505, Jun. 1997, doi: 10.1016/S0965-1748(97)00024-6.
- [97] W. Kang *et al.*, “Organizing Enzymes on Self-Assembled Protein Cages for Cascade Reactions,” *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 61, no. 52, p. e202214001, 2022, doi: 10.1002/anie.202214001.
- [98] F. X. Cunningham, B. Pogson, Z. Sun, K. A. McDonald, D. DellaPenna, and E. Gantt, “Functional analysis of the beta and epsilon lycopene cyclase enzymes of *Arabidopsis* reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation,” *The Plant Cell*, vol. 8, no. 9, pp. 1613–1626, Sep. 1996, doi: 10.1105/tpc.8.9.1613.

- [99] A. Blatt, M. E. Bauch, Y. Pörschke, and M. Lohr, "A lycopene β -cyclase/lycopene ϵ -cyclase/light-harvesting complex-fusion protein from the green alga *Ostreococcus lucimarinus* can be modified to produce α -carotene and β -carotene at different ratios," *The Plant Journal*, vol. 82, no. 4, pp. 582–595, 2015, doi: 10.1111/tpj.12826.
- [100] J.-W. Xu, W. Zhao, and J.-J. Zhong, "Biotechnological production and application of ganoderic acids," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 87, no. 2, pp. 457–466, Jun. 2010, doi: 10.1007/s00253-010-2576-5.
- [101] "Genome sequence of the model medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* | Nature Communications." <https://www.nature.com/articles/ncomms1923> (accessed Mar. 28, 2023).
- [102] W. Yuan *et al.*, "Biosynthesis of mushroom-derived type II ganoderic acids by engineered yeast," *Nat Commun*, vol. 13, no. 1, Art. no. 1, Dec. 2022, doi: 10.1038/s41467-022-35500-1.
- [103] S. A. Lim and J. A. Wells, "Split enzymes: Design principles and strategy," *Methods Enzymol*, vol. 644, pp. 275–296, 2020, doi: 10.1016/bs.mie.2020.05.001.
- [104] L. de Mena, P. Rizk, and D. E. Rincon-Limas, "Bringing Light to Transcription: The Optogenetics Repertoire," *Front. Genet.*, vol. 9, p. 518, Nov. 2018, doi: 10.3389/fgene.2018.00518.
- [105] A. Levskaya, O. D. Weiner, W. A. Lim, and C. A. Voigt, "Spatiotemporal control of cell signalling using a light-switchable protein interaction," *Nature*, vol. 461, no. 7266, pp. 997–1001, Oct. 2009, doi: 10.1038/nature08446.
- [106] G. Guntas *et al.*, "Engineering an improved light-induced dimer (iLID) for controlling the localization and activity of signaling proteins," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 112, no. 1, pp. 112–117, Jan. 2015, doi: 10.1073/pnas.1417910112.
- [107] M. J. Kennedy, R. M. Hughes, L. A. Peteya, J. W. Schwartz, M. D. Ehlers, and C. L. Tucker, "Rapid blue-light-mediated induction of protein interactions in living cells," *Nat Methods*, vol. 7, no. 12, Art. no. 12, Dec. 2010, doi: 10.1038/nmeth.1524.
- [108] M. Grusch *et al.*, "Spatio-temporally precise activation of engineered receptor tyrosine kinases by light," *The EMBO Journal*, vol. 33, no. 15, pp. 1713–1726, Aug. 2014, doi: 10.15252/embj.201387695.
- [109] X. X. Zhou, L. Z. Fan, P. Li, K. Shen, and M. Z. Lin, "Optical control of cell signaling by single-chain photoswitchable kinases," *Science*, vol. 355, no. 6327, pp. 836–842, Feb. 2017, doi: 10.1126/science.aah3605.
- [110] C. Renicke, D. Schuster, S. Usherenko, L.-O. Essen, and C. Taxis, "A LOV2 Domain-Based Optogenetic Tool to Control Protein Degradation and Cellular Function," *Chemistry & Biology*, vol. 20, no. 4, pp. 619–626, Apr. 2013, doi: 10.1016/j.chembiol.2013.03.005.
- [111] D. Niopek *et al.*, "Engineering light-inducible nuclear localization signals for precise spatiotemporal control of protein dynamics in living cells," *Nat Commun*, vol. 5, no. 1, p. 4404, Jul. 2014, doi: 10.1038/ncomms5404.
- [112] D. Niopek, P. Wehler, J. Roensch, R. Eils, and B. Di Ventura, "Optogenetic control of nuclear protein export," *Nat Commun*, vol. 7, no. 1, p. 10624, Feb. 2016, doi: 10.1038/ncomms10624.
- [113] H. Yumerefendi *et al.*, "Light-induced nuclear export reveals rapid dynamics of epigenetic modifications," *Nat Chem Biol*, vol. 12, no. 6, Art. no. 6, Jun. 2016, doi: 10.1038/nchembio.2068.
- [114] E. Dine, A. A. Gil, G. Uribe, C. P. Brangwynne, and J. E. Toettcher, "Protein Phase Separation Provides Long-Term Memory of Transient Spatial Stimuli," *cels*, vol. 6, no. 6, pp. 655–663.e5, Jun. 2018, doi: 10.1016/j.cels.2018.05.002.
- [115] D. Bracha *et al.*, "Mapping Local and Global Liquid Phase Behavior in Living Cells Using Photo-Oligomerizable Seeds," *Cell*, vol. 175, no. 6, pp. 1467–1480.e13, Nov. 2018, doi: 10.1016/j.cell.2018.10.048.
- [116] Y. Shin, J. Berry, N. Pannucci, M. P. Haataja, J. E. Toettcher, and C. P. Brangwynne, "Spatiotemporal Control of Intracellular Phase Transitions Using Light-Activated optoDroplets," *Cell*, vol. 168, no. 1, pp. 159–171.e14, Jan. 2017, doi: 10.1016/j.cell.2016.11.054.

- [117] H. Farrants *et al.*, “Chemogenetic Control of Nanobodies,” *Nat Methods*, vol. 17, no. 3, Art. no. 3, Mar. 2020, doi: 10.1038/s41592-020-0746-7.
- [118] D. Yu *et al.*, “Optogenetic activation of intracellular antibodies for direct modulation of endogenous proteins,” *Nat Methods*, vol. 16, no. 11, Art. no. 11, Nov. 2019, doi: 10.1038/s41592-019-0592-7.
- [119] S. Muyldermans, “Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies,” *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 82, no. 1, pp. 775–797, Jun. 2013, doi: 10.1146/annurev-biochem-063011-092449.
- [120] O. Dagliyan *et al.*, “Engineering extrinsic disorder to control protein activity in living cells,” *Science*, vol. 354, no. 6318, pp. 1441–1444, Dec. 2016, doi: 10.1126/science.aah3404.
- [121] A. A. Gil *et al.*, “Optogenetic control of protein binding using light-switchable nanobodies,” *Nature Communications*, vol. 11, no. 1, Art. no. 1, Aug. 2020, doi: 10.1038/s41467-020-17836-8.
- [122] S. Seifert and S. Brakmann, “LOV Domains in the Design of Photoresponsive Enzymes,” *ACS Chem. Biol.*, vol. 13, no. 8, pp. 1914–1920, Aug. 2018, doi: 10.1021/acscchembio.8b00159.
- [123] C. Carrasco-López, S. A. García-Echauri, T. Kichuk, and J. L. Avalos, “Optogenetics and biosensors set the stage for metabolic cybergenetics,” *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 65, pp. 296–309, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.copbio.2020.07.012.