



(12) **DEMANDE DE BREVET CANADIEN
CANADIAN PATENT APPLICATION**

(13) **A1**

(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2019/12/20
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2020/06/25
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2021/06/15
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 2019/053227
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2020/128379
(30) Priorité/Priority: 2018/12/20 (FR1873492)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *C12N 15/10* (2006.01),
C12P 7/16 (2006.01)
(71) Demandeur/Applicant:
IFP ENERGIES NOUVELLES, FR
(72) Inventeurs/Inventors:
HOCQ, REMI, FR;
CHARTIER, GWLADYS, FR;
WASELS, FRANCOIS, FR;
LOPES FERREIRA, NICOLAS, FR
(74) Agent: SMART & BIGGAR LLP

(54) Titre : BACTERIES CLOSTRIDIUM GENETIQUEMENT MODIFIEES, PREPARATION ET UTILISATIONS DE
CELLES-CI
(54) Title: GENETICALLY MODIFIED CLOSTRIDIUM BACTERIA, PREPARATION AND USES OF SAME

(57) Abrégé/Abstract:

La présente invention concerne la modification génétique de bactéries du genre Clostridium, typiquement de bactéries solvantogènes du genre Clostridium, en particulier de bactéries possédant à l'état sauvage un gène codant une amphénicol-O-acétyltransférase. Elle concerne ainsi des méthodes, outils et kits permettant une telle modification génétique, en particulier l'élimination ou la modification d'une séquence codant ou contrôlant la transcription d'une amphénicol-O-acétyltransférase, les bactéries génétiquement modifiées obtenues et leurs utilisations, en particulier pour produire un solvant, de préférence à l'échelle industrielle.

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international(43) Date de la publication internationale
25 juin 2020 (25.06.2020)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2020/128379 A1

(51) Classification internationale des brevets :

C12N 15/10 (2006.01) C12R 1/145 (2006.01)
C12P 7/16 (2006.01)

européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR2019/053227

(22) Date de dépôt international :

20 décembre 2019 (20.12.2019)

Publiée:

- avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues (règle 48.2(h))
- avec la partie de la description réservée au listage des séquences (règle 5.2(a))

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

1873492 20 décembre 2018 (20.12.2018) FR

(71) Déposant : IFP ENERGIES NOUVELLES [FR/FR] ; 1
et 4 Avenue de Bois Préau, 92500 Rueil-Malmaison (FR).

(72) Inventeurs : HOCQ, Rémi ; 4 rue Malebranche, 75005 Paris (FR). CHARTIER, Gwladys ; 130 Boulevard de la République, 78400 Chatou (FR). WASELS, François ; 11 rue du Sansonnet, 57050 Metz (FR). LOPES FERREIRA, Nicolas ; 34 Domaine de la Croix de Pierre, 28210 Croisilles (FR).

(74) Mandataire : STARCK-LOUDES, Anne-Caroline ; Becker & Associates, 25 rue Louis le Grand, 75002 Paris (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM),

(54) Title: GENETICALLY MODIFIED CLOSTRIDIUM BACTERIA, PREPARATION AND USES OF SAME

(54) Titre : BACTERIES CLOSTRIDIUM GENETIQUEMENT MODIFIEES, PREPARATION ET UTILISATIONS DE CELLES-CI

(57) Abstract: The present invention concerns the genetic modification of bacteria of the *Clostridium* genus, typically solventogenic bacteria of the *Clostridium* genus, in particular bacteria having, in the wild state, a gene coding an amphenicol-O-acetyltransferase. It thus concerns methods, tools and kits allowing such a genetic modification, in particular the elimination or modification of a sequence coding or controlling the transcription of an amphenicol-O-acetyltransferase, the genetically modified bacteria obtained and the uses of same, in particular for producing a solvent, preferably on an industrial scale.(57) Abrégé : La présente invention concerne la modification génétique de bactéries du genre *Clostridium*, typiquement de bactéries solvantogènes du genre *Clostridium*, en particulier de bactéries possédant à l'état sauvage un gène codant une amphenicol-O-acetyltransférase. Elle concerne ainsi des méthodes, outils et kits permettant une telle modification génétique, en particulier l'élimination ou la modification d'une séquence codant ou contrôlant la transcription d'une amphenicol-O-acetyltransférase, les bactéries génétiquement modifiées obtenues et leurs utilisations, en particulier pour produire un solvant, de préférence à l'échelle industrielle.

WO 2020/128379 A1

DESCRIPTION

Titre : BACTERIES CLOSTRIDIUM GENETIQUEMENT MODIFIEES, PREPARATION ET UTILISATIONS DE CELLES-CI

La présente invention concerne la modification génétique de bactéries du genre *Clostridium*, typiquement de bactéries solvantogènes du genre *Clostridium*, en particulier de bactéries possédant à l'état sauvage un gène codant une amphénicol-O-acetyltransférase. Elle concerne ainsi des méthodes, outils et kits permettant une telle modification génétique, en particulier l'élimination ou la modification d'une séquence codant, ou contrôlant la transcription d'une séquence codant, une amphénicol-O-acetyltransférase, les bactéries génétiquement modifiées obtenues et leurs utilisations, en particulier pour produire un solvant, de préférence à l'échelle industrielle.

ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE

Le genre *Clostridium* contient des bactéries à Gram positif, anaérobies strictes et sporulantes, appartenant au phylum des Firmicutes. Les *Clostridia* sont un groupe d'importance pour la communauté scientifique pour plusieurs raisons. La première est qu'un certain nombre de maladies graves (e.g. tétanos, botulisme) sont dues à des infections de membres pathogènes de cette famille (Gonzales *et al.*, 2014). La deuxième est la possibilité d'utiliser des souches dites acidogènes ou solvantogènes en biotechnologie (John & Wood, 1986, et Moon *et al.*, 2016). Ces *Clostridia*, non pathogènes, ont naturellement la capacité de transformer une variété importante de sucres pour produire des espèces chimiques d'intérêt, et plus particulièrement de l'acétone, du butanol, et de l'éthanol (John & Wood, 1986) au cours d'un processus fermentaire dit ABE. De manière similaire, la fermentation IBE est possible chez certaines espèces particulières, lors de laquelle l'acétone est réduit en proportion variable en isopropanol (Chen *et al.*, 1986, George *et al.*, 1983) grâce à la présence dans le génome de ces souches de gènes codant des alcool déshydrogénases secondaires (s-ADH ; Ismael *et al.*, 1993, Hiu *et al.*, 1987). Les espèces de *Clostridia* solvantogènes présentent des similarités phénotypiques importantes, ce qui rendait difficile leur classification avant l'émergence des techniques de séquençage modernes (Rogers *et al.*, 2006). Avec la possibilité de séquencer les génomes complets de ces bactéries, il est aujourd'hui possible de classer ce genre bactérien en 4 espèces majeures : *C. acetobutylicum*, *C. saccharoperbutylacetonicum*, *C. saccharobutylicum* et *C. beijerinckii*. Une publication récente a permis de classer ces *Clostridia* solvantogènes en 4 clades principaux après analyse comparative des génomes complets de 30 souches (Figure 1).

Ces groupes séparent notamment les espèces que sont *C. acetobutylicum* et *C. beijerinckii* avec comme références respectives *C. acetobutylicum* ATCC 824 (également désignée DSM 792 ou encore LMG

5710) et *C. beijerinckii* NCIMB 8052 qui sont les souches modèles pour l'étude de la fermentation de type ABE.

Les souches de *Clostridium* naturellement capables d'effectuer une fermentation IBE sont peu nombreuses et appartiennent majoritairement à l'espèce *Clostridium beijerinckii* (cf. Zhang *et al.*, 2018, Tableau 1). Ces souches sont typiquement sélectionnées parmi les souches *C. butylicum* LMD 27.6, *C. aurantibutylicum* NCIB 10659, *C. beijerinckii* LMD 27.6, *C. beijerinckii* VPI2968, *C. beijerinckii* NRRL B-593, *C. beijerinckii* ATCC 6014, *C. beijerinckii* McClung 3081, *C. isopropylicum* IAM 19239, *C. beijerinckii* DSM 6423, *C. sp.* A1424, *C. beijerinckii optinoii*, et *C. beijerinckii* BGS1.

Il n'existe toutefois à ce jour pas de souche de bactérie *Clostridium* naturellement capable de produire de l'isopropanol, en particulier naturellement capable d'effectuer une fermentation IBE, qui ait été modifiée génétiquement, en particulier une souche modifiée génétiquement de manière à la rendre sensible à un antibiotique appartenant à la classe des amphénicols tel que le chloramphénicol ou le thiamphénicol, de préférence pour permettre la production optimisée d'isopropanol.

RESUME DE L'INVENTION

Les inventeurs décrivent, dans le contexte de la présente invention et pour la première fois, une bactérie *C. beijerinckii* génétiquement modifiée, ainsi que les outils permettant une modification génétique de bactéries du genre *Clostridium*, typiquement de bactéries solvantogènes du genre *Clostridium* naturellement (i.e. à l'état sauvage) capable de produire de l'isopropanol, en particulier naturellement capables d'effectuer une fermentation IBE, en particulier de bactéries comprenant à l'état sauvage un gène conférant à la bactérie la résistance à un ou plusieurs antibiotiques, en particulier un gène codant une amphénicol-O-acetyltransférase, par exemple une chloramphénicol-O-acetyltransférase ou une thiamphénicol-O-acetyltransférase.

Une bactérie génétiquement modifiée préférée selon l'invention est une bactérie n'exprimant pas une enzyme lui conférant la résistance à un ou plusieurs antibiotiques, en particulier une bactérie n'exprimant pas une amphénicol-O-acetyltransférase, par exemple une bactérie dépourvue du gène *catB* ou incapable d'exprimer ledit gène.

Une bactérie génétiquement modifiée préférée selon l'invention est la bactérie identifiée dans la présente description en tant que *C. beijerinckii* DSM 6423 $\Delta catB$ telle qu'enregistrée sous le numéro de dépôt LMG P-31151 (également identifié en tant que *Clostridium beijerinckii* IFP962 delta *catB*) auprès de la Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms (« BCCM », K.L. Ledeganckstraat 35, B-9000 Gent - Belgique) le 6 décembre 2018. La description concerne également toute bactérie dérivée, clone, mutant ou version génétiquement modifiée de celle-ci.

Un objet particulier décrit par les inventeurs est un acide nucléique reconnaissant (liant au moins en partie), et de préférence ciblant, i.e. reconnaissant et permettant la coupure, dans le génome d'une bactérie d'intérêt, d'au moins un brin i) d'une séquence codant, ii) d'une séquence contrôlant la transcription d'une séquence codant, ou iii) d'une séquence flanquant la séquence codant, une enzyme permettant à ladite bactérie d'intérêt de croître dans un milieu de culture contenant un antibiotique, typiquement un antibiotique appartenant à la classe des amphénicols, de préférence sélectionné parmi le chloramphénicol, le thiamphénicol, l'azidamfénicol et le florfénicol, typiquement une amphénicol-O-acetyltransférase telle qu'une chloramphénicol-O-acetyltransférase ou une thiamphénicol-O-acetyltransférase

Les inventeurs décrivent aussi l'utilisation d'un tel acide nucléique pour transformer et/ou modifier génétiquement une bactérie du genre *Clostridium*, de préférence une bactérie du genre *Clostridium* naturellement capable de produire de l'isopropanol, en particulier une bactérie du genre *Clostridium* capable d'effectuer une fermentation IBE.

Les inventeurs décrivent en particulier l'utilisation d'un acide nucléique reconnaissant le gène *catB* de séquence SEQ ID NO : 18 ou une séquence identique à au moins 70% à celle-ci au sein du génome de *C. beijerinckii* DSM 6423 pour transformer et/ou modifier génétiquement une bactérie *C. beijerinckii* DSM 6423.

La bactérie capable de produire de l'isopropanol à l'état sauvage peut être par exemple une bactérie sélectionnée parmi une bactérie *C. beijerinckii*, une bactérie *C. diolis*, une bactérie *C. puniceum*, une bactérie *C. butyricum*, une bactérie *C. saccharoperbutylacetonicum*, une bactérie *C. botulinum*, une bactérie *C. drakei*, une bactérie *C. scatologenes*, une bactérie *C. perfringens*, et une bactérie *C. tunisiense*, de préférence une bactérie sélectionnée parmi une bactérie *C. beijerinckii*, une bactérie *C. diolis*, une bactérie *C. puniceum* et une bactérie *C. saccharoperbutylacetonicum*. Une bactérie naturellement capable de produire de l'isopropanol particulièrement préférée est une bactérie *C. beijerinckii*.

Selon un aspect particulier, l'acide nucléique reconnaissant, et de préférence ciblant, i) une séquence codant une amphénicol-O-acetyltransférase, ii) une séquence contrôlant la transcription d'une telle séquence, ou iii) une séquence flanquant une telle séquence, est utilisé pour transformer un sous-clade de *C. beijerinckii* sélectionné parmi DSM 6423, LMG 7814, LMG 7815, NRRL B-593, NCCB 27006 et un sous-clade présentant au moins 97% d'identité avec la souche DSM 6423.

Les inventeurs décrivent par ailleurs un procédé pour transformer, et de préférence modifier génétiquement, une bactérie du genre *Clostridium*. Ce procédé comprend une étape de transformation de ladite bactérie par introduction dans cette bactérie d'un acide nucléique reconnaissant, et de préférence ciblant, i) une séquence codant, ii) une séquence contrôlant la transcription d'une séquence codant, ou iii) une séquence flanquant une séquence codant, une enzyme d'intérêt, de préférence une amphénicol-O-acetyltransférase. Ce procédé est typiquement réalisé à l'aide d'un outil de modification

génétique, par exemple à l'aide d'un outil de modification génétique sélectionné parmi un outil CRISPR, un outil basé sur l'utilisation d'introns de type II et un outil d'échange allélique. Sont également décrites les bactéries transformées et modifiées génétiquement à l'aide d'un tel procédé, dont la bactérie *C. beijerinckii* DSM 6423 $\Delta catB$ est un exemple.

Un autre aspect décrit par les inventeurs concerne l'utilisation d'une bactérie modifiée génétiquement selon l'invention, de préférence de la bactérie *C. beijerinckii* DSM 6423 $\Delta catB$ telle qu'enregistrée sous le numéro de dépôt LMG P-31151, ou d'une version génétiquement modifiée de celle-ci, pour produire un solvant, de préférence l'isopropanol, ou un mélange de solvants, de préférence à l'échelle industrielle.

La description concerne enfin des kits, en particulier un kit comprenant un acide nucléique décrit dans le présent texte et un outil de modification génétique, en particulier un outil de modification génétique sélectionné parmi les éléments d'un outil génétique sélectionné parmi un outil CRISPR, un outil basé sur l'utilisation d'introns de type II et un outil d'échange allélique ; un acide nucléique en tant qu'ARN guide (ARNg) ; un acide nucléique en tant que matrice de réparation ; au moins une paire d'amorces ; et un inducteur permettant l'expression d'une protéine codée par ledit outil.

DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

Bien qu'utilisées en industrie depuis plus d'un siècle, les connaissances sur les bactéries appartenant au genre *Clostridium* sont limitées par les difficultés rencontrées pour les modifier génétiquement.

Différents outils génétiques ont été conçus au cours des dernières années pour optimiser les souches de ce genre, la dernière génération étant basée sur l'utilisation de la technologie CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)/Cas (CRISPR-associated protein). Cette méthode est basée sur l'emploi d'une enzyme appelée nucléase (typiquement une nucléase de type Cas dans le cas de l'outil génétique CRISPR/Cas, telle que la protéine Cas9 de *Streptococcus pyogenes*), qui va, guidée par une molécule d'ARN, réaliser une coupure double brin au sein d'une molécule d'ADN (séquence cible d'intérêt). La séquence de l'ARN guide (ARNg) déterminera le site de coupure de la nucléase, lui conférant ainsi une très forte spécificité (Figure 17).

Une coupure double brin au sein d'une molécule d'ADN indispensable étant létale pour un organisme, la survie de ce dernier dépendra de sa capacité à la réparer (cf. par exemple Cui & Bikard, 2016). Chez les bactéries du genre *Clostridium*, la réparation d'une coupure double brin dépend d'un mécanisme de recombinaison homologue nécessitant une copie intacte de la séquence clivée. En fournissant à la bactérie un fragment d'ADN permettant d'effectuer cette réparation tout en modifiant la séquence originelle, il est possible de forcer le micro-organisme à intégrer les changements désirés au sein de son génome. La modification réalisée ne doit plus permettre le ciblage de l'ADN génomique par le complexe ribonucléoprotéique Cas9-ARNg, via la modification de la séquence cible ou du site PAM (Figure 18).

Différentes approches ont été décrites pour tenter de rendre fonctionnel cet outil génétique au sein de bactéries du genre *Clostridium*. Ces microorganismes sont en effet connus pour être difficiles à modifier génétiquement en raison de leurs faibles fréquences de transformation et de recombinaison homologue. Quelques approches sont basées sur l'emploi de Cas9, exprimée de manière constitutive chez *C. beijerinckii* et *C. ljungdahlii* (Wang *et al*, 2015 ; Huang *et al*, 2016) ou sous contrôle d'un promoteur inductible chez *C. beijerinckii*, *C. saccharoperbutylacetonicum* et *C. autoethanogenum* (Wang *et al*, 2016 ; Nagaraju *et al*, 2016 ; Wang *et al*, 2017). D'autres auteurs ont décrit l'utilisation d'une version modifiée de la nucléase, Cas9n, qui réalise des coupures simple brin, au lieu de coupures double brin, au sein du génome (Xu *et al*, 2015 ; Li *et al*, 2016). Ce choix est dû aux observations selon lesquelles la toxicité de Cas9 est trop importante pour son utilisation chez des bactéries du genre *Clostridium* dans les conditions expérimentales testées. La plupart des outils décrits précédemment reposent sur l'utilisation d'un plasmide unique. Enfin, il est également possible d'utiliser des systèmes CRISPR/Cas endogènes lorsqu'ils ont été identifiés au sein du génome du micro-organisme, comme par exemple chez *C. pasteurianum* (Pyne *et al*, 2016).

A moins qu'ils n'utilisent (comme dans le dernier cas décrit ci-dessus) la machinerie endogène de la souche à modifier, les outils basés sur la technologie CRISPR présentent l'inconvénient majeur de limiter significativement la taille de l'acide nucléique d'intérêt (et donc le nombre de séquences codantes ou gènes) susceptible d'être inséré dans le génome bactérien (1,8 kb environ au mieux d'après Xu *et al*, 2015).

Les inventeurs ont mis au point et décrit un outil génétique plus performant de modification de bactéries, adapté aux bactéries, typiquement aux bactéries appartenant au phylum des Firmicutes, en particulier aux bactéries du genre *Clostridium*, basé sur l'utilisation de deux acides nucléiques distincts, typiquement de deux plasmides (cf. WO2017064439, Wasels *et al*, 2017 et Figure 3) qui résout notamment ce problème. Dans un mode de réalisation particulier, le premier acide nucléique de cet outil permet l'expression de *cas9* et un deuxième acide nucléique, spécifique de la modification à effectuer, contient une ou plusieurs cassettes d'expression d'ARNg ainsi qu'une matrice de réparation permettant le remplacement d'une portion de l'ADN bactérien ciblée par Cas9 par une séquence d'intérêt. La toxicité du système est limitée en plaçant *cas9* et/ou la (les) cassette(s) d'expression d'ARNg sous contrôle de promoteurs inductibles. Les inventeurs ont récemment amélioré cet outil en permettant d'augmenter très significativement l'efficacité de transformation et donc l'obtention, en nombre et quantité utile (en particulier dans un contexte de sélection de souches robustes pour une production à l'échelle industrielle), de bactéries génétiquement modifiées d'intérêt (cf. FR 18/54835). Dans cet outil amélioré au moins un acide nucléique comprend une séquence codant une protéine anti-CRISPR (« acr »), placée sous le contrôle d'un promoteur inductible. Cette protéine anti-CRISPR permet de réprimer l'activité du complexe endonucléase d'ADN/ARN guide. L'expression de la protéine est régulée pour permettre son expression uniquement pendant l'étape de transformation de la bactérie.

Par bactérie appartenant au phylum des Firmicutes on entend, dans le contexte de la présente description, les bactéries appartenant à la classe des *Clostridia*, *Mollicutes*, *Bacilli* ou des *Togobacteria*, de préférence à la classe des *Clostridia* ou des *Bacilli*.

Des bactéries particulières appartenant au phylum des Firmicutes comprennent par exemple les bactéries du genre *Clostridium*, les bactéries du genre *Bacillus* ou les bactéries du genre *Lactobacillus*.

Par « bactérie du genre *Bacillus* », on entend en particulier *B. amyloliquefaciens*, *B. thurigiensis*, *B. coagulans*, *B. cereus*, *B. anthracis* ou encore *B. subtilis*.

Par « bactérie du genre *Clostridium* », on entend en particulier les espèces de *Clostridium* dites d'intérêt industriel, typiquement les bactéries solvantogènes ou acétogènes du genre *Clostridium*. L'expression « bactérie du genre *Clostridium* » englobe les bactéries sauvages ainsi que les souches dérivées de celles-ci, modifiées génétiquement dans le but d'améliorer leur performance (par exemple surexprimant les gènes *ctfA*, *ctfB* et *adc*) sans avoir été exposées au système CRISPR.

Par « espèce de *Clostridium* d'intérêt industriel » on entend les espèces capables de produire, par fermentation, des solvants et des acides tels que l'acide butyrique ou l'acide acétique, à partir de sucres ou d'oses, typiquement à partir de sucres comprenant 5 atomes de carbone tels que le xylose, l'arabinose ou le fructose, de sucres comprenant 6 atomes de carbones tels que le glucose ou le mannose, de polysides tels que la cellulose ou les hémicelluloses et/ou de toute autre source de carbone assimilable et utilisable par les bactéries du genre *Clostridium* (CO, CO₂, et méthanol par exemple). Des exemples de bactéries solvantogènes d'intérêt sont les bactéries du genre *Clostridium* productrices d'acétone, de butanol, d'éthanol et/ou d'isopropanol, telles que les souches identifiées dans la littérature en tant que « souche ABE » [souches réalisant des fermentations permettant la production d'acétone, de butanol et d'éthanol] et « souche IBE » [souches réalisant des fermentations permettant la production d'isopropanol (par réduction de l'acétone), de butanol et d'éthanol]. Des bactéries solvantogènes du genre *Clostridium* peuvent être sélectionnées par exemple parmi *C. acetobutylicum*, *C. cellulolyticum*, *C. phytofermentans*, *C. beijerinckii*, *C. saccharobutylicum*, *C. saccharoperbutylacetonicum*, *C. sporogenes*, *C. butyricum*, *C. aurantibutyricum* et *C. tyrobutyricum*, de manière préférée parmi *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. butyricum*, *C. tyrobutyricum* et *C. cellulolyticum*, et de manière encore plus préférée parmi *C. acetobutylicum* et *C. beijerinckii*.

Les bactéries du genre *Clostridium* naturellement productrice d'isopropanol, typiquement possédant dans leur génome un gène *adh* codant une alcool-déshydrogénase primaire/secondaire qui permet la réduction de l'acétone en isopropanol, se distinguent à la fois génétiquement et fonctionnellement des bactéries capables à l'état naturel d'une fermentation ABE.

Les inventeurs sont avantageusement parvenus, dans le contexte de la présente invention, à modifier génétiquement une bactérie du genre *Clostridium* naturellement productrice d'isopropanol, la bactérie *C. beijerinckii* DSM 6423, ainsi que la souche de référence *C. acetobutylicum* DSM 792.

Les inventeurs décrivent ainsi, pour la première fois, une bactérie solvantogène du genre *Clostridium* naturellement (i.e. à l'état sauvage) capable de produire de l'isopropanol, en particulier naturellement capable d'effectuer une fermentation IBE, qui a été modifiée génétiquement, ainsi que les outils, en particulier les outils génétiques, ayant permis son obtention. Ces outils présentent l'avantage de faciliter considérablement la transformation et la modification génétique des bactéries capables, à l'état sauvage, de produire de l'isopropanol, en particulier d'effectuer une fermentation IBE, en particulier celles porteuses d'un gène codant une enzyme responsable de la résistance à un antibiotique.

Une partie des travaux décrits dans la partie expérimentale ont été réalisés au sein d'une souche capable de fermentation IBE, i.e. la souche *C. beijerinckii* DSM 6423 dont le génome et une analyse transcriptomique ont été décrits récemment par les inventeurs (Máté de Gerando *et al.*, 2018).

Lors de l'assemblage du génome de cette souche, les inventeurs ont en particulier découvert, en plus du chromosome, la présence d'éléments génétiques mobiles (numéro d'accension PRJEB11626 - <https://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/PRJEB11626>): deux plasmides naturels (pNF1 et pNF2) et un bactériophage linéaire (Φ 6423).

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, les inventeurs sont parvenus à supprimer de la souche *C. beijerinckii* DSM 6423 son plasmide naturel pNF2.

Dans un autre mode de réalisation particulier, ils sont parvenus à supprimer le gène *upp* à l'origine présent sur le chromosome de la souche *C. beijerinckii* DSM 6423. Ces expériences démontrent ainsi l'utilisation possible des outils et plus généralement de la technologie décrite dans le présent texte par les inventeurs pour modifier génétiquement une bactérie capable, à l'état sauvage, de produire de l'isopropanol, en particulier d'effectuer une fermentation IBE.

Dans un mode de réalisation particulièrement avantageux, les inventeurs sont en particulier parvenus à rendre sensible à un amphotéricol, une bactérie naturellement porteuse (porteuse à l'état sauvage) d'un gène codant une enzyme responsable de la résistance à ces antibiotiques.

Des exemples d'amphotéricols d'intérêt dans le contexte de l'invention sont le chloramphotéricol, le thiamphotéricol, l'azidamphotéricol et le florphotéricol (Schwarz S. *et al.*, 2004), en particulier le chloramphotéricol et le thiamphotéricol.

Un premier aspect de l'invention concerne ainsi un outil génétique utilisable pour transformer et/ou modifier génétiquement une bactérie d'intérêt, typiquement une bactérie telle que décrite dans le présent texte appartenant au phylum des Firmicutes, par exemple une bactérie du genre *Clostridium*, du genre *Bacillus* ou du genre *Lactobacillus*, de préférence une bactérie solvantogène du genre *Clostridium* naturellement (i.e. à l'état sauvage) capable de produire de l'isopropanol, en particulier naturellement capable d'effectuer une fermentation IBE, de préférence une bactérie résistante naturellement à un ou plusieurs antibiotiques, telle qu'une bactérie *C. beijerinckii*. Une bactérie préférée possède à l'état

sauvage à la fois un chromosome bactérien et au moins une molécule d'ADN distincte de l'ADN chromosomique.

Selon un aspect particulier, cet outil génétique consiste en un acide nucléique (également identifié dans le présent texte en tant que « acide nucléique d'intérêt ») reconnaissant (liant au moins en partie), et de préférence ciblant, i.e. reconnaissant et permettant la coupure, dans le génome d'une bactérie d'intérêt, d'au moins un brin i) d'une séquence codant une enzyme permettant à la bactérie d'intérêt de croître dans un milieu de culture contenant un antibiotique vis-à-vis duquel elle lui confère une résistance, ii) d'une séquence contrôlant la transcription d'une séquence codant une enzyme permettant à la bactérie d'intérêt de croître dans un milieu de culture contenant un antibiotique vis-à-vis duquel elle lui confère une résistance, ou iii) d'une séquence flanquant une séquence codant une enzyme permettant à la bactérie d'intérêt de croître dans un milieu de culture contenant un antibiotique vis-à-vis duquel elle lui confère une résistance. Cet acide nucléique d'intérêt est utilisé typiquement dans le contexte de la présente invention pour supprimer la séquence reconnue du génome de la bactérie ou pour modifier son expression, par exemple pour moduler/réguler son expression, en particulier l'inhiber, de préférence pour la modifier de manière à rendre ladite bactérie incapable d'exprimer une protéine, en particulier une protéine fonctionnelle, à partir de ladite séquence. La séquence reconnue est également identifiée dans le présent texte en tant que « séquence cible » ou « séquence ciblée ».

Dans un mode de réalisation particulier, l'acide nucléique d'intérêt comprend au moins une région complémentaire de la séquence cible identique à 100% ou identique à 80% au moins, de préférence à 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% au moins à la région/portion/séquence d'ADN ciblée au sein du génome bactérien et est capable de s'hybrider à tout ou partie de la séquence complémentaire de ladite région/portion/séquence, typiquement à une séquence comprenant au moins 1 nucléotide, de préférence au moins 1, 2, 3, 4, 5, 10, 14, 15, 20, 25, 30, 35 ou 40 nucléotides, typiquement entre 1, 10 ou 20 et 1000 nucléotides, par exemple entre 1, 10 ou 20 et 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300 ou 200 nucléotides, entre 1, 10 ou 20 et 100 nucléotides, entre 1, 10 ou 20 et 50 nucléotides, ou entre 1, 10 ou 20 et 40 nucléotides, par exemple entre 10 et 40 nucléotides, entre 10 et 30 nucléotides, entre 10 et 20 nucléotides, entre 20 et 30 nucléotides, entre 15 et 40 nucléotides, entre 15 et 30 nucléotides ou entre 15 et 20 nucléotides, de préférence à une séquence comprenant 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30 nucléotides. La région complémentaire de la séquence cible présente au sein de l'acide nucléique d'intérêt peut correspondre à la région « SDS » d'un ARN guide (ARNg) utilisé dans un outil CRISPR tel que décrit dans le présent texte.

Dans un autre mode de réalisation particulier, l'acide nucléique d'intérêt comprend au moins deux régions complémentaires chacune d'une séquence cible, identiques à 100% ou identiques à 80% au moins, de préférence à 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% au moins à ladite région/portion/séquence d'ADN ciblée au sein du génome bactérien. Ces régions sont capables de s'hybrider à tout ou partie de la séquence complémentaire de ladite région/portion/séquence, typiquement à une séquence telle que décrite ci-dessus comprenant au moins 1 nucléotide, de préférence

au moins 100 nucléotides, typiquement entre 100 et 1000 nucléotides. Les régions complémentaires de la séquence cible présentes au sein de l'acide nucléique d'intérêt peuvent reconnaître, de préférence cibler, les régions flanquantes en 5' et en 3' de la séquence ciblée dans un outil de modification génétique tel que décrit dans le présent texte, par exemple l'outil génétique ClosTron®, l'outil génétique Targetron® ou un outil d'échange allélique type ACE®.

Typiquement, la séquence cible est une séquence codant une amphénicol-O-acetyltransférase, par exemple une chloramphénicol-O-acetyltransférase ou une thiamphénicol-O-acetyltransférase, contrôlant la transcription d'une telle séquence ou flanquant une telle séquence, au sein du génome d'une bactérie d'intérêt du genre *Clostridium* capable de croître dans un milieu de culture contenant un ou plusieurs antibiotiques appartenant à la classe des amphénicols, par exemple du chloramphénicol et/ou du thiamphénicol.

Dans un mode de réalisation particulier, la séquence reconnue est la séquence SEQ ID NO : 18 correspondant au gène *catB* (CIBE_3859) codant une chloramphénicol-O-acetyltransférase de *C. beijerinckii* DSM 6423 ou une séquence d'acides aminés identique à au moins 70%, 75%, 80%, 85%, 90% ou 95% à ladite chloramphénicol-O-acetyltransférase, ou une séquence comprenant tout ou au moins 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de la séquence SEQ ID NO : 18. Autrement formulé, la séquence reconnue peut être une séquence comprenant au moins 1 nucléotide, de préférence au moins 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 ou 40 nucléotides, typiquement entre 1 et 40 nucléotides, de préférence une séquence comprenant 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30 nucléotides de la séquence SEQ ID NO : 18.

Des exemples de séquences d'acides aminés identiques à au moins 70% à la chloramphénicol-O-acetyltransférase codée par la séquence SEQ ID NO : 18 correspondent aux séquences identifiées dans la base de données NCBI sous les références suivantes : WP_077843937.1, SEQ ID NO : 44 (WP_063843219.1), SEQ ID NO : 45 (WP_078116092.1), SEQ ID NO : 46 (WP_077840383.1), SEQ ID NO : 47 (WP_077307770.1), SEQ ID NO : 48 (WP_103699368.1), SEQ ID NO : 49 (WP_087701812.1), SEQ ID NO : 50 (WP_017210112.1), SEQ ID NO : 51 (WP_077831818.1), SEQ ID NO : 52 (WP_012059398.1), SEQ ID NO : 53 (WP_077363893.1), SEQ ID NO : 54 (WP_015393553.1), SEQ ID NO : 55 (WP_023973814.1), SEQ ID NO : 56 (WP_026887895.1), SEQ ID NO : 57 (AWK51568.1), SEQ ID NO : 58 (WP_003359882.1), SEQ ID NO : 59 (WP_091687918.1), SEQ ID NO : 60 (WP_055668544.1), SEQ ID NO : 61 (KGK90159.1), SEQ ID NO : 62 (WP_032079033.1), SEQ ID NO : 63 (WP_029163167.1), SEQ ID NO : 64 (WP_017414356.1), SEQ ID NO : 65 (WP_073285202.1), SEQ ID NO : 66 (WP_063843220.1), et SEQ ID NO : 67 (WP_021281995.1).

Des exemples de séquences d'acides aminés identiques à au moins 75% à la chloramphénicol-O-acetyltransférase codée par la séquence SEQ ID NO : 18 correspondent aux séquences

WP_077843937.1, WP_063843219.1, WP_078116092.1, WP_077840383.1, WP_077307770.1, WP_103699368.1, WP_087701812.1, WP_017210112.1, WP_077831818.1, WP_012059398.1, WP_077363893.1, WP_015393553.1, WP_023973814.1, WP_026887895.1 AWK51568.1, WP_003359882.1, WP_091687918.1, WP_055668544.1 et KGK90159.1.

Des exemples de séquences d'acides aminés identiques à au moins 90% à la chloramphénicol-O-acetyltransférase codée par la séquence SEQ ID NO : 18, sont les séquences WP_077843937.1, WP_063843219.1, WP_078116092.1, WP_077840383.1, WP_077307770.1, WP_103699368.1, WP_087701812.1, WP_017210112.1, WP_077831818.1, WP_012059398.1, WP_077363893.1, WP_015393553.1, WP_023973814.1, WP_026887895.1 et AWK51568.1.

Des exemples de séquences d'acides aminés identiques à au moins 95% à la chloramphénicol-O-acetyltransférase codée par la séquence SEQ ID NO : 18 correspondent aux séquences WP_077843937.1, WP_063843219.1, WP_078116092.1, WP_077840383.1, WP_077307770.1, WP_103699368.1, WP_087701812.1, WP_017210112.1, WP_077831818.1, WP_012059398.1, WP_077363893.1, WP_015393553.1, WP_023973814.1, et WP_026887895.1.

Des séquences d'acides aminés préférées, identiques à au moins 99% à la chloramphénicol-O-acetyltransférase codée par la séquence SEQ ID NO : 18, sont les séquences WP_077843937.1, SEQ ID NO : 44 (WP_063843219.1) et SEQ ID NO : 45 (WP_078116092.1).

Une séquence particulière identique à la séquence SEQ ID NO : 18 est la séquence identifiée dans la base de données NCBI sous la référence WP_077843937.1.

Dans un mode de réalisation particulier, la séquence cible est la séquence SEQ ID NO : 68 correspondant au gène *catQ* codant une chloramphénicol-O-acetyltransférase de *C. perfringens* dont la séquence d'acides aminés correspond à SEQ ID NO : 66 (WP_063843220.1), ou une séquence identique à au moins 70%, 75%, 80%, 85%, 90% ou 95% à ladite chloramphénicol-O-acetyltransférase, ou une séquence comprenant tout ou au moins 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de la séquence SEQ ID NO : 68.

Autrement formulé, la séquence reconnue peut être une séquence comprenant au moins 1 nucléotide, de préférence au moins 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 ou 40 nucléotides, typiquement entre 1 et 40 nucléotides, de préférence une séquence comprenant 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30 nucléotides de la séquence SEQ ID NO : 68.

Dans encore un autre mode de réalisation particulier, la séquence reconnue est sélectionnée parmi une séquence d'acide nucléique *catB* (SEQ ID NO : 18), *catQ* (SEQ ID NO : 68), *catD* (SEQ ID NO : 69, Schwarz S. *et al.*, 2004) ou *catP* (SEQ ID NO : 70, Schwarz S. *et al.*, 2004) connue de l'homme du métier, présente naturellement au sein d'une bactérie du genre *Clostridium* ou introduite artificiellement dans une telle bactérie.

Comme indiqué précédemment, selon un autre mode de réalisation, la séquence cible peut aussi être une séquence contrôlant la transcription d'une séquence codante telle que décrite précédemment (codant une enzyme permettant à la bactérie d'intérêt de croître dans un milieu de culture contenant un antibiotique vis-à-vis duquel elle lui confère une résistance), typiquement une séquence promotrice, par exemple la séquence promotrice (SEQ ID NO : 73) du gène *catB* ou celle (SEQ ID NO : 74) du gène *catQ*.

L'acide nucléique d'intérêt, utilisé comme outil génétique, reconnaît alors, et est donc typiquement capable de se lier à une séquence contrôlant la transcription d'une séquence codante telle que décrite précédemment.

Selon un autre mode de réalisation, la séquence cible peut être une séquence flanquant une séquence codante telle que décrite précédemment (codant une enzyme permettant à la bactérie d'intérêt de croître dans un milieu de culture contenant un antibiotique vis-à-vis duquel elle lui confère une résistance), par exemple une séquence flanquant le gène *catB* de séquence SEQ ID NO : 18 ou une séquence identique à au moins 70% à celle-ci. Une telle séquence flanquante comprend typiquement 1, 10 ou 20 et 1000 nucléotides, par exemple entre 1, 10 ou 20 et 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300 ou 200 nucléotides, entre 1, 10 ou 20 et 100 nucléotides, entre 1, 10 ou 20 et 50 nucléotides, ou entre 1, 10 ou 20 et 40 nucléotides, par exemple entre 10 et 40 nucléotides, entre 10 et 30 nucléotides, entre 10 et 20 nucléotides, entre 20 et 30 nucléotides, entre 15 et 40 nucléotides, entre 15 et 30 nucléotides ou entre 15 et 20 nucléotides.

Selon un aspect particulier, la séquence cible correspond à la paire de séquences flanquant une telle séquence codante, chaque séquence flanquante comprenant typiquement au moins 20 nucléotides, typiquement entre 100 et 1000 nucléotides, de préférence entre 200 et 800 nucléotides.

Par « acide nucléique », on entend au sens de l'invention, toute molécule d'ADN ou d'ARN naturelle, synthétique, semi-synthétique ou recombinante, éventuellement modifiée chimiquement (i.e. comprenant des bases non naturelles, des nucléotides modifiés comprenant par exemple une liaison modifiée, des bases modifiées et/ou des sucres modifiés), ou optimisée de manière à ce que les codons des transcrits synthétisés à partir des séquences codantes soient les codons les plus fréquemment trouvés chez une bactérie du genre *Clostridium* en vue de son utilisation chez celle-ci. Dans le cas du genre *Clostridium*, les codons optimisés sont typiquement des codons riches en bases adénines (« A ») et thymines (« T »).

Dans les séquences peptidiques décrites dans ce document, les acides aminés sont représentés par leur code à une lettre selon la nomenclature suivante : C : cystéine; D : acide aspartique; E : acide glutamique; F : phénylalanine; G : glycine; H : histidine; I : isoleucine; K : lysine; L : leucine ; M : méthionine ; N : asparagine ; P : proline ; Q : glutamine ; R : arginine ; S : sérine ; T : thréonine ; V : valine ; W : tryptophane et Y : tyrosine.

Dans le contexte de la présente invention, l'acide nucléique d'intérêt, utilisé comme outil génétique pour transformer et/ou modifier génétiquement une bactérie d'intérêt, est un fragment d'ADN i)

reconnaissant une séquence codant, ii) contrôlant la transcription d'une séquence codant, ou iii) flanquant une séquence codant, une enzyme d'intérêt, de préférence une amphénicol-O-acetyltransférase, par exemple une chloramphénicol-O-acetyltransférase ou une thiamphénicol-O-acetyltransférase, au sein du génome d'une bactérie du genre *Clostridium*, en particulier d'une bactérie solvantogène du genre *Clostridium* naturellement capable de produire de l'isopropanol, en particulier naturellement capable d'effectuer une fermentation IBE.

La bactérie capable de produire naturellement de l'isopropanol peut être par exemple une bactérie sélectionnée parmi une bactérie *C. beijerinckii*, une bactérie *C. diolis*, une bactérie *C. puniceum*, une bactérie *C. butyricum*, une bactérie *C. saccharoperbutylacetonicum*, une bactérie *C. botulinum*, une bactérie *C. drakei*, une bactérie *C. scatologenes*, une bactérie *C. perfringens*, et une bactérie *C. tunisiense*, de préférence une bactérie sélectionnée parmi une bactérie *C. beijerinckii*, une bactérie *C. diolis*, une bactérie *C. puniceum* et une bactérie *C. saccharoperbutylacetonicum*. Une bactérie capable de produire de l'isopropanol à l'état sauvage particulièrement préférée est une bactérie *C. beijerinckii*.

Selon un aspect particulier, la bactérie du genre *Clostridium* est une bactérie *C. beijerinckii* dont le sous-clade est sélectionnée parmi DSM 6423, LMG 7814, LMG 7815, NCCB 27006 et un sous-clade présentant au moins 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% d'identité avec la souche DSM 6423.

Comme indiqué précédemment, l'acide nucléique d'intérêt selon l'invention est capable de supprimer la séquence (« séquence cible ») reconnue du génome de la bactérie ou de modifier son expression, par exemple de la moduler, en particulier de l'inhiber, de préférence de la modifier de manière à rendre ladite bactérie incapable d'exprimer une protéine, de préférence une amphénicol-O-acetyltransférase, en particulier une protéine fonctionnelle, à partir de ladite séquence.

Cet acide nucléique d'intérêt se présente typiquement sous la forme d'une cassette d'expression (ou « construction ») telle que par exemple un acide nucléique comprenant un promoteur transcriptionnel lié de manière opérationnelle (au sens où l'entend l'homme du métier) à une ou plusieurs séquences (codantes) d'intérêt, par exemple un opéron comprenant plusieurs séquences codantes d'intérêt dont les produits d'expression concourent à la réalisation d'une fonction d'intérêt au sein de la bactérie, ou un acide nucléique comprenant en outre une séquence activatrice et/ou un terminateur de transcription ; ou sous la forme d'un vecteur, circulaire ou linéaire, simple ou double brin, par exemple un plasmide, un phage, un cosmide, un chromosome artificiel ou synthétique, comprenant une ou plusieurs cassettes d'expression telles que définies ci-dessus. De manière préférée, le vecteur est un plasmide.

Les acides nucléiques d'intérêt, typiquement les cassettes ou vecteurs, peuvent être construits par des techniques classiques bien connues de l'homme du métier et peuvent comporter un(e) ou plusieurs promoteurs, origines de répllication bactérienne (séquences ORI), séquences de terminaison, gènes de sélection, par exemple gènes de résistance à un antibiotique, et séquence(s) (par exemple « région(s) »).

flanquée(s) ») permettant l'insertion ciblée de la cassette ou du vecteur. Par ailleurs, ces cassettes et vecteurs d'expression peuvent être intégrés au sein du génome par des techniques bien connues de l'homme du métier.

Des séquences ORI d'intérêt peuvent être choisies parmi pIP404, pAM β 1, pCB102, repH (origine de réplication chez *C. acetobutylicum*), ColE1 ou rep (origine de réplication chez *E. coli*), ou toute autre origine de réplication permettant le maintien du vecteur, typiquement du plasmide, au sein d'une cellule de *Clostridium*.

Des séquences de terminaison d'intérêt peuvent être choisies parmi celles des gènes *adc*, *thl*, de l'opéron *bcs*, ou de tout autre terminateur, bien connu de l'homme de l'art, permettant l'arrêt de la transcription au sein de *Clostridium*.

Des gènes de sélection (gènes de résistance) d'intérêt peuvent être choisis parmi *ermB*, *catP*, *bla*, *tetA*, *tetM*, et/ou tout autre gène de résistance à l'ampicilline, à l'érythromycine, au chloramphénicol, au thiamphénicol, à la tétracycline ou à tout autre antibiotique pouvant être utilisé pour sélectionner des bactéries du genre *Clostridium* bien connu de l'homme de l'art.

Dans un mode de réalisation particulier où la séquence reconnue codant une enzyme est une séquence conférant à la bactérie une résistance au chloramphénicol et/ou au thiamphénicol, le gène de sélection utilisé n'est pas un gène de résistance au chloramphénicol et/ou au thiamphénicol, et n'est de préférence aucun des gènes *catB*, *catQ*, *catD* ou *catP*.

Dans un mode de réalisation particulier, l'acide nucléique d'intérêt comprend un ou plusieurs ARN guides (ARNg) ciblant une séquence (« séquence cible », « séquence ciblée » ou « séquence reconnue ») codant, contrôlant la transcription d'une séquence codant, ou flanquant une séquence codant, une enzyme d'intérêt, en particulier une amphénicol-O-acetyltransférase, et/ou une matrice de modification (également identifiée dans le présent texte en tant que « matrice d'édition »), par exemple une matrice permettant d'éliminer ou de modifier tout ou partie de la séquence cible, de préférence dans le but d'inhiber ou supprimer l'expression de la séquence cible, typiquement une matrice comprenant des séquences homologues (correspondant) aux séquences situées en amont et en aval de la séquence cible telles que décrites précédemment, typiquement des séquences (homologues auxdites séquences situées en amont et en aval de la séquence cible) comprenant chacune entre 10 ou 20 paires de base et 1000, 1500 ou 2000 paires de base, par exemple entre 100, 200, 300, 400 ou 500 paires de base et 1000, 1200, 1300, 1400 ou 1500 paires de base, de préférence entre 100 et 1500 ou entre 100 et 1000 paires de bases, et de manière encore plus préférée entre 500 et 1000 paires de base ou entre 200 et 800 paires de base.

Un acide nucléique d'intérêt particulier se présente sous la forme d'un vecteur comprenant une ou plusieurs cassettes d'expression, chaque cassette codant au moins un ARN guide (ARNg).

Un outil génétique particulier selon l'invention comprend plusieurs (au moins deux) acides nucléiques d'intérêt tels que décrits précédemment, lesdits acides nucléiques d'intérêt étant différents les uns des autres.

Dans un mode de réalisation particulier, l'acide nucléique d'intérêt utilisé comme outil génétique pour transformer et/ou modifier génétiquement une bactérie d'intérêt, typiquement une bactérie du genre *Clostridium*, est un acide nucléique reconnaissant une séquence codant, une séquence contrôlant la transcription, ou une séquence flanquant, une séquence codant une enzyme conférant à la bactérie la résistance à un ou plusieurs antibiotiques, et capable de supprimer ladite séquence au sein du génome de cette bactérie ou de la rendre non fonctionnelle, en particulier un acide nucléique ne présentant pas de méthylation aux niveaux des motifs reconnus par les méthyltransférases de type Dam et Dcm (préparé à partir d'une bactérie *Escherichia coli* présentant le génotype *dam⁻ dcm⁻*).

Lorsque la bactérie d'intérêt à transformer et/ou modifier génétiquement est une bactérie *C. beijerinckii*, en particulier appartenant à l'un des sous-clades DSM 6423, LMG 7814, LMG 7815, NRRL B-593 et NCCB 27006, l'acide nucléique d'intérêt utilisé comme outil génétique, par exemple le plasmide, est un acide nucléique ne présentant pas de méthylation aux niveaux des motifs reconnus par les méthyltransférases de type Dam et Dcm, typiquement un acide nucléique dont l'adénosine (« A ») du motif GATC et/ou la deuxième cytosine « C » du motif CCWGG (W pouvant correspondre à une adénosine (« A ») ou à une thymine (« T »)) sont déméthylés.

Un acide nucléique ne présentant pas de méthylation aux niveaux des motifs reconnus par les méthyltransférases de type Dam et Dcm peut typiquement être préparé à partir d'une bactérie *Escherichia coli* présentant le génotype *dam⁻ dcm⁻* (par exemple *Escherichia coli* INV 110, Invitrogen). Ce même acide nucléique peut comporter d'autres méthylations réalisées par exemple par des méthyltransférases de type EcoKI, cette dernière visant les adénines (« A ») des motifs AAC(N6)GTGC et GCAC(N6)GTT (N pouvant correspondre à n'importe quel base).

Dans un mode de réalisation préféré, la séquence ciblée correspond à un gène codant une amphénicol-O-acetyltransférase par exemple une chloramphénicol-O-acetyltransférase tel que le gène *catB*, à une séquence contrôlant la transcription de ce gène, ou à une séquence flanquant ce gène.

Un acide nucléique d'intérêt particulier utilisé comme outil génétique dans le cadre de l'invention est par exemple un vecteur, de préférence un plasmide, par exemple le plasmide pCas9ind- Δ *catB* de séquence SEQ ID NO : 21 ou le plasmide pCas9ind-gRNA-*catB* de séquence SEQ ID NO : 38 décrit dans la partie expérimentale de la présente description, en particulier une version de ladite séquence ne présentant pas de méthylation au niveau des motifs reconnus par les méthyltransférases de type Dam et Dcm.

La présente description concerne aussi l'utilisation d'un acide nucléique d'intérêt tel que décrit dans le présent texte pour transformer et/ou modifier génétiquement une bactérie d'intérêt, en particulier une bactérie solvantogène du genre *Clostridium* capable à l'état sauvage de produire de l'isopropanol, en particulier capable à l'état sauvage d'effectuer une fermentation IBE.

Une bactérie capable de produire de l'isopropanol à l'état sauvage, en particulier capable d'effectuer une fermentation IBE à l'état sauvage, peut être par exemple une bactérie sélectionnée parmi une bactérie *C. beijerinckii*, une bactérie *C. diolis*, une bactérie *C. puniceum*, une bactérie *C. butyricum*, une bactérie *C. saccharoperbutylacetonicum*, une bactérie *C. botulinum*, une bactérie *C. drakei*, une bactérie *C. scatologenes*, une bactérie *C. perfringens*, et une bactérie *C. tunisiense*, de préférence une bactérie sélectionnée parmi une bactérie *C. beijerinckii*, une bactérie *C. diolis*, une bactérie *C. puniceum* et une bactérie *C. saccharoperbutylacetonicum*.

Une bactérie (naturellement) capable de produire de l'isopropanol à l'état sauvage, en particulier capable d'effectuer une fermentation IBE à l'état sauvage, particulièrement préférée est une bactérie *C. beijerinckii*.

Les bactéries acétogènes d'intérêt sont des bactéries productrices d'acides et/ou de solvants à partir de CO₂ et H₂. Des bactéries acétogènes du genre *Clostridium* peuvent être sélectionnées par exemple parmi *C. aceticum*, *C. thermoaceticum*, *C. ljungdahlii*, *C. autoethanogenum*, *C. difficile*, *C. scatologenes* et *C. carboxydvorans*.

Dans un mode de réalisation particulier, la bactérie du genre *Clostridium* concernée est une « souche ABE », de préférence la souche DSM 792 (également désignée souche ATCC 824 ou encore LMG 5710) de *C. acetobutylicum*, ou la souche NCIMB 8052 de *C. beijerinckii*.

Dans un autre mode de réalisation particulier, la bactérie du genre *Clostridium* concernée est une « souche IBE », typiquement l'une des bactéries *C. beijerinckii* identifiées dans la présente description, par exemple une bactérie *C. beijerinckii* dont le sous-clade est sélectionnée parmi DSM 6423, LMG 7814, LMG 7815, NRRL B-593, NCCB 27006, ou une bactérie *C. aurantibutyricum* DSZM 793 (Georges *et al.*, 1983), et un sous-clade d'une telle bactérie *C. beijerinckii* ou *C. aurantibutyricum* présentant au moins 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% d'identité avec la souche DSM 6423. Une bactérie *C. beijerinckii*, ou un sous-clade de bactérie *C. beijerinckii*, particulièrement préféré(e) est dépourvu(e) du plasmide pNF2.

Les génomes respectifs des sous-clades LMG 7814, LMG 7815, NRRL B-593 et NCCB 27006 d'une part, et DSZM 793 d'autre part, présentent des pourcentages d'identité de séquence d'au moins 97% avec le génome du sous-clade DSM 6423.

Les inventeurs ont réalisé des tests fermentaires confirmant que les bactéries *C. beijerinckii* de sous-clade DSM 6423, LMG 7815 et NCCB 27006 sont capables de produire de l'isopropanol à l'état sauvage (cf. tableau 1).

[Tableau 1]

	Fermentation (g/L)								Glucose consommé (g/L)	Rendement
	Glucose	Ac. Acétique	Ac. Butyrique	Ethanol	Acétone	Isopropanol	Butanol	Autres		
Contrôle	56,19	2,1806	0	-	-	-	-	0,00		
DSM 6423_A	31,70	0	0	0,16	0,24	3,72	8,18	10,11	24,50	0,41
DSM 6423_B	29,08	0	0	0,18	0,23	4,33	6,94	11,50	27,12	0,42
LMG_7815_A	27,65	0,93	0,73	0,16	0,35	3,93	7,38	11,56	28,96	0,40
LMG_7815_B	27,20	0,63	0,73	0,18	0,29	4,30	7,63	12,22	28,70	0,43
NCCB 27006_A	36,38	0,98	1,08	0,13	0,15	2,83	5,23	8,18	19,93	0,41
NCCB 27006_B	36,10	1,08	1,27	0,13	0,15	2,70	5,17	8,02	20,10	0,40

Bilan des essais de fermentation de glucose à l'aide des souches naturellement productrices d'isopropanol *C. beijerinckii* DSM 6423, LMG 7815 et NCCB 27006.

Dans un mode de réalisation particulièrement préféré de l'invention, la bactérie *C. beijerinckii* est la bactérie de sous-clade DSM 6423.

Dans encore un autre mode de réalisation préféré de l'invention, la bactérie *C. beijerinckii* est une souche *C. beijerinckii* IFP963 $\Delta catB$ $\Delta pNF2$ (enregistrée le 20 février 2019 sous le numéro de dépôt LMG P-31277 auprès de la collection BCCM-LMG, et également identifiée dans le présent texte en tant que *C. beijerinckii* DSM 6423 $\Delta catB$ $\Delta pNF2$).

La bactérie destinée à être transformée, et de préférence modifiée génétiquement, est selon un mode de réalisation particulier une bactérie qui a été exposée à une première étape de transformation et à une première étape de modification génétique à l'aide d'un acide nucléique ou outil génétique selon l'invention ayant permis de supprimer au moins une molécule d'ADN extrachromosomique (typiquement au moins un plasmide) naturellement présente au sein de ladite bactérie à l'état sauvage.

Un autre aspect décrit par les inventeurs a trait à un procédé pour transformer, et de préférence en outre modifier génétiquement, une bactérie du genre *Clostridium* à l'aide d'un outil génétique selon l'invention, typiquement à l'aide d'un acide nucléique d'intérêt selon l'invention tel que décrit plus haut. Ce procédé comprend une étape de transformation de la bactérie par introduction dans ladite bactérie de l'acide nucléique d'intérêt décrit dans le présent texte. Le procédé peut comprendre en outre une étape d'obtention, de récupération, de sélection ou d'isolement de la bactérie transformée, i.e. de la bactérie présentant la ou les recombinaisons/modifications/optimisations recherchées.

Dans un mode de réalisation particulier, le procédé pour transformer, et de préférence modifier génétiquement, une bactérie du genre *Clostridium* fait intervenir un outil de modification génétique par exemple un outil de modification génétique sélectionné parmi un outil CRISPR, un outil basé sur l'utilisation d'introns de type II (par exemple l'outil Targetron® ou l'outil ClosTron®) et un outil d'échange allélique (par exemple l'outil ACE®), et comprend une étape de transformation de la bactérie par introduction dans ladite bactérie d'un acide nucléique d'intérêt selon l'invention tel que décrit plus haut.

La présente invention est typiquement avantageusement mise en œuvre dès lors que l'outil de modification génétique sélectionné pour transformer, et de préférence modifier génétiquement, une bactérie du genre *Clostridium*, est destiné à être utilisé sur une bactérie telle que *C. beijerinckii*, porteuse à l'état sauvage d'un gène codant une enzyme responsable de la résistance à un ou plusieurs antibiotiques, et que la mise en œuvre dudit outil génétique comprend une étape de transformation de ladite bactérie à l'aide d'un acide nucléique permettant l'expression d'un marqueur de résistance à un antibiotique auquel cette bactérie est résistante à l'état sauvage et/ou une étape de sélection des bactéries transformées et/ou modifiées génétiquement à l'aide dudit antibiotique (auquel la bactérie est résistante à l'état sauvage).

Une modification avantageusement réalisable grâce à la présente invention, par exemple à l'aide d'un outil de modification génétique sélectionné parmi un outil CRISPR, un outil basé sur l'utilisation d'introns de type II et un outil d'échange allélique, consiste à supprimer une séquence codant une enzyme conférant à la bactérie la résistance à un ou plusieurs antibiotiques, ou à rendre cette séquence non fonctionnelle. Une autre modification avantageusement réalisable grâce à la présente invention consiste à modifier génétiquement une bactérie afin d'améliorer ses performances, par exemple ses performances dans la production d'un solvant ou d'un mélange de solvants d'intérêt, ladite bactérie ayant préalablement déjà été modifiée grâce à l'invention pour la rendre sensible à un antibiotique auquel elle était résistante à l'état sauvage.

Dans un mode de réalisation préféré, le procédé selon l'invention est basé sur l'utilisation de (met en œuvre) la technologie / l'outil génétique CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), en particulier l'outil génétique CRISPR/Cas (CRISPR-associated protein).

Cette méthode est basée sur l'emploi d'une enzyme appelée nucléase (typiquement une nucléase de type Cas dans le cas de l'outil génétique CRISPR/Cas, telle que la protéine Cas9 (CRISPR-associated protein 9) de *Streptococcus pyogenes*), qui va, guidée par une molécule d'ARN, réaliser une coupure double brin au sein d'une molécule d'ADN (séquence cible d'intérêt). La séquence de l'ARN guide (ARNg) déterminera le site de coupure de la nucléase, lui conférant ainsi une très forte spécificité. Une coupure double brin au sein d'une molécule d'ADN indispensable à la survie du microorganisme étant de fait létal pour un organisme, la survie de ce dernier dépendra de sa capacité à la réparer (cf. par exemple Cui & Bikard, 2016). Chez les bactéries du genre *Clostridium*, la réparation d'une coupure double brin dépend d'un mécanisme de recombinaison homologue nécessitant une copie intacte de la séquence clivée. En fournissant à la bactérie un fragment d'ADN permettant d'effectuer cette réparation tout en modifiant la séquence originelle, il est possible de forcer le micro-organisme à intégrer les changements désirés au sein de son génome.

La présente invention peut être mise en œuvre sur une bactérie du genre *Clostridium* à l'aide d'un outil génétique CRISPR/Cas classique utilisant un unique plasmide comprenant une nucléase, un ARNg et une matrice de réparation tel que décrit par Wang et al. (2015). Le système CRISPR/Cas contient deux

éléments essentiels distincts, i.e. i) une endonucléase, dans le cas présent la nucléase associée au système CRISPR, Cas, et ii) un ARN guide. L'ARN guide se présente sous la forme d'un ARN chimérique qui consiste en la combinaison d'un ARN bactérien CRISPR (ARN_{Ncr}) et d'un ARN_{tracr} (*trans-activating* ARN CRISPR). L'ARN_g combine la spécificité de ciblage de l'ARN_{Ncr} correspondant aux "séquences espaçantes" qui servent de guides aux protéines Cas, et les propriétés conformationnelles de l'ARN_{tracr} en un transcrit unique. Lorsque l'ARN_g et la protéine Cas sont exprimés simultanément dans la cellule, la séquence génomique cible peut être modifiée de manière permanente grâce à une matrice de réparation fournie. L'homme du métier peut aisément définir la séquence et la structure des ARN_g selon la région chromosomique ou l'élément génétique mobile à cibler en utilisant des techniques bien connues (voir par exemple l'article de DiCarlo *et al.*, 2013).

L'introduction dans la bactérie des éléments (acides nucléiques ou ARN_g) de l'outil génétique est réalisée par toute méthode, directe ou indirecte, connue de l'homme du métier, par exemple par transformation, conjugaison, microinjection, transfection, électroporation, etc., de préférence par électroporation (Mermelstein *et al.*, 1993).

Les inventeurs ont récemment mis au point et décrit un outil génétique de modification de bactéries, adapté aux bactéries du genre *Clostridium* et utilisable dans le contexte de la présente invention, basé sur l'utilisation de deux plasmides (cf. WO2017/064439, Wasels *et al.*, 2017, et Figure 15 associée à la présente description).

Dans un mode de réalisation particulier, le « premier » plasmide de cet outil permet l'expression de la nucléase Cas et un « deuxième » plasmide, spécifique de la modification à effectuer, contient une ou plusieurs cassettes d'expression d'ARN_g (ciblant typiquement des régions différentes de l'ADN bactérien) ainsi qu'une matrice de réparation permettant, par un mécanisme de recombinaison homologue, le remplacement d'une portion de l'ADN bactérien ciblée par Cas par une séquence d'intérêt. Le gène *cas* et/ou la (les) cassette(s) d'expression d'ARN_g sont placés sous le contrôle de promoteurs d'expression constitutifs ou inductibles, de préférence inductibles, connus de l'homme du métier (par exemple décrits dans la demande WO2017/064439 et incorporés par référence à la présente description), et de préférence différents mais inductibles par le même agent inducteur.

Les ARN_g peuvent être des ARN naturels, synthétiques ou produits par des techniques de recombinaison. Ces ARN_g peuvent être préparés par toutes méthodes connues de l'homme du métier telles que, par exemple, la synthèse chimique, la transcription *in vivo* ou des techniques d'amplification. Lorsque plusieurs ARN_g sont utilisés, l'expression de chaque ARN_g peut être contrôlée par un promoteur différent. De préférence, le promoteur utilisé est le même pour tous les ARN_g. Un même promoteur peut dans un mode de réalisation particulier être utilisé pour permettre l'expression de plusieurs, par exemple de quelques-uns seulement, ou en d'autres termes de tout ou partie, des ARN_g destinés à être exprimés.

Dans un autre mode de réalisation particulier, utilisable dans le contexte de la présente invention, ii) au moins l'un desdits « premier » et « deuxième » acides nucléiques code en outre un ou plusieurs ARN

guides (ARNg) ou l'outil génétique comprend en outre un ou plusieurs ARN guides, chaque ARN guide comprenant une structure ARN de fixation à l'enzyme Cas et une séquence complémentaire de la portion ciblée de l'ADN bactérien, et iii) au moins l'un desdits « premier » et « deuxième » acides nucléiques comprend en outre une séquence codant une protéine anti-CRISPR placée sous le contrôle d'un promoteur inductible, ou l'outil génétique comprend en outre un « troisième » acide nucléique codant une protéine anti-CRISPR placée sous le contrôle d'un promoteur inductible, de préférence différent des promoteurs contrôlant l'expression de Cas et/ou du ou des ARNg et inductible par un autre agent inducteur.

Dans un mode de réalisation préféré, la protéine anti-CRISPR est capable d'inhiber, de préférence neutraliser, l'action de la nucléase, de préférence durant la phase d'introduction des séquences d'acide nucléique de l'outil génétique dans la souche bactérienne d'intérêt.

Un procédé particulier faisant intervenir la technologie CRISPR, susceptible d'être mis en œuvre dans le cadre de la présente invention pour transformer, et typiquement pour modifier génétiquement par recombinaison homologue, une bactérie du genre *Clostridium*, comprend les étapes suivantes :

- a) d'introduction dans la bactérie d'un outil génétique CRISPR décrit par les inventeurs en présence d'un agent inducteur de l'expression d'une protéine anti-CRISPR, et
- b) de culture de la bactérie transformée obtenue à l'issue de l'étape a) sur un milieu ne contenant pas (ou dans des conditions n'impliquant pas) l'agent inducteur de l'expression de la protéine anti-CRISPR, permettant typiquement l'expression du complexe ribonucléoprotéique Cas/ARNg.

Dans un mode de réalisation particulier, le procédé comprend en outre, pendant ou après l'étape b), une étape d'induction de l'expression du ou des promoteurs inductibles contrôlant l'expression de Cas et/ou du ou des ARN guides lorsqu'un tel ou de tels promoteurs sont présents au sein de l'outil génétique, afin de permettre la modification génétique d'intérêt de la bactérie une fois ledit outil génétique introduit dans ladite bactérie. L'induction est réalisée à l'aide d'une substance permettant de lever l'inhibition d'expression liée au promoteur inductible sélectionné.

Dans un autre mode de réalisation particulier, le procédé comprend une étape c) additionnelle d'élimination de l'acide nucléique contenant la matrice de réparation (la cellule bactérienne étant alors considérée comme « curée » dudit acide nucléique) et/ou d'élimination du/des ARNs guides ou séquences codant le/les ARNs guides introduits avec l'outil génétique lors de l'étape a).

Dans encore un autre mode de réalisation particulier, le procédé comprend une ou plusieurs étapes additionnelles, postérieure(s) à l'étape b) ou à l'étape c), d'introduction d'un *én*ième, par exemple troisième, quatrième, cinquième, etc., acide nucléique contenant une matrice de réparation distincte de celle(s) déjà introduite(s) et d'une ou plusieurs cassettes d'expression d'ARN guides permettant l'intégration de la séquence d'intérêt contenue dans ladite matrice de réparation distincte dans une zone ciblée du génome de la bactérie, en présence d'un agent inducteur de l'expression de la protéine anti-CRISPR, chaque étape additionnelle étant suivie d'une étape de culture de la bactérie ainsi transformée

sur un milieu ne contenant pas l'agent inducteur de l'expression de la protéine anti-CRISPR, permettant typiquement l'expression du complexe ribonucléoprotéique Cas/ARNg.

Dans un mode de réalisation particulier du procédé selon l'invention, la bactérie est transformée à l'aide d'un outil CRISPR ou d'un procédé, tels ceux décrits plus haut, utilisant (par exemple codant) une enzyme responsable de la coupure d'au moins un brin de la séquence cible d'intérêt, dans lequel l'enzyme est dans un mode particulier une nucléase, de préférence une nucléase de type Cas, préférentiellement sélectionnée parmi une enzyme Cas9 et une enzyme MAD7. De manière préférée, la séquence cible d'intérêt est une séquence, par exemple le gène *catB*, codant une enzyme conférant à la bactérie la résistance à un ou plusieurs antibiotiques, de préférence à un ou plusieurs antibiotiques appartenant à la classe des amphénicols, typiquement une amphénicol-O-acetyltransférase telle qu'une chloramphénicol-O-acetyltransférase, une séquence contrôlant la transcription de la séquence codante ou une séquence flanquant ladite séquence codante.

Des exemples de protéines Cas9 utilisables dans la présente invention incluent, sans y être limités, les protéines Cas9 de *S. pyogenes* (cf. SEQ ID NO : 1 de la demande WO2017/064439 et numéro d'entrée NCBI : WP_010922251.1), *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus mutans*, *Campylobacter jejuni*, *Pasteurella multocida*, *Francisella novicida*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria lactamica* et *Legionella pneumophila* (cf. Fonfara *et al*, 2013 ; Makarova *et al*, 2015).

La nucléase MAD7 (dont la séquence d'acides aminés correspond à la séquence SEQ ID NO : 72), également identifiée en tant que « Cas12 » ou « Cpf1 », peut autrement être avantageusement utilisée dans le cadre de la présente invention en la combinant avec un ou des ARNg connu(s) de l'homme de métier capable(s) de se lier à une telle nucléase (cf. Garcia-Doval *et al.*, 2017 et Stella S. *et al.*, 2017).

Selon un aspect particulier, la séquence codant la nucléase MAD7 est une séquence optimisée pour être facilement exprimée dans des souches de *Clostridium*, de préférence la séquence SEQ ID NO : 71.

Lorsqu'elle est utilisée la protéine anti-CRISPR est typiquement une protéine « anti-Cas », i.e. une protéine capable d'inhiber ou d'empêcher/de neutraliser l'action de Cas, et/ou une protéine capable d'inhiber ou d'empêcher/de neutraliser l'action d'un système CRISPR/Cas, par exemple d'un système CRISPR/Cas de type II lorsque la nucléase est une nucléase de type Cas9.

La protéine anti-CRISPR est avantageusement une protéine « anti-Cas9 », par exemple sélectionnée parmi AcrIIA1, AcrIIA2, AcrIIA3, AcrIIA4, AcrIIA5, AcrIIC1, AcrIIC2 et AcrIIC3 (Pawluk *et al*, 2018). De manière préférée la protéine « anti-Cas9 » est AcrIIA2 ou AcrIIA4. Une telle protéine est typiquement capable de limiter très significativement, idéalement d'empêcher, l'action de Cas9, par exemple en se fixant sur l'enzyme Cas9.

Une autre protéine anti-CRISPR avantageusement utilisable est une protéine « anti-MAD7 », par exemple la protéine AcrVA1 (Marino *et al*, 2018).

Tout comme la portion d'ADN ciblée (« séquence reconnue »), la matrice d'édition/de réparation peut elle-même comprendre une ou plusieurs séquences d'acide nucléique ou portions de séquence d'acide nucléique correspondant à des séquences naturelles et/ou synthétiques, codantes et/ou non codantes. La matrice peut également comprendre une ou plusieurs séquences « étrangères », i.e. naturellement absentes du génome des bactéries appartenant au genre *Clostridium* ou du génome d'espèces particulières dudit genre. La matrice peut aussi comprendre une combinaison de séquences.

L'outil génétique utilisé dans le cadre de la présente invention permet à la matrice de réparation de guider l'incorporation au sein du génome bactérien d'un acide nucléique d'intérêt, typiquement d'une séquence ou portion de séquence d'ADN comprenant au moins 1 paire de base (pb), de préférence au moins 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 50, 100, 1 000, 10 000, 100 000 ou 1 000 000 pb, typiquement entre 1 pb et 20 kb, par exemple 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 ou 13 kb, ou entre 1 pb et 10 kb, de préférence entre 10 pb et 10 kb ou entre 1 kb et 10 kb, par exemple entre 1 pb et 5 kb, entre 2 kb et 5 kb, ou encore entre 2,5 ou 3 kb et 5 kb.

Dans un mode de réalisation particulier, l'expression de la séquence d'ADN d'intérêt permet à la bactérie du genre *Clostridium* de fermenter (typiquement simultanément) plusieurs sucres différents, par exemple au moins deux sucres différents, typiquement au moins deux sucres différents parmi les sucres comprenant 5 atomes de carbone (tels que le glucose ou le mannose) et/ou parmi les sucres comprenant 6 atomes de carbone (tels que le xylose, l'arabinose ou le fructose), de préférence au moins trois sucres différents, sélectionnés par exemple parmi glucose, xylose et mannose ; glucose, arabinose et mannose ; et glucose xylose et arabinose.

Dans un autre mode de réalisation particulier, la séquence d'ADN d'intérêt code au moins un produit d'intérêt, de préférence un produit favorisant la production de solvant par la bactérie du genre *Clostridium*, typiquement au moins une protéine d'intérêt, par exemple une enzyme ; une protéine membranaire tel qu'un transporteur ; une protéine de maturation d'autres protéines (protéine chaperonne) ; un facteur de transcription ; ou une combinaison de ceux-ci.

Dans un autre mode de réalisation, le procédé selon l'invention est basé sur l'utilisation d'introns de type II, et met par exemple en œuvre la technologie / l'outil génétique ClosTron® ou l'outil génétique Targetron®.

La technologie Targetron® repose sur l'utilisation d'un intron de groupe II (basé sur l'intron LI.ltrB de *Lactococcus lactis*) reprogrammable, capable d'intégrer le génome bactérien rapidement à un locus désiré (Chen *et al.*, 2005, Wang *et al.*, 2013), typiquement dans le but d'inactiver un gène ciblé. Les mécanismes de reconnaissance de la zone éditée ainsi que d'insertion dans le génome par rétro-épissage sont basés sur une homologie entre l'intron et ladite zone d'une part, et sur l'activité d'une protéine (ItrA) d'autre part.

La technologie ClosTron® repose sur une approche similaire, complétée par l'ajout d'un marqueur de sélection dans la séquence de l'intron (Heap *et al.*, 2007). Ce marqueur permet de sélectionner l'intégration de l'intron dans le génome, et facilite donc l'obtention des mutants désirés. Ce système génétique exploite également les introns de type I. En effet, le marqueur de sélection (appelé RAM pour *retrotransposition-activated marker*) est interrompu par un tel élément génétique, qui empêche son expression depuis le plasmide (une description plus précise du système : Zhong *et al.*). L'épissage de cet élément génétique se produit avant intégration dans le génome, ce qui permet l'obtention d'un chromosome présentant une forme active du gène de résistance. Une version optimisée du système comprend des sites FLP/FRT en amont et en aval de ce gène, ce qui permet d'utiliser la recombinaise FRT pour éliminer le gène de résistance (Heap *et al.*, 2010).

Dans un autre mode de réalisation, le procédé selon l'invention est basé sur l'utilisation d'un outil d'échange allélique, et met par exemple en œuvre la technologie / l'outil génétique ACE®.

La technologie ACE® repose sur l'utilisation d'un mutant auxotrophe (pour l'uracile chez *C. acetobutylicum* ATCC 824 par délétion du gène *pyrE*, qui provoque également une résistance à l'acide 5- fluoroorotique (A-5-FO) ; Heap *et al.*, 2012). Le système utilise le mécanisme d'échange allélique, bien connu de l'homme de métier. Suite à une transformation avec un vecteur pseudo-suicide (à très faible copies), l'intégration de ce dernier dans le chromosome bactérien par un premier événement d'échange allélique est sélectionné grâce au gène de résistance présent initialement sur le plasmide. L'étape d'intégration peut être réalisée de deux manières différentes, soit au sein du locus *pyrE* soit au sein d'un autre locus :

Dans le cas de l'intégration au locus *pyrE*, le gène *pyrE* est également placé sur le plasmide, sans toutefois être exprimé (pas de promoteur fonctionnel). La deuxième recombinaison restaure un gène *pyrE* fonctionnel et peut alors être sélectionnée par auxotrophie (milieu minimum, ne contenant pas d'uracile). Le gène *pyrE* non-fonctionnel présentant également un caractère sélectionnable (sensibilité au A-5-FO), d'autres intégrations sont ensuite envisageables sur le même modèle, en alternant successivement l'état de *pyrE* entre fonctionnel et non-fonctionnel.

Dans le cas de l'intégration à un autre locus, une zone génomique permettant une expression du marqueur de contre-sélection après recombinaison est ciblée (typiquement, en opéron après un autre gène, de préférence un gène fortement exprimé). Cette deuxième recombinaison est alors sélectionnée par auxotrophie (milieu minimum ne contenant pas d'uracile).

Dans les modes de réalisation décrits basés sur l'utilisation d'introns de type II, et mettant par exemple en œuvre la technologie / l'outil génétique ClosTron® ou l'outil génétique Targetron®, ou basés sur l'utilisation d'un outil d'échange allélique, et mettant par exemple en œuvre la technologie / l'outil

génétique ACE®, la séquence ciblée est de préférence une séquence flanquant la séquence codant une enzyme d'intérêt, de préférence, comme expliqué ci-dessus, une amphénicol-O-acetyltransférase.

Un autre objet de l'invention concerne une bactérie transformée et/ou génétiquement modifiée, typiquement une bactérie du genre *Clostridium* appartenant à une espèce ou correspondant à l'un des sous-clades décrits par les inventeurs, obtenue à l'aide d'un procédé tel que décrit par les inventeurs dans le présent texte, ainsi que toute bactérie dérivée, clone, mutant ou version génétiquement modifiée de celle-ci.

Une bactérie ainsi transformée et/ou génétiquement modifiée typique de l'invention est une bactérie n'exprimant plus une enzyme lui conférant la résistance à un ou plusieurs antibiotiques, en particulier une bactérie n'exprimant plus une amphénicol-O-acetyltransférase, par exemple une bactérie exprimant à l'état sauvage le gène *catB*, et dépourvue dudit gène *catB* ou incapable d'exprimer ledit gène *catB* une fois transformée et/ou génétiquement modifiée grâce à l'invention. La bactérie ainsi transformée et/ou génétiquement modifiée grâce à l'invention est rendue sensible à un amphénicol, par exemple à un amphénicol tel que décrit dans le présent texte, en particulier au chloramphénicol ou au thiamphénicol. Un exemple particulier de bactérie génétiquement modifiée préférée selon l'invention est la bactérie identifiée dans la présente description en tant que *C. beijerinckii* DSM 6423 $\Delta catB$ telle qu'enregistrée sous le numéro de dépôt LMG P-31151 auprès de la Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms (« BCCM », K.L. Ledeganckstraat 35, B-9000 Gent - Belgique) le 6 décembre 2018. La description concerne également toute bactérie dérivée, clone, mutant ou version génétiquement modifiée de ladite bactérie restant sensible à un amphénicol tel que le thiamphénicol et/ou le chloramphénicol.

Selon un mode de réalisation particulier, la bactérie transformée et/ou génétiquement modifiée selon l'invention n'exprimant pas une enzyme lui conférant la résistance à un ou plusieurs antibiotiques, en particulier une amphénicol-O-acetyltransférase telle que la chloramphénicol-O-acetyltransférase, par exemple la bactérie *C. beijerinckii* DSM 6423 $\Delta catB$, est encore susceptible d'être transformée, et de préférence modifiée génétiquement. Elle peut l'être à l'aide d'un acide nucléique, par exemple d'un plasmide tel que décrit dans la présente description, par exemple dans la partie expérimentale. Un exemple d'acide nucléique susceptible d'être avantageusement utilisé est le plasmide pCas9_{acr} de séquence SEQ ID NO : 23 (décrit dans la partie expérimentale de la présente description).

Un aspect particulier de l'invention concerne en effet l'utilisation d'une bactérie modifiée génétiquement selon l'invention, de préférence de la bactérie *C. beijerinckii* DSM 6423 $\Delta catB$ déposée sous le numéro LMG P-31151 ou d'une version génétiquement modifiée de celle-ci, par exemple à l'aide de l'un des outils génétiques ou procédés décrits dans le présent texte, pour produire, grâce à l'expression du ou des acides nucléiques d'intérêt introduits volontairement dans son génome, un ou plusieurs solvants, de préférence au moins l'isopropanol, de préférence à l'échelle industrielle.

L'invention concerne aussi un kit (trousse) comprenant (i) un acide nucléique d'intérêt selon l'invention, typiquement un fragment d'ADN reconnaissant une séquence codant, ou contrôlant la transcription d'une séquence codant, une enzyme d'intérêt dans une bactérie du genre *Clostridium*, en particulier dans une bactérie capable d'effectuer une fermentation IBE telle que décrite dans le présent texte, et (ii) au moins un outil, de préférence plusieurs outils, sélectionnés parmi les éléments d'un outil de modification génétique permettant de transformer, et typiquement modifier génétiquement une bactérie du genre *Clostridium*, en vue de produire un variant amélioré de ladite bactérie; un acide nucléique en tant qu'ARNg ; un acide nucléique en tant que matrice de réparation ; au moins une paire d'amorces, par exemple une paire d'amorces telle que décrite dans le contexte de la présente invention ; et un inducteur permettant l'expression d'une protéine codée par ledit outil, par exemple d'une nucléase de type Cas9 ou MAD7.

L'outil de modification génétique pour transformer, et typiquement modifier génétiquement une bactérie du genre *Clostridium*, peut-être par exemple sélectionné parmi un outil CRISPR, un outil basé sur l'utilisation d'introns de type II et un outil d'échange allélique, comme expliqué plus haut.

Le kit peut en outre comprendre un ou plusieurs inducteurs adaptés au(x) promoteur(s) inductible(s) sélectionné(s) éventuellement utilisé(s) au sein de l'outil génétique pour contrôler l'expression de la nucléase utilisée et/ou d'un ou de plusieurs ARN guides.

Un kit particulier selon l'invention permet l'expression d'une nucléase comprenant une étiquette (ou «tag»).

Les kits selon l'invention peuvent en outre comprendre un ou plusieurs consommables tels qu'un milieu de culture, au moins une bactérie compétente du genre *Clostridium* (i.e. conditionnée en vue de la transformation), au moins un ARNg, une nucléase, une ou plusieurs molécules de sélection, ou encore une notice explicative.

La description concerne également l'utilisation d'un kit selon l'invention, ou de l'un ou de plusieurs des éléments de ce kit, pour la mise en œuvre d'un procédé de transformation et idéalement de modification génétique d'une bactérie du genre *Clostridium* décrit dans le présent texte, et/ou pour la production de solvant(s) ou de biocarburant(s), ou de mélanges de ceux-ci, de préférence à l'échelle industrielle, à l'aide d'une bactérie du genre *Clostridium*, de préférence d'une bactérie du genre *Clostridium* naturellement productrice d'isopropanol.

Des solvants susceptibles d'être produits sont typiquement l'acétone, le butanol, l'éthanol, l'isopropanol ou un mélange de ceux-ci, typiquement un mélange éthanol/isopropanol, butanol/isopropanol, ou éthanol/butanol, de préférence un mélange isopropanol/butanol.

L'utilisation de bactéries transformées selon l'invention permet typiquement la production par an à l'échelle industrielle d'au moins 100 tonnes d'acétone, d'au moins 100 tonnes d'éthanol, d'au moins 1000 tonnes d'isopropanol, d'au moins 1800 tonnes de butanol, ou d'au moins 40 000 tonnes d'un mélange de ceux-ci.

Les exemples et figures ci-après ont pour but d'illustrer plus pleinement l'invention sans pour autant en limiter la portée.

FIGURES

[Fig 1] La Figure 1 représente le Classement de 30 souches de *Clostridium* solvantogènes, d'après Poehlein *et al.*, 2017. A noter que le sous-clade *C. beijerinckii* NRRL B-593 est également identifié dans la littérature en tant que *C. beijerinckii* DSM 6423.

[Fig 2] La Figure 2 représente la Carte du plasmide pCas9ind- $\Delta catB$

[Fig 3] La Figure 3 représente la Carte du plasmide pCas9acr

[Fig 4] La Figure 4 représente la Carte du plasmide pEC750S-*uppHR*

[Fig 5] La Figure 5 représente la Carte du plasmide pEX-A2-gRNA-*upp*.

[Fig 6] La Figure 6 représente la Carte du plasmide pEC750S- Δupp .

[Fig 7] La Figure 7 représente la Carte du plasmide pEC750C- Δupp

[Fig 8] La Figure 8 représente la Carte du pGRNA-pNF2

[Fig 9] La Figure 9 représente l'Amplification PCR du gène *catB* dans les clones issus de la transformation bactérienne de la souche *C. beijerinckii* DSM 6423.

Amplification d'environ 1,5 kb si la souche possède encore le gène *catB*, ou d'environ 900 pb si ce gène est délété.

[Fig 10] La Figure 10 représente la Croissance des souches *C. beijerinckii* DSM6423 WT et $\Delta catB$ sur milieu 2YTG et milieu sélectif 2YTG thiamphénicol.

[Fig 11] La Figure 11 représente l'Induction du système CRISPR/Cas9acr chez des transformants de la souche *C. beijerinckii* DSM 6423 contenant pCas9_{acr} et un plasmide d'expression de l'ARNg ciblant *upp*, avec ou sans matrice de réparation. Légende : Em, érythromycine ; Tm, thiamphénicol ; aTc, anhydrotétracycline ; ND, non dilué.

[Fig 12A] La Figure 12 représente la Modification du locus *upp* de *C. beijerinckii* DSM 6423 via le système CRISPR/Cas9. La Figure 12A représente l'organisation génétique du locus *upp* : gènes, site cible de l'ARNg et matrices de réparation, associées aux régions d'homologies correspondantes sur l'ADN génomique. Les sites d'hybridation des amorces pour la vérification par PCR (RH010 et RH011) sont également indiqués.

[Fig 12B] La Figure 12 représente la Modification du locus *upp* de *C. beijerinckii* DSM 6423 via le système CRISPR/Cas9. La Figure 12B représente l'amplification du locus *upp* à l'aide des amorces RH010 et RH011. Une amplification de 1680 pb est attendue dans le cas d'un gène sauvage, contre 1090 pb pour un gène *upp* modifié. M, marqueur de taille 100 bp – 3 kb (Lonza) ; WT, souche sauvage.

[Fig 13] La Figure 13 représente l'Amplification PCR vérifiant la présence du plasmide pCas9_{ind.} dans la souche *C. beijerinckii* 6423 $\Delta catB$.

[Fig 14] La Figure 14 représente l'Amplification PCR (≈ 900 pb) vérifiant la présence ou non du plasmide naturel pNF2 avant induction (contrôle positif 1 et 2) puis après induction sur milieu contenant de l'aTc du système CRISPR-Cas9.

[Fig 15] La Figure 15 représente l'Outil génétique de modification de bactéries, adapté aux bactéries du genre *Clostridium*, basé sur l'utilisation de deux plasmides (cf. WO2017/064439, Wasels *et al.*, 2017).

[Fig 16] La Figure 16 représente la Carte du plasmide pCas9ind-gRNA_catB.

[Fig 17] La Figure 17 représente le système CRISPR/Cas9 utilisé pour l'édition du génome en tant qu'outil génétique permettant de créer, à l'aide de la nucléase Cas9, une ou des coupures double brin dans l'ADN génomique dirigée(s) par l'ARNg.

ARNg, ARN guide ; PAM, Protospacer Adjacent Motif. Figure modifiée depuis Jinek *et al.*, 2012.

[Fig 18] La Figure 18 représente la réparation par recombinaison homologue d'une coupure double brin induite par Cas9. PAM, Protospacer Adjacent Motif.

[Fig 19] La Figure 19 représente l'utilisation de CRISPR/Cas9 chez *Clostridium*.

ermB, gène de résistance à l'érythromycine ; *catP* (SEQ ID NO : 70), gène de résistance au thiamphénicol/chloramphenicol ; *tetR*, gène dont le produit d'expression réprime la transcription à partir de Pcm-tetO2/1 ; Pcm-2tetO1 et Pcm-tetO2/1, promoteurs inductibles à l'anhydrotétracycline, « aTc » (Dong *et al.*, 2012) ; miniPthl, promoteur constitutif (Dong *et al.*, 2012).

[Fig 20] La Figure 20 représente la carte du plasmide pCas9_{acr} (SEQ ID NO : 23).

ermB, gène de résistance à l'érythromycine ; rep, origine de répllication chez *E. coli* ; repH, origine de répllication chez *C. acetobutylicum* ; Tthl, terminateur thiolase ; miniPthl, promoteur constitutif (Dong *et al.*, 2012) ; Pcm-tetO2/1, promoteur réprimé par le produit de *tetR* et inductible par l'anhydrotétracycline, « aTc » (Dong *et al.*, 2012) ; Pbgal, promoteur réprimé par le produit de *lacR* et inductible par le lactose (Hartman *et al.*, 2011) ; *acrIIA4*, gène codant la protéine anti-CRISPR AcrII14 ; *bgaR*, gène dont le produit d'expression réprime la transcription à partir de Pbgal.

[Fig 21] La Figure 21 représente le taux de transformation relatifs de *C. acetobutylicum* DSM 792 contenant pCas9_{ind} (SEQ ID NO : 22) ou pCas9_{acr} (SEQ ID N : 23). Les fréquences sont exprimées en nombre de transformants obtenus par μ g d'ADN utilisé lors de la transformation, rapportées aux fréquences de transformation de pEC750C (SEQ ID NO : 106), et représentent les moyennes d'au moins deux expériences indépendantes.

[Fig 22] La Figure 22 représente l'induction du système CRISPR/Cas9 chez des transformants de la souche DSM 792 contenant pCas9_{acr} et un plasmide d'expression de l'ARNg ciblant *bdhB*, avec (SEQ ID NO : 79 et SEQ ID NO : 80) ou sans (SEQ ID NO : 105) matrice de réparation. Em, érythromycine ; Tm, thiamphénicol ; aTc, anhydrotétracycline ; ND, non dilué.

[Fig 23A] La Figure 23 représente la modification du locus *bdh* de *C. acetobutylicum* DSM792 via le système CRISPR/Cas9. La figure 23A représente l'organisation génétique du locus *bdh*. Les homologues entre matrice de réparation et ADN génomique sont mises en évidence à l'aide de parallélogrammes gris clair. Les sites d'hybridation des amorces V1 et V2 sont également représentés.

[Fig. 23B] La Figure 23 représente la modification du locus *bdh* de *C. acetobutylicum* DSM792 via le système CRISPR/Cas9. La figure 23B représente l'amplification du locus *bdh* à l'aide des amorces V1 et V2. M, marqueur de taille 2-log (NEB) ; P, plasmide pGRNA- $\Delta bdhA\Delta bdhB$; WT, souche sauvage.

[Fig. 24] La figure 24 représente l'efficacité de transformation (en colonies observées par μg d'ADN transformé) pour 20 μg de plasmide pCas9_{ind} dans la souche de *C. beijerinckii* DSM6423. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la moyenne pour un triplicat biologique.

[Fig. 25] La figure 25 représente la carte du plasmide pNF3.

[Fig. 26] La figure 26 représente la carte du plasmide pEC751S.

[Fig. 27] La figure 27 représente la carte du plasmide pNF3S.

[Fig. 28] La figure 28 représente la carte du plasmide pNF3E.

[Fig. 29] La figure 29 représente la carte du plasmide pNF3C.

[Fig. 30] La figure 30 représente l'efficacité de transformation (en colonies observées par μg d'ADN transformé) du plasmide pCas9_{ind} dans trois souches de *C. beijerinckii* DSM 6423. Les barres d'erreur correspondent à l'écart standard de la moyenne pour un duplicat biologique.

[Fig. 31] La figure 31 représente l'efficacité de transformation (en colonies observées par μg d'ADN transformé) du plasmide pEC750C dans deux souches dérivées de *C. beijerinckii* DSM 6423. Les barres d'erreur correspondent à l'écart standard de la moyenne pour un duplicat biologique.

[Fig. 32] La figure 32 représente l'efficacité de transformation (en colonies observées par μg d'ADN transformé) des plasmides pEC750C, pNF3C, pFW01 et pNF3E dans la souche *C. beijerinckii* IFP963 $\Delta catB$ $\Delta pNF2$. Les barres d'erreur correspondent à l'écart standard de la moyenne pour un triplicat biologique.

[Fig. 33] La figure 33 représente l'efficacité de transformation (en colonies observées par μg d'ADN transformé) des plasmides pFW01, pNF3E et pNF3S dans la souche *C. beijerinckii* NCIMB 8052.

EXEMPLES

EXEMPLE n°1

Matériels et méthodes

Conditions de culture

C. acetobutylicum DSM 792 a été cultivée en milieu 2YTG (Tryptone 16 g.l⁻¹, extrait de levure 10 g.l⁻¹, glucose 5 g.l⁻¹, NaCl 4 g.l⁻¹). *E. coli* NEB10B a été cultivée en milieu LB (Tryptone 10 g.l⁻¹, extrait de levure 5 g.l⁻¹, NaCl 5 g.l⁻¹). Les milieux solides ont été réalisés en ajoutant 15 g.l⁻¹ d'agarose aux milieux liquides. De l'érythromycine (à des concentrations de 40 ou 500 mg.l⁻¹ respectivement en milieu 2YTG ou LB), du chloramphénicol (25 ou 12,5 mg.l⁻¹ respectivement en LB solide ou liquide) et du thiamphénicol (15 mg.l⁻¹ en milieu 2YTG) ont été utilisés lorsque nécessaire.

Manipulation des acides nucléiques

Toutes les enzymes et kits utilisés l'ont été en suivant les recommandations des fournisseurs.

Construction des plasmides

Le plasmide pCas9_{acr} (SEQ ID NO : 23), présenté en Figure 20, a été construit en clonant le fragment (SEQ ID NO : 81) contenant *bgaR* et *acrIIA4* sous le contrôle du promoteur P_{bgal} synthétisé par Eurofins Genomics au niveau du site SacI du vecteur pCas9_{ind} (Wasels *et al*, 2017).

Le plasmide pGRNA_{ind} (SEQ ID NO : 82) a été construit en clonant une cassette d'expression (SEQ ID NO : 83) d'un ARNg sous contrôle du promoteur P_{cm-2tetO1} (Dong *et al*, 2012) synthétisée par Eurofins Genomics au niveau du site SacI du vecteur pEC750C (SEQ ID NO : 106) (Wasels *et al*, 2017).

Les plasmides pGRNA-xylB (SEQ ID NO : 102), pGRNA-xylR (SEQ ID NO : 103), pGRNA-glcG (SEQ ID NO : 104) et pGRNA-bdhB (SEQ ID NO : 105) ont été construits en clonant les couples d'amorces respectifs 5'-TCATGATTTCTCCATATTAGCTAG-3' et 5'-AAACCTAGCTAATATGGAGAAATC-3', 5'-TCATGTTACACTTGGAACAGGCGT-3' et 5'-AAACACGCCTGTTCCAAGTGTAAC-3', 5'-TCATTTCCGGCAGTAGGATCCCCA-3' et 5'-AAACTGGGGATCCTACTGCCGGAA-3', 5'-TCATGCTTATTACGACATAACACA-3' et 5'-AAACTGTGTTATGTCGTAATAAGC-3' au sein du plasmide pGRNA_{ind} (SEQ ID NO : 82) digéré par BsaI.

Le plasmide pGRNA- $\Delta bdhB$ (SEQ ID NO : 79) a été construit en clonant le fragment d'ADN obtenu par assemblage par PCR chevauchante des produits PCR obtenus avec les amorces 5'-ATGCATGGATCCAAACGAACCCAAAAAGAAAGTTTC-3' et 5'-GGTTGATTTCAAATCTGTGTAAACCTACCG-3' d'une part, 5'-ACACAGATTTGAAATCAACCACTTTAACCC-3' et 5'-ATGCATGTCGACTCTTAAGAACATGTATAAAGTATGG-3' d'autre part, dans le vecteur pGRNA-bdhB digéré par BamHI et SacI.

Le plasmide pGRNA- $\Delta bdhA\Delta bdhB$ (SEQ ID NO : 80) a été construit en clonant le fragment d'ADN obtenu par assemblage par PCR chevauchante des produits PCR obtenus avec les amorces 5'-ATGCATGGATCCAAACGAACCCAAAAAGAAAGTTTC-3' et 5'-GCTAAGTTTTAAATCTGTGTAAACCTACCG-3' d'une part, 5'-ACACAGATTTAAACTTAGCATACTTCTTACC-3' et 5'-ATGCATGTCGACCTTCTAATCTCCTCTACTATTTTAG-3' d'autre part, dans le vecteur pGRNA-bdhB digéré par BamHI et SacI.

Transformation

C. acetobutylicum DSM 792 a été transformée selon le protocole décrit par Mermelstein *et al*, 1993. La sélection de transformants de *C. acetobutylicum* DSM 792 contenant déjà un plasmide d'expression de

Cas9 (pCas9_{ind} ou pCas9_{acr}) transformés avec un plasmide contenant une cassette d'expression d'un ARNg a été réalisée sur milieu 2YTG solide contenant de l'érythromycine (40 mg.l⁻¹), du thiamphénicol (15 mg.l⁻¹) et du lactose (40 nM).

Induction de l'expression de *cas9*

L'induction de l'expression de *cas9* a été réalisée via la croissance des transformants obtenus sur un milieu 2YTG solide contenant de l'érythromycine (40 mg.l⁻¹), du thiamphénicol (15 mg.l⁻¹) et l'agent inducteur de l'expression de *cas9* et de l'ARNg, l'aTc (1 mg.l⁻¹).

Amplification du locus *bdh*

Le contrôle de l'édition du génome de *C. acetobutylicum* DSM 792 au niveau du locus des gènes *bdhA* et *bdhB* a été réalisé par PCR à l'aide de l'enzyme Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB) à l'aide des amorces V1 (5'-ACACATTGAAGGGAGCTTTT-3') et V2 (5'-GGCAACAACATCAGGCCTTT-3').

Résultats

Efficacité de transformation

Afin d'évaluer l'impact de l'insertion du gène *acrIIA4* sur la fréquence de transformation du plasmide d'expression de *cas9*, différents plasmides d'expression d'ARNg ont été transformés dans la souche DSM 792 contenant pCas9_{ind} (SEQ ID NO : 22) ou pCas9_{acr} (SEQ ID NO : 23), et les transformants ont été sélectionnés sur un milieu supplémenté en lactose. Les fréquences de transformations obtenues sont présentées en Figure 21.

Génération de mutants $\Delta bdhB$ et $\Delta bdhA\Delta bdhB$

Le plasmide de ciblage contenant la cassette d'expression de l'ARNg ciblant *bdhB* (pGRNA-bdhB – SEQ ID NO : 105) ainsi que deux plasmides dérivés contenant des matrices de réparation permettant la délétion du gène *bdhB* seul (pGRNA- $\Delta bdhB$ – SEQ ID NO : 79) ou des gènes *bdhA* et *bdhB* (pGRNA- $\Delta bdhA\Delta bdhB$ – SEQ ID NO : 80) ont été transformés dans la souche DSM 792 contenant pCas9_{ind} (SEQ ID NO : 22) ou pCas9_{acr} (SEQ ID NO : 23). Les fréquences de transformation obtenues sont présentées dans le Tableau 2 :

[Tableau 2]

	DSM 792	
	pCas9 _{ind}	pCas9 _{acr}
pEC750C	32,6 ± 27,1 ufc.µg ⁻¹	24,9 ± 27,8 ufc.µg ⁻¹
pGRNA-bdhB	0 ufc.µg ⁻¹	17,0 ± 10,7 ufc.µg ⁻¹
pGRNA-Δ <i>bdhB</i>	0 ufc.µg ⁻¹	13,3 ± 4,8 ufc.µg ⁻¹
pGRNA-Δ <i>bdhA</i> Δ <i>bdhB</i>	0 ufc.µg ⁻¹	33,1 ± 13,4 ufc.µg ⁻¹

Fréquences de transformation de la souche DSM 792 contenant pCas9_{ind} ou pCas9_{acr} avec des plasmides ciblant *bdhB*. Les fréquences sont exprimées en nombre de transformants obtenus par µg d'ADN utilisé lors de la transformation, et représentent les moyennes d'au moins deux expériences indépendantes.

Les transformants obtenus ont subi une phase d'induction de l'expression du système CRISPR/Cas9 via un passage sur milieu supplémenté en anhydrotétracycline, aTc (Figure 22).

Les modifications désirées ont été confirmées par PCR sur l'ADN génomique de deux colonies résistantes à l'aTc (Figure 23).

Conclusions

L'outil génétique basé sur CRISPR/Cas9 décrit dans Wasels *et al.* (2017) utilise deux plasmides :

- le premier plasmide, pCas9_{ind}, contient *cas9* sous contrôle d'un promoteur inducible à l'aTc, et
- le deuxième plasmide, dérivé de pEC750C, contient la cassette d'expression d'un ARNg (placé sous le contrôle d'un second promoteur inducible à l'aTc) ainsi qu'une matrice d'édition permettant de réparer la cassure double brin induite par le système.

Cependant, les inventeurs ont observé que certains ARNg semblaient encore être trop toxiques, malgré le contrôle de leur expression ainsi que de celle de Cas9 à l'aide de promoteurs inducibles à l'aTc, limitant en conséquence l'efficacité de transformation des bactéries par l'outil génétique et donc la modification du chromosome.

Afin d'améliorer cet outil génétique, le plasmide d'expression de *cas9* a été modifié, via l'insertion d'un gène anti-CRISPR, *acrIIA4*, sous contrôle d'un promoteur inducible au lactose. Les efficacités de transformation de différents plasmides d'expression d'ARNg ont ainsi pu être améliorées de manière très significative, permettant l'obtention de transformants pour tous les plasmides testés.

Il a également été possible de réaliser l'édition du locus *bdhB* au sein du génome de *C. acetobutylicum* DSM 792, à l'aide de plasmides qui n'avaient pas pu être introduits dans la souche DSM 792 contenant pCas9_{ind}. Les fréquences de modification observées sont les mêmes que celles observées précédemment (Wasels *et al.*, 2017), avec 100% des colonies testées modifiées.

En conclusion, la modification du plasmide d'expression de *cas9* permet un meilleur contrôle du complexe ribonucléoprotéique Cas9-ARNg, facilitant avantageusement l'obtention de transformants dans lesquels l'action de Cas9 peut être déclenchée afin d'obtenir des mutants d'intérêt.

EXEMPLE n°2

Matériels et méthodes

Conditions de culture

C. beijerinckii DSM 6423 a été cultivée en milieu 2YTG (Tryptone 16 g L⁻¹, extrait de levure 10 g L⁻¹, glucose 5 g L⁻¹, NaCl 4 g L⁻¹). *E. coli* NEB 10-beta et INV110 ont été cultivées en milieu LB (Tryptone 10 g L⁻¹, extrait de levure 5 g L⁻¹, NaCl 5 g L⁻¹). Les milieux solides ont été réalisés en ajoutant 15 g L⁻¹ d'agarose aux milieux liquides. De l'érythromycine (à des concentrations de 20 ou 500 mg L⁻¹ respectivement en milieu 2YTG ou LB), du chloramphénicol (25 ou 12,5 mg L⁻¹ respectivement en LB solide ou liquide) et du thiamphénicol (15 mg L⁻¹ en milieu 2YTG) ou de la spectinomycine (à des concentrations de 100 ou 650 mg L⁻¹ respectivement en milieu LB ou 2YTG) ont été utilisés si nécessaire.

Acides nucléiques et vecteurs plasmidiques

Toutes les enzymes et kits utilisés l'ont été en suivant les recommandations des fournisseurs.

Les tests de PCR sur colonie ont respecté le protocole suivant :

Une colonie isolée de *C. beijerinckii* DSM 6423 est resuspendue dans 100 µL de Tris 10 mM pH 7,5 EDTA 5 mM. Cette solution est chauffée à 98 °C pendant 10 min sans agitation. 0,5 µL de ce lysat bactérien peuvent alors être utilisés comme matrice de PCR dans des réactions de 10 µL avec la Phire (Thermo Scientific), la Phusion (Thermo Scientific), la Q5 (NEB) ou la KAPA2G Robust (Sigma-Aldrich) polymérase.

La liste des amorces ayant servies à l'ensemble des constructions (nom/séquence d'ADN) est détaillée ci-dessous :

ΔcatB_fwd : TGTTATGGATTATAAGCGGCTCGAGGACGTCAAACCATGTTAATCATTGC

ΔcatB_rev : AATCTATCACTGATAGGGACTCGAGCAATTCACCAAAGAATTCGCTAGC

ΔcatB_gRNA_rev

AATCTATCACTGATAGGGACTCGAGGGGCAAAAGTGTAAGACAAGCTTC

RH076 : CATATAATAAAAGGAAACCTCTTGATCG

RH077 : ATTGCCAGCCTAACACTTGG

RH001 : ATCTCCATGGACGCGTGACGTCGACATAAGGTACCAGGAATTAGAGCAGC

RH002 : TCTATCTCCAGCTCTAGACCATTATTATTCCTCCAAGTTTGCT

RH003 : ATAATGGTCTAGAGCTGGAGATAGATTATTTGGTACTAAG
 RH004 : TATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGAAGCGCTTATTATTGCATTAGC
 pEX-fwd : CAGATTGTACTGAGAGTGCACC
 pEX-rev : GTGAGCGGATAACAATTTTCACAC
 pEC750C-fwd : CAATATTCCACAATATTATATTATAAGCTAGC
 M13-rev : CAGGAAACAGCTATGAC
 RH010 : CGGATATTGCATTACCAGTAGC
 RH011 : TTATCAATCTCTTACACATGGAGC
 RH025 : TAGTATGCCGCCATTATTACGACA
 RH134 : GTCGACGTGGAATTGTGAGC
 pNF2_fwd : GGGCGCACTTATACACCACC
 pNF2_rev : TGCTACGCACCCCTAAAGG
 RH021 ACTTGGGTCGACCACGATAAAACAAGGTTTAAAGG
 RH022 TACCAGGGATCCGTATTAATGTAAGTATGATATCAATTCTTG
 aad9-fwd2 ATGCATGGTCCCAATGAATAGGTTTACACTTACTTTAGTTTTATGG
 aad9-rev ATGCGAGTTAACAACCTTCTAAAATCTGATTACCAATTAG
 RH031 ATGCATGGATCCCAATGAATAGGTTTACACTTACTTTAGTTTTATGG
 RH032 ATGCGAGAGCTCAACTTCTAAAATCTGATTACCAATTAG
 RH138 ATGCATGGATCCGTCTGACAGTTACCAGGTCC
 RH139 ATGCGAGAGCTCCAATTGTTCAAAAAAATAATGGCGGAG
 RH140 ATGCATGGATCCCGGCAGTTTTTCTTTTTTCGG
 RH141 ATGCGAGAGCTCGGTTAAATACTAGTTTTTTAGTTACAGAC

Les neuf vecteurs plasmidiques suivants ont été préparés :

- Plasmide N°1 : pEX-A258- $\Delta catB$ (SEQ ID NO : 17)

Il contient le fragment d'ADN synthétisé $\Delta catB$ cloné dans le plasmide pEX-A258. Ce fragment $\Delta catB$ comprend i) une cassette d'expression d'un ARN guide ciblant le gène *catB* (gène de résistance au chloramphénicol codant une chloramphénicol-O-acetyltransférase - SEQ ID NO : 18) de *C. beijerinckii* DSM6423 sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'anhydrotetracycline (cassette d'expression : SEQ ID NO : 19), et ii) une matrice d'édition (SEQ ID NO : 20) comprenant 400 pb homologues situées en amont et en aval du gène *catB*.

- Plasmide N°2 : pCas9ind- $\Delta catB$ (cf. Figure 2 et SEQ ID NO : 21)

Il contient le fragment $\Delta catB$ amplifié par PCR (amorces $\Delta catB$ _fwd et $\Delta catB$ _rev) et cloné dans le pCas9ind (décrit dans la demande de brevet WO2017/064439 – SEQ ID NO : 22) après digestion des différents ADN par l'enzyme de restriction XhoI.

- Plasmide N°3 : pCas9acr (cf. Figure 3 et SEQ ID NO : 23)

- Plasmide N°4 : pEC750S-*upp*HR (cf. Figure 4 et SEQ ID NO : 24)

Il contient une matrice de réparation (SEQ ID NO : 25) utilisée pour la délétion du gène *upp* et constituée par deux fragments d'ADN homologues en amont et en aval du gène *upp* (tailles respectives : 500 (SEQ ID NO : 26) et 377 (SEQ ID NO : 27) paires de bases). L'assemblage a été obtenu à l'aide du système de clonage Gibson (New England Biolabs, Gibson assembly Master Mix 2X). Pour ce faire, les parties amont et aval ont été amplifiées par PCR à partir de l'ADN génomique de la souche DSM 6423 (cf. Maté de Gerando *et al.*, 2018 et numéro d'accèsion PRJEB11626 (<https://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/PRJEB11626>)) à l'aide des amorces respectives RH001 / RH002 et RH003 / RH004. Ces deux fragments ont ensuite été assemblés dans le pEC750S linéarisé au préalable par restriction enzymatique (enzymes de restriction Sall et SacI).

- Plasmide N°5 : pEX-A2-gRNA-*upp* (cf. Figure 5 et SEQ ID NO : 28)

Ce plasmide comprend le fragment d'ADN gRNA-*upp* correspondant à une cassette d'expression (SEQ ID NO : 29) d'un ARN guide ciblant le gène *upp* (protospacer ciblant *upp* (SEQ ID NO : 31)) sous le contrôle d'un promoteur constitutif (ARN non codant de séquence SEQ ID NO : 30), inséré dans un plasmide de réplication nommé pEX-A2.

- Plasmide N°6 : pEC750S- Δ *upp* (cf. Figure 6 et SEQ ID NO : 32)

Il possède comme base le plasmide pEC750S-*upp*HR (SEQ ID NO : 24) et contient en plus le fragment d'ADN comportant une cassette d'expression d'un ARN guide ciblant le gène *upp* sous le contrôle d'un promoteur constitutif.

Ce fragment a été inséré dans un pEX-A2, appelé pEX-A2-gRNA-*upp*. L'insert a ensuite été amplifié par PCR avec les amorces pEX-fwd et pEX-rev, puis digéré avec les enzymes de restriction XhoI et NcoI. Enfin, ce fragment a été cloné par ligation dans le pEC750S-*upp*HR préalablement digéré par les mêmes enzymes de restriction pour obtenir le pEC750S- Δ *upp*.

- Plasmide N°7 : pEC750C- Δ *upp* (cf. Figure 7 et SEQ ID NO : 33)

La cassette comportant l'ARN guide ainsi que la matrice de réparation ont ensuite été amplifiées avec les amorces pEC750C-fwd et M13-rev. L'amplicon a été digéré par restriction enzymatique avec les enzymes XhoI et SacI, puis cloné par ligation enzymatique dans le pEC750C pour obtenir le pEC750C- Δ *upp*.

- Plasmide N°8 : pGRNA-pNF2 (cf. Figure 8 et SEQ ID NO : 34)

Ce plasmide a comme base pEC750C et contient une cassette d'expression d'un ARN guide ciblant le plasmide pNF2 (SEQ ID NO : 118).

- Plasmide N°9 : pCas9ind-gRNA-*catB* (cf. Figure 16 et SEQ ID NO : 38).

Il contient la séquence codant pour l'ARN guide ciblant le locus *catB* amplifiée par PCR (amorces Δ catB_fwd et Δ catB_gRNA_rev) et clonée dans le pCas9ind (décrit dans la demande de brevet WO2017/064439) après digestion des différents ADN par l'enzyme de restriction XhoI et ligation.

- Plasmide N°10 : pNF3 (cf. Figure 25 et SEQ ID NO : 119)

Il contient une partie du pNF2, comprenant notamment l'origine de répllication et un gène codant pour une protéine de répllication de plasmide (CIBE_p20001), amplifiée avec les amorces RH021 et RH022. Ce produit de PCR a ensuite été cloné au niveau des sites de restriction SalI et BamHI dans le plasmide pUC19 (SEQ ID NO : 117).

- Plasmide N°11 : pEC751S (cf. Figure 26 et SEQ ID NO : 121)

Il contient tous les éléments du pEC750C (SEQ ID NO : 106), sauf le gène de résistance au chloramphénicol *catP* (SEQ ID NO : 70). Ce dernier a été remplacé par le gène *aad9* d'*Enterococcus faecalis* (SEQ ID NO : 130), qui confère une résistance à la spectinomycine. Cet élément a été amplifié avec les amorces *aad9*-fwd2 et *aad9*-rev à partir du plasmide pMTL007S-E1 (SEQ ID NO : 120) et cloné dans les sites AvaII et HpaI du pEC750C, à la place du gène *catP* (SEQ ID NO : 70).

- Plasmide N°12 : pNF3S (cf. Figure 27 et SEQ ID NO : 123)

Il contient tous les éléments du pNF3, avec une insertion du gène *aad9* (amplifié avec les amorces RH031 et RH032 à partir du pEC751S) entre les sites BamHI et SacI.

- Plasmide N°13 : pNF3E (cf. Figure 28 et SEQ ID NO : 124)

Il contient tous les éléments du pNF3, avec une insertion du gène *ermB* de *Clostridium difficile* (SEQ ID NO : 131) sous le contrôle du promoteur miniPthl. Cet élément a été amplifié à partir du pFW01 avec les amorces RH138 et RH139 et cloné entre les sites BamHI et SacI du pNF3E.

- Plasmide N°14 : pNF3C (cf. Figure 29 et SEQ ID NO : 125)

Il contient tous les éléments du pNF3, avec une insertion du gène *catP* de *Clostridium perfringens* (SEQ ID NO : 70). Cet élément a été amplifié à partir du pEC750C avec les amorces RH140 et RH141 et cloné entre les sites BamHI et SacI du pNF3E.

Résultats n°1

Transformation de la souche *C. beijerinckii* DSM 6423

Les plasmides ont été introduits et répliqués dans une souche de *E. coli dam⁻ dcm⁻* (INV110, Invitrogen). Ceci permet d'éliminer les méthylations de type Dam et Dcm sur le plasmide pCas9ind- Δ *catB* avant de l'introduire par transformation dans la souche DSM 6423 selon le protocole décrit par Mermelstein *et al.* (1993), avec les modifications suivantes : la souche est transformée avec une quantité plus importante de plasmide (20 μ g), à une DO₆₀₀ de 0,8, et à l'aide des paramètres d'électroporation suivants : 100 Ω , 25 μ F, 1400 V. L'étalement sur boîte de Pétri contenant de l'érythromycine (20 μ g/mL) a ainsi permis d'obtenir des transformants de *C. beijerinckii* DSM 6423 contenant le plasmide pCas9ind- Δ *catB*.

Induction de l'expression de *cas9* et obtention de la souche *C. beijerinckii* DSM 6423 Δ *catB*

Plusieurs colonies résistantes à l'érythromycine ont ensuite été reprises dans 100 μ L de milieu de culture (2YTG) puis diluées en série jusqu'à un facteur de dilution de 10⁴ dans du milieu de culture. Pour chaque colonie, huit μ L de chaque dilution ont été déposés sur une boîte de Pétri contenant de l'érythromycine

et de l'anhydrotétracycline (200 ng/mL) permettant d'induire l'expression du gène codant la nucléase Cas9.

Après extraction d'ADN génomique, la délétion du gène *catB* au sein des clones ayant poussés sur cette boîte a été vérifiée par PCR, à l'aide des amorces RH076 et RH077 (cf. Figure 9).

Vérification de la sensibilité de la souche *C. beijerinckii* DSM 6423 $\Delta catB$ au thiamphénicol

Pour s'assurer que la délétion du gène *catB* confère bien une sensibilité nouvelle au thiamphénicol, des analyses comparatives sur milieu gélosé ont été réalisées. Des précultures de *C. beijerinckii* DSM 6423 et *C. beijerinckii* DSM 6423 $\Delta catB$ ont été réalisées sur milieu 2YTG puis 100 μ L de ces précultures ont été étalés sur des milieux gélosés 2YTG supplémentée ou non en thiamphénicol à une concentration de 15 mg/L. La figure 10 permet d'observer que seule la souche initiale *C. beijerinckii* DSM 6423 est capable de pousser sur un milieu supplémenté en thiamphénicol.

Délétion du gène *upp* par l'outil CRISPR-Cas9 dans la souche *C. beijerinckii* DSM 6423 $\Delta catB$

Un clone de la souche *C. beijerinckii* DSM 6423 $\Delta catB$ a été au préalable transformé avec le vecteur pCas9_{acr} ne présentant pas de méthylation aux niveaux des motifs reconnus par les méthyltransférases de type dam et dcm (préparé à partir d'une bactérie *Escherichia coli* présentant le génotype *dam⁻ dcm⁻*). La vérification de la présence du plasmide pCas9_{acr} maintenu dans la souche *C. beijerinckii* DSM 6423 a été vérifiée par PCR sur colonie avec les amorces RH025 et RH134.

Un clone résistant à l'érythromycine a ensuite été transformé avec pEC750C- Δupp préalablement déméthylé. Les colonies ainsi obtenues ont été sélectionnées sur du milieu contenant de l'érythromycine (20 μ g/mL), du thiamphénicol (15 μ g/mL) et du lactose (40 mM).

Plusieurs de ces clones ont ensuite été resuspendus dans 100 μ L de milieu de culture (2YTG) puis dilués en série dans du milieu de culture (jusqu'à un facteur de dilution de 10⁴). Cinq μ L de chaque dilution ont été déposés sur une boîte de Pétri contenant de l'érythromycine, du thiamphénicol et de l'anhydrotétracycline (200 ng/mL) (cf. Figure 11).

Pour chaque clone, deux colonies résistantes à l'aTc ont été testées par colonie PCR avec des amorces destinées à amplifier le locus *upp* (cf. Figure 12).

Délétion du plasmide naturel pNF2 par l'outil CRISPR-Cas9 dans la souche *C. beijerinckii* DSM 6423 $\Delta catB$

Un clone de la souche *C. beijerinckii* DSM 6423 $\Delta catB$ a été au préalable transformé avec le vecteur pCas9_{ind} ne présentant pas de méthylation aux niveaux des motifs reconnus par les méthyltransférases de type Dam et Dcm (préparé à partir d'une bactérie *Escherichia coli* présentant le génotype *dam⁻ dcm⁻*). La présence du plasmide pCas9_{ind} au sein de la souche *C. beijerinckii* DSM6423 a été vérifiée par PCR avec les amorces pCas9_{ind}_fwd (SEQ ID NO : 42) et pCas9_{ind}_rev (SEQ ID NO : 43) (cf. Figure 13).

Un clone résistant à l'érythromycine a ensuite été utilisé pour transformer le pGRNA-pNF2, préparé à partir d'une bactérie *Escherichia coli* présentant le génotype *dam⁻ dcm⁻*.

Plusieurs colonies obtenues sur du milieu contenant de l'érythromycine (20 µg/mL) et du thiamphénicol (15 µg/mL) ont été resuspendues dans du milieu de culture et diluées en série jusqu'à un facteur de dilution de 10⁴. Huit µL de chaque dilution ont été déposés sur une boîte de Pétri contenant de l'érythromycine, du thiamphénicol et de l'anhydrotétracycline (200 ng/mL) afin d'induire l'expression du système CRISPR/Cas9.

L'absence du plasmide naturel pNF2 a été vérifiée par PCR avec les amorces pNF2_fwd (SEQ ID NO: 39) et pNF2_rev (SEQ ID NO : 40) (cf. Figure 14).

Conclusions

Au cours de ce travail, les inventeurs sont parvenus à introduire et maintenir différents plasmides au sein de la souche *Clostridium beijerinckii* DSM 6423. Ils sont parvenus à supprimer le gène *catB* à l'aide d'un outil de type CRISPR-Cas9 basé sur l'utilisation d'un seul plasmide. La sensibilité au thiamphénicol des souches recombinantes obtenues a été confirmée par des tests en milieu gélosé.

Cette délétion leur a permis d'utiliser l'outil CRISPR-Cas9 nécessitant deux plasmides décrit dans la demande de brevet FR1854835. Deux exemples permettant de démontrer l'intérêt de cette application ont été réalisés : la délétion du gène *upp* et l'élimination d'un plasmide naturel non essentiel pour la souche *Clostridium beijerinckii* DSM 6423.

Résultats n°2

Transformation des souches de *C. beijerinckii*

Les plasmides préparés dans la souche d'*E. coli* NEB 10-beta sont également utilisés pour transformer la souche *C. beijerinckii* NCIMB 8052. En revanche, pour *C. beijerinckii* DSM 6423, les plasmides sont préalablement introduits et répliqués dans une souche de *E. coli dam⁻ dcm⁻* (INV110, Invitrogen). Ceci permet d'éliminer les méthylations de type Dam et Dcm sur les plasmides d'intérêt avant de les introduire par transformation dans la souche DSM 6423.

La transformation est autrement réalisée similairement pour chaque souche, c'est-à-dire selon le protocole décrit par Mermelstein *et al.* 1992, avec les modifications suivantes : la souche est transformée avec une quantité plus importante de plasmide (5-20 µg), à une DO₆₀₀ de 0,6-0,8, et les paramètres d'électroporation sont 100 Ω, 25 µF, 1400 V. Après 3h de régénération dans du 2YTG, les bactéries sont étalées sur boîte de Petri (2YTG agar) contenant l'antibiotique souhaité (erythromycine : 20-40 µg/mL ; thiamphénicol : 15 µg/mL ; spectinomycine : 650 µg/mL).

Comparaison des efficacités de transformation des souches de *C. beijerinckii* DSM 6423

Des transformations ont été réalisées en duplicat biologique dans les souches de *C. beijerinckii* suivantes : DSM 6423 sauvage, DSM 6423 $\Delta catB$ et DSM 6423 $\Delta catB \Delta pNF2$ (Figure 30). Pour cela, le vecteur pCas9_{ind}, notablement difficile à utiliser pour modifier une bactérie car ne permettant pas de bonnes efficacités de transformation, a été utilisé. Il comporte de plus un gène conférant à la souche une résistance à l'érythromycine, antibiotique pour lequel les trois souches sont sensibles.

Les résultats indiquent une augmentation de l'efficacité de transformation d'un facteur d'environ 15-20 imputable à la perte du plasmide naturel pNF2.

L'efficacité de transformation a également été testée pour le plasmide pEC750C, qui confère une résistance au thiamphénicol, uniquement dans les souches DSM 6423 $\Delta catB$ (IFP962 $\Delta catB$) et DSM 6423 $\Delta catB \Delta pNF2$ (IFP963 $\Delta catB \Delta pNF2$), puisque la souche sauvage est résistante à cet antibiotique (Figure 31). Pour ce plasmide, le gain en efficacité de transformation est encore plus flagrant (amélioration d'un facteur d'environ 2000).

Comparaison des efficacités de transformation des plasmides pNF3 avec d'autres plasmides

Afin de déterminer l'efficacité de transformation de plasmides contenant l'origine de réplication du plasmide naturel pNF2, les plasmides pNF3E et pNF3C ont été introduits dans la souche *C. beijerinckii* DSM 6423 $\Delta catB \Delta pNF2$. L'utilisation de vecteurs contenant des gènes de résistance à l'érythromycine ou au chloramphénicol permet de comparer l'efficacité de transformation du vecteur en fonction de la nature du gène de résistance. Les plasmides pFW01 et pEC750C ont également été transformés. Ces deux plasmides contiennent des gènes de résistance à des antibiotiques différents (respectivement l'érythromycine et le thiamphénicol) et sont couramment utilisés pour transformer *C. beijerinckii* et *C. acetobutylicum*.

Comme montré dans la Figure 32, les vecteurs basés sur le pNF3 présentent une excellente efficacité de transformation, et sont notamment utilisables chez *C. beijerinckii* DSM 6423 $\Delta catB \Delta pNF2$. En particulier, le pNF3E (qui contient un gène de résistance à l'érythromycine) montre une efficacité de transformation nettement supérieure à celle de pFW01, qui comprend le même gène de résistance. Ce même plasmide n'a pas pu être introduit dans la souche *C. beijerinckii* DSM 6423 sauvage (0 colonies obtenues avec 5 µg de plasmides transformés en duplicat biologique), ce qui démontre l'impact de la présence du plasmide naturel pNF2.

Vérification de la transformabilité des plasmides pNF3 dans d'autres souches/espèces

Pour illustrer la possibilité d'utiliser ce nouveau plasmide dans d'autres souches solvantogènes de *Clostridium*, les inventeurs ont réalisé une analyse comparative des efficacités de transformation des plasmides pFW01, pNF3E et pNF3S dans la souche ABE *C. beijerinckii* NCIMB 8052 (Figure 33). La souche NCIMB 8052 étant naturellement résistante au thiamphénicol, le pNF3S, conférant une résistance à la spectinomycine, a été utilisé à la place du pNF3C.

Les résultats démontrent que la souche NCIMB 8052 est transformable avec les plasmides basés sur le pNF3, ce qui prouve que ces vecteurs sont applicables à l'espèce *C. beijerinckii* au sens large.

L'applicabilité de la suite de vecteurs de synthèse basés sur le pNF3 a également été testée dans la souche référence DSM 792 de *C. acetobutylicum*. Un essai de transformation a ainsi montré la possibilité de transformer cette souche par le plasmide pNF3C (Efficacité de transformation de 3 colonies observées par μg d'ADN transformé contre 120 colonies/ μg pour le plasmide pEC750C).

Vérification de la compatibilité des plasmides pNF3 avec l'outil génétique décrit dans la demande FR18/73492

La demande de brevet FR18/73492 décrit la souche $\Delta catB$ ainsi que l'utilisation d'un système CRISPR/Cas9 à deux plasmides nécessitant l'utilisation d'un gène de résistance à l'érythromycine et d'un gène de résistance au thiamphénicol. Pour démontrer l'intérêt de la nouvelle suite de plasmides pNF3, le vecteur pNF3C a été transformé dans la souche $\Delta catB$ contenant déjà le plasmide pCas9_{acr}. La transformation, réalisée en duplicat, a montré une efficacité de transformation de $0,625 \pm 0,125$ colonies/ μg d'ADN (moyenne $\pm$ erreur standard), ce qui prouve qu'un vecteur basé sur le pNF3C peut être utilisé en combinaison avec le pCas9_{acr} dans la souche $\Delta catB$.

Parallèlement à ces résultats, une partie du plasmide pNF2 comprenant son origine de répllication (SEQ ID NO : 118) a pu être réutilisée avec succès pour créer une nouvelle suite de vecteurs navettes (SEQ ID NO : 119, 123, 124 et 125), modifiables à façon, permettant notamment leur répllication dans une souche d'*E. coli* ainsi que leur réintroduction chez *C. beijerinckii* DSM 6423. Ces nouveaux vecteurs présentent des efficacités de transformation avantageuses pour réaliser de l'édition génétique par exemple chez *C. beijerinckii* DSM 6423 et ses dérivées, en particulier à l'aide de l'outil CRISPR/Cas9 comprenant deux acides nucléiques différents.

Ces nouveaux vecteurs ont également pu être testés avec succès dans une autre souche de *C. beijerinckii* (NCIMB 8052), et d'espèce de *Clostridium* (en particulier *C. acetobutylicum*), démontrant leur applicabilité dans d'autres organismes du phylum des Firmicutes. Un test est également réalisé sur *Bacillus*.

Conclusions

Ces résultats démontrent que la suppression du plasmide naturel pNF2 augmente significativement les fréquences de transformation de la bactérie qui le contenait (d'un facteur d'environ 15 pour le pFW01 et d'un facteur d'environ 2000 pour le pEC750C). Ce résultat est particulièrement intéressant dans le cas des bactéries du genre *Clostridium*, connues pour être difficiles à transformer, et en particulier pour la souche *C. beijerinckii* DSM 6423 qui souffre naturellement d'une efficacité de transformation faible (inférieure à 5 colonies/ μg de plasmide).

REFERENCES

- Banerjee, A., Leang, C., Ueki, T., Nevin, K. P., & Lovley, D. R. (2014). Lactose-inducible system for metabolic engineering of *Clostridium ljungdahlii*. *Applied and environmental microbiology*, 80(8), 2410-2416.
- Chen J.-S., Hiu S.F. (1986) Acetone-butanol-isopropanol production by *Clostridium beijerinckii* (synonym, *Clostridium butylicum*). *Biotechnol. Lett.* **8**:371–376.
- Cui, L., & Bikard, D. (2016). Consequences of Cas9 cleavage in the chromosome of *Escherichia coli*. *Nucleic acids research*, 44(9), 4243-4251.
- Currie, D. H., Herring, C. D., Guss, A. M., Olson, D. G., Hogsett, D. A., & Lynd, L. R. (2013). Functional heterologous expression of an engineered full length CipA from *Clostridium thermocellum* in *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*. *Biotechnology for biofuels*, 6(1), 32.
- DiCarlo, J. E., Norville, J. E., Mali, P., Rios, X., Aach, J., & Church, G. M. (2013). Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic acids research*, 41(7), 4336-4343.
- Dong, H., Tao, W., Zhang, Y., & Li, Y. (2012). Development of an anhydrotetracycline-inducible gene expression system for solvent-producing *Clostridium acetobutylicum*: A useful tool for strain engineering. *Metabolic engineering*, 14(1), 59-67.
- Dong, D., Guo, M., Wang, S., Zhu, Y., Wang, S., Xiong, Z., ... & Huang, Z. (2017). Structural basis of CRISPR–SpyCas9 inhibition by an anti-CRISPR protein. *Nature*, 546(7658), 436.
- Dupuy, B., Mani, N., Katayama, S., & Sonenshein, A. L. (2005). Transcription activation of a UV-inducible *Clostridium perfringens* bacteriocin gene by a novel σ factor. *Molecular microbiology*, 55(4), 1196-1206.
- Egholm, M., Buchardt, O., Nielsen, P. E., & Berg, R. H. (1992). Peptide nucleic acids (PNA). Oligonucleotide analogs with an achiral peptide backbone. *Journal of the American Chemical Society*, 114(5), 1895-1897.
- Fonfara, I., Le Rhun, A., Chylinski, K., Makarova, K. S., Lecrivain, A. L., Bzdrenga, J., ... & Charpentier, E. (2013). Phylogeny of Cas9 determines functional exchangeability of dual-RNA and Cas9 among orthologous type II CRISPR-Cas systems. *Nucleic acids research*, 42(4), 2577-2590.
- Garcia-Doval C, Jinek M. Molecular architectures and mechanisms of Class 2 CRISPR-associated nucleases. *Curr Opin Struct Biol.* 2017 Dec;47:157-166. doi: 10.1016/j.sbi.2017.10.015 Ajouter au projet Citavi par DOI. Epub 2017 Nov 3. Review.
- George H.A., Johnson J.L., Moore W. E. C., Holdeman, L. V., Chen J. S. (1983) Acetone, Isopropanol, and Butanol Production by *Clostridium beijerinckii* (syn. *Clostridium butylicum*) and *Clostridium aurantibutyricum*. *Appl. Env. Microbiol.* **45**:1160–1163.
- Gonzales y Tucker RD, Frazee B. View from the front lines: an emergency medicine perspective on clostridial infections in injection drug users. *Anaerobe.* 2014 Dec; 30:108-15.

- Hartman, A. H., Liu, H., & Melville, S. B. (2011). Construction and characterization of a lactose-inducible promoter system for controlled gene expression in *Clostridium perfringens*. *Applied and environmental microbiology*, 77(2), 471-478.
- Heap, J. T., Ehsaan, M., Cooksley, C. M., Ng, Y. K., Cartman, S. T., Winzer, K., & Minton, N. P. (2012). Integration of DNA into bacterial chromosomes from plasmids without a counter-selection marker. *Nucleic acids research*, 40(8), e59-e59.
- Heap, J. T., Kuehne, S. A., Ehsaan, M., Cartman, S. T., Cooksley, C. M., Scott, J. C., & Minton, N. P. (2010). The ClosTron: mutagenesis in *Clostridium* refined and streamlined. *Journal of microbiological methods*, 80(1), 49-55.
- Heap, J. T., Pennington, O. J., Cartman, S. T., Carter, G. P., & Minton, N. P. (2007). The ClosTron: a universal gene knock-out system for the genus *Clostridium*. *Journal of microbiological methods*, 70(3), 452-464.
- Heap, J. T., Pennington, O. J., Cartman, S. T., & Minton, N. P. (2009). A modular system for *Clostridium* shuttle plasmids. *Journal of microbiological methods*, 78(1), 79-85.
- Hidalgo-Cantabrana, C., O'Flaherty, S., & Barrangou, R. (2017). *CRISPR-based engineering of next-generation lactic acid bacteria*. *Current opinion in microbiology*, 37, 79-87.
- Hiu S.F., Zhu C.-X., Yan R.-T., Chen J.-S. (1987) Butanol-ethanol dehydrogenase and butanol-ethanol-isopropanol dehydrogenase: different alcohol dehydrogenases in two strains of *Clostridium beijerinckii* (*Clostridium butylicum*). *Appl. Env. Microbiol.* **53**:697–703.
- Huang, H., Chai, C., Li, N., Rowe, P., Minton, N. P., Yang, S., & Gu, Y. (2016). CRISPR/Cas9-based efficient genome editing in *Clostridium ljungdahlii*, an autotrophic gas-fermenting bacterium. *ACS synthetic biology*, 5(12), 1355-1361.
- Huggins, A.S., Bannam, T.L. and Rood, J.I. (1992) Comparative sequence analysis of the *catB* gene from *Clostridium butyricum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36, 2548-2551.
- Ismaiel A.A., Zhu C.X., Colby G.D., Chen, J. S. (1993). Purification and characterization of a primary-secondary alcohol dehydrogenase from two strains of *Clostridium beijerinckii*. *J. Bacteriol.* **175**:5097–5105.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816-821.
- Jones D.T., Woods D.R. (1986) Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiological Reviews* **50**:484–524.
- Kolek J., Sedlar K., Provaznik I., Patakova P. (2016). Dam and Dcm methylations prevent gene transfer into *Clostridium pasteurianum* NRRL B-598: development of methods for electrotransformation, conjugation, and sonoporation. *Biotechnol Biofuels.* **9**:14.

- Li, Q., Chen, J., Minton, N. P., Zhang, Y., Wen, Z., Liu, J., ... & Gu, Y. (2016). CRISPR-based genome editing and expression control systems in *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*. *Biotechnology journal*, 11(7), 961-972.
- Makarova, K. S., Haft, D. H., Barrangou, R., Brouns, S. J., Charpentier, E., Horvath, P., ... & Van Der Oost, J. (2011). Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, 9(6), 467.
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Alkhnbashi, O. S., Costa, F., Shah, S. A., Saunders, S. J., ... & Horvath, P. (2015). An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, 13(11), 722.
- Marino, N. D., Zhang, J. Y., Borges, A. L., Sousa, A. A., Leon, L. M., Rauch, B. J., ... & Bondy-Denomy, J. (2018). Discovery of widespread type I and type V CRISPR-Cas inhibitors. *Science*, 362(6411), 240-242.
- Máté de Gérando, H., Wasels, F., Bisson, A., Clément, B., Bidard, F., Jourdiere E., Lopez-Contreras A., Lopes Ferreira N. (2018). Genome and transcriptome of the natural isopropanol producer *Clostridium beijerinckii* DSM 6423. *BMC genomics*. **19**:242.
- Mearls, E. B., Olson, D. G., Herring, C. D., & Lynd, L. R. (2015). Development of a regulatable plasmid-based gene expression system for *Clostridium thermocellum*. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(18), 7589-7599.
- Mermelstein L.D., Welker N.E., Bennett G.N., Papoutsakis E.T. (1993). Expression of cloned homologous fermentative genes in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 **10**:190-195.
- Mermelstein L.D., Welker N.E., Bennett G.N., Papoutsakis E.T. (1993). Expression of cloned homologous fermentative genes in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 **10**:190-195.
- Moon HG, Jang YS, Cho C, Lee J, Binkley R, Lee SY. One hundred years of clostridial butanol fermentation. *FEMS Microbiol Lett*. 2016 Feb;363(3).
- Nagaraju, S., Davies, N. K., Walker, D. J. F., Köpke, M., & Simpson, S. D. (2016). Genome editing of *Clostridium autoethanogenum* using CRISPR/Cas9. *Biotechnology for biofuels*, 9(1), 219.
- Nariya, H., Miyata, S., Kuwahara, T., & Okabe, A. (2011). Development and characterization of a xylose-inducible gene expression system for *Clostridium perfringens*. *Applied and environmental microbiology*, 77(23), 8439-8441.
- Newcomb, M., Millen, J., Chen, C. Y., & Wu, J. D. (2011). Co-transcription of the *celC* gene cluster in *Clostridium thermocellum*. *Applied microbiology and biotechnology*, 90(2), 625-634.
- Pawluk, A., Davidson, A. R., & Maxwell, K. L. (2018). Anti-CRISPR: Discovery, mechanism and function. *Nature Reviews Microbiology*, 16(1), 12
- Poehlein A., Solano J.D.M., Flitsch S.K., Krabben P., Winzer K., Reid S.J., Jones D.T., Green E., Minton N.P., Daniel R., Dürre P. (2017). Microbial solvent formation revisited by comparative genome analysis. *Biotechnol Biofuels*. **10**:58.

- Pyne, M. E., Bruder, M. R., Moo-Young, M., Chung, D. A., & Chou, C. P. (2016). Harnessing heterologous and endogenous CRISPR-Cas machineries for efficient markerless genome editing in *Clostridium*. *Scientific reports*, 6.
- Rauch, B. J., Silvis, M. R., Hultquist, J. F., Waters, C. S., McGregor, M. J., Krogan, N. J., & Bondy-Denomy, J. (2017). Inhibition of CRISPR-Cas9 with bacteriophage proteins. *Cell*, 168(1-2), 150-158.
- Rajewska M., Wegrzyn K., Konieczny I., FEMS Microbiol Rev. 2012 Mar; 36(2). *AT-rich region and repeated sequences – the essential elements of replication origins of bacterial replicons* :408-34.
- Ransom, E. M., Ellermeier, C. D., & Weiss, D. S. (2015). Use of mCherry red fluorescent protein for studies of protein localization and gene expression in *Clostridium difficile*. *Applied and environmental microbiology*, 81(5), 1652-1660.
- Rogers P., Chen J.-S., Zidwick M. (2006) in *The prokaryotes*. 3rd edition, Vol. 1, edited by Dworkin M (Springer, New York, USA,2006). 3rd edition, Vol. 1, pp. 672–755.
- Schwarz S, Kehrenberg C, Doublet B, Cloeckaert A. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphénicol and florfenicol. FEMS Microbiol Rev. 2004 Nov;28(5):519-42.
- Stella S, Alcón P, Montoya G. Class 2 CRISPR-Cas RNA-guided endonucleases: Swiss Army knives of genome editing. Nat Struct Mol Biol. 2017 Nov;24(11):882-892. doi: 10.1038/nsmb.3486
- Wang, S., Dong, S., Wang, P., Tao, Y., & Wang, Y. (2017). Genome Editing in *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 with the CRISPR-Cas9 System. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(10), e00233-17.
- Wang Y, Li X, Milne CB, et al. Development of a gene knockout system using mobile group II introns (Targetron) and genetic disruption of acid production pathways in *Clostridium beijerinckii*. *Appl Environ Microbiol*. 2013; 79(19): 5853-63.
- Wang, Y. *et al.* Markerless chromosomal gene deletion in *Clostridium beijerinckii* using CRISPR/Cas9 system. *J. Biotechnol.* 2015. 200: 1-5.
- Wang, Y., Zhang, Z. T., Seo, S. O., Lynn, P., Lu, T., Jin, Y. S., & Blaschek, H. P. (2016). Bacterial genome editing with CRISPR-Cas9: deletion, Integration, single nucleotide modification, and desirable “clean” mutant selection in *Clostridium beijerinckii* as an example. *ACS synthetic biology*, 5(7), 721-732.
- Wasels, F., Jean-Marie, J., Collas, F., López-Contreras, A. M., & Ferreira, N. L. (2017). A two-plasmid inducible CRISPR/Cas9 genome editing tool for *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of microbiological methods*. 140:5-11.
- Xu, T., Li, Y., Shi, Z., Hemme, C. L., Li, Y., Zhu, Y., ... & Zhou, J. (2015). Efficient genome editing in *Clostridium cellulolyticum* via CRISPR-Cas9 nickase. *Applied and environmental microbiology*, 81(13), 4423-4431.
- Yadav, R., Kumar, V., Baweja, M., & Shukla, P. (2018). *Gene editing and genetic engineering approaches for advanced probiotics: A Review*. *Critical reviews in food science and nutrition*, 58(10), 1735-1746.- Yue Chen, Bruce A. McClane, Derek J. Fisher, Julian I. Rood, Phalguni Gupta;

Construction of an Alpha Toxin Gene Knockout Mutant of *Clostridium perfringens* Type A by Use of a Mobile Group II Intron; Appl. Environ. Microbiol. Nov 2005, 71 (11) 7542-7547; **DOI:** 10.1128/AEM.71.11.7542-7547.2005.

- Zhang, J., Liu, Y. J., Cui, G. Z., & Cui, Q. (2015). A novel arabinose-inducible genetic operation system developed for *Clostridium cellulolyticum*. *Biotechnology for biofuels*, 8(1), 36.
- Zhang C., Tinggang L. Jianzhong H. (2018) Characterization and genome analysis of a butanol–isopropanol-producing *Clostridium beijerinckii* strain BGS1. *Biotechnol Biofuels* (2018) **11**:280.
- Zhong, J., Karberg, M., & Lambowitz, A. M. (2003). Targeted and random bacterial gene disruption using a group II intron (targetron) vector containing a retrotransposition-activated selectable marker. *Nucleic acids research*, 31(6), 1656-1664.

REVENDICATIONS

1. Acide nucléique reconnaissant le gène *catB* de séquence SEQ ID NO : 18 ou une séquence identique à au moins 70% à celle-ci au sein du génome d'une bactérie du genre *Clostridium*.
2. Acide nucléique selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit acide nucléique est sélectionné parmi une cassette d'expression et un vecteur, de préférence un plasmide.
3. Acide nucléique selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que l'acide nucléique comprend un ARN guide (ARNg) et/ou une matrice de modification.
4. Acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la bactérie *Clostridium* est une bactérie capable de produire de l'isopropanol à l'état sauvage.
5. Acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la bactérie *Clostridium* est une bactérie *C. beijerinckii* dont le sous-clade est sélectionnée parmi DSM 6423, LMG 7814, LMG 7815, NRRL B-593, NCCB 27006 et un sous-clade présentant au moins 95% d'identité avec la souche DSM6423.
6. Acide nucléique selon l'une des revendications 2 à 5, caractérisé en ce qu'il s'agit du plasmide pCas9ind- Δ *catB* de séquence SEQ ID NO : 21 ou du plasmide pCas9ind-gRNA-*catB* de séquence SEQ ID NO : 38.
7. Utilisation d'un acide nucléique selon l'une des revendications 2 à 6 pour transformer et/ou modifier génétiquement une bactérie *Clostridium* capable de produire de l'isopropanol à l'état sauvage.
8. Utilisation d'un acide nucléique reconnaissant le gène *catB* de séquence SEQ ID NO : 18 ou une séquence identique à au moins 70% à celle-ci au sein du génome de *C. beijerinckii* DSM 6423 pour transformer et/ou modifier génétiquement une bactérie *C. beijerinckii* DSM 6423.
9. Utilisation d'un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 6, ledit acide nucléique ne présentant pas de méthylation aux niveaux des motifs reconnus par les méthyltransférases de type Dam et Dcm, pour transformer un sous-clade *C. beijerinckii* sélectionné parmi DSM 6423, LMG 7814, LMG 7815, NRRL B-593, NCCB 27006 et un sous-clade présentant au moins 95%, de préférence 97%, d'identité avec la souche DSM 6423.

10. Procédé pour transformer, et de préférence modifier génétiquement, une bactérie du genre *Clostridium* à l'aide d'un outil de modification génétique, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de transformation de la bactérie par introduction dans ladite bactérie d'un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 6.
11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que la bactérie est transformée à l'aide d'un outil CRISPR utilisant une enzyme responsable de la coupure d'au moins un brin de la séquence cible codant ou contrôlant la transcription d'une amphénicol-O-acetyltransférase.
12. Bactérie du genre *Clostridium* modifiée génétiquement obtenu(e) à l'aide du procédé selon la revendication 10 ou 11.
13. Bactérie *C. beijerinckii* DSM6423 $\Delta catB$ déposée sous le numéro LMG P-31151.
14. Utilisation de la bactérie modifiée génétiquement selon la revendication 12, ou de la bactérie *C. beijerinckii* DSM6423 $\Delta catB$ déposée sous le numéro LMG P-31151 selon revendication 13, pour produire un solvant, de préférence l'isopropanol, ou un mélange de solvants, de préférence à l'échelle industrielle.
15. Kit comprenant (i) un acide nucléique selon l'une des revendications 2 à 6 et (ii) au moins un outil sélectionné parmi les éléments d'un outil de modification génétique ; un acide nucléique en tant qu'ARNg ; un acide nucléique en tant que matrice de réparation ; au moins une paire d'amorces ; et un inducteur permettant l'expression d'une protéine codée par ledit outil.

1/34

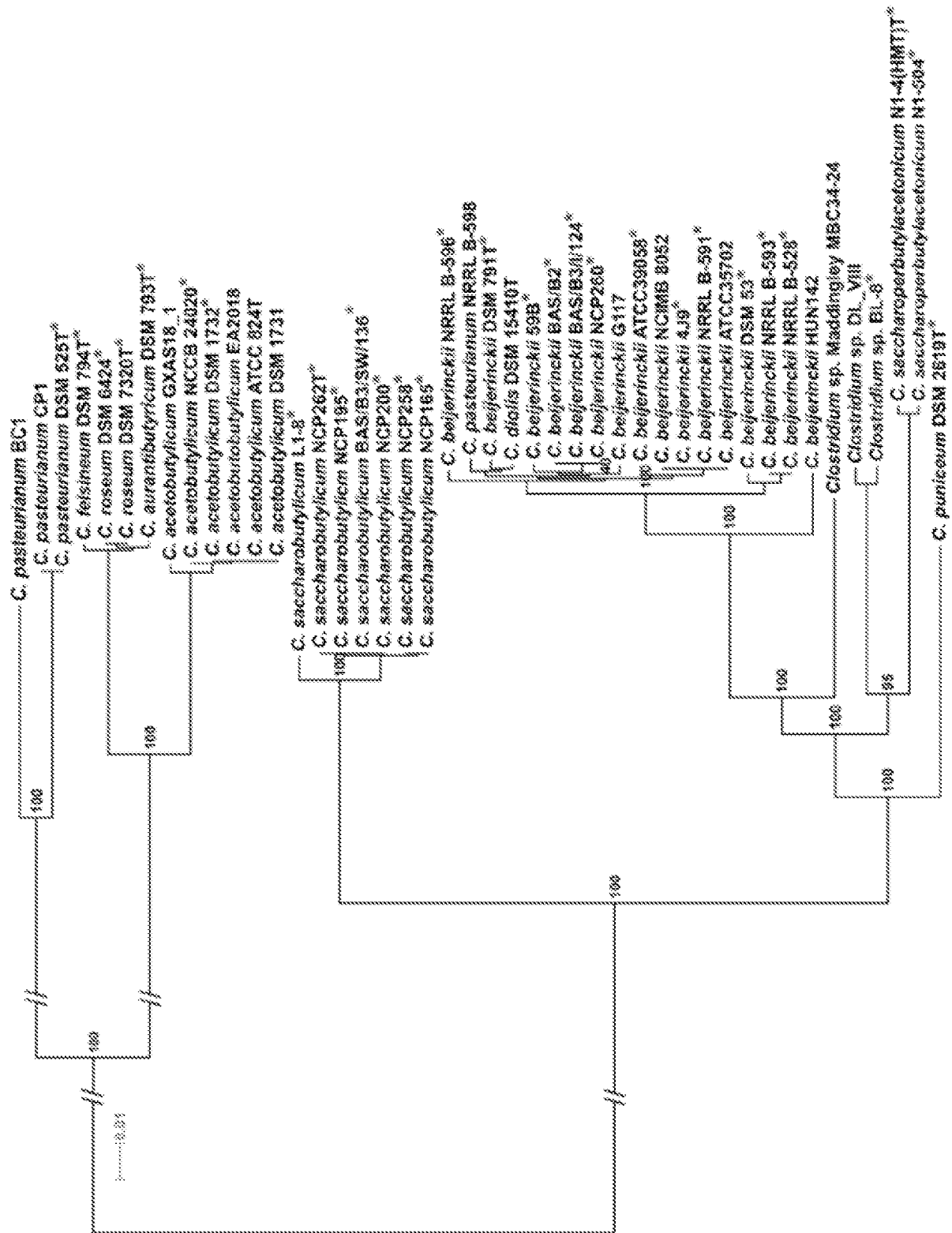


FIGURE 1

2/34

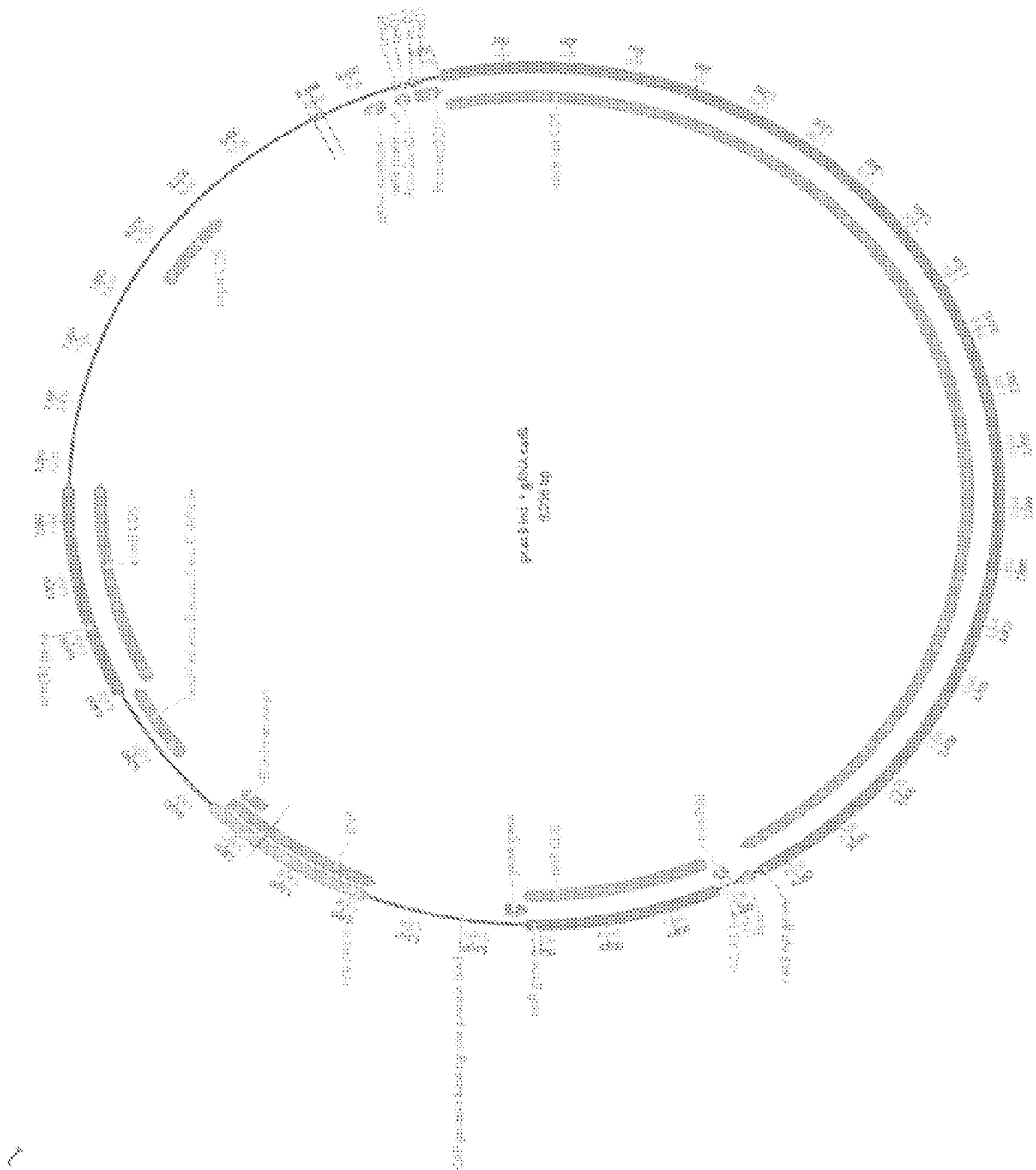


FIGURE 2

3/34

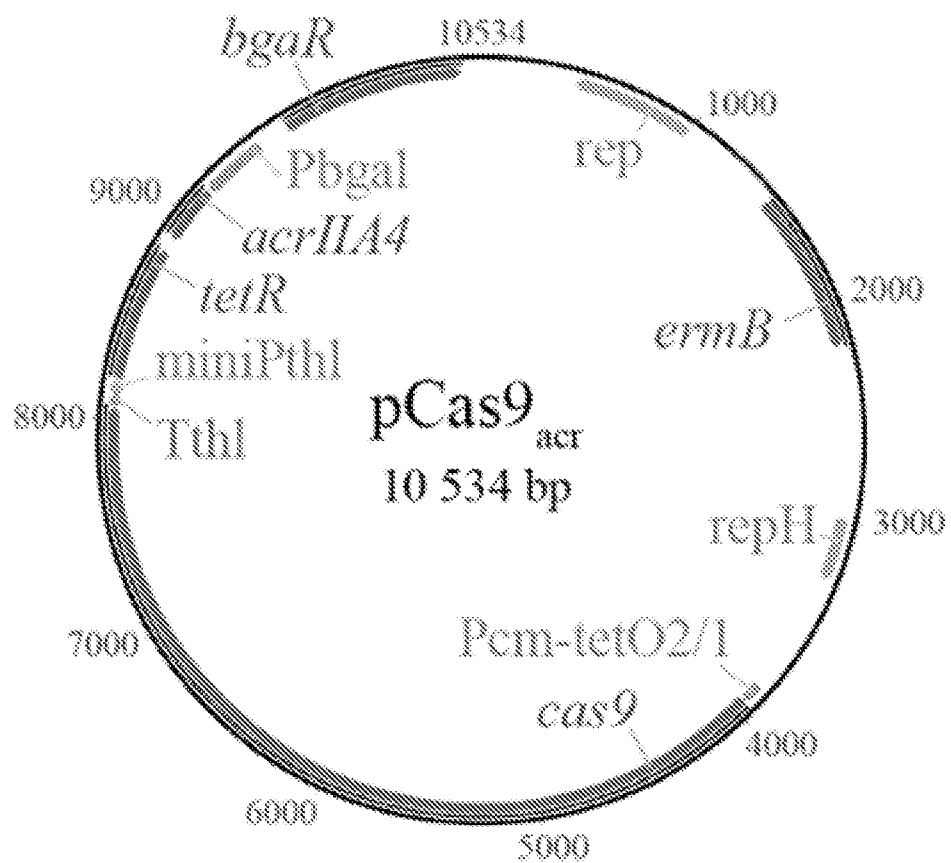


FIGURE 3

4/34

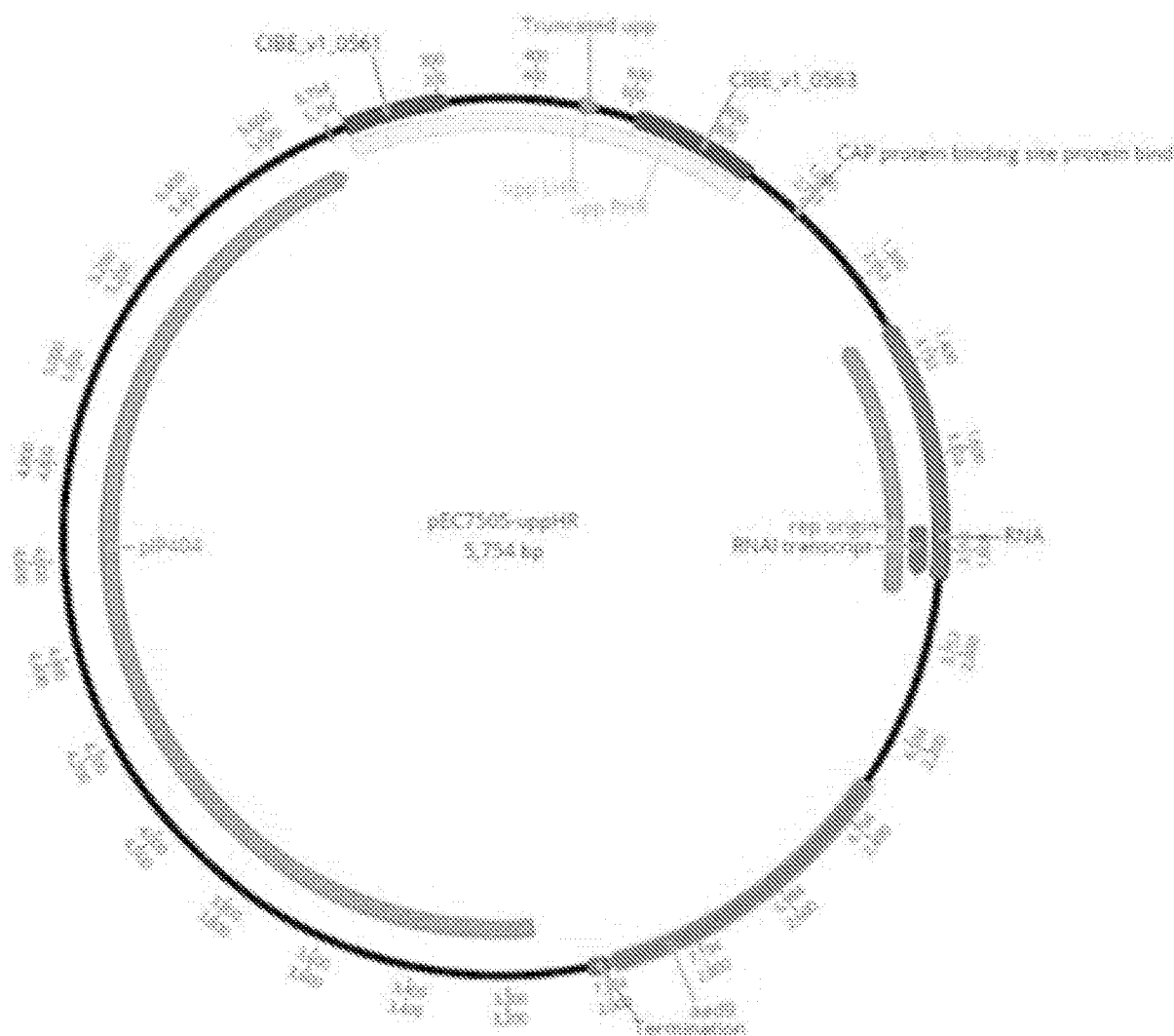


FIGURE 4

5/34

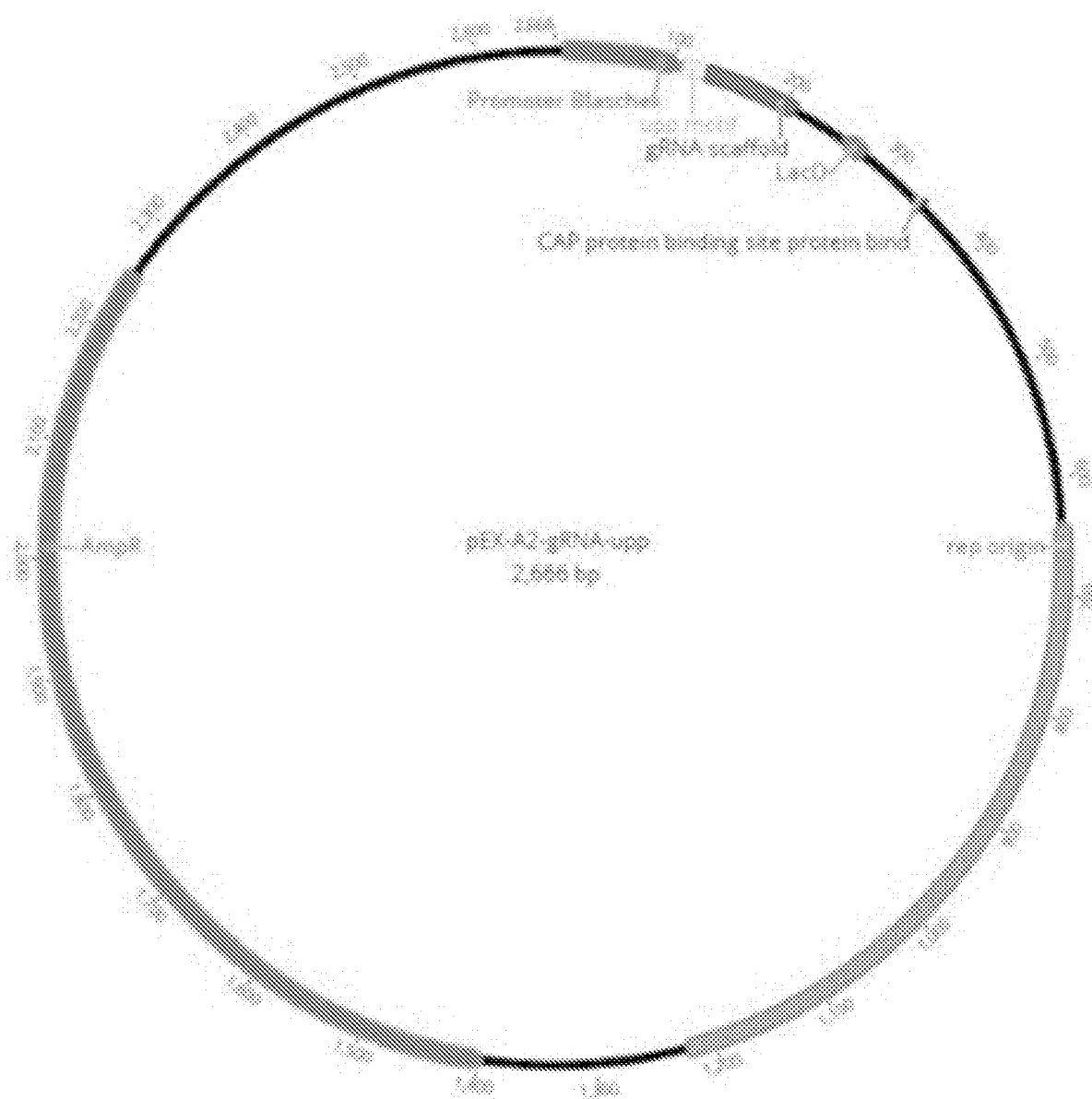
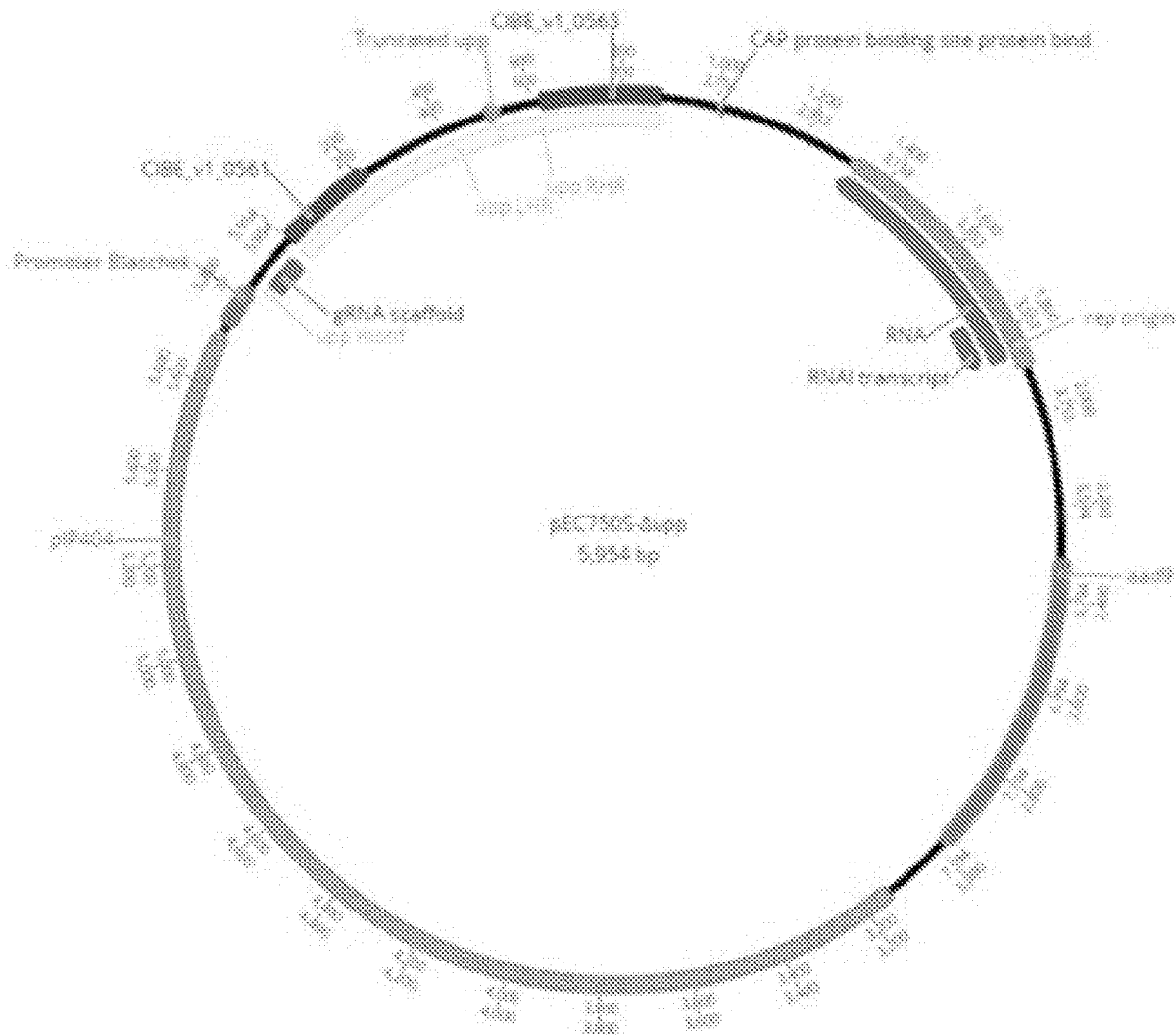
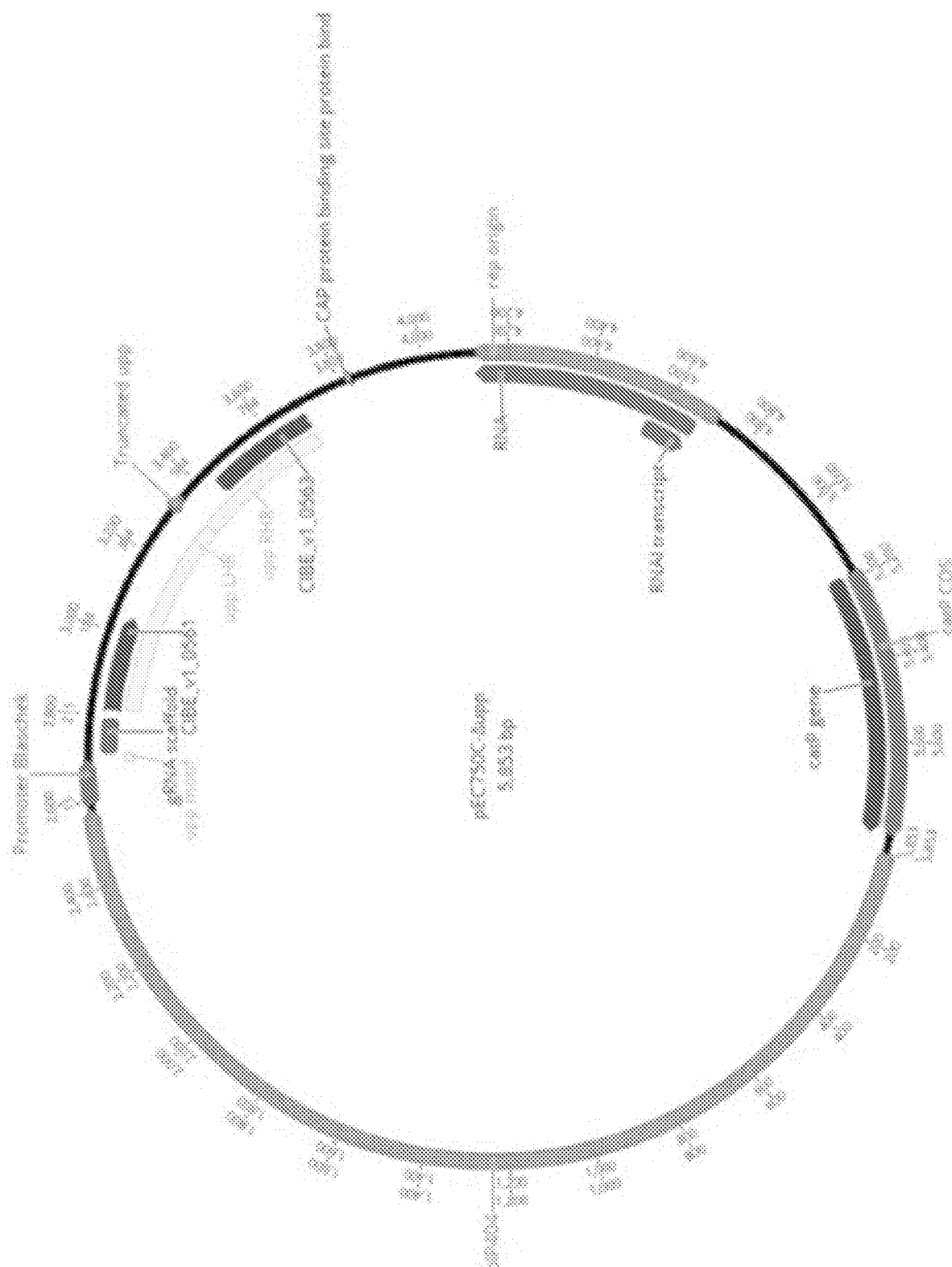


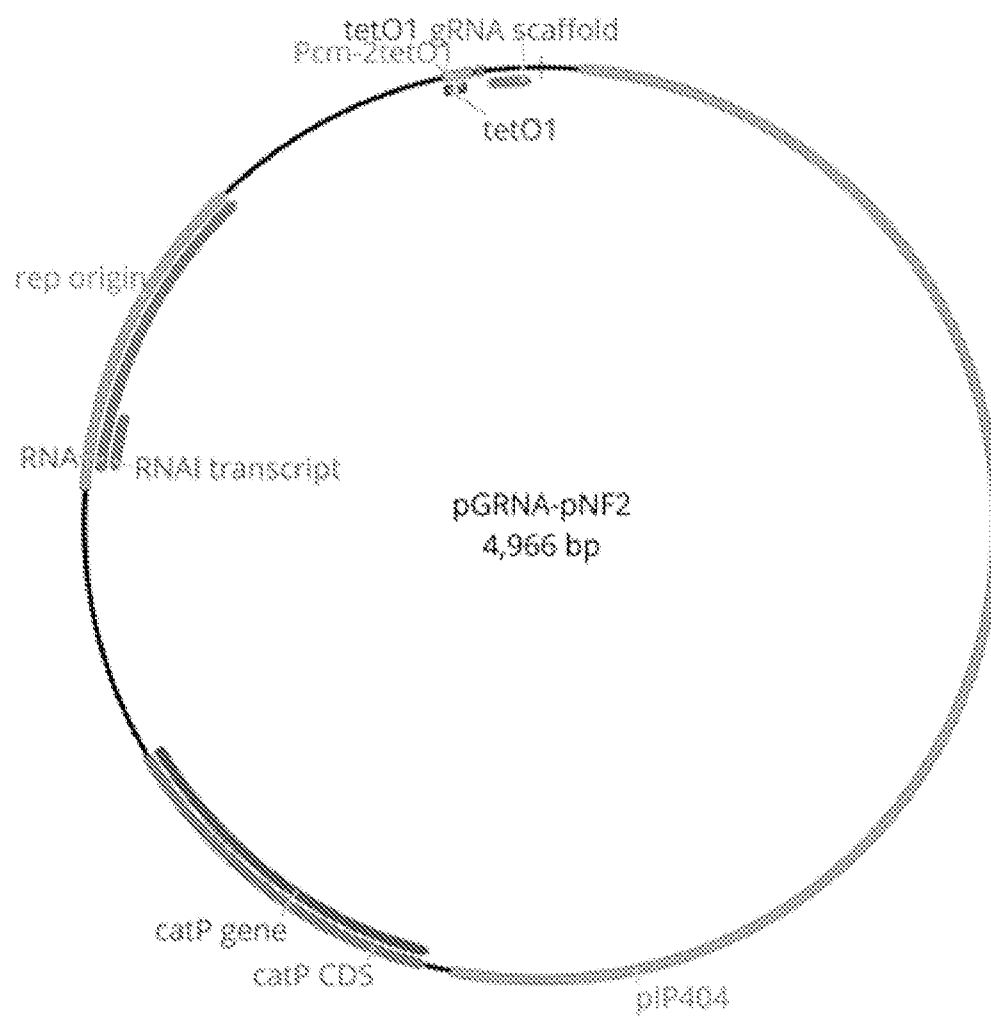
FIGURE 5

6/34

**FIGURE 6**



8/34

**FIGURE 8**

9/34

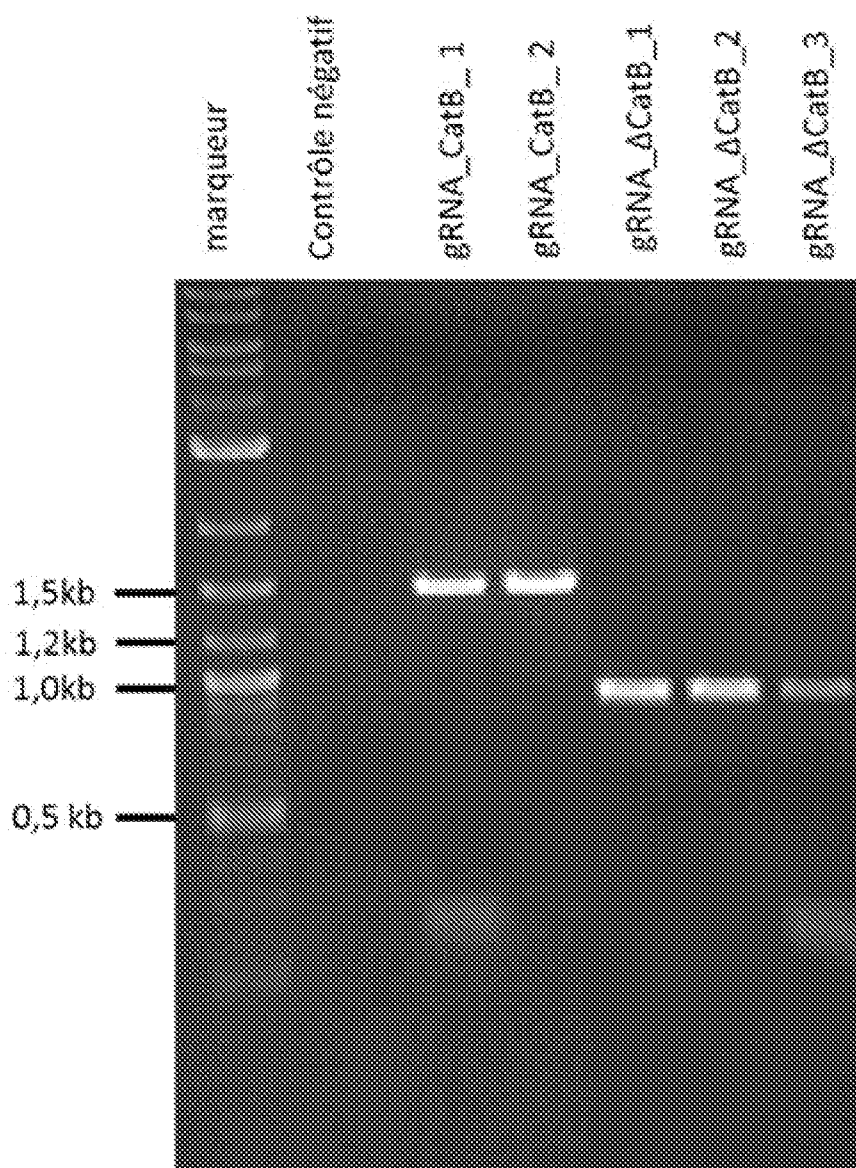
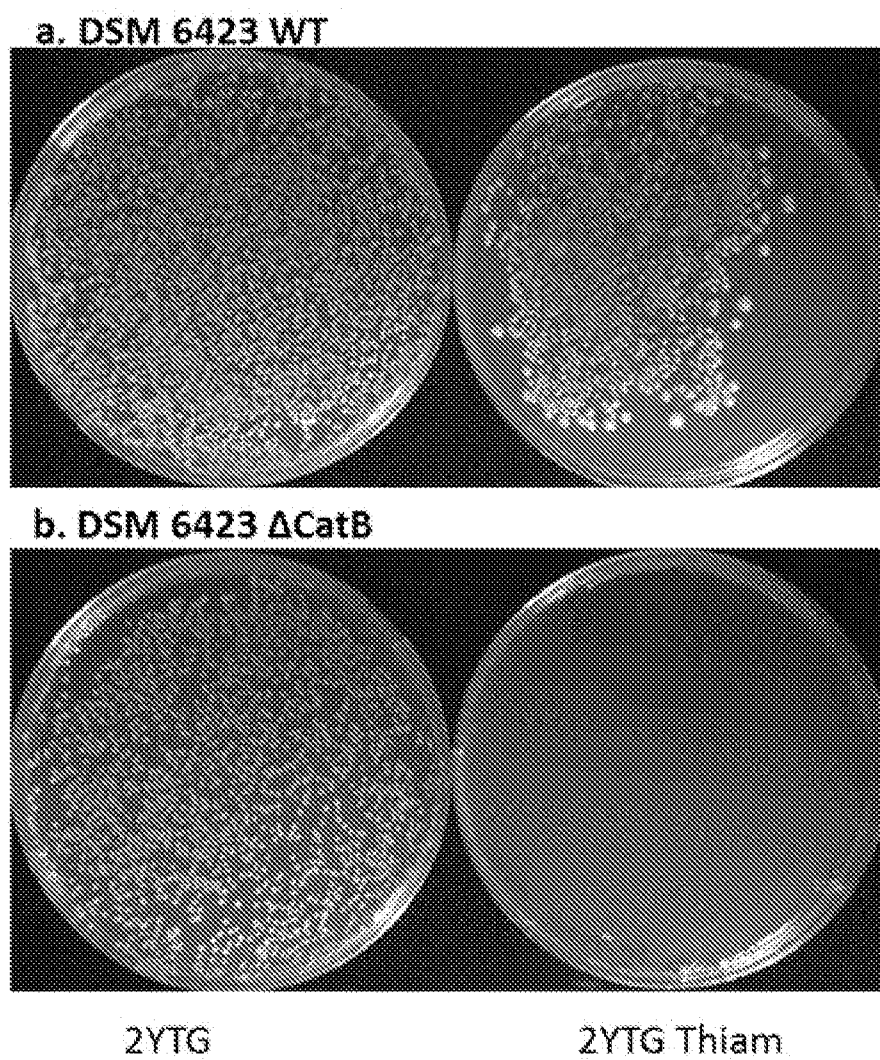


FIGURE 9

10/34

**FIGURE 10**

11/34

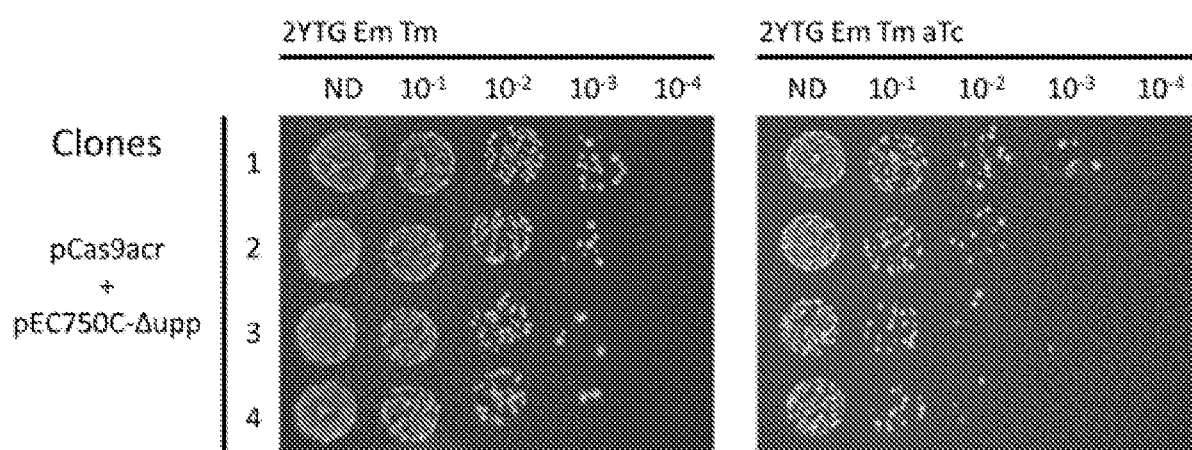
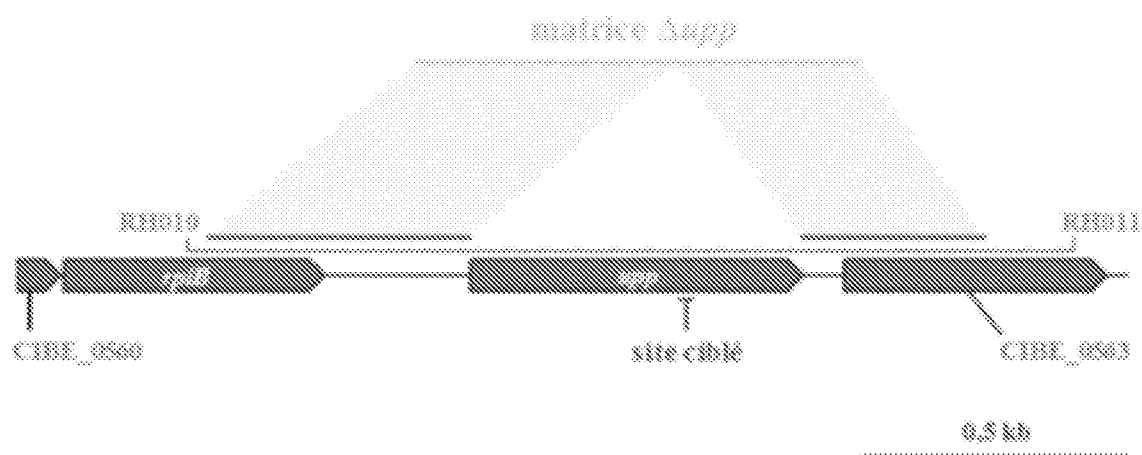


FIGURE 11

12/34

A



B

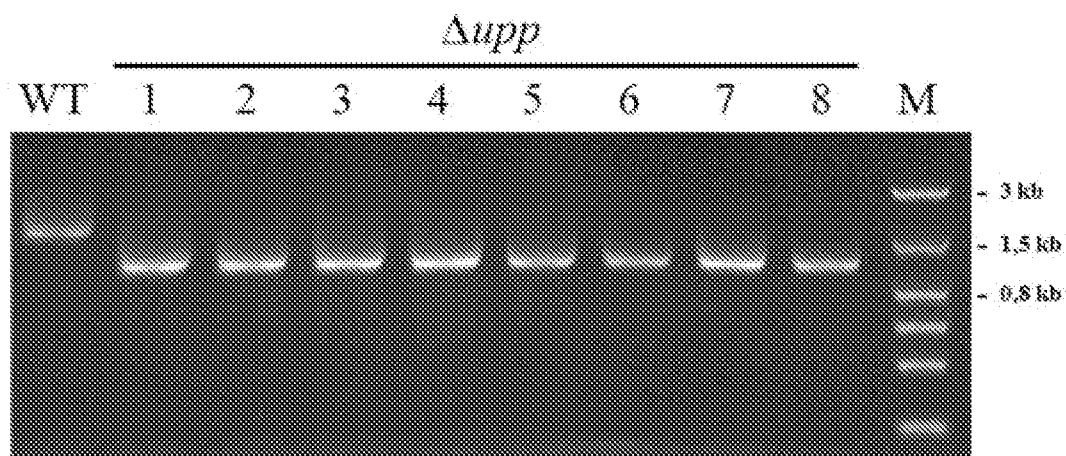
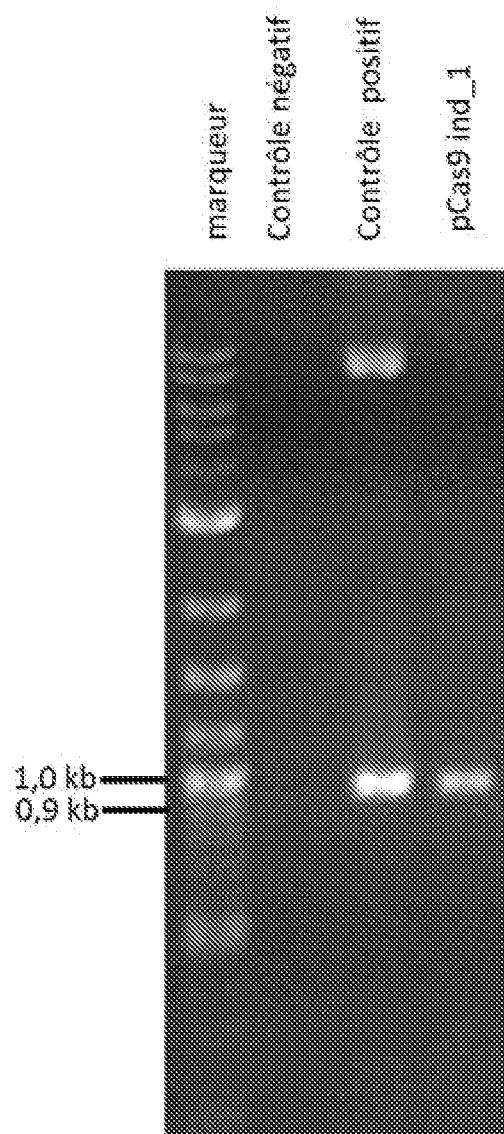


FIGURE 12

13/34

**FIGURE 13**

14/34

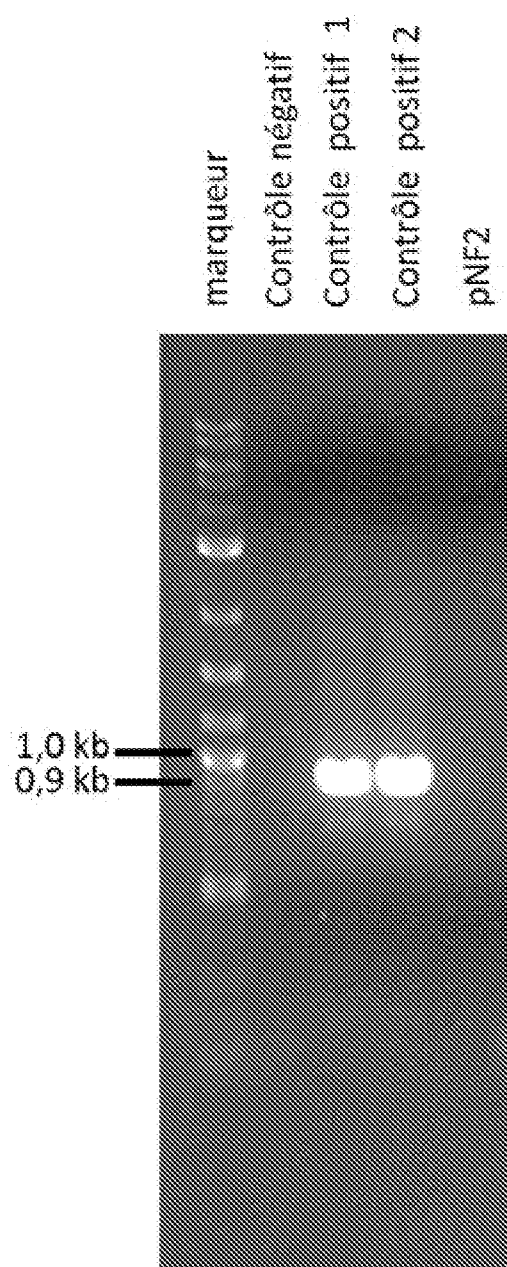


FIGURE 14

15/34

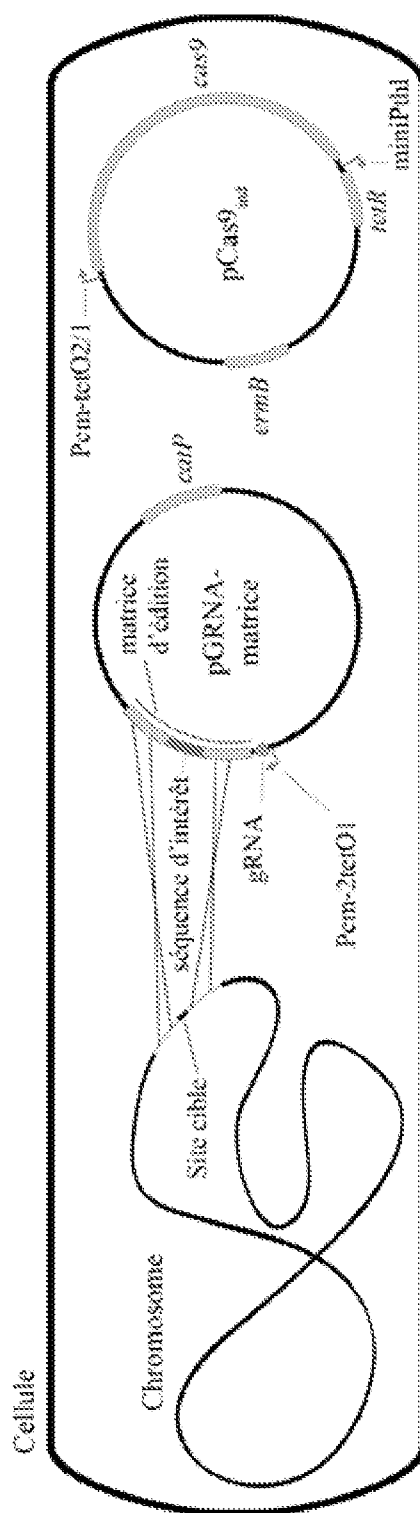


FIGURE 15

16/34

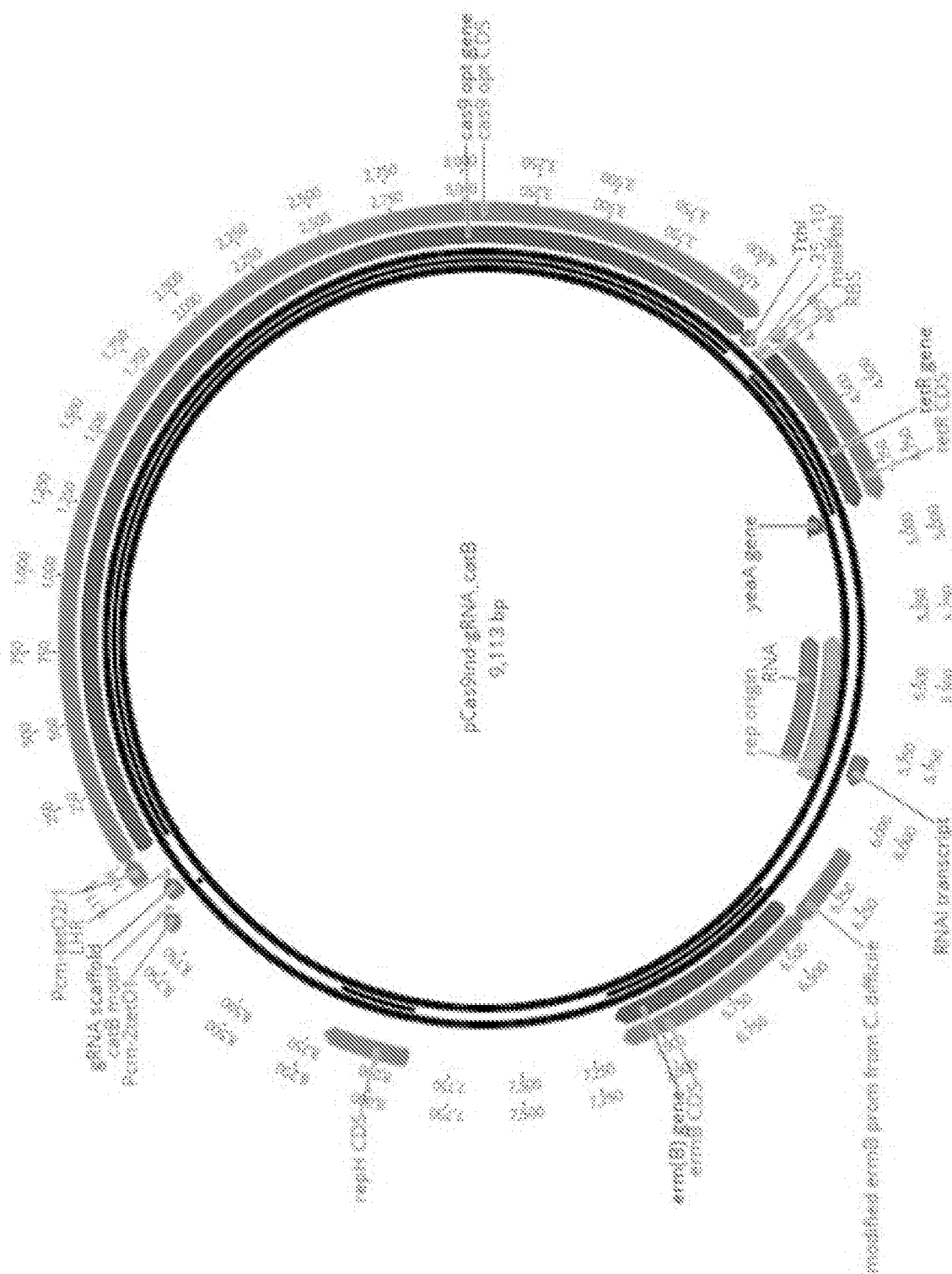
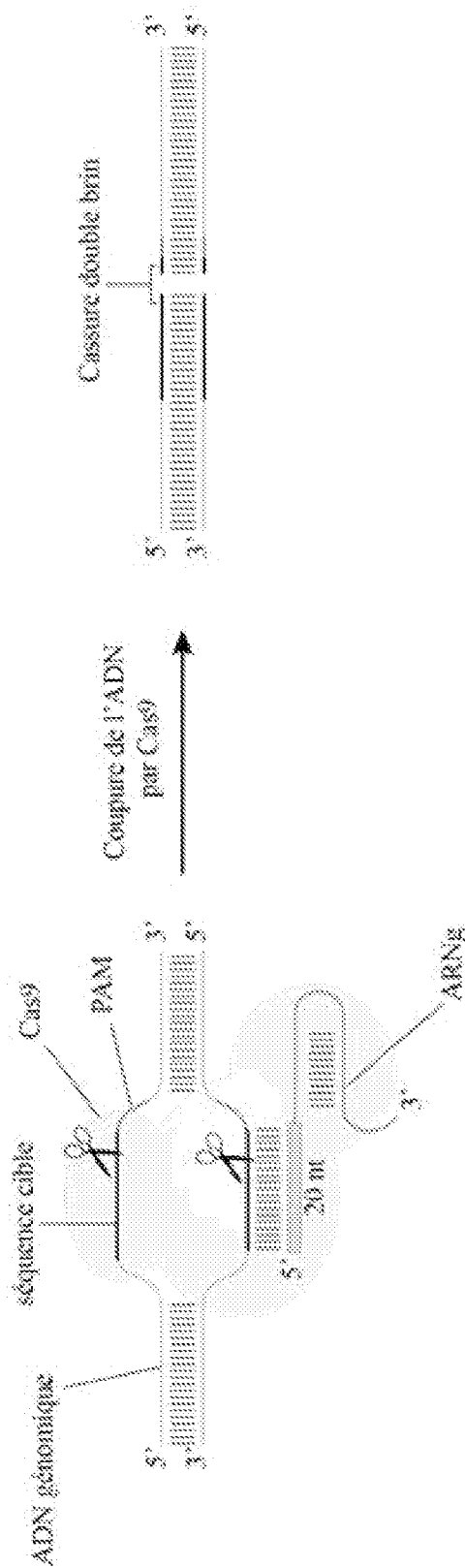


FIGURE 16

17/34



18/34

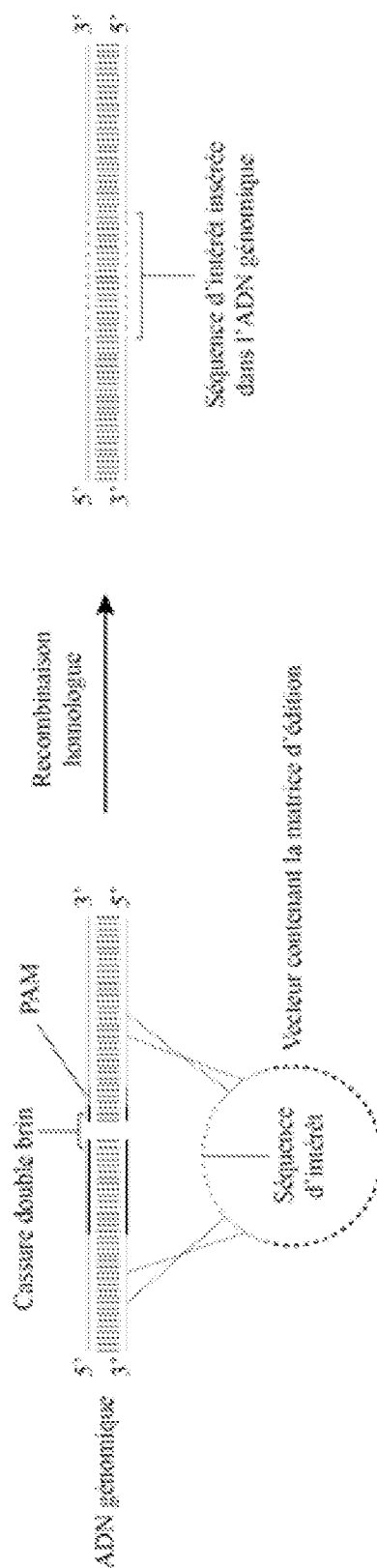


FIGURE 18

19/34

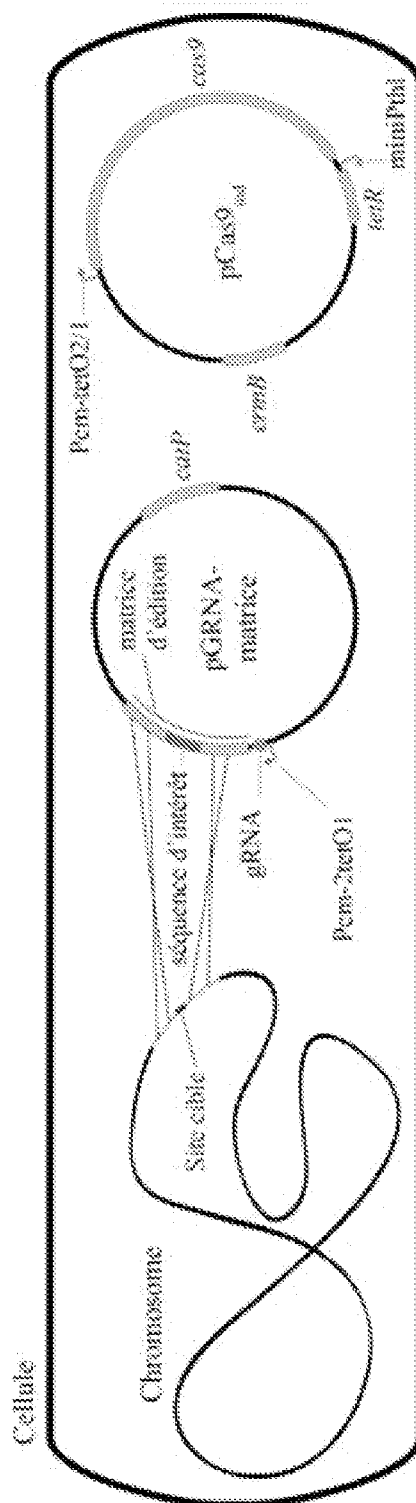


FIGURE 19

20/34

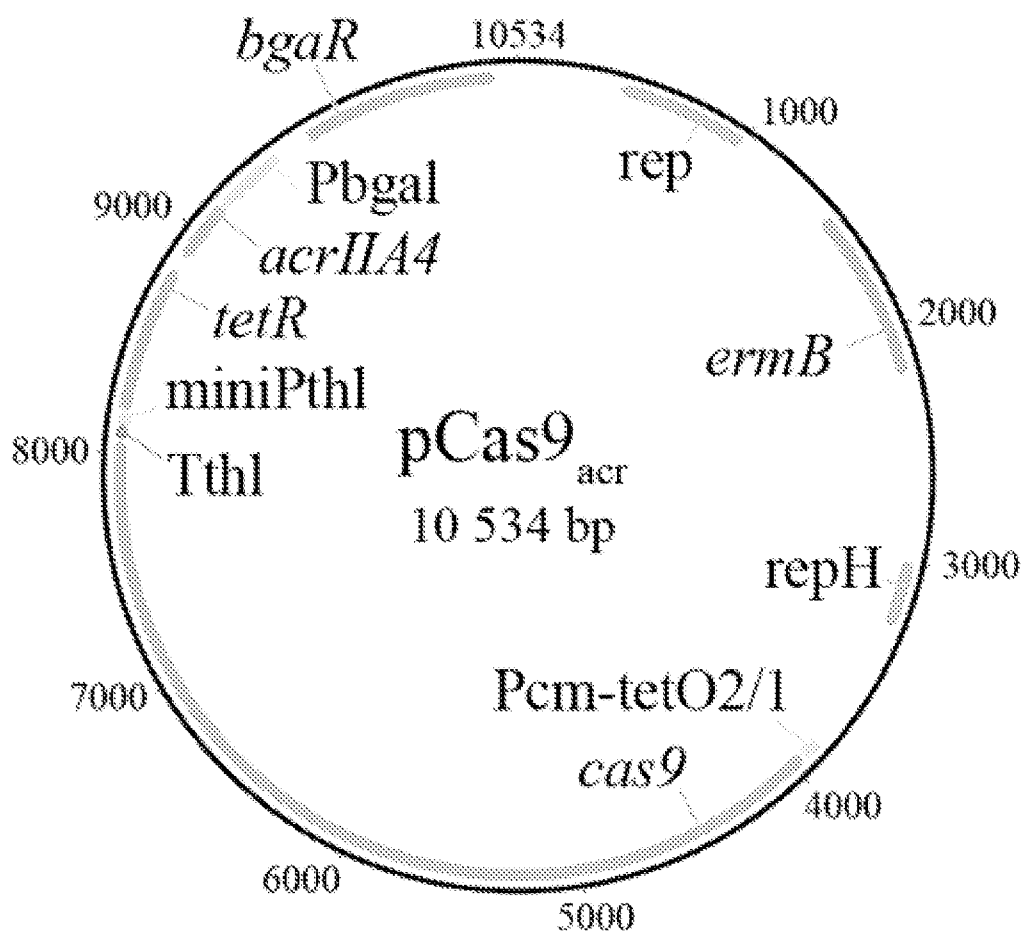


FIGURE 20

21/34

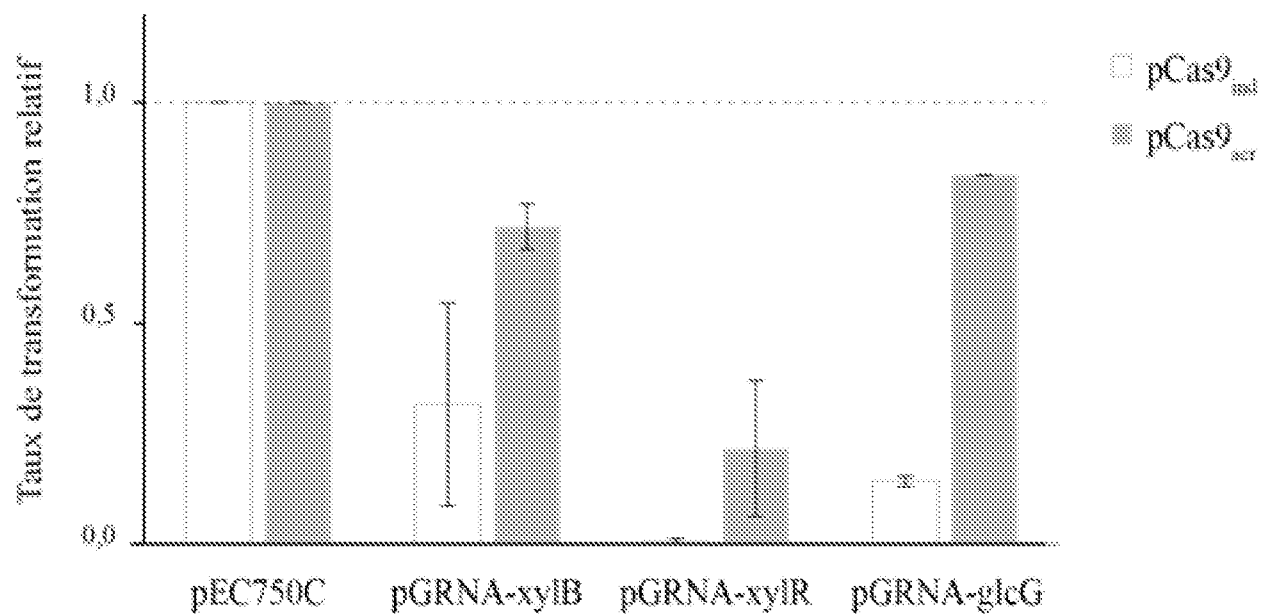


FIGURE 21

22/34

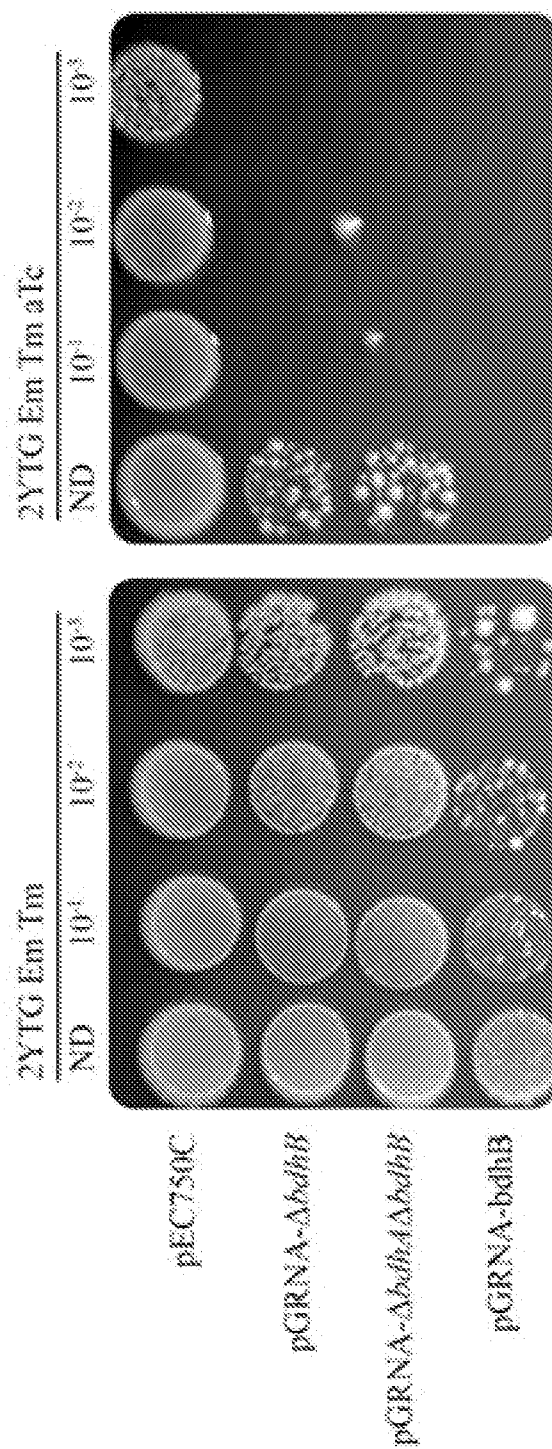


FIGURE 22

23/34

A

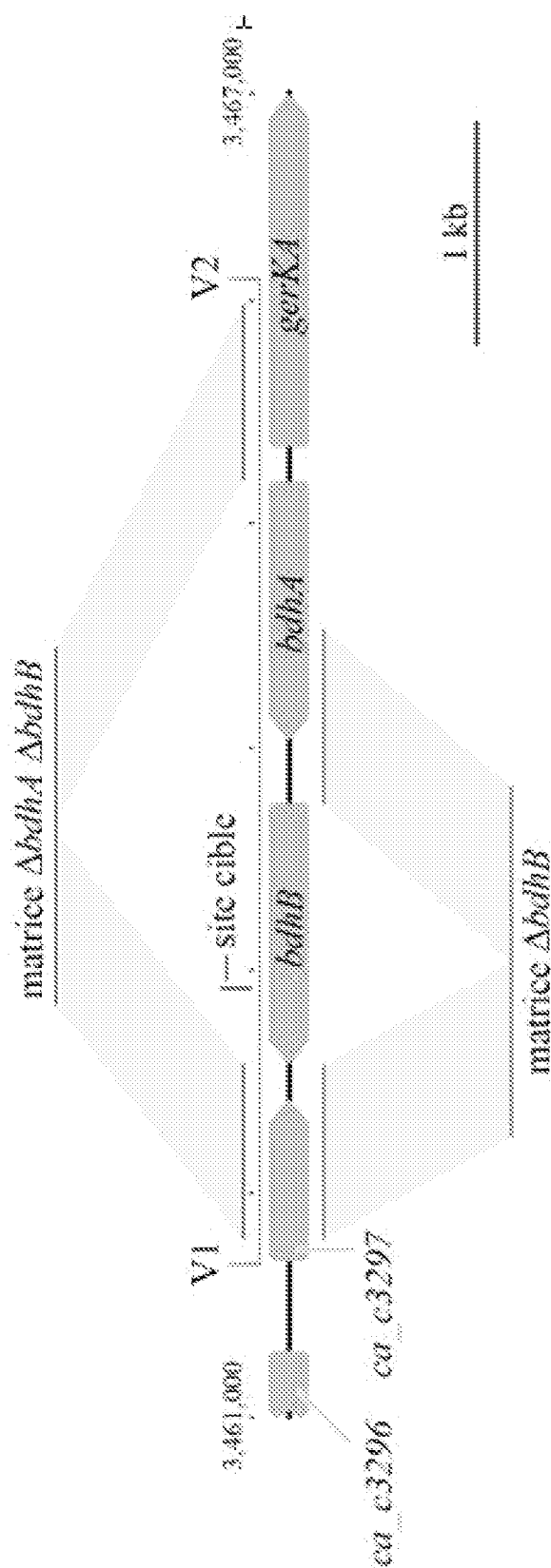
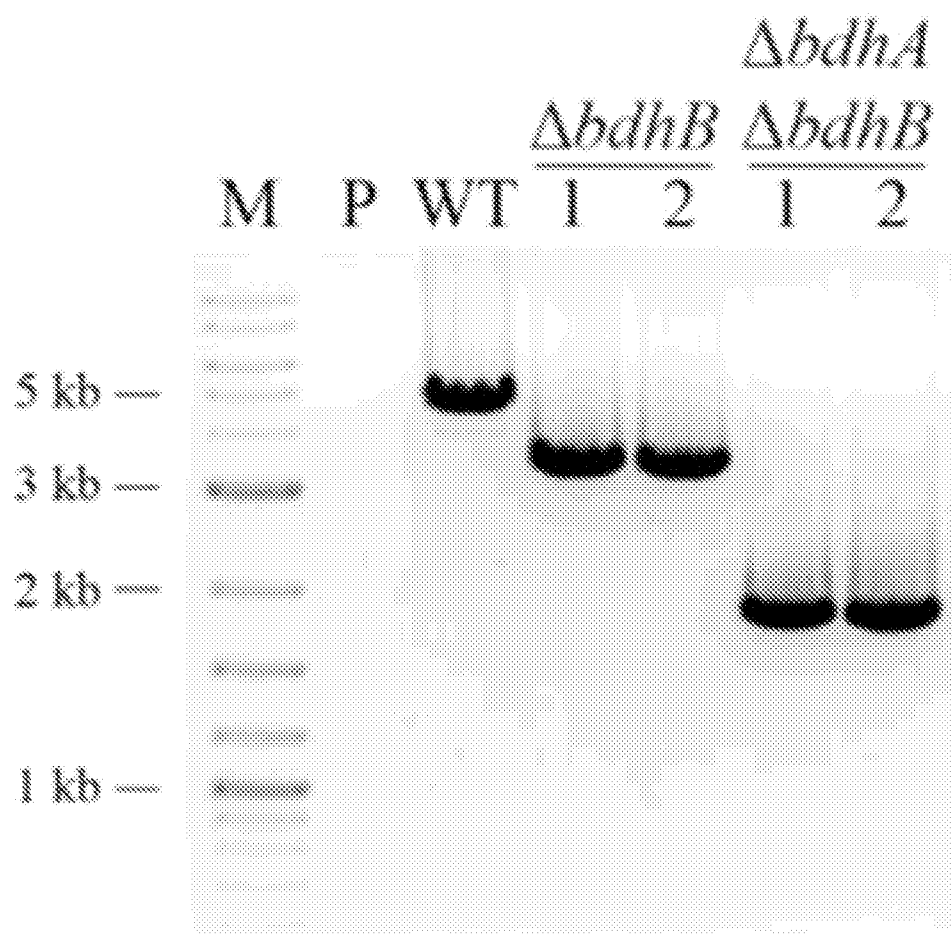


FIGURE 23

24/34

**FIGURE 23 (Following)**

25/34

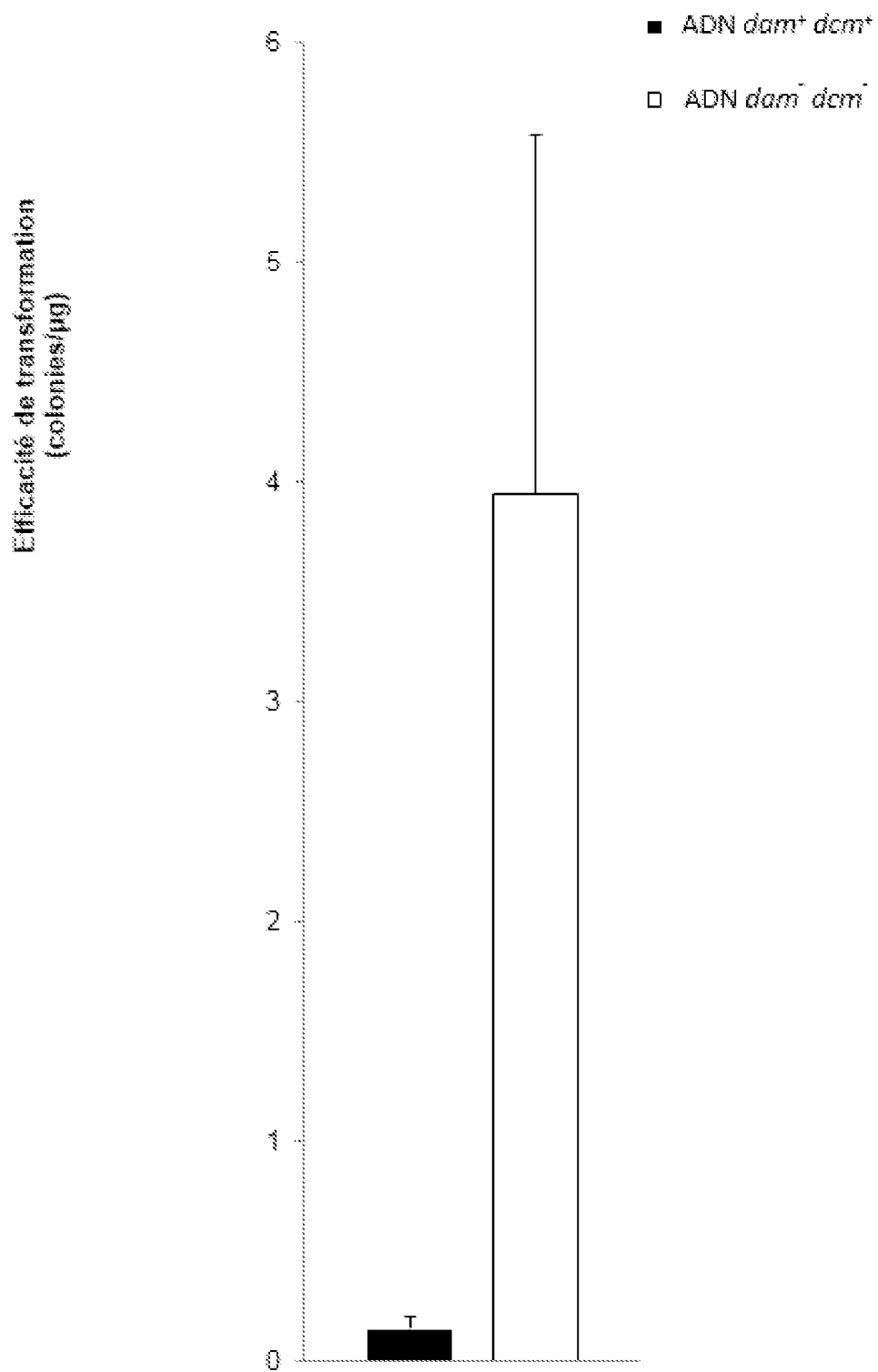


FIGURE 24

26/34

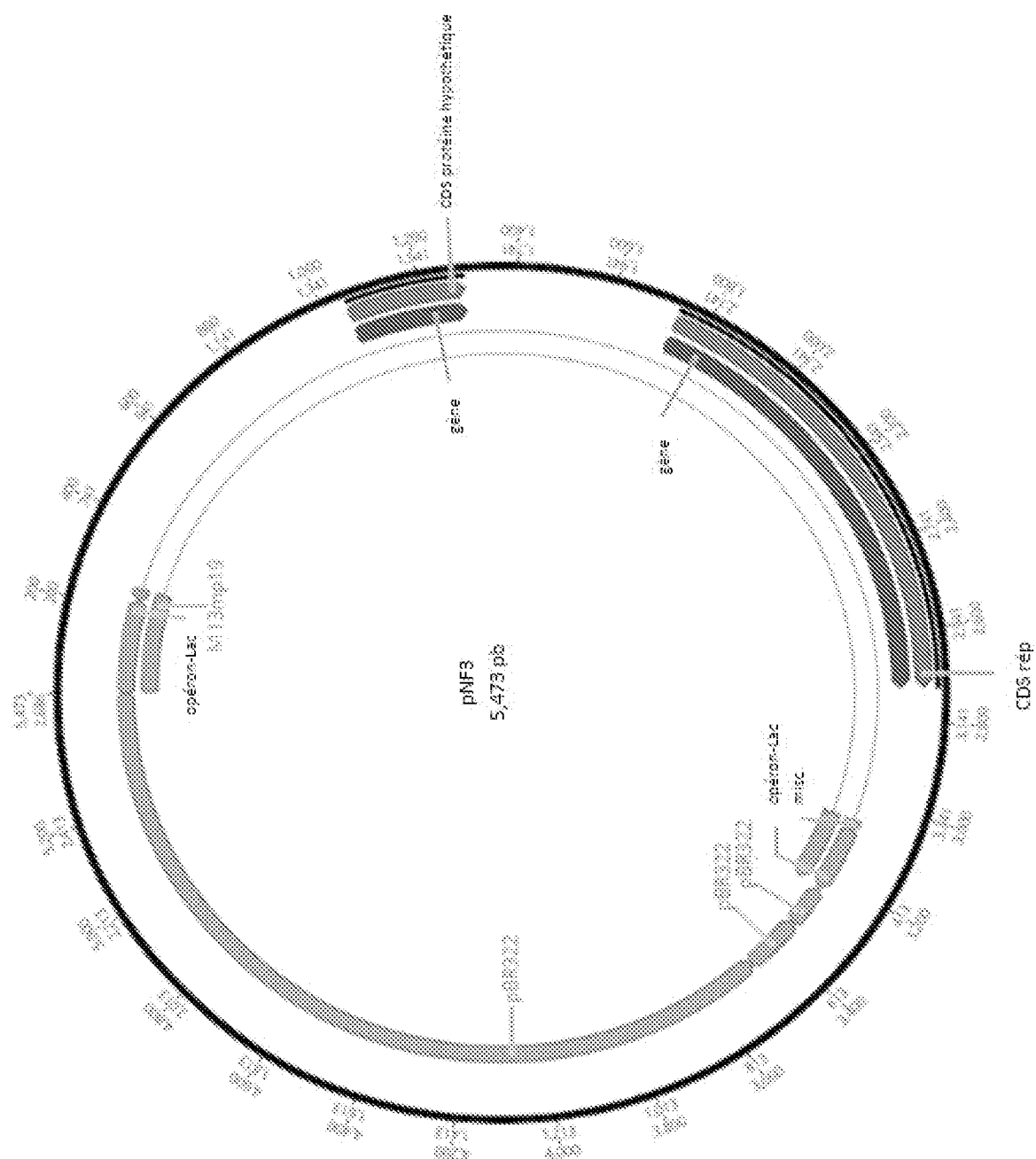


FIGURE 25

27/34

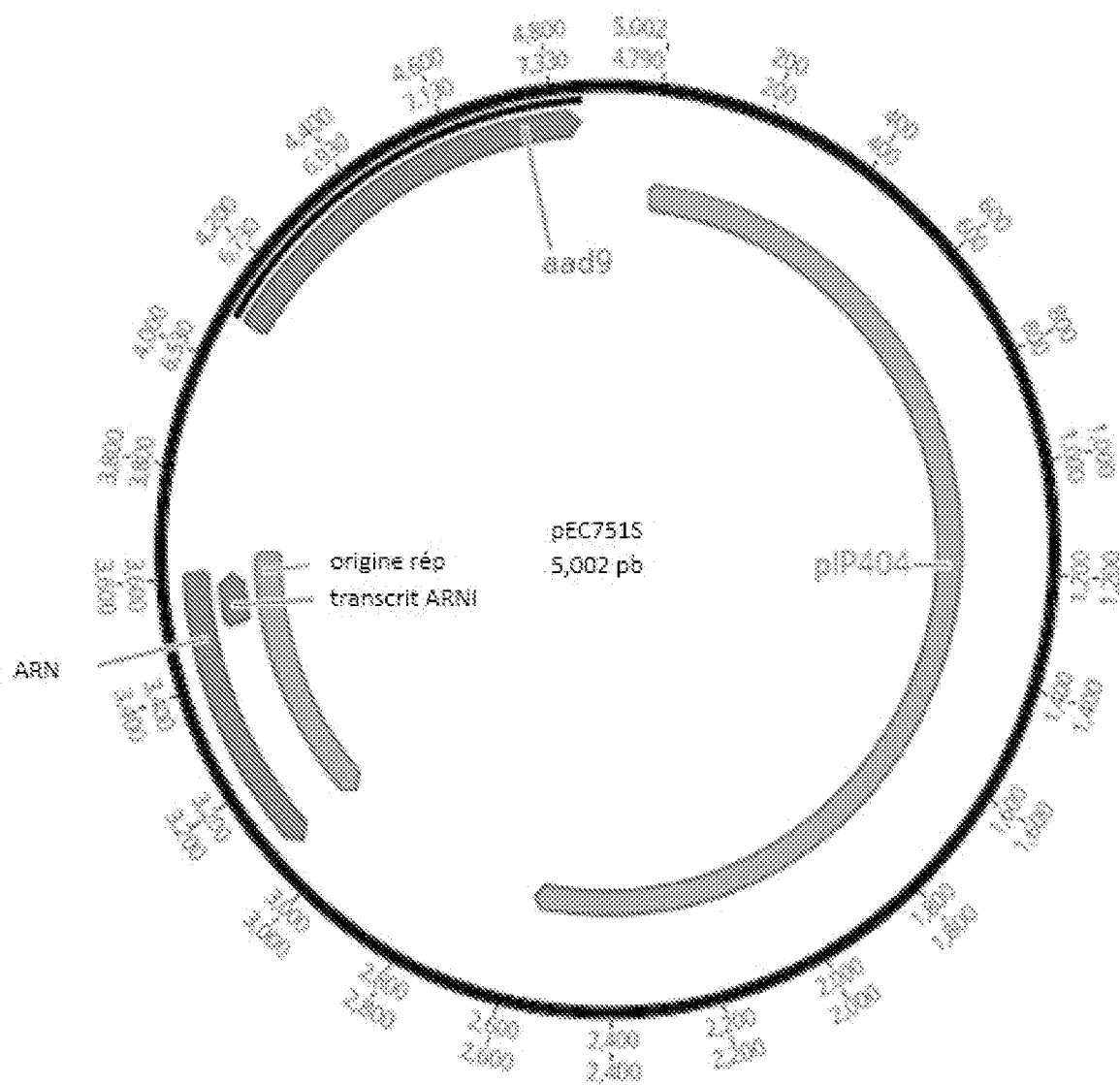


FIGURE 26

28/34

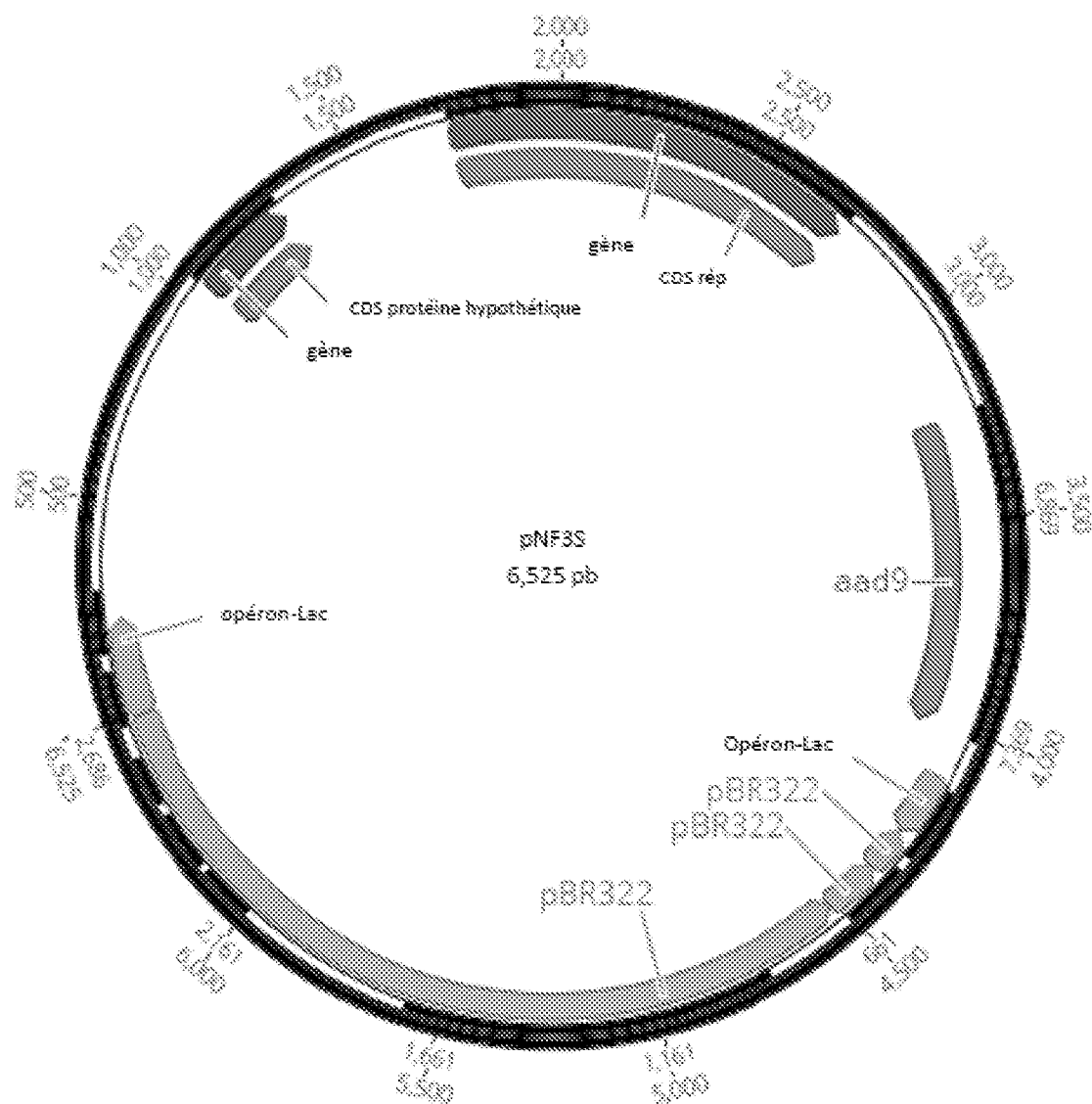


FIGURE 27

FIGURE 28

30/34

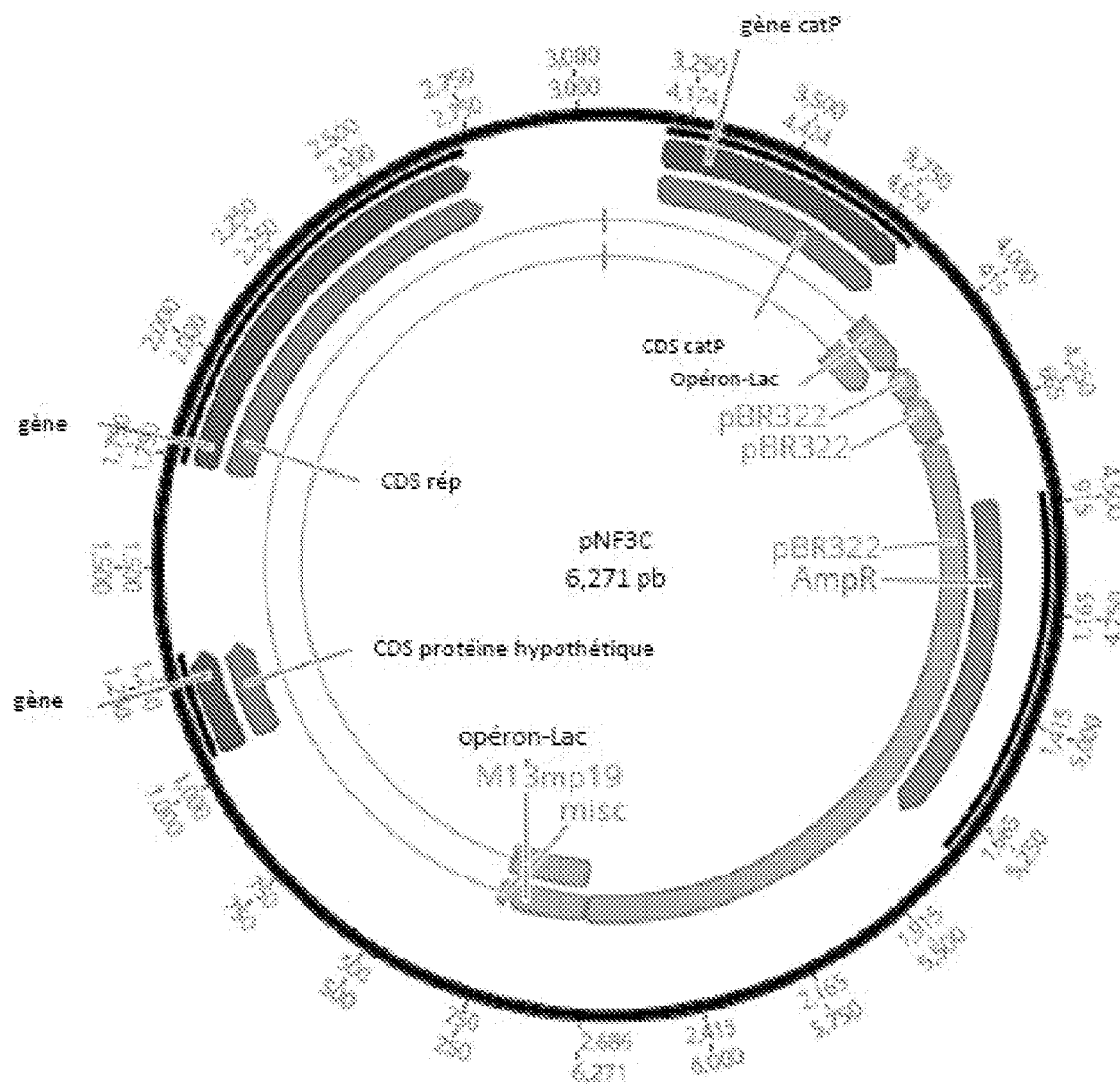


FIGURE 29

31/34

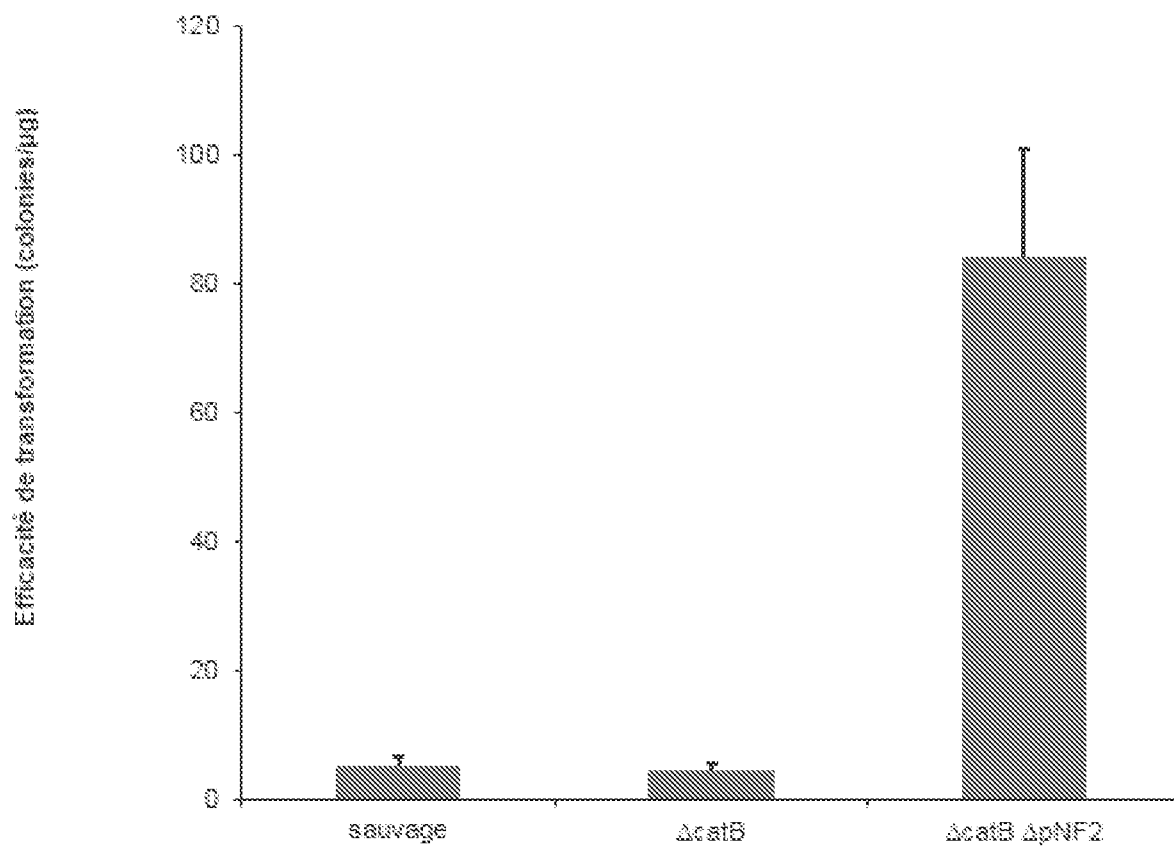


FIGURE 30

32/34

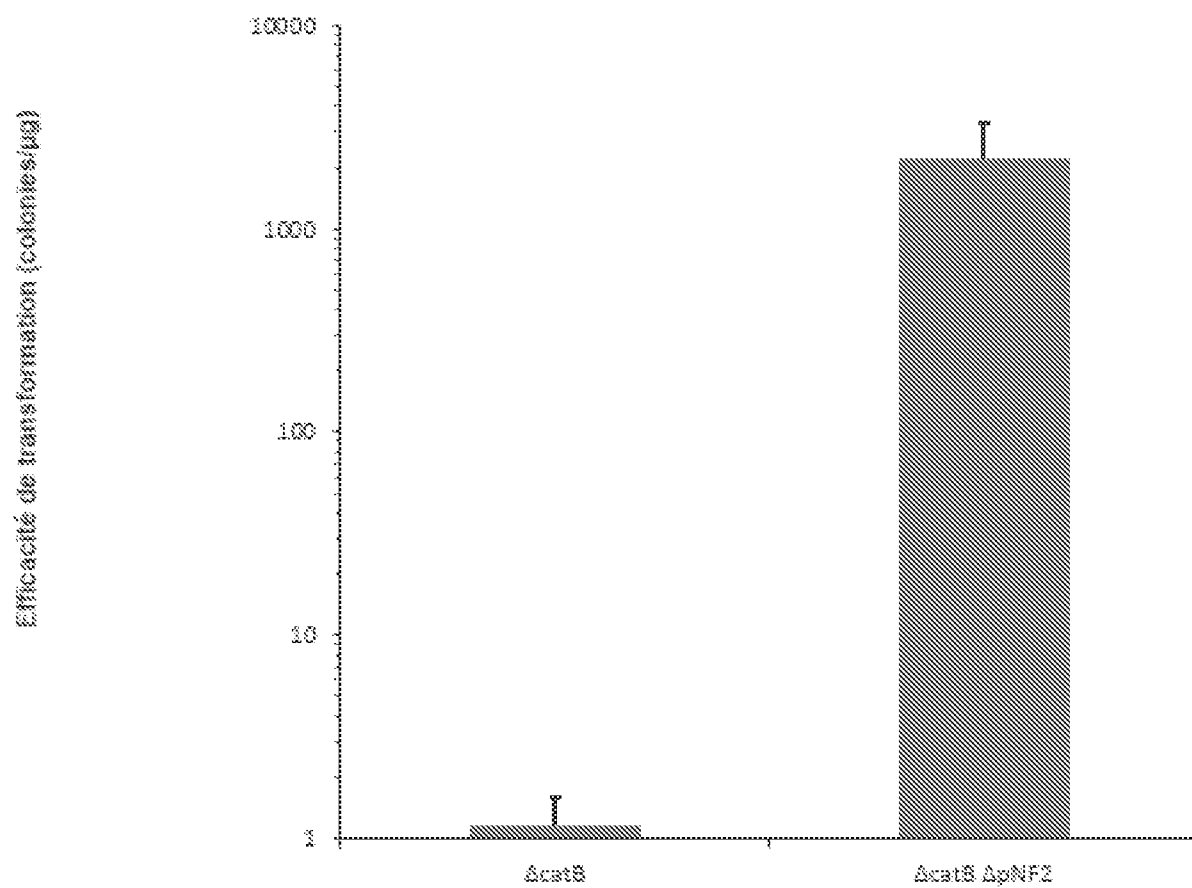
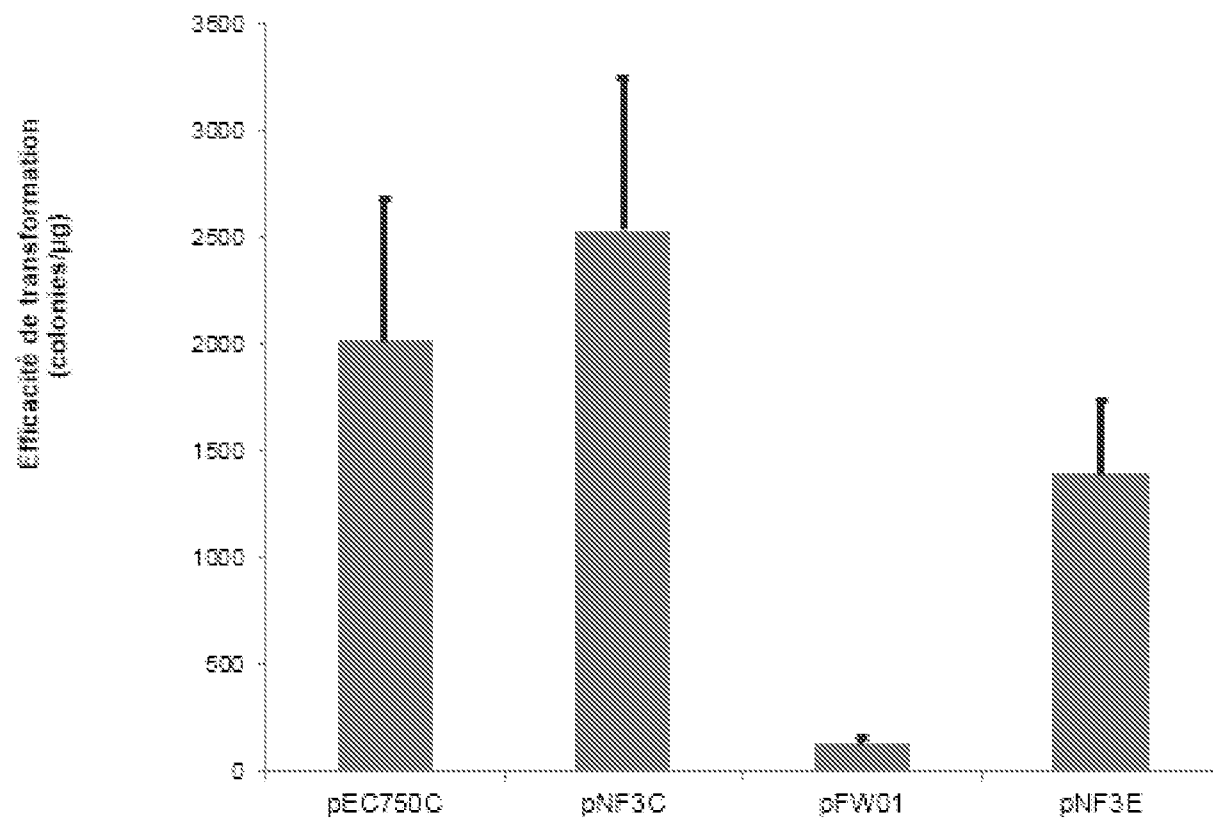
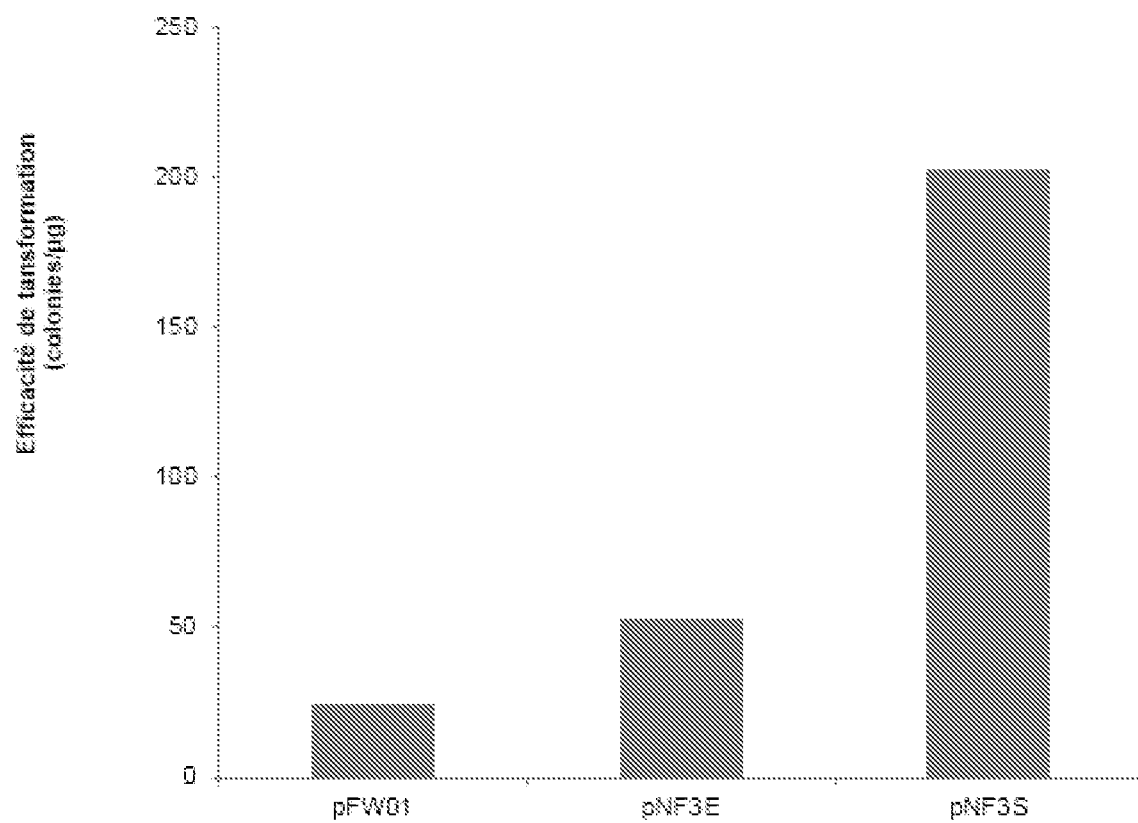


FIGURE 31

33/34

**FIGURE 32**

34/34

**FIGURE 33**