

⑫

BREVET D'INVENTION

B1

⑤④ MICROORGANISME GENETIQUEMENT OPTIMISE POUR LA PRODUCTION DE MOLE-
CULES D'INTERET.

②② Date de dépôt : 27.01.17.

③③ Priorité :

⑥⑥ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

☐ Demande(s) d'extension :

⑦① Demandeur(s) : *ENOBRAQ Société par actions
simplifiée* — FR.

④③ Date de mise à la disposition du public
de la demande : 03.08.18 Bulletin 18/31.

④⑤ Date de la mise à disposition du public du
brevet d'invention : 16.04.21 Bulletin 21/15.

⑦② Inventeur(s) : BOISART CEDRIC et MORIN
NICOLAS.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche :

⑦③ Titulaire(s) : *ENOBRAQ Société par actions
simplifiée*.

Se reporter à la fin du présent fascicule

⑦④ Mandataire(s) : CABINET LTL S.A.S. LAW TECH
LINK.



Microorganisme génétiquement optimisé pour la production de molécules d'intérêt

Domaine de l'invention

L'invention concerne un microorganisme génétiquement modifié, apte à utiliser du dioxyde de carbone comme source de carbone au moins partielle pour la production de molécules d'intérêt. Plus particulièrement, l'invention a trait à un microorganisme dans lequel au moins la branche non-oxydative de la voie des pentoses phosphates est au moins partiellement inhibée. L'invention a également trait à des procédés pour la production d'au moins une molécule d'intérêt utilisant un tel microorganisme.

Etat de la technique

Depuis plusieurs années, de nombreux procédés microbiologiques ont été développés pour permettre la production de molécules d'intérêt en grandes quantités.

Ainsi, des procédés de fermentation sont utilisés pour faire produire des molécules par un microorganisme à partir d'une source de carbone fermentescible, telle que le glucose.

Des procédés de bioconversion ont également été développés, pour permettre à un microorganisme de convertir un co-substrat, non assimilable par ledit microorganisme, en une molécule d'intérêt. Là encore, une source de carbone est nécessaire, non plus pour la production proprement dite de la molécule d'intérêt, mais pour la production de cofacteurs, et plus particulièrement de NADPH, pouvant être nécessaire à la bioconversion. D'une manière générale, le rendement de production par de tels procédés microbiologiques est faible du fait principalement des besoins en cofacteurs et de la difficulté d'équilibrer les réactions métaboliques redox. Se pose également le problème du coût de revient de telles molécules, puisqu'une source de carbone assimilable par le microorganisme est toujours nécessaire. Autrement dit, actuellement pour produire une molécule d'intérêt avec un procédé microbiologique, il est nécessaire de fournir une molécule (glucose, ou autre), certes de moindre valeur industrielle, mais qui suffit à rendre la production de certaines molécules non économiquement intéressante.

En parallèle, le dioxyde de carbone (CO₂), dont les émissions dans l'atmosphère ne cessent de croître, n'est pas ou peu utilisé dans les procédés microbiologiques actuels, alors que sa consommation par les microorganismes pour la production de molécules d'intérêt permettrait

non seulement de réduire les coûts de production, mais également de répondre à des problématiques écologiques certaines.

Il existe donc toujours un besoin en des procédés microbiologiques pour permettre la production de molécules d'intérêt en grandes quantités et avec des coûts de revient plus faibles qu'avec les procédés actuels.

Résumé de l'invention

- L'intérêt d'utiliser des microorganismes non-photosynthétiques génétiquement modifiés pour pouvoir capturer le CO₂ et l'utiliser comme source de carbone principale, au même titre que les plantes et les microorganismes photosynthétiques a déjà été démontré. Ainsi, des microorganismes modifiés de manière à exprimer une RuBisCO (Ribulose 1,5 biphosphate carboxylase/oxygénase - EC 4.1.1.39) et une PRK (phosphoribulokinase - EC 2.7.1.19) fonctionnelles pour pouvoir ainsi reproduire un cycle de Calvin et convertir le ribulose 5 phosphate en deux molécules de 3-phosphoglycérate par capture d'une molécule de dioxyde de carbone ont été développés.
- En travaillant sur les solutions apportées par le cycle de Calvin pour produire des molécules d'intérêt en utilisant le CO₂ comme source de carbone, les inventeurs ont eu l'idée de coupler une partie du cycle de Calvin (PRK/RuBisCO) à une inhibition au moins partielle de la branche non-oxydative de la voie des pentoses phosphates, afin d'augmenter le rendement de production de molécules d'intérêt. De manière intéressante, cette inhibition, avantageusement réalisée en aval de la production de ribulose-5-phosphate favorise la consommation de CO₂ exogène par le microorganisme. Les microorganismes ainsi développés permettent de produire à grande échelle et avec un rendement industriellement intéressant un grand nombre de molécules d'intérêt, telles que des acides aminés, acides organiques, terpènes, terpénoïdes, peptides, acides gras, polyols, etc.
- L'invention a donc pour objet un microorganisme génétiquement modifié exprimant une enzyme RuBisCO et une phosphoribulokinase (PRK) fonctionnelles, et dans lequel la branche non-oxydative de la voie des pentoses phosphates est au moins partiellement inhibée, ledit microorganisme étant génétiquement modifié de manière à produire une molécule exogène et/ou à surproduire une molécule endogène.
- L'invention concerne également l'utilisation d'un microorganisme génétiquement modifié selon l'invention, pour la production ou la surproduction d'une molécule d'intérêt, préférentiellement choisie parmi les acides aminés, les peptides, les protéines, les vitamines, les

stérols, les flavonoïdes, les terpènes, les terpénoïdes, les acides gras, les polyols et les acides organiques.

La présente invention concerne également un procédé biotechnologique pour produire ou surproduire au moins une molécule d'intérêt, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de

5 mise en culture d'un microorganisme génétiquement modifié selon l'invention, dans des conditions permettant la synthèse ou la bioconversion, par ledit microorganisme, de ladite molécule d'intérêt, et de manière optionnelle une étape de récupération et/ou purification de ladite molécule d'intérêt.

Elle concerne également un procédé de production d'une molécule d'intérêt comprenant (i)

10 l'insertion d'au moins une séquence codant une enzyme impliquée dans la synthèse ou bioconversion de ladite molécule d'intérêt dans un microorganisme recombinant selon l'invention, (ii) la culture dudit microorganisme dans des conditions permettant l'expression de ladite enzyme et de manière optionnelle (iii) la récupération et/ou purification de ladite molécule d'intérêt.

15 Description des figures

Figure 1 : Représentation schématique de la glycolyse, de la voie Entner-Doudoroff et de la voie des pentoses phosphates, montrant l'inhibition de la branche non-oxydative de la voie des pentoses phosphates, selon l'invention ;

Figure 2 : Représentation schématique de la glycolyse et de la voie des pentoses phosphates, montrant l'inhibition de la branche non-oxydative de la voie des pentoses phosphates et la prise

20 en charge du ribulose-5- phosphate par PRK et RuBisCO, selon l'invention.

Description détaillée de l'invention

Définitions

Les termes «*microorganisme recombinant*», «*microorganisme modifié*» et «*cellule hôte recombinante*» sont utilisés ici de manière interchangeable et désignent des microorganismes

25 qui ont été génétiquement modifiés pour exprimer ou pour surexprimer des séquences nucléotidiques endogènes, pour exprimer des séquences nucléotidiques hétérologues, ou qui ont une altération de l'expression d'un gène endogène. Par «altération», on entend que l'expression du gène, ou niveau d'une molécule d'ARN ou molécules d'ARN équivalentes

30 codant pour un ou plusieurs polypeptides ou sous-unités polypeptidiques, ou l'activité d'un ou

plusieurs polypeptides ou sous-unités polypeptidiques est régulée, de sorte que l'expression, le niveau ou l'activité soit supérieur ou inférieur à celui observé en l'absence de modification.

Il est entendu que les termes «*microorganisme recombinant*», «*microorganisme modifié*» et «*cellule hôte recombinante*» se réfèrent non seulement au microorganisme recombinant particulier, mais à la descendance ou à la descendance potentielle d'un tel microorganisme. Certaines modifications pouvant se produire dans les générations suivantes, du fait d'une mutation ou d'influences environnementales, cette progéniture peut ne pas être identique à la cellule mère, mais elle est encore comprise dans le cadre du terme tel qu'utilisé ici.

Dans le contexte de l'invention, une voie métabolique au moins partiellement «*inhibée*» ou «*inactivée*» s'entend d'une voie métabolique altérée, qui ne peut plus se dérouler correctement dans le microorganisme considéré, comparativement au même microorganisme sauvage (non génétiquement modifié pour inhiber ladite voie métabolique). Notamment la voie métabolique peut être interrompue, entraînant l'accumulation d'un métabolite intermédiaire. Une telle interruption peut être obtenue par exemple par inhibition de l'enzyme nécessaire à la dégradation d'un métabolite intermédiaire de la voie métabolique considérée et/ou par inhibition de l'expression du gène codant pour cette enzyme. La voie métabolique peut également être atténuée, c'est-à-dire ralentie. Une telle atténuation peut être obtenue par exemple par inhibition partielle d'une ou plusieurs enzymes intervenant dans la voie métabolique considérée et/ou par inhibition partielle de l'expression d'un gène codant pour au moins une de ces enzymes et/ou en jouant sur les cofacteurs nécessaires pour certaines réactions. L'expression «*voie métabolique au moins partiellement inhibée*» signifie que le niveau de la voie métabolique considéré est réduit d'au moins 20%, plus préférentiellement au moins 30%, 40%, 50%, ou plus, comparativement au niveau dans un microorganisme sauvage. La réduction peut être plus importante, et notamment être au moins supérieure à 60%, 70%, 80%, 90%. Selon l'invention, l'inhibition peut être totale, en ce sens que la voie métabolique considérée n'est plus du tout utilisée par ledit microorganisme. Selon l'invention, une telle inhibition peut être temporaire ou définitive.

Selon l'invention, on entend par «*inhibition de l'expression d'un gène*» le fait que ledit gène n'est plus exprimé dans le microorganisme considéré ou que son expression est réduite, comparativement au microorganisme sauvage (non génétiquement modifié pour inhiber l'expression du gène), conduisant à l'absence de production de la protéine correspondante ou à une baisse significative de sa production, et notamment à une baisse supérieure à 20%, plus préférentiellement 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%. Dans un mode de réalisation, l'inhibition peut être totale, c'est-à-dire que la protéine codée par ledit gène n'est plus du tout

produite. L'inhibition de l'expression d'un gène peut notamment être obtenue par délétion, mutation, insertion et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides dans le gène considéré. Préférentiellement, l'inhibition de l'expression du gène est obtenue par délétion totale de la séquence nucléotidique correspondante. Selon l'invention, toute méthode d'inhibition d'un gène, connue en soi par l'homme de l'art et applicable à un microorganisme peut être utilisée. Par exemple, l'inhibition de l'expression d'un gène peut être obtenue par recombinaison homologue (Datsenko *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 ; 97:6640-5 ; Lodish *et al.*, Molecular Cell Biology 4th ed. 2000. W. H. Freeman and Company. ISBN 0-7167-3136-3) ; mutagenèse aléatoire ou dirigée pour modifier l'expression d'un gène et/ou l'activité de la protéine encodée (Thomas *et al.*, Cell. 1987;51:503-12) ; modification d'une séquence promotrice du gène pour altérer son expression (Kaufmann *et al.*, Methods Mol Biol. 2011;765:275-94. doi: 10.1007/978-1-61779-197-0_16) ; ciblage induit des lésions locales dans les génomes (TILLING) ; conjugaison, etc. Une autre approche particulière est l'inactivation génique par insertion d'une séquence étrangère, par exemple par mutagenèse de transposon en utilisant des éléments génétiques mobiles (transposons), d'origine naturelle ou artificielle. Selon un autre mode de réalisation préféré, l'inhibition de l'expression du gène est obtenue par des techniques knock-out. L'inhibition de l'expression du gène peut également être obtenue par extinction du gène en utilisant des ARN interférents, ribozymes ou antisens (Daneholt, 2006. Nobel Prize in Physiology or Medicine). Dans le contexte de la présente invention, le terme "ARN interférent" ou "ARNi" désigne toute molécule d'ARNi (par exemple ARN monocaténaire ou ARN bicaténaire) qui peut bloquer l'expression d'un gène cible et/ou faciliter la dégradation de l'ARNm correspondants. L'inhibition du gène peut également être obtenue par des méthodes d'édition génomique qui permettent de directement apporter des modifications génétiques à un génome donné, via l'utilisation de nucléases à doigts de zinc (Kim *et al.*, PNAS; 93: 1156-1160), de nucléases effectrices de type activateur de transcription, dites « TALEN » (Ousterout *et al.*, Methods Mol Biol. 2016;1338:27-42. doi: 10.1007/978-1-4939-2932-0_3), d'un système combinant des nucléases de type Cas9 avec des courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées dites 'CRISPR' (Mali *et al.*, Nat Methods. 2013 Oct;10(10):957-63. doi: 10.1038/nmeth.2649), ou encore de méganucléases (Daboussi *et al.*, Nucleic Acids Res. 2012. 40:6367-79). L'inhibition de l'expression du gène peut également être obtenue par inactivation de la protéine codée par ledit gène.

Par voie de biosynthèse ou bioconversion « *NADPH-dépendante* » ou « *consommatrice de NADPH* », on entend dans le contexte de l'invention l'ensemble des voies de biosynthèse ou bioconversion dont une ou plusieurs enzymes nécessitent l'apport concomitant d'électrons obtenus par l'oxydation d'un cofacteur NADPH. Les voies de biosynthèse ou bioconversion « *NADPH-dépendantes* » concernent notamment la synthèse d'acides aminés (e.g. arginine,

lysine, méthionine, thréonine, proline, glutamate, homosérine, isoleucine, valine), de terpénoïdes et de terpènes (e.g. farnésène), de vitamines et précurseurs (e.g. pantoate, pantothenate, transneurosporène, phylloquinone, tocophérols), de stérols (e.g. squalène, cholestérol, testostérone, progestérone, cortisone), de flavonoïdes (e.g. frambinone, vestinone),
 5 d'acides organiques (e.g. acide coumarique, acide 3-hydroxypropionique), de polyols (e.g. sorbitol, xylitol, glycérol), de polyamines (e.g. spermidine), de molécules aromatiques à partir d'une hydroxylation stéréospécifique, via un cytochrome p450 NADP-dépendant (e.g. phénylpropanoïdes, terpènes, lipides, tannins, arômes, hormones).

Le terme «*exogène*» tel qu'utilisé ici en référence à diverses molécules (séquences
 10 nucléotidiques, peptides, enzymes, etc.), désigne des molécules qui ne sont pas normalement ou naturellement trouvées dans et / ou produites par le microorganisme considéré. A l'inverse, le terme "*endogène*" ou "*natif*" en référence à diverses molécules (séquences nucléotidiques, peptides, enzymes, etc.), désigne des molécules qui sont normalement ou naturellement trouvées dans et / ou produit par le microorganisme considéré.

15 Microorganismes

L'invention propose des microorganismes génétiquement modifiés pour la production d'une molécule d'intérêt, endogène ou exogène.

Par microorganisme « *génétiquement modifié* », on entend que le génome du microorganisme a été modifié de manière à intégrer une séquence nucléique codant une enzyme intervenant dans
 20 la voie de biosynthèse ou de bioconversion d'une molécule d'intérêt, ou codant un fragment biologiquement actif de celle-ci. Ladite séquence nucléique peut avoir été introduite dans le génome dudit microorganisme ou d'un de ses ascendants, par le biais de toute méthode de clonage moléculaire adaptée. Dans le contexte de l'invention, le génome du microorganisme s'entend de l'ensemble du matériel génétique contenu dans ledit microorganisme, y compris le
 25 matériel génétique extrachromosomique contenu par exemple dans des plasmides, épisomes, chromosomes synthétiques, etc. La séquence nucléique introduite peut être une séquence hétérologue, c'est-à-dire qui n'existe pas à l'état naturel dans ledit microorganisme, ou une séquence homologue. Avantagusement, on introduit dans le génome du microorganisme une unité transcriptionnelle comportant la séquence nucléique d'intérêt, placée sous le contrôle d'un
 30 ou plusieurs promoteur(s). Une telle unité transcriptionnelle comprend également, avantagusement, les séquences usuelles telles que des terminateurs transcriptionnels, et le cas échéant d'autres éléments de régulation de la transcription.

Des promoteurs utilisables dans le cadre de la présente invention incluent des promoteurs constitutifs, à savoir des promoteurs qui sont actifs dans la plupart des états cellulaires et des conditions environnementales, ainsi que des promoteurs inductibles qui sont activés ou réprimés par des stimuli physiques ou chimiques exogènes, et qui induisent donc un niveau d'expression variable en fonction de la présence ou de l'absence de ces stimuli. Par exemple, lorsque le microorganisme est une levure, il est possible d'utiliser un promoteur constitutif, tel que celui d'un gène parmi *TEF1*, *TDH3*, *PGII*, *PGK*, *ADH1*. Des exemples de promoteurs inductibles utilisables chez la levure sont les promoteurs tetO-2, *GAL10*, *GAL10-CYC1*, *PHO5*.

D'une manière générale, le microorganisme génétiquement modifié selon l'invention présente les caractéristiques suivantes :

- Expression d'une RuBisCO (EC 4.1.1.39) fonctionnelle ;
- Expression d'une PRK (EC 2.7.1.19) fonctionnelle ;
- Inhibition au moins partielle de la branche non-oxydative de la voie des pentoses phosphates ; et
- Expression d'au moins un gène participant à la synthèse et/ou la bioconversion d'une molécule d'intérêt, et/ou inhibition d'au moins un gène codant une activité compétitrice à la synthèse et/ou la bioconversion d'une molécule d'intérêt.

Selon l'invention, tout microorganisme peut être utilisé. Préférentiellement le microorganisme est une cellule eucaryote, préférentiellement choisie parmi les levures, les champignons, les microalgues, ou une cellule procaryote, préférentiellement une bactérie ou cyanobactérie.

Dans un mode de réalisation, le microorganisme génétiquement modifié selon l'invention est une levure, préférentiellement choisie parmi les levures ascomycètes (*Spermophthoraceae* et *Saccharomycetaceae*), les levures basidiomycètes (*Leucosporidium*, *Rhodospiridium*, *Sporidiobolus*, *Filobasidium*, et *Filobasidiella*) et les levures deuteromycètes appartenant au *Fungi imperfecti* (*Sporobolomycetaceae*, et *Cryptococcaceae*). Préférentiellement, la levure génétiquement modifiée selon l'invention appartient au genre *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Candida*, *Lipomyces*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Yarrowia*, ou *Debaryomyces*. Plus préférentiellement, la levure génétiquement modifiée selon l'invention est choisie parmi *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis*, *Saccharomyces oviformis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodospiridium toruloides*, *Yarrowia lipolytica*, *Debaryomyces hansenii* et *Lipomyces starkeyi*.

Dans un autre mode de réalisation, le microorganisme génétiquement modifié selon l'invention est un champignon, et plus particulièrement un champignon « *filamenteux* ». Dans le contexte de l'invention, les « *champignons filamenteux* » désignent toutes les formes filamenteuses de la sous-division *Eumycotina*. Par exemple, le champignon génétiquement modifié selon l'invention appartient au genre *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Neurospora*, *Podospora*, *Endothia*, *Mucor*, *Cochiobolus* ou *Pyricularia*. Préférentiellement, le champignon génétiquement modifié selon l'invention est choisi parmi *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus awomari*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus terreus*, *Neurospora crassa*, *Trichoderma reesei*, et *Trichoderma viride*.

- 10 Dans un autre mode de réalisation, le microorganisme génétiquement modifié selon l'invention est une microalgue. Dans le contexte de l'invention, on désigne par « *microalgue* » l'ensemble des algues microscopiques de type eucaryote, appartenant préférentiellement aux classes ou superclasses des Chlorophyceae, Chrysophyceae, Prymnesiophyceae, Diatomées ou Bacillariophyta, Euglenophyceae, Rhodophyceae, ou Trebouxiophyceae. Préférentiellement,
- 15 les microalgues génétiquement modifiées selon l'invention sont choisies parmi *Nannochloropsis* sp. (e.g. *Nannochloropsis oculata*, *Nannochloropsis gaditana*, *Nannochloropsis salina*), *Tetraselmis* sp. (e.g. *Tetraselmis suecica*, *Tetraselmis chuii*), *Chlorella* sp. (e.g. *Chlorella salina*, *Chlorella protothecoides*, *Chlorella ellipsoidea*, *Chlorella emersonii*, *Chlorella minutissima*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella vulgaris*), *Chlamydomonas* sp. (e.g. *Chlamydomonas reinhardtii*) *Dunaliella* sp. (e.g. *Dunaliella tertiolecta*, *Dunaliella salina*), *Phaeodactylum tricornutum*, *Botryococcus braunii*, *Chroomonas salina*, *Cyclotella cryptica*, *Cyclotella* sp., *Ettlia texensis*, *Euglena gracilis*, *Gymnodinium nelsoni*, *Haematococcus pluvialis*, *Isochrysis galbana*, *Monoraphidium minutum*, *Monoraphidium* sp., *Neochloris oleoabundans*, *Nitzschia laevis*, *Onoraphidium* sp.,
- 20 *Pavlova lutheri*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Porphyridium cruentum*, *Scenedesmus* sp. (e.g. *Scenedesmus obliquus*, *Scenedesmus quadricaula*, *Scenedesmus* sp.), *Stichococcus bacillaris*, *Spirulina platensis*, *Thalassiosira* sp.

- Dans un mode de réalisation, le microorganisme génétiquement modifié selon l'invention est une bactérie, préférentiellement choisie parmi les phyla Acidobacteria, Actinobacteria,
- 30 Aquificae, Bacteroidetes, Chlamydiae, Chlorobi, Chloroflexi, Chrysiogenetes, Cyanobacteria, Deferribacteres, Deinococcus-Thermus, Dictyoglomi, Fibrobacteres, Firmicutes, Fusobacteria, Gemmatimonadetes, Nitrospirae, Planctomycetes, Proteobacteria, Spirochaetes, Thermodesulfobacteria, Thermomicrobia, Thermotogae, ou Verrucomicrobia. De manière préférée, la bactérie génétiquement modifiée selon l'invention appartient au genre
- 35 *Acaryochloris*, *Acetobacter*, *Actinobacillus*, *Agrobacterium*, *Alicyclobacillus*, *Anabaena*,

Anacystis, *Anaerobiospirillum*, *Aquifex*, *Arthrobacter*, *Arthrosira*, *Azobacter*, *Bacillus*,
Brevibacterium, *Burkholderia*, *Chlorobium*, *Chromatium*, *Chlorobaculum*, *Clostridium*,
Corynebacterium, *Cupriavidus*, *Cyanothece*, *Enterobacter*, *Deinococcus*, *Erwinia*,
Escherichia, *Geobacter*, *Gloeobacter*, *Gluconobacter*, *Hydrogenobacter*, *Klebsiella*,
5 *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Mannheimia*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*,
Microbacterium, *Microcystis*, *Nitrobacter*, *Nitrosomonas*, *Nitrospina*, *Nitrospira*, *Nostoc*,
Phormidium, *Prochlorococcus*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhizobium*, *Rhodobacter*,
Rhodococcus, *Rhodopseudomonas*, *Rhodospirillum*, *Salmonella*, *Scenedesmus*, *Serratia*,
Shigella, *Staphylococcus*, *Streptomyces*, *Synechococcus*, *Synechocystis*, *Thermosynechococcus*,
10 *Trichodesmium*, ou *Zymomonas*. De manière encore préférée, la bactérie génétiquement
modifiée selon l'invention est choisie parmi les espèces *Agrobacterium tumefaciens*,
Anaerobiospirillum succiniciproducens, *Actinobacillus succinogenes*, *Aquifex aeolicus*,
Aquifex pyrophilus, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Brevibacterium*
ammoniaenes, *Brevibacterium immariophilum*, *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium*
15 *ljungdahlii*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beigerinckii*, *Corynebacterium*
glutamicum, *Cupriavidus necator*, *Cupriavidus metallidurans*, *Enterobacter sakazakii*,
Escherichia coli, *Gluconobacter oxydans*, *Hydrogenobacter thermophilus*, *Klebsiella oxytoca*,
Lactococcus lactis, *Lactobacillus plantarum*, *Mannheimia succiniciproducens*, *Mesorhizobium*
loti, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas mevalonii*, *Pseudomonas pudica*, *Pseudomonas*
20 *putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizobium etli*, *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodobacter*
sphaeroides, *Rhodospirillum rubrum*, *Salmonella enterica*, *Salmonella typhi*, *Salmonella*
typhimurium, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*,
Streptomyces coelicolor, *Zymomonas mobilis*, *Acaryochloris marina*, *Anabaena variabilis*,
Arthrosira platensis, *Arthrosira maxima*, *Chlorobium tepidum*, *Chlorobaculum sp.*,
25 *Cyanothece sp.*, *Gloeobacter violaceus*, *Microcystis aeruginosa*, *Nostoc punctiforme*,
Prochlorococcus marinus, *Synechococcus elongatus*, *Synechocystis sp.*, *Thermosynechococcus*
elongatus, *Trichodesmium erythraeum*, et *Rhodopseudomonas palustris*.

Expression d'une RuBisCO et d'une PRK fonctionnelles

30 Selon l'invention, le microorganisme peut exprimer naturellement une RuBisCO et une PRK
fonctionnelles. C'est le cas par exemple des microorganismes photosynthétiques, tels que les
microalgues ou les cyanobactéries.

Il existe plusieurs formes de RuBisCO dans la nature (Tabita *et al.*, J Exp Bot. 2008;59(7):1515-
24. doi: 10.1093/jxb/erm361). Les formes I, II et III catalysent les réactions de carboxylation et
d'oxygénation du ribulose 1,5-biphosphate. La forme I est présente chez les eucaryotes et les

bactéries. Elle est constituée de deux types de sous-unités : des grandes sous-unités (RbcL) et des petites sous-unités (RbcS). Le complexe enzymatique fonctionnel est un hexadécamère constitué de huit sous-unités L et huit sous-unités S. L'assemblage correct de ces sous-unités nécessite en outre l'intervention d'au moins une chaperonne spécifique : RbcX (Liu et al.,
 5 Nature. 2010 Jan 14;463(7278):197-202. doi: 10.1038/nature08651). La forme II se trouve principalement chez les protéobactéries, les archaea et les algues dinoflagellées. Sa structure est beaucoup plus simple : il s'agit d'un dimère formé de deux sous-unités RbcL identiques. Selon l'organisme, les gènes codant pour une RuBisCO de type I peuvent s'appeler rbcL/rbcS (par exemple, *Synechococcus elongatus*), ou encore cbxLC/cbxSC, cfxLC/cfxSC, cbbL/cbbS
 10 (par exemple, *Cupriavidus necator*). Selon l'organisme, les gènes codant pour une RuBisCO de type II s'appellent généralement cbbM (par exemple, *Rhodospirillum rubrum*). La forme III est présente chez les archaea. On la trouve généralement sous la forme de dimères de sous-unité RbcL, ou en pentamères de dimères. Selon l'organisme, les gènes codant pour une RuBisCO de type III peuvent s'appeler rbcL (par exemple, *Thermococcus kodakarensis*), cbbL (par
 15 exemple, *Haloferax sp.*).

On connaît deux classes de PRKs : les enzymes de classe I qui se rencontrent chez les protéobactéries sont des octamères, tandis que celles de classe II qui se trouvent chez les cyanobactéries et chez les plantes sont des tétramères ou des dimères. Selon l'organisme, les gènes codant pour une PRK peuvent s'appeler prk (par exemple, *Synechococcus elongatus*),
 20 prkA (par exemple, *Chlamydomonas reinhardtii*), prkB (par exemple, *Escherichia coli*), prk1, prk2 (par exemple, *Leptolyngbya sp.*), cbbP (par exemple, *Nitrobacter vulgaris*) ou encore cfxP (par exemple, *Cupriavidus necator*).

Dans le cas où le microorganisme utilisé n'exprime pas naturellement une RuBisCO et une PRK fonctionnelles, ledit microorganisme est modifié génétiquement pour exprimer une
 25 RuBisCO et une PRK hétérologues. Avantagusement, dans un tel cas, le microorganisme est transformé de manière à intégrer dans son génome une ou plusieurs cassettes d'expression intégrant les séquences codant pour lesdites protéines, et avantagusement les facteurs transcriptionnels appropriés. Selon le type de RuBisCO à exprimer, il peut être nécessaire de faire également exprimer par le microorganisme une ou des protéines chaperonnes, afin de
 30 favoriser le bon assemblage des sous-unités formant la RuBisCO. C'est le cas notamment pour la RuBisCO de type I, où l'introduction et l'expression de gènes codant pour une chaperonne spécifique (Rbcx) et des chaperonnes généralistes (GroES et GroEL, par exemple) s'avèrent nécessaire pour obtenir une RuBisCO fonctionnelle. La demande WO2015/107496 décrit en détail comment modifier génétiquement une levure pour qu'elle exprime une RuBisCO de type

I et une PRK fonctionnelles. Il est également possible de se référer à la méthode décrite dans GUADALUPE-MEDINA et al. (Biotechnology for Biofuels, 6, 125, 2013).

- 5 Dans un mode de réalisation, le microorganisme est génétiquement modifié pour exprimer une RuBisCO de type I. Dans un autre mode de réalisation, le microorganisme est génétiquement modifié pour exprimer une RuBisCO de type II. Dans un autre mode de réalisation, le microorganisme est génétiquement modifié pour exprimer une RuBisCO de type III.

Les tableaux 1 et 2 ci-dessous répertorient, à titre d'exemples, des séquences codant pour des RuBisCO et PRK qui peuvent être utilisées pour transformer un microorganisme de manière à ce qu'il exprime une RuBisCO et une PRK fonctionnelles.

10 **Tableau 1 : Exemples de séquences codant pour une RuBisCO**

Gène	GenBank	GI	Organisme
rbcL	BAD78320.1	56685098	<i>Synechococcus elongatus</i>
rbcS	BAD78319.1	56685097	<i>Synechococcus elongatus</i>
cbbL2	CAJ96184.1	113529837	<i>Cupriavidus necator</i>
cbbS	P09658.2	6093937	<i>Cupriavidus necator</i>
cbbM	P04718.1	132036	<i>Rhodospirillum rubrum</i>
cbbM	Q21YM9.1	115502580	<i>Rhodoferrax ferrireducens</i>
cbbM	Q479W5.1	115502578	<i>Dechloromonas aromatica</i>
rbcL	O93627.5	37087684	<i>Thermococcus kodakarensis</i>
cbbL	CQR50548.1	811260688	<i>Haloferax sp. Arc-Hr</i>

Tableau 2 : Exemples de séquences codant pour une PRK

Gène	GenBank	GI	Organisme
Prk	BAD78757.1	56685535	<i>Synechococcus elongatus</i>
cfXP	P19923.3	125575	<i>Cupriavidus necator</i>
PRK	P09559.1	125579	<i>Spinacia oleracea</i>
cbbP	P37100.1	585367	<i>Nitrobacter vulgaris</i>

Inhibition de la branche non-oxydative de la voie des pentoses phosphates

Selon l'invention, la branche non-oxydative de la voie des pentoses phosphates est au moins partiellement inhibée, de sorte que le microorganisme n'est plus apte à rejoindre la voie de la glycolyse par la voie des pentoses phosphates.

- 5 Préférentiellement, le microorganisme est génétiquement modifié de manière à inhiber la branche non-oxydative de la voie des pentoses phosphates en aval de la production de ribulose-5-phosphate (figure 1).

L'interruption de la branche non-oxydative de la voie des pentoses phosphates en aval de la production de ribulose-5-phosphate (Ru5P) est avantageusement obtenue par inhibition au
10 moins partielle d'une transaldolase (E.C. 2.2.1.2) normalement produite par le microorganisme.

La transaldolase est une enzyme qui catalyse une réaction de type transférase entre les couples de métabolites sédoheptulose 7-phosphate/glycéraldéhyde 3-phosphate, et érythrose-4-phosphate/fructose 6-phosphate.

Selon l'organisme les gènes codant pour la transaldolase peuvent s'appeler tal, talA, talB (par
15 exemple chez *Escherichia coli*, *Synechocystis sp.*), TALDO, TALDO1, TALDOR (par exemple chez *Homo sapiens*, *Mus musculus*), TAL1 (par exemple chez *Saccharomyces cerevisiae*), TAL2 (par exemple chez *Nostoc punctiforme*), talA1, talA2 (par exemple *Streptococcus gallolyticus*), talB1, talB2 (par exemple *Azotobacter vinelandii*), ou encore NQM1 (par exemple chez *Saccharomyces cerevisiae*).

- 20 De manière alternative ou additionnelle, l'interruption de la branche non-oxydative de la voie des pentoses phosphates en aval de la production de ribulose-5-phosphate (Ru5P) peut être obtenue par inhibition au moins partielle d'une transketolase (E.C. 2.2.1.1) normalement produite par le microorganisme.

La transketolase est une enzyme qui catalyse une réaction de type transférase entre les couples
25 de métabolites sédoheptulose-7-phosphate/glycéraldéhyde 3-phosphate, et ribose-5-phosphate/xylulose-5-phosphate, ainsi qu'entre les couples fructose-6-phosphate/glycéraldéhyde 3-phosphate, et érythrose-4-phosphate/xylulose-5-phosphate. Selon l'organisme, les gènes codant pour la transketolase peuvent s'appeler TKL, TKL1, TKL2 (par exemple *Saccharomyces cerevisiae*), tklA, tklB (par exemple *Rhodobacter sphaeroides*), tktA, tktB, (par exemple *Escherichia coli*), TKT, TKT1, TKT2 (par exemple *Homo sapiens*,
30

Dictyostelium discoideum), ou encore TKTL1, TKTL2 (par exemple *Bos taurus*), ou encore cbbT, cbbTC, cbbTP (par exemple *Cupriavidus necator*, *Synechococcus sp.*).

Dans un exemple particulier, le microorganisme est génétiquement modifié de manière à ce que l'expression du gène codant la transaldolase soit au moins partiellement inhibée.

- 5 Préférentiellement, l'expression du gène est complètement inhibée. De manière alternative ou additionnelle, le microorganisme est génétiquement modifié de manière à ce que l'expression du gène codant la transketolase soit au moins partiellement inhibée. Préférentiellement, l'expression du gène est complètement inhibée.

- 10 Les tableaux 3 et 4 ci-dessous listent, à titre d'exemples, les séquences codant une transaldolase ou une transketolase, qui peuvent être inhibées en fonction du microorganisme cible. L'homme du métier sait quel gène correspond à l'enzyme d'intérêt à inhiber en fonction du microorganisme.

Tableau 3 : Exemples de séquences codant pour une transaldolase

Gène	GenBank	GI	Organisme
TAL1	P15019.4	1729825	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NQM1	P53228.1	1729826	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
talA	BAA21821.1	2337774	<i>Escherichia coli</i>
talB	BAA16812.1	1651885	<i>Synechocystis sp.</i>

- 15 **Tableau 4 : Exemples de séquences codant pour une transketolase**

Gène	GenBank	GI	Organisme
TKL1	NP_015399.1	6325331	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
TKL2	NP_009675.3	398364879	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
tktA	AAA69102.1	882464	<i>Escherichia coli</i>
cbbT	AHF62567.1	572996306	<i>Synechococcus sp.</i>

- 20 D'une manière générale, la jonction entre la voie des pentoses phosphates et la voie de la glycolyse n'est plus possible par le biais de la branche non-oxydative des pentoses phosphates, ou au moins fortement diminuée, dans le microorganisme génétiquement modifié selon l'invention.

Dans un exemple de réalisation particulier, le microorganisme est une levure du genre *Saccharomyces cerevisiae* dans laquelle l'expression du gène NQM1 et/ou TAL1 est au moins partiellement inhibée.

5 Dans un autre exemple de réalisation particulier, le microorganisme est une bactérie du genre *Escherichia coli* dans laquelle l'expression du gène talA est au moins partiellement inhibée.

Selon l'invention, le microorganisme génétiquement modifié, qui exprime une RuBisCO et une PRK fonctionnelles, et dont la branche non-oxydative de la voie des pentoses phosphates est au moins partiellement inhibée n'est plus apte à rejoindre la voie de la glycolyse par la voie des pentoses phosphates. Il est par contre apte à produire du glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P), à
10 partir du Ru5P synthétisé par la branche oxydative de la voie des pentoses phosphates, via l'expression hétérologue de PRK et RuBisCO, tout en fixant une molécule de carbone supplémentaire (Figure 2).

Ainsi, le microorganisme génétiquement modifié est apte à produire du NADPH via la branche oxydative des pentoses phosphates, et du G3P via l'expression hétérologue de PRK et
15 RuBisCO, en utilisant du CO₂ exogène, et notamment du CO₂ atmosphérique, comme source de carbone complémentaire.

Ainsi, le microorganisme génétiquement modifié selon l'invention permet d'augmenter le rendement carbone, en fixant et en utilisant du CO₂ exogène, pour la production de NADPH et de G3P (et par la suite de molécules d'intérêt). Là encore, il y a augmentation du rendement
20 carbone.

Inhibition de la voie d'Entner-Doudoroff

Dans un mode de réalisation particulier, le microorganisme génétiquement modifié selon l'invention a une voie d'Entner-Doudoroff, et celle-ci est en au moins partiellement inhibée. Cette voie, principalement retrouvée chez les bactéries (notamment de type Gram-), est une
25 alternative à la glycolyse et à la voie des pentoses pour la production de pyruvate à partir de glucose. Plus précisément, cette voie se branche sur la voie des pentoses phosphates au niveau du P-gluconate pour alimenter la glycolyse au niveau notamment du pyruvate.

Préférentiellement, le microorganisme est génétiquement modifié de manière à inhiber les réactions de la voie d'Entner-Doudoroff en aval de la production de 6-phosphogluconate. Cette
30 inhibition permet d'éliminer une possible voie compétitrice, et d'assurer la disponibilité du 6-phosphogluconate comme substrat pour l'ingénierie PRK/RuBisCO.

L'interruption de la voie d'Entner-Doudoroff en aval de la production de 6-phosphogluconate cible spécifiquement une ou plusieurs réactions dans le processus de synthèse du pyruvate à partir de 6-phosphogluconate. Cette synthèse est initiée par les actions successives de deux enzymes : (i) la 6-phosphogluconate déshydratase (« EDD » - EC. 4.2.1.12), et (ii) la 2-déshydro-3-désoxy-phosphogluconate aldolase (« EDA » - E.C. 4.1.2.14).

La 6-phosphogluconate déshydratase catalyse la déshydratation du 6-phosphogluconate en 2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate. Selon l'organisme, les gènes codant pour la 6-phosphogluconate déshydratase peuvent s'appeler *edd* (GenBank NP_416365, par exemple, chez *Escherichia coli*), ou *ilvD* (par exemple, chez *Mycobacterium sp.*).

La 2-déshydro-3-désoxy-phosphogluconate aldolase catalyse la synthèse d'une molécule de pyruvate et d'une molécule de glycéraldéhyde-3-phosphate à partir du 2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate produit par la 6-phosphogluconate déshydratase. Selon l'organisme, les gènes codant pour la 2-déshydro-3-désoxy-phosphogluconate aldolase peuvent s'appeler *eda* (GenBank NP_416364, par exemple, chez *Escherichia coli*), ou *kdgA* (par exemple chez *Thermoproteus tenax*), ou *dgaF* (par exemple chez *Salmonella typhimurium*).

Dans un exemple particulier, le microorganisme est génétiquement modifié de manière à ce que l'expression du gène codant la 6-phosphogluconate déshydratase soit au moins partiellement inhibée. Préférentiellement, l'expression du gène est complètement inhibée.

De manière alternative ou additionnelle, le microorganisme est génétiquement modifié de manière à ce que l'expression du gène codant la 2-déshydro-3-désoxy-phosphogluconate aldolase soit au moins partiellement inhibée. Préférentiellement, l'expression du gène est complètement inhibée.

Les tableaux 5 et 6 ci-dessous listent, à titre d'exemples, les séquences codant une 6-phosphogluconate déshydratase et une 2-déshydro-3-désoxy-phosphogluconate aldolase qui peuvent être inhibés en fonction du microorganisme cible. L'homme du métier sait quel gène correspond à l'enzyme d'intérêt à inhiber en fonction du microorganisme.

Tableau 5 : Exemples de séquences codant pour une EDD

Gène	GenBank	GI	Organisme
<i>edd</i>	NP_416365.1	16129804	<i>Escherichia coli</i>
<i>ilvD</i>	CND70554.1	893638835	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>edd</i>	AJQ65426.1	764046652	<i>Salmonella enterica</i>

Tableau 6 : Exemples de séquences codant pour une EDA

Gène	GenBank	GI	Organisme
eda	AKF72280.1	817591701	<i>Escherichia coli</i>
kdgA	Q704D1.1	74500902	<i>Thermoproteus tenax</i>
eda	O68283.2	81637643	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

D'une manière générale, dans ce mode de réalisation, la production de pyruvate n'est plus possible par le biais de la voie Entner-Doudoroff, ou au moins fortement diminuée.

- 5 Dans un exemple de réalisation particulier, le microorganisme est une bactérie du genre *Escherichia coli* dans laquelle l'expression du gène *edd* est au moins partiellement inhibée.

Dans un exemple particulier, la bactérie du genre *Escherichia coli* est génétiquement modifiée de manière à ce que l'expression des gènes *talA*, et *edd* soient au moins partiellement inhibées.

- 10 Selon l'invention, le microorganisme génétiquement modifié, qui exprime une RuBisCO et une PRK fonctionnelles, et dont la branche non-oxydative de la voie des pentoses phosphates et la voie Entner-Doudoroff sont au moins partiellement inhibées n'est plus apte à produire du pyruvate par la voie Entner-Doudoroff ou la voie des pentoses phosphates. Le flux de carbone à partir du glucose lors de la production de NADPH est par conséquent orienté de façon préférentielle vers l'ingénierie PRK/RuBisCO.

Production de molécules d'intérêt

- 15 Selon l'invention, le microorganisme génétiquement modifié est transformé de manière à produire une molécule exogène d'intérêt et/ou à surproduire une molécule endogène d'intérêt.

D'une manière générale, les modifications génétiques apportées au microorganisme, telles qu'exposées ci-dessus, permettent d'améliorer le rendement carbone des voies de synthèse et/ou de bioconversion de molécules d'intérêt.

- 20 Dans le contexte de l'invention, un rendement « amélioré » s'entend en termes de quantité de produit fini. D'une manière générale, le rendement carbone correspond dans le contexte de l'invention au ratio quantité de produit fini / quantité de sucre fermentescible, notamment en poids. Selon l'invention, le rendement carbone est augmenté chez les microorganismes génétiquement modifiés selon l'invention, comparativement aux microorganismes sauvages,
- 25 placés dans des conditions de culture identiques. Avantagusement, le rendement carbone est augmenté de 2%, 5%, 10%, 15%, 18%, 20%, ou plus. Le microorganisme génétiquement

modifié selon l'invention peut produire une plus grande quantité des molécules d'intérêt (produit fini) comparativement aux molécules hétérologues produites par un microorganisme modifié génétiquement simplement pour produire ou surproduire cette molécule. Selon l'invention, le microorganisme génétiquement peut également surproduire une molécule endogène comparativement au microorganisme sauvage. La surproduction d'une molécule endogène s'entend principalement en termes de quantités. Avantageusement, le microorganisme génétiquement modifié produit au moins 20%, 30%, 40%, 50%, ou plus en poids de la molécule endogène que le microorganisme sauvage. Avantageusement, le microorganisme selon l'invention est génétiquement modifié de manière à produire ou surproduire au moins une molécule parmi les acides aminés, les terpénoïdes, les terpènes, les vitamines et/ou précurseurs de vitamines, les stérols, les flavonoïdes, les acides organiques, les polyols, les polyamines, les molécules aromatiques obtenues à partir d'une hydroxylation stéréospécifique, via un cytochrome p450 NADP-dépendant, etc.

Dans un exemple particulier, le microorganisme est génétiquement modifié pour surproduire au moins un acide aminé, préférentiellement choisi parmi l'arginine, la lysine, la méthionine, la thréonine, la proline, le glutamate, l'homosérine, l'isoleucine et la valine.

Dans un exemple particulier, le microorganisme est génétiquement modifié pour produire ou surproduire des molécules de la voie des terpénoïdes, tel que le farnésène, et de la voie des terpènes.

Dans un exemple particulier, le microorganisme est génétiquement modifié pour produire ou surproduire une vitamine ou un précurseur, préférentiellement choisi parmi le pantoate, pantothenate, transneurosporène, phylloquinone et tocophérols.

Dans un exemple particulier, le microorganisme est génétiquement modifié pour produire ou surproduire un stérol, préférentiellement choisi parmi le squalène, cholestérol, testostérone, progestérone et la cortisone.

Dans un exemple particulier, le microorganisme est génétiquement modifié pour produire ou surproduire un flavonoïde, préférentiellement choisi parmi la frambinone et la vestinone.

Dans un exemple particulier, le microorganisme est génétiquement modifié pour produire ou surproduire un acide organique, préférentiellement choisi parmi l'acide coumarique et l'acide 3-hydroxypropionique.

Dans un exemple particulier, le microorganisme est génétiquement modifié pour produire ou surproduire un polyol, préférentiellement choisi parmi le sorbitol, xylitol et le glycérol.

Dans un exemple particulier, le microorganisme est génétiquement modifié pour produire ou surproduire une polyamine, préférentiellement de la spermidine.

- 5 Dans un exemple particulier, le microorganisme est génétiquement modifié pour produire ou surproduire une molécule aromatique à partir d'une hydroxylation stéréospécifique, via un cytochrome p450 NADP-dépendant, préférentiellement choisie parmi les phénylpropanoïdes, terpènes, lipides, tannins, arômes, hormones.

- 10 Dans le cas où la molécule d'intérêt est obtenue par bioconversion, le microorganisme génétiquement modifié est avantageusement mis en culture dans un milieu de culture comprenant le substrat à convertir. D'une manière générale, la production ou surproduction d'une molécule d'intérêt par un microorganisme génétiquement modifié selon l'invention est obtenue par mise en culture dudit microorganisme dans un milieu de culture approprié, connu de l'homme du métier.

- 15 Le terme « milieu de culture approprié » désigne d'une manière générale un milieu de culture stérile apportant les nutriments essentiels ou bénéfiques à la maintenance et/ou à la croissance dudit microorganisme, tels que les sources carbonées ; les sources azotées telles que le sulfate d'ammonium ; les sources de phosphores, par exemple, le potassium phosphate monobasique ; les oligo-éléments, par exemple, les sels de cuivre, d'iodure, de fer, de magnésium, de zinc ou
20 de molybdate ; les vitamines et autres facteurs de croissance tels que des acides aminés ou autres promoteurs de croissance. Un antimousse peut être ajouté selon les besoins. Selon l'invention, ce milieu de culture approprié peut être chimiquement défini ou complexe. Le milieu de culture peut ainsi être de composition identique ou similaire à un milieu synthétique, tel que défini par Verduyn et al., (Yeast. 1992. 8:501–17), adapté par Visser et al., (Biotechnology and
25 bioengineering. 2002. 79:674–81), ou commercialement disponible tel que le milieu YNB (Yeast Nitrogen Base, MP Biomedicals ou Sigma-Aldrich).

- Notamment, le milieu de culture peut comprendre une source de carbone simple, telle le glucose, le galactose, le saccharose, les mélasses, ou les sous-produits de ces sucres, éventuellement supplémentée en CO₂ comme co-substrat carboné. Selon la présente invention,
30 la source de carbone simple doit permettre la croissance normale du microorganisme d'intérêt. Il est également possible, dans certains cas, d'utiliser une source de carbone complexe, telle que de la biomasse lignocellulosique, de la paille de riz, ou de l'amidon. L'utilisation d'une source de carbone complexe nécessite généralement un prétraitement avant utilisation.

Dans un mode de réalisation particulier, le milieu de culture contient au moins une source de carbone parmi les monosaccharides tels que le glucose, le xylose ou l'arabinose, les disaccharides tels que le saccharose, les acides organiques tels que l'acétate, le butyrate, le propionate ou le valérate afin de favoriser différentes sortes de polyhydroxyalcanoate (PHA), du glycérol traité ou non-traité.

En fonction des molécules à produire et/ou surproduire, il est possible de jouer sur l'apport en facteur nutritionnels (N, O, P, S, K⁺, Mg²⁺, Fe²⁺, Mn, Co, Cu, Ca, Sn ; Koller et al., Microbiology Monographs, G.-Q. Chen, 14: 85-119, (2010)). C'est le cas notamment pour favoriser la synthèse et l'accumulation intracellulaire de PHA dont le PHB.

Selon l'invention, tout mode de culture permettant la production à l'échelle industrielle de molécules d'intérêt peut être envisagé. Avantagusement, la culture se fait en bioréacteurs, notamment en mode batch, fed-batch et/ou culture continue. Préférentiellement, la conduite de culture associée à la production de la molécule d'intérêt est en mode fed-batch correspondant à une alimentation contrôlée en un ou plusieurs substrats, par exemple via l'ajout d'une solution concentrée en glucose dont la concentration peut être comprise entre 200 g.L⁻¹ et 700 g.L⁻¹. Une alimentation contrôlée en vitamines au cours du procédé peut également être bénéfique à la productivité (Alfenore et al., Appl Microbiol Biotechnol. 2002. 60:67–72). Il est également possible d'ajouter une solution de sels d'ammonium pour limiter l'apport azoté.

La fermentation est généralement conduite en bioréacteurs, avec de possibles étapes de précultures solides et/ou liquides en Erlenmeyers, avec un milieu de culture approprié contenant au moins une source de carbone simple et/ou un apport de CO₂ exogène, nécessaire à la production de la molécule d'intérêt.

D'une manière générale, les conditions de culture des microorganismes selon l'invention sont aisément adaptables par l'homme du métier, en fonction du microorganisme et/ou de la molécule à produire/surproduire. Par exemple, la température de culture est notamment comprise pour les levures entre 20°C et 40°C, de préférence entre 28°C et 35°C, et plus particulièrement d'environ 30°C pour *S.cerevisiae*. La température de culture est notamment comprise entre 25°C et 35°C, de préférence 30°C pour *Cupriavidus necator*.

L'invention a donc également pour objet l'utilisation d'un microorganisme génétiquement modifié selon l'invention, pour la production ou la surproduction d'une molécule d'intérêt, préférentiellement choisie parmi les acides aminés, les peptides, les protéines, les vitamines, les stérols, les flavonoïdes, les terpènes, les terpénoïdes, les acides gras, les polyols et les acides organiques.

L'invention a aussi pour objet un procédé biotechnologique pour produire au moins une molécule d'intérêt, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de mise en culture d'un microorganisme génétiquement modifié selon l'invention, dans des conditions permettant la synthèse ou la bioconversion, par ledit microorganisme, de ladite molécule d'intérêt, et de manière optionnelle une étape de récupération et/ou purification de ladite molécule d'intérêt.

Dans un mode de réalisation particulier, le microorganisme est génétiquement modifié pour exprimer au moins une enzyme impliquée dans la synthèse de ladite molécule d'intérêt.

Dans un autre mode de réalisation particulier, le microorganisme est génétiquement modifié pour exprimer au moins une enzyme impliquée dans la bioconversion de ladite molécule d'intérêt.

L'invention a aussi pour objet un procédé de production d'une molécule d'intérêt comprenant (i) l'insertion d'au moins une séquence codant une enzyme impliquée dans la synthèse ou la bioconversion de ladite molécule d'intérêt dans un microorganisme recombinant selon l'invention, (ii) la culture dudit microorganisme dans des conditions permettant l'expression de ladite enzyme et de manière optionnelle (iii) la récupération et/ou purification de ladite molécule d'intérêt.

Par exemple, il est possible de faire produire du farnésène par une levure, telle qu'une levure du genre *Saccharomyces cerevisiae*, génétiquement modifiée pour exprimer une PRK et une RuBisCO fonctionnelles, une farnésène synthase et dans laquelle l'expression d'un gène TAL1 (Gene ID : 851068) est au moins partiellement inhibée.

Il est également possible de faire surproduire du glutamate par une bactérie, telle qu'une bactérie du genre *Escherichia coli*, génétiquement modifiée pour exprimer une PRK et une RuBisCO fonctionnelles, et dans laquelle l'expression des gènes talA (Gene ID : 947006.) et sucA (Gene ID : 945303) est au moins partiellement inhibée.

EXEMPLES

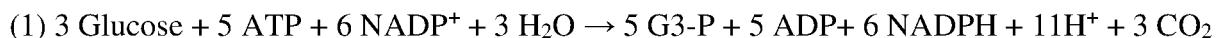
Exemple 1: Analyse bio-informatique

a) Comparaison des rendements de fixation de carbone à partir de glucose entre une souche sauvage utilisant la voie des pentoses phosphates et la glycolyse, et une souche modifiée selon l'invention

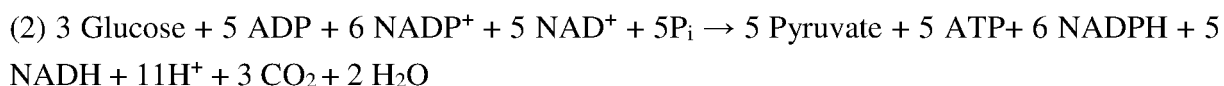
Afin d'évaluer le bénéfice apporté par les modifications selon l'invention, des calculs de rendements théoriques ont été réalisés sur la base de la stœchiométrie des réactions impliquées.

Deux cas de figure ont été analysés : (i) une souche sauvage, utilisant la voie des pentoses phosphates pour alimenter une voie de biosynthèse NADPH-dépendante (par exemple, synthèse de farnésène), et (ii) une souche modifiée selon l'invention, dans les mêmes conditions.

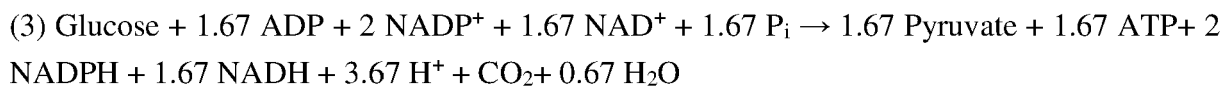
Dans le cadre de l'amélioration des voies de biosynthèse NADPH-dépendantes, le bilan théorique de la formation de NADPH et de glycéraldéhyde-3-phosphate (G3-P) à partir de glucose par la voie des pentoses phosphates a été calculé selon l'équation ci-dessous (1) :



En descendant jusqu'à la formation de pyruvate à partir de G3P, on arrive au bilan suivant :



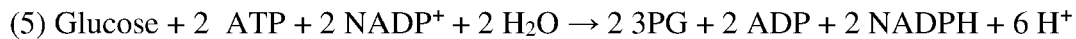
Si on normalise le bilan pour une mole de glucose, on obtient le rendement suivant :



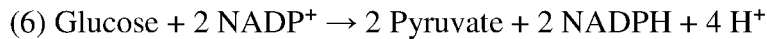
En passant par la voie des pentoses, 1.67 moles de pyruvate et 2 moles de NADPH sont produites à partir d'une mole de glucose. Une mole de carbone est par contre perdue par décarboxylation, lors de la formation de ribulose-5-phosphate par la 6-phosphogluconate déshydrogénase (EC 1.1.1.44).

Le rendement maximum théorique de production de pyruvate lors de la production de 2 NADPH par la voie des pentoses phosphates est par conséquent de 0.82 g_{pyruvate}/g_{glucose} (g de pyruvate synthétisé, par glucose consommé).

En intégrant l'ingénierie PRK/RuBisCO dans une souche inhibée pour la branche non-oxydative de la voie des pentoses phosphates (par exemple Δ TAL1- Δ NQM1 dans le cadre de la levure *S. cerevisiae*), le flux de fixation de carbone est redirigé de la branche oxydative de la voie des pentoses phosphates vers l'ingénierie PRK/RuBisCO (figure 2). Ce flux se rattache à la fin de la voie de la glycolyse, au niveau de la formation de 3-phosphoglycérate (3PG), avec le rendement suivant :



En descendant jusqu'à la formation de pyruvate à partir de 3PG, on arrive au bilan suivant :



- 10 L'intégration des modifications selon l'invention permet de récupérer la molécule de carbone autrement perdue par la décarboxylation dans la voie des pentoses phosphates. Le rendement maximum théorique de synthèse de pyruvate lors de la production de 2 NADPH par l'ingénierie est par conséquent de 0.98 g_{pyruvate}/g_{glucose}, ce qui permet d'améliorer de 20.5%, celui obtenu par la voie des pentoses phosphates.

15 *b) Simulation de rendements de biosynthèse par analyse de balance de flux*

Dans une approche bioinformatique, des analyses de type « Analyse de balance de flux » (ABF) ont également été réalisées pour simuler l'impact des modifications décrites selon l'invention sur le rendement de différentes voies de biosynthèse.

- 20 Les analyses FBA reposent sur des modèles mathématiques permettant de simuler des réseaux métaboliques à l'échelle d'un génome (Orth et al., Nat Biotechnol. 2010 ; 28: 245–248). Les réseaux reconstruits contiennent les réactions métaboliques connues d'un organisme donné et intègrent les besoins de la cellule, pour assurer notamment la maintenance cellulaire, ou la croissance. Les analyses FBA permettent de calculer le flux des métabolites au travers de ces réseaux, permettant de prédire des taux de croissance théoriques, ainsi que des rendements de production de métabolites.

i) Procédure

- Les simulations ABF ont été réalisées avec le logiciel OptFlux (Rocha et al., BMC Syst Biol. 2010 Apr 19;4:45. doi: 10.1186/1752-0509-4-45), et le modèle métabolique de *Saccharomyces cerevisiae* iMM904 (Mo et al., BMC Syst Biol. 2009 Mar 25;3:37. doi: 10.1186/1752-0509-3-37). Ce modèle a été modifié pour inclure les améliorations décrites selon l'invention,

notamment une voie hétérologue de fixation de CO₂ avec (i) ajout d'une réaction de type PRK, (ii) ajout d'une réaction de type RuBisCO.

Dans des exemples de réalisation particuliers, les réactions nécessaires pour simuler la production de molécule par des voies hétérologues ont également été ajoutées au modèle.

- 5 Dans un exemple de réalisation particulier, une réaction de type farnésène synthase (EC 4.2.3.46 ou EC 4.2.3.47) a notamment été rajoutée pour la production hétérologue de farnésène.

- Dans un second exemple de réalisation particulier, les réactions de type acetoacetyl-CoA reductase (EC 1.1.1.36), et poly-β-hydroxybutyrate synthase (EC 2.3.1.B2 ou 2.3.1.B5), ont été rajoutées au modèle pour simuler une voie de production hétérologue de β-hydroxybutyrate, le monomère du polyhydroxybutyrate. Les simulations ont été réalisées en appliquant au modèle un ensemble de contraintes reproductibles par l'homme du métier, visant à simuler les conditions de culture *in vivo* d'une souche de *S. cerevisiae* dans les conditions décrites selon l'invention (par exemple, présence de glucose non limitante dans le milieu, condition de culture aérobie).
- 10

- 15 Les simulations ont été réalisées en appliquant au modèle un ensemble de contraintes reproductibles par l'homme du métier, visant à simuler les conditions de culture *in vivo* d'une souche de *S. cerevisiae* dans les conditions décrites selon l'invention (par exemple, présence de glucose non limitante dans le milieu, condition de culture aérobie).

- Dans des exemples de réalisation particuliers, les simulations sont réalisées en inactivant virtuellement les réactions des enzymes transaldolases TAL1 et NQM1, de façon à simuler les diminutions d'activité de la branche non-oxydative de la voie des pentoses, décrites selon l'invention.
- 20

- Les simulations sont réalisées en parallèle sur un modèle de type « souche sauvage », non modifié, de façon à évaluer l'impact des améliorations décrites selon l'invention sur le rendement de production des voies de biosynthèse testées.
- 25

ii) Résultats

Les rendements théoriques obtenus et les pourcentages d'amélioration apportés par l'invention sont décrits dans le tableau 7 ci-dessous.

Tableau 7 : Rendements de production maximums théoriques évalués par ABF sur une souche sauvage et une souche modifiée selon l'invention, pour la production de différentes molécules.

Molécule cible	Rendements de production maximums théoriques avec une souche sauvage			Rendements de production maximums théoriques avec une souche modifiée selon l'invention			Pourcentage d'amélioration du rendement massique théorique $\frac{g_X}{g_{GLUC}}$ apporté par l'invention
	Mol_X / Mol_{GLUC}	$CMol_X / CMol_{GLUC}$	g_X / g_{GLUC}	Mol_X / Mol_{GLUC}	$CMol_X / CMol_{GLUC}$	g_X / g_{GLUC}	
Glutamate	0.92	0.77	0.75	1	0.83	0.82	+9.3 %
Acide β -hydroxybutyrique	0.92	0.61	0.53	1	0.67	0.58	+ 9.4 %
Farnésène	0.21	0.54	0.24	0.22	0.56	0.25	+4.2 %

Mol_X / Mol_{GLUC} : moles de molécule X produites, rapportées aux moles de glucose consommées

5 $CMol_X / CMol_{GLUC}$: moles de carbone de molécule X produites, rapportées aux moles de carbone de glucose consommées

g_X / g_{GLUC} : g de molécule X produits, rapporté aux g de glucose consommés

Exemple 2: Amélioration de la production hétérologue de farnésène chez *S. cerevisiae*

- 10 Une souche de levure *Saccharomyces cerevisiae*, CEN.PK 1605 (Mat a HIS3 leu2-3.112 trp1-289 ura3-52 MAL.28c) issue de la souche commerciale CEN.PK 113-7D (GenBank : JRIV000000000) est ingénierée pour produire du NADPH sans perte de CO₂ et ainsi permettre l'amélioration de la production d'alpha farnésène à partir de glucose.

a) Inactivation de la branche non-oxydative de la voie des pentoses phosphates

- 15 La branche non-oxydative de la voie des pentoses phosphates a été inactivée par la délétion du gène TAL1 et de son paralogue NQM1.

i) Inactivation du gène TAL1 : Chromosome XI (836350 à 837357, brin complémentaire)

Pour se faire, la phase codante du gène de résistance au G418, issue de la cassette KanMX contenue sur le plasmide pUG6 (P30114) - Euroscarf a été amplifiée avec les oligonucléotides

- 20 Sdtal1- Rdtal1 (Tableau 8).

Tableau 8 : Oligonucléotides

Nom	séquence
Sdtal1 (SEQ ID N°1)	<u>ACGATAGTAAAATACTTCTCGAACTCGTCACATATACGTGTACATA</u> AATGGGTAA GGAAAAGACTCACGTTTC
Rdtal1 (SEQ ID N°2)	<u>ATCAAAAGAAACGTGCATAAGGACATGGCCTAAATTAATATTTCCGAGATACTT</u> <u>CCTTAGAAAACTCATCGAGCATCAAATGAAAC</u>
Sdnqm1 (SEQ ID N°3)	<u>TTGCTAGCGTAAGTCATAAAAAATAGGAAATAATCACATATATACAAGAAATTA</u> <u>AATATGGGTAAAAAGCCTGAACTCACCG</u>
Rdnqm1 (SEQ ID N°4)	<u>AGTGGTATATATATTTATATATATAAGTAGGTACCTCTACTCTTAATGATTAT</u> TCCTTTGCCCTCGGACG

La partie soulignée des oligonucléotides est parfaitement homologue à la séquence KanMX et le reste de la séquence correspond aux régions adjacentes à la phase codante du gène TAL1 sur le génome de *Saccaromyces cerevisiae*, de manière à générer un amplicon PCR contenant aux extrémités des séquences de recombinaison homologues du locus du gène TAL1.

Pour la réaction de transformation, la souche CEN.PK 1605 a été cultivée dans un volume de 50 ml de milieu riche complexe YPD (yeast extract peptone dextrose) à 30°C, jusqu'à une densité optique 600nm de 0.8. Les cellules ont été centrifugées pendant 5 minutes à 2500 tr / min à la température ambiante. Le surnageant a été éliminé et les cellules ont été remises en suspension dans 25 ml d'eau stérile et centrifugées de nouveau pendant 5 minutes à 2500 tr / min à température ambiante. Après avoir éliminé le surnageant, les cellules ont été remises en suspension dans 400 µl d'acétate de lithium stérile 100 mM.

Parallèlement, un mix de transformation a été préparé dans un tube de 2 ml comme suit: 250 µL de 50% de PEG, 10 µL d'ADN « porteur » à 5 mg / mL, 36 µL d'acétate de lithium 1 M, 10 µL de réaction PCR purifiée (cassette de délétion) et de l'eau à 350 µl.

50 µl des cellules remises en suspension ont été ajoutés au mélange de transformation et incubés à 42°C pendant 40 minutes dans un bain d'eau.

Après incubation, le tube a été centrifugé pendant 1 minute à 5000 tr / min à température ambiante et le surnageant a été jeté. Les cellules ont été remises en suspension dans 2 mL de YPD, transférées dans un tube de 14 mL et incubées pendant 2 heures à 30 ° C 200 tours par minute. Les cellules ont ensuite été centrifugées pendant 1 minute à 5000 tr / min à température ambiante. Le surnageant a été éliminé et les cellules ont été remises en suspension dans 1 ml

d'eau stérile et centrifugées de nouveau pendant 1 minute et ressuspendues dans 100 µl d'eau stérile et étalé sur YPD+G418 180 µg/mL.

Les colonies obtenues ont été génotypées pour validation de la délétion du gène TAL1 et référencées **EQ-0520 (CEN.PK1605 $\Delta tal1::kan$)**.

5 *ii) Inactivation du gène NQM1 : Chromosome VII (580435 à 581436, brin complémentaire)*

La phase codante du gène de résistance à l'hygromycine B, issue de la cassette hphMX (loxP-pAgTEF1-hphMX-tAgTEF1-loxP) et contenue sur le plasmide pUG75 (P30671) - Euroscarf, est amplifiée avec les oligonucléotides Sdnqm1 et Rdnqm1 (tableau 8). Cela permet de générer un amplicon PCR $\Delta nqm1$ contenant aux extrémités des séquences de recombinaison homologues du locus du gène de la Transaldolase NQM1.

Pour la réaction de transformation, la souche **EQ-0520 (CEN.PK1605 $\Delta tal1::kan$)** a été cultivée dans un volume de 50 ml de milieu riche complexe YPD (yeast extract peptone dextrose) à 30°C jusqu'à une densité optique à 600nm de 0,8. Les cellules ont été centrifugées pendant 5 minutes à 2500 tr / min à la température ambiante. Le surnageant a été éliminé et les cellules ont été remises en suspension dans 25 ml d'eau stérile et centrifugées de nouveau pendant 5 minutes à 2500 tr / min à température ambiante. Après avoir éliminé le surnageant, les cellules ont été remises en suspension dans 400 µl d'acétate de lithium stérile 100 mM. Parallèlement, un mix de transformation a été préparé dans un tube de 2 ml comme suit: 250 µL de 50% de PEG, 10 µL d'ADN « porteur » à 5 mg / mL, 36 µL d'acétate de lithium 1 M, 10 µL de réaction PCR purifiée (cassette de délétion) et de l'eau à 350 µl.

50 µl des cellules remises en suspension ont été ajoutés au mélange de transformation et incubés à 42°C pendant 40 minutes dans un bain d'eau. Après incubation, le tube a été centrifugé pendant 1 minute à 5000 tr / min à température ambiante et le surnageant a été jeté. Les cellules ont été remises en suspension dans 2 mL de YPD, transférées dans un tube de 14 mL et incubées pendant 2 heures à 30°C à 200 tours par minute. Les cellules ont ensuite été centrifugées pendant 1 minute à 5000 tr / min à température ambiante. Le surnageant a été éliminé et les cellules ont été remises en suspension dans 1 ml d'eau stérile et centrifugées de nouveau pendant 1 minute et ressuspendues dans 100 µl d'eau stérile et étalées sur YPD + HygromycineB 200 µg/mL +G418 180 µg/mL.

30 Les colonies obtenues ont été génotypées pour la validation de la délétion du gène TAL1 et référencées **EQ-0521 (CEN.PK1605 $\Delta tal1::kan \Delta nqm1::hph$)**.

b) Introduction des enzymes PRK/RuBisCO/Farnésène synthase

Afin de créer une voie alternative à la glycolyse et permettant à la souche **EQ-0521 (CEN.PK1605 $\Delta tal1::kan$ $\Delta nqm1::hph$)** d'augmenter le rendement de certains produits métabolique par la fixation de CO₂, la souche est modifiée pour exprimer:

- 5
 - un gène codant pour une phosphoribulokinase PRK qui se greffe sur la voie des pentoses phosphate en consommant le ribulose-5P pour donner le ribulose-1.5bisP et
 - une RuBisCO de type I (avec les gènes structuraux RbcL et RbcS et les chaperonnes RbcX, GroES et GroEL). La RuBisCO consomme le ribulose-1.5bisP et une mole de CO₂ pour former le 3phosphoglycerate

- 10 Pour produire de l'alpha-farnésène, il manque à la levure le gène de l'alpha-farnésène synthase (AFS1; GenBank accession number AY182241).

Tableau 9 : Cassettes d'expression et composition des plasmides

Protéines	GenBank	Optimisation de codons	Promoteur	Terminateur	ori	Marqueur auxotrophie	Plasmides		
RbcL	BAD78320.1	Oui	TDH3p	ADH1	2μ	URA3	pFPP45	pL4	
RbcS	BAD78319.1	Oui	TEF1p	PGK1	2μ	URA3	pFPP45	pL4	
RbcX	BAD80711.1	Oui	TEF1p	PGK1	ARS-CEN6	LEU2	pFPP56		
GroES	U00096	Non	PGI1p	CYC1	ARS-CEN6	LEU2	pFPP56		
GroEL	AP009048	Non	TDH3	ADH1	ARS-CEN6	LEU2	pFPP56		
PRK	BAD78757.1	Oui	Tet-OFF	CYC1	ARS416-CEN4	TRP1	pFPP20		
alpha-farnésène synthase	AY182241	Oui	PGI1p	CYC1	2μ	URA3		pL4	pL5
Vide			Tet-OFF	CYC1	ARS416-CEN4	TRP1	pCM185		
Vide					ARS-CEN6	LEU2	pFL36		

Les sept gènes nécessaires à l'ingénierie (Tableau 9) ont été clonés sur trois vecteurs plasmidiques capables de se répliquer de manière autonome, avec des origines de répllication compatibles et portant chacun un gène de complémentation d'auxotrophies différents, permettant de sélectionner les souches contenant les trois constructions plasmidiques. Deux de ces plasmides sont monocopies, avec une origine de répllication de type Ars/CEN et le troisième est multicopies avec une origine 2μ.

Les gènes issus de *Synechococcus elongatus*, tels que RbcL, RbcS, RbcX et PRK (préalablement décrits dans WO 2015107496 A1) et l'alpha-farnésène synthase de *Malus*

domestica (Tippmann et al. Biotechnol Bioeng. 2016 Jan;113(1):72-81) ont été optimisés pour l'utilisation de codons chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Selon le protocole précédemment décrit la souche EQ-0521 a été cultivée dans un volume de 50 ml de milieu riche complexe YPD à 30°C et avec le mix de transformation suivant : 250 µL de 50% de PEG, 10 µL d'ADN « porteur » à 5 mg / mL, 36 µL d'acétate de lithium 1 M, 10 µL (3µg de d'une combinaison pFPP45+pFPP56+pFPP20 ou pL4+pFPP56+pFPP20 ou pL5+pFL36+pCM185) et de l'eau à 350 µl.

50 µl des cellules remises en suspension ont été ajoutés au mélange de transformation et incubés à 42°C pendant 40 minutes dans un bain d'eau. Après incubation, le tube a été centrifugé pendant 1 minute à 5000 tr / min à température ambiante et le surnageant a été jeté. Les cellules ont été remises en suspension dans 2 mL de YNB (yeast without nitrogen base supplémenté en sulfate d'ammonium¹, glucose) complémenté avec un milieu commercial CSM (MP Biomedicals) adapté aux marqueurs de sélection, transférées dans un tube de 14 mL et incubées pendant 2 heures à 30°C. Le mix final est étalé sur YNB+sulphate d'ammonium+CSM – LUW (leucine uracile, tryptophane en 20g/L glucose et 2µg/mL de doxycycline).

Les souches obtenues sont :

- **EQ-0523 (CEN.PK1605 *Δtal1::kan Δnqm1::hph*) (pFPP45+pFPP56+pFPP20)**
- **EQ-0524 (CEN.PK1605 *Δtal1::kan Δnqm1::hph*) (pL4+pFPP56+ pFPP20)**
- **EQ-0525 (CEN.PK1605) (pL5+pFL36+pCM185)**

Les souches EQ-0523 (PRK/RuBisCO/*Δtal1::kan Δnqm1::hph*) , EQ-0524 (PRK/RuBisCO/*Δtal1::kan Δnqm1::hph* + farnésène synthase) et EQ-0525 (farnésène synthase) à la croissance sur milieu liquide YNB avec 20g/L glucose et 10% CO₂

Les cultures en mode batch effectuées en erlenmeyers sont réalisées avec le milieu de culture approprié et un apport en CO₂ exogène de 10%, en incubateur agité (120 RPM, 30°C), avec une inoculation à 0.05 D.O.600nm mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre EON (BioTek Instruments). La souche d'intérêt est cultivée sur milieu YNB+CSM-LUW avec 20 g/L de glucose et un apport en CO₂ exogène de 10%

Après observation d'un démarrage de croissance significatif, les souches sont adaptées à un milieu minéral minimum exempt des acides aminés et base azoté inclus dans le CSM-LUW, soit uniquement du YNB avec 20 g/L de glucose et un apport en CO₂ exogène de 10% c) *Production de farnésène en Erlenmeyers*

La souche EQ-0524 de *Saccharomyces cerevisiae*, dont la branche non-oxydative de la voie des pentoses phosphates est inhibée par inhibition des gènes TAL1 et NQM1, est cultivée afin de produire du farnésène en surproduisant du NADPH sans perte de CO₂, en utilisant une PRK et une RuBisCO exogènes. Cette souche d'intérêt est comparée à une souche de référence EQ-0525 produisant du farnésène suite à l'ajout d'une farnésène synthase hétérologue, sans délétion de TAL1 et NQM1 ni ajout de PRK et RuBisCO exogène. Les cultures en mode batch effectuées en erlenmeyers sont réalisées dans les conditions décrites précédemment.

La concentration en farnésène est quantifiée à partir du surnageant de moûts de fermentation. Brièvement, les suspensions de cellules sont centrifugées à 5000rpm pendant 5 minutes. La phase dodécane est diluée 10 fois dans de l'hexane et est injectée en GC-MS, pour analyse selon le protocole décrit dans Tippman et al. (Biotechnol Bioeng. 2016; 1131:72-81).

Une augmentation de 3% du rendement de production, en gramme de farnésène par gramme de glucose consommé, est observée chez la souche EQ-0253, comparativement à la souche EQ-0253

Exemple 3 : Amélioration de la production de glutamate chez *E. coli*

Il a déjà été décrit que la délétion du gène de l'alpha-ketoglutarate déshydrogénase augmente la production de glutamate (Usuda et al., J Biotechnol. 2010 May 3;147(1):17-30. doi: 10.1016/j.jbiotec.2010.02.018). Les expérimentations décrites ci-dessous ont donc été réalisées chez une souche d'*Escherichia coli* K12 MG1655, dont le gène *sucA* a été délété. Cette souche est issue d'une banque de délétion de gènes (Baba et al., Mol Syst Biol. 2006;2:2006.0008) chez *Escherichia coli* et fournie par le Coli Genetic Stock Center sous le nom JW0715-2 et avec la référence 8786. (**JW0715-2 : MG1655 Δ sucA::Kan**).

a) Elimination de la cassette de sélection par recombinaison spécifique des régions FTR par recombinaison Flp

Afin de pouvoir réutiliser la même stratégie de délétion que celle utilisée pour construire la souche JW0715-2 ci-dessus, la cassette de sélection a dû être éliminée, à l'aide d'une recombinase.

Le plasmide p707-Flpe (fourni dans le kit Quick&Easy *E. coli* Gene Deletion Red®/ET® Recombination par Gene bridges) est transformé par électroporation selon le protocole du kit. Les cellules sont sélectionnées sur LB agar complémenté avec 0,2% de glucose, tétracycline

0.0003% et additionné de 0,3% de L-arabinose. Une contre sélection des clones obtenus est effectuée en vérifiant qu'ils ne sont plus capables de pousser sur le même milieu supplémenté en kanamycin 0,0015%.

La souche obtenue se nomme **EQ.EC002 : MG1655 Δ sucA**

5 b) Délétion de l'opéron *edd-eda*, codant pour la voie métabolique d'Entner-Doudoroff

La délétion de l'opéron *edd-eda* est réalisée par recombinaison homologue et utilisation du kit Quick&Easy E. coli Gene Deletion Red®/ET® Recombination Kit, selon le protocole du fournisseur Gene bridges.

1. Des oligonucléotides dessinés pour amplifier une cassette d'expression d'un gène de résistance FRT-PKG-gb2-neo-FRT et possédant une séquence 5' homologue, sur 50 nucléotides, aux régions adjacentes du locus de délétion (positions 1932065-1932115 et 1934604-1934654) sur le chromosome, générant ainsi des bras de recombinaison de la cassette sur le génome bactérien de part et d'autre de la totalité de l'opéron ;
2. La souche de *Escherichia coli* K-12, EQ.EC002 est transformée par électroporation avec le plasmide pRedET selon le protocole du kit. Les colonies obtenues sont sélectionnées sur milieu riche complexe LB agar 0,2% glucose, tétracycline 0,0003% ;
3. La transformation de l'amplicon obtenu lors de la première étape en présence de la recombinase RedET, induite par l'arabinose 0.3% en LB liquide pendant 1H. Pour se faire, une seconde électroporation des cellules exprimant RedET par la cassette de délétion est effectuée et les colonies sont sélectionnées sur LB agar complémenté avec 0,2% glucose, tétracycline 0,0003% et additionné de 0,3% L-arabinose et kanamycin 0,0015%.
4. Le plasmide p707-Flpe (fournit dans le kit Quick&Easy E. coli Gene Deletion Red®/ET® Recombination par Gene bridges) est transformé par électroporation selon le protocole du kit. Les cellules sont sélectionnées sur LB agar complémenté avec 0,2% glucose, tétracycline 0,0003% et additionné de 0,3% L-arabinose. Une contre sélection des clones obtenus est effectuée en vérifiant qu'ils ne sont plus capables de pousser sur le même milieu supplémenté en kanamycin 0,0015%.
5. La souche obtenue se nomme **EQ.EC003 : MG1655 Δ sucA Δ edd-eda**

c) Délétion du gène *talA*

La délétion du gène *talA* est réalisée par recombinaison homologue et l'utilisation du kit Quick&Easy E. coli Gene Deletion Red®/ET® Recombination Kit, selon le protocole du fournisseur Gene bridges.

- 5 1. Des oligonucléotides dessinés pour amplifier une cassette d'expression d'un gène de résistance FRT-PKG-gb2-neo-FRT et possédant une séquence 5' homologues sur 50 nucléotides aux régions adjacentes du locus de délétion, c'est à dire la phase codante du gène (*talA*) (Gene ID : 947006), générant ainsi des bras de recombinaison de la cassette sur le génome bactérien.
- 10 2. La souche de *Escherichia coli* K-12, EQ.EC003 est transformée par électroporation avec le plasmide pRedET, selon le protocole du kit. Les colonies obtenues sont sélectionnées sur milieu riche complexe LB agar 0,2% glucose, tétracycline 0,0003%.
- 15 3. La transformation de l'amplicon obtenu lors de la première étape, en présence de la recombinase RedET qui sera induite par l'arabinose 0,3% en LB liquide pendant 1H. Pour se faire, une seconde électroporation des cellules exprimant RedET par la cassette de délétion est effectuée et les colonies sont sélectionnées sur LB agar complémenté avec 0,2% glycérol et pyruvate 0,3%, tétracycline 0,0003% et additionné de 0,3% L-arabinose et kanamycin 0,0015%.

Les délétions sont vérifiées par génotypage et séquençage et le nom des souches obtenues est

- 20 • EQ.EC002 : MG1655 Δ *sucA*
- EQ.EC003 : MG1655 Δ *sucA* Δ *edd-eda*
- EQ.EC020 : MG1655 Δ *sucA* Δ *edd-edda* Δ *talA::kan*

d) Insertion de l'ingénierie PRK/RuBisCO pour la fixation du CO₂

- 25 Pour l'expression recombinante des différents composants d'une RuBisCO de type I chez E. coli, les gènes décrits dans le

Tableau ci-dessous sont clonés sous la forme d'un opéron synthétique contenant les gènes décrits dans

Tableau ci-dessous.

- 30 Pour contrôler le niveau d'expression de ces gènes, des séquences de liaison aux ribosomes (RBS) présentées dans le

Tableau , ayant des efficacités de traduction variables, comme décrit dans Zelebuch et al. (Zelebuch et al., Nucleic Acids Res. 2013 May;41(9):e98 ; Levin-Karp et al., ACS Synth Biol. 2013 Jun 21;2(6):327-36. doi: 10.1021/sb400002n) sont insérées entre la phase codante de chaque gène. La succession de chaque phase codante intercalée par une séquence RBS est construite par insertion successive dans un vecteur pZA11 (Expressys) qui contient un promoteur PLtetO-1, une origine de réplication moyenne p15A, et un gène de résistance à l'ampicilline.

Tableau 10 : Références des gènes

Gènes	GenBank	Organism
rbcL	BAD78320.1	<i>Synechococcus elongatus</i>
rbcS	BAD78319.1	<i>Synechococcus elongatus</i>
rbcX	<u>BAD80711.1</u>	<i>Synechococcus elongatus</i>
Prk	BAD78757.1	<i>Synechococcus elongatus</i>

Tableau 11 : Composition des cassettes d'expression sur les plasmides

Plasmide	Structure de l'opéron synthétique dans vecteur pZA11								
	geneA	RBS1	geneB	RBS2	geneC	RBS3	geneD	RBS4	geneE
pZA11									
pEQEC005	rbcS	D	rbcL	B	RbcX	F			
pEQEC006	rbcS	D	rbcL	B	RbcX	F	Prk		
pEQEC008	Prk								

Tableau 12: Séquences intercistroniques “ribosome binding site” (RBS)

Nom	Séquences RBS
A (SEQ ID N°5)	AGGAGGTTTGGA
B (SEQ ID N°6)	AACAAAATGAGGAGGTACTGAG
C (SEQ ID N°7)	AAGTTAAGAGGCAAGA
D (SEQ ID N°8)	TTCGCAGGGGGAAG
E (SEQ ID N°9)	TAAGCAGGACCGGCGGCG
F (SEQ ID N°10)	CACCATACTG

Plusieurs souches sont réalisées en électroporant les différents vecteurs présentés selon le plan ci-dessus :

EQ.EC 020 → (EQ.EC 003+ pZA11) : MG1655 Δ sucA Δ edd-eda

EQ.EC 021 → (EQ.EC 004+ pEQEC005) : MG1655 Δ sucA Δ edd-eda -talA::kan (RuBisCO)

- 5 EQ.EC 022 → (EQ.EC 004+ pEQEC006) : MG1655 Δ sucA Δ edd-eda talA::kan (RuBisCO+PRK)

EQ.EC 024 → (EQ.EC 003+ pEQEC008) : MG1655 Δ sucA Δ edd-eda Δ talA::kan (PRK)

- 10 Les clones sont sélectionnés sur milieu LB supplémenté par 100 mg/L d'ampicilline. Après obtention d'une quantité de biomasse suffisante, des cultures d'un volume supérieur ou égal à 50 mL en Erlenmeyer de 250ml minimum sont ensemencées afin d'effectuer l'adaptation de la souche à l'utilisation de l'ingénierie PRK/RuBisCO. Cette adaptation est effectuée sur le milieu de culture LB avec 2 g/L de glucose, et un apport en CO₂ exogène de 1 atmosphère à 37°C comme décrit ci-dessus.

e) Production de glutamate

- 15 Pour la production de glutamate, les cellules issues de 500ml de culture en LB sont inoculées dans 20ml de milieu MS (40 g/L de glucose, 1 g/L MgSO₄.7H₂O, 20 g/L de (NH₄)₂SO₄, 1 g/L KH₂PO₄, 10 mg/L FeSO₄.7H₂O, 10 mg/L MnSO₄.7H₂O, 2 g/L d'extrait de levure, 30 g/L de CaCO₃, 100 mg/L d'ampicilline à une pression 0.1 atmosphère de CO₂.

- 20 Le glutamate et le glucose résiduels sont mesurés avec un bio analyseur (Sakura seiki). Le rendement carbone Y_{p/s} est calculé en gramme de glutamate produit par gramme de glucose consommé. Ce rendement augmente de 8% chez les souches EQ.EC 022 (RuBisCO+PRK), par comparaison avec les souches contrôles EQ.EC 020 (vide), EQ.EC 021 (RuBisCO seule). La souche contrôle EQ.EC 024 (PRK seule) n'est pas viable.

25 **Exemple 4 : Amélioration de la production de PHB chez *C. necator***

a) Inhibition de la branche non-oxydative de la voie des pentoses phosphates

L'augmentation du pouvoir réducteur peut aussi améliorer de manière intéressante le rendement de voies métaboliques déjà existantes. C'est le cas pour la souche bactérienne *Ralstonia eutropha* ATCC 17699 (*Cupriavidus necator*) qui produit naturellement du polyhydroxybutyrate (PHB). Cette bactérie est capable de se développer aussi bien en conditions d'autotrophie que d'hétérotrophie.

La délétion, selon l'invention, du gène *tal* (Transaldolase MF_00492) permet de concentrer le flux métabolique sur la voie oxydative des pentoses phosphates, en augmentant le pool de nucléotides réduits NADPH, permettant ainsi d'augmenter le rendement de production de PHB, mais aussi d'utiliser la voie de la glycolyse.

Cette souche *Cupriavidus necator* (*R. eutropha* H16) possède un mega plasmide pHG1 et deux chromosomes. La délétion du gène *tal* est réalisée en générant un vecteur contenant un gène suicide *SacA* pour les bactéries gram négatives, comme décrit dans Quandt et al. et Lindenkamp et al. (Quandt et al., Gene. 1993 May 15;127(1):15-21 ; Lindenkamp et al., Appl Environ Microbiol. 2010 Aug;76(16):5373-82 ; Lindenkamp et al., Appl Environ Microbiol. 2012 Aug;78(15):5375-83).

Deux amplicons PCR correspondants aux régions adjacentes du gène *tal* sont clonés par restriction selon la procédure décrite dans Lindenkamp et al. (Appl Environ Microbiol. 2012 Aug;78(15):5375-83) dans le plasmide pJQ200mp18Tc. Le plasmide modifié pJQ200mp18Tc::Δ*tal* est alors transformé dans une souche d'E. coli S17-1, par transformation par la méthode du chlorure de calcium. Et le transfert du matériel génétique est fait par conjugaison en déposant sur gélose un point de dépôt de culture de *Ralstonia Eutropha* sur une boîte contenant un tapis cellulaire de bactéries S17-1 et la sélection se fait sur milieu NT (Nutrient growth) à 30°C, en présence de 10% sucrose à titre de sélection (Hogrefe et al., J Bacteriol. 1984 Apr;158(1):43-8.) et validé sur un milieu minéral contenant 25μg/ml tetracycline.

Les délétions sont validées par génotypage et séquençage. La souche EQCN_002 obtenue est donc déléetée pour le gène *tal*. **EQCN_010 : H16 Δ*tal***

b) Inactivation de la voie métabolique d'Entner-Doudoroff

Deux amplicons PCR correspondants aux régions adjacentes des gènes *edd* et *eda* (en amont d'*edd* et en aval d'*eda*) sont clonés par restriction selon la procédure décrite dans Srinivasan et al. (Appl Environ Microbiol. 2002 Dec;68(12):5925-32) dans le plasmide pJQ200mp18Cm.

Le plasmide modifié *pJQ200mp18Cm:: Δ edd-eda* est alors transformé dans une souche d'E. coli S17-1, par transformation par la méthode du chlorure de calcium. Et le transfert du matériel génétique est fait par conjugaison, en déposant sur gélose un point de dépôt de culture de *Ralstonia Eutropha* **EQCN_010** sur une boîte contenant un tapis cellulaire de bactéries S17-1 et la sélection se fait sur milieu NT (Nutrient broth) à 30°C, en présence de 10% sucrose à titre de sélection (Hogrefe et al., J Bacteriol. 1984 Apr;158(1):43-8.) et validé sur un milieu minéral contenant 50µg/ml chloramphenicol.

Les délétions sont validées par génotypage et séquençage. La souche EQCN_003 obtenue est donc déléetée pour le gène *tal*. **EQCN_011 : H16 Δ tal Δ edd-eda**

10 c) Production de PHB en bioréacteur

L'inoculum issu d'un stock congelé est étalé sur milieu solide à raison de 50 à 100 µL issus d'un cryotube mis en incubation à 30°C pendant 48 à 96h, en présence de glucose. L'expression des gènes codant pour la RuBisCO et la PRK sont maintenus chez *C. necator* en conditions aerobies hétérotrophes (Rie Shimizu et al., Sci Rep. 2015; 5: 11617. Published online 2015 Jul 15 1.). Les cultures en mode batch effectuées en erlenmeyers (10 mL dans 50 mL, puis 50 mL dans 250 mL) sont réalisées avec le milieu de culture approprié, en glucose 20 g/L et un apport de CO₂ exogène de 10% en incubateur agité (100-200 RPM, 30°C), avec une inoculation minimale de 0.01 de DO_{620nm}.

La souche d'intérêt EQCN_011 améliorant le rendement de production de PHB est comparée à une souche H16 de référence accumulant naturellement du PHB en conditions hétérotrophes en présence d'une limitation nutritionnelle.

La productivité des souches est comparée en bioréacteurs. Les cultures effectuées en bioréacteurs sontensemencées à partir de chaînes d'amplification solide et/ou liquide en erlenmeyers, dans les conditions décrites précédemment. Les bioréacteurs, de type My-control (Applikon Biotechnology, Delft, Netherlands) de 750 ml ou Biostat B (Sartorius Stedim, Goettingen, Germany) de 2,5 L sontensemencés à une concentration minimale équivalente à 0.01 DO_{620nm}.

L'accumulation de PHB est découplée de la croissance. La culture est régulée à 30°C, l'aération est maintenue entre 0,1 VVM (volume gaz/volume liquide/min) et 1 VVM, afin de maintenir une concentration minimale en oxygène dissous supérieur à 20% (30°C, 1 bar). L'agitation est adaptée en fonction de l'échelle du bioréacteur utilisé. Le débit de gazage en entrée est constitué d'air éventuellement supplémenté en CO₂. La supplémentation en CO₂ est comprise entre 1 et

10%. Le pH est régulé à 7, par ajout d'une solution d'ammoniaque à 14 ou 7 %. Le mode de culture en fed-batch permet un apport en substrat carboné non limitant associé à une limitation en phosphore ou en azote, en conservant un ratio carbone/phosphore ou carbone/azote constant.

- 5 L'extraction et la quantification du PHB sont réalisées selon la méthode de Brandl et al. (Appl Environ Microbiol. 1988 Aug;54(8):1977-82.).

Le protocole consiste à rajouter 1ml de chloroforme à 10 mg de cellules lyophilisées suivi d'un ajout de 850 µl de méthanol et de 150µl d'acide sulfurique. Le mélange est chauffé pendant 2,5 heures à 100°C, refroidi et 500µl d'eau sont rajoutés. Les deux phases sont séparées par centrifugation et la phase organique est séchée par l'ajout de sulfate de sodium.

- 10 Les échantillons sont filtrés et analysés comme décrit par Müller et al. (Appl Environ Microbiol. 2013 Jul;79(14):4433-9). La comparaison des cultures de *C. necator* **sauvage H16** et de la souche **EQCN_011 : H16 $\Delta tal \Delta edd-ed a$** , respectivement, montre une augmentation de 2% du rendement de production de PHB (en gramme de PHB par gramme de glucose consommé) en faveur de la souche modifiée selon l'invention.

REVENDEICATIONS

- 1- Microorganisme génétiquement modifié exprimant une enzyme RuBisCO et une phosphoribulokinase (PRK) fonctionnelles, et dans lequel la branche non-oxydative de la voie des pentoses phosphates est au moins partiellement inhibée, ledit microorganisme étant génétiquement modifié de manière à produire une molécule exogène d'intérêt et/ou à surproduire une molécule endogène d'intérêt.
- 2- Microorganisme génétiquement modifié selon la revendication 1, ledit microorganisme étant génétiquement modifié pour exprimer une enzyme RuBisCO et/ou une PRK recombinantes.
- 3- Microorganisme génétiquement modifié selon la revendication 1 ou 2, ledit microorganisme étant génétiquement modifié de manière à inhiber la branche non-oxydative de la voie des pentoses phosphates est inhibée en aval de la production de ribulose-5-phosphate.
- 4- Microorganisme génétiquement modifié selon l'une des revendications précédentes, dans lequel l'expression du gène codant une transaldolase (E.C.2.2.1.2) et/ou une transketolase (E.C.2.2.1.1), est au moins partiellement inhibée.
- 5- Microorganisme génétiquement modifié selon l'une des revendications précédentes, dans lequel la molécule exogène et/ou la molécule endogène est choisie parmi les acides aminés, les peptides, les protéines, les vitamines, les stérols, les flavonoïdes, les terpènes, les terpénoïdes, les acides gras, les polyols et les acides organiques.
- 6- Microorganisme génétiquement modifié selon l'une des revendications précédentes, ledit microorganisme étant une cellule eucaryote, préférentiellement choisie parmi les levures, les champignons, les microalgues, ou une cellule procaryote, préférentiellement une bactérie.
- 7- Microorganisme génétiquement modifié selon l'une des revendications précédentes, ledit microorganisme étant une levure du genre *Saccharomyces cerevisiae* génétiquement modifiée pour exprimer une RuBisCO de type I ou II et une phosphoribulokinase (PRK) fonctionnelles, et dans laquelle l'expression des gènes TAL1 et/ou NQM1 est au moins partiellement inhibée.
- 8- Utilisation d'un microorganisme génétiquement modifié selon l'une des revendications précédentes, pour la production ou la surproduction d'une molécule d'intérêt, préférentiellement choisie parmi les acides aminés, les peptides, les protéines, les vitamines, les stérols, les flavonoïdes, les terpènes, les terpénoïdes, les acides gras, les polyols et les acides organiques.

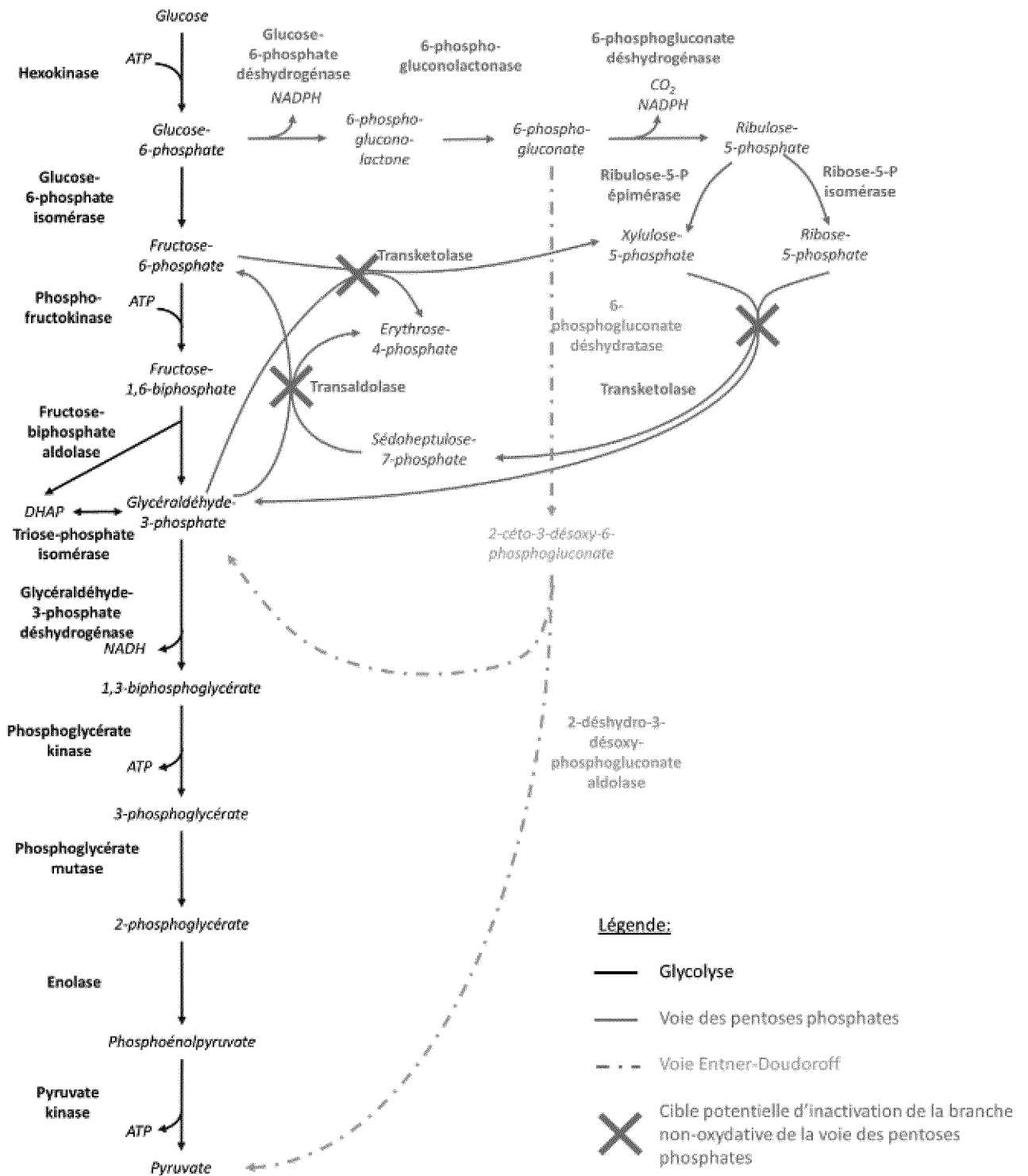
9- Procédé biotechnologique pour produire au moins une molécule d'intérêt, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de mise en culture d'un microorganisme génétiquement modifié selon l'une des revendications 1 à 8, dans des conditions permettant la synthèse ou la bioconversion, par ledit microorganisme, de ladite molécule d'intérêt, et de manière optionnelle une étape de récupération et/ou purification de ladite molécule d'intérêt.

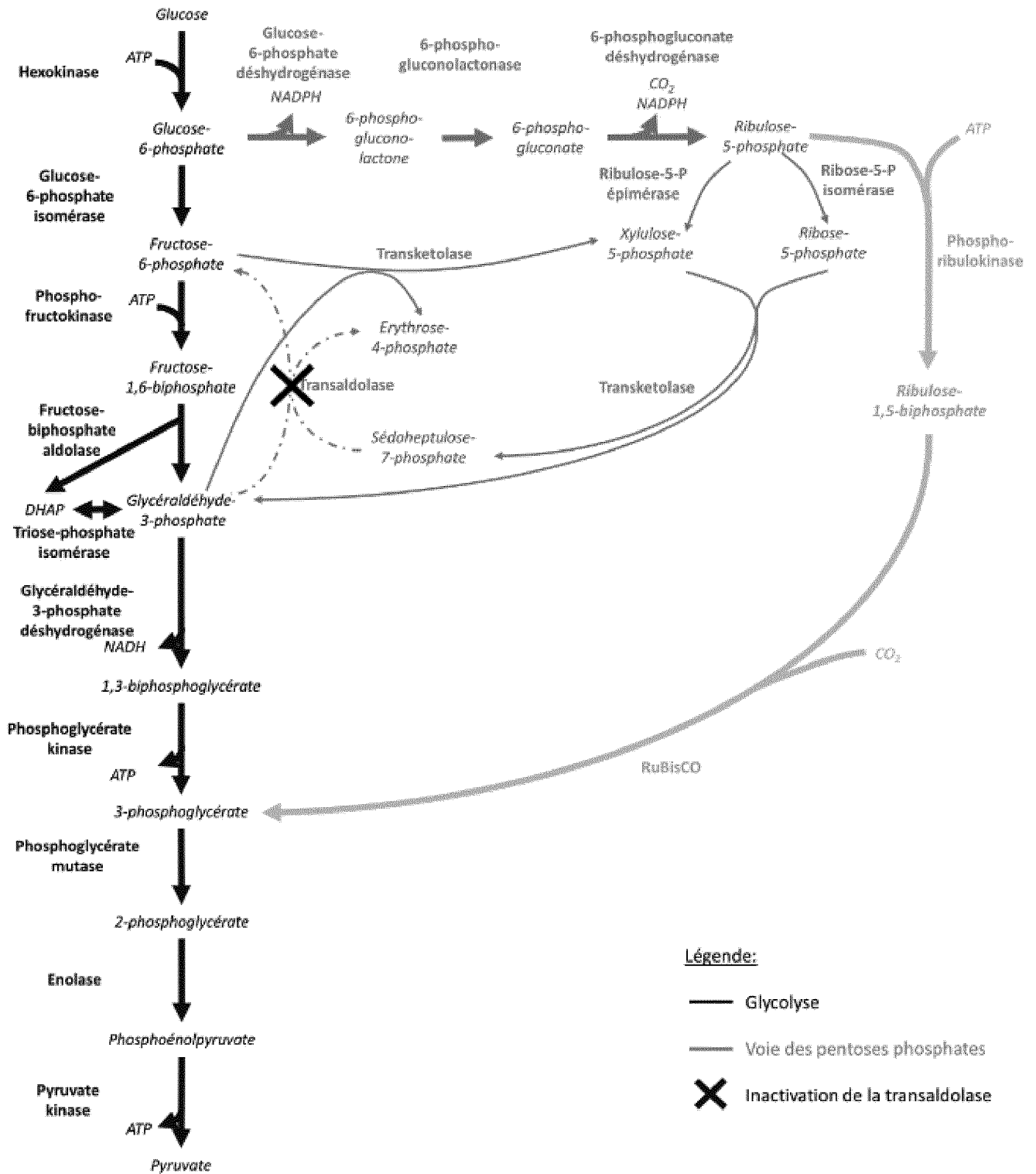
10- Procédé biotechnologique selon la revendication 9, selon lequel le microorganisme est génétiquement modifié pour exprimer au moins une enzyme impliquée dans la bioconversion ou la synthèse de ladite molécule d'intérêt.

11- Procédé biotechnologique selon la revendication 9 ou 10, selon lequel le microorganisme est génétiquement modifié pour inhiber au moins partiellement une enzyme impliquée dans la dégradation de ladite molécule d'intérêt.

12- Procédé de production d'une molécule d'intérêt comprenant (i) l'insertion d'au moins une séquence codant une enzyme impliquée dans la synthèse ou la bioconversion de ladite molécule d'intérêt dans un microorganisme recombinant selon l'une des revendications 1 à 8, (ii) la culture dudit microorganisme dans des conditions permettant l'expression de ladite enzyme et de manière optionnelle (iii) la récupération et/ou purification de ladite molécule d'intérêt.

13- Procédé de production d'une molécule d'intérêt comprenant (i) l'inhibition de l'expression d'au moins un gène codant une enzyme impliquée dans la dégradation de ladite molécule d'intérêt dans un microorganisme recombinant selon l'une des revendications 1 à 8, (ii) la culture dudit microorganisme dans des conditions permettant l'expression de ladite enzyme et de manière optionnelle (iii) la récupération et/ou purification de ladite molécule d'intérêt.





SEQUENCE LISTING

<110> ENOBRAQ

<120> Microorganisme génétiquement optimisé pour la production de molécules d'intérêt

<130> B2423

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 72

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> oligonucleotide Sdtal1

<400> 1

acgatagtaa aatactctc gaactcgtca catatacgtg tacataatgg gtaaggaaaa 60

gactcacgtt tc 72

<210> 2

<211> 87

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide Rdtal1

<400> 2

atcaaaagaa acgtgcataa ggacatggcc taaattaata ttccgagat acttccttag 60

aaaaactcat cgagcatcaa atgaaac 87

<210> 3

<211> 82

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide Sdnqm1

<400> 3

ttgctagcgt aagtcataaa aaataggaaa taatcacata tatacaagaa attaaatatg 60

ggtaaaaagc ctgaactcac cg 82

<210> 4

<211> 72

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Oligonucleotide Rdnqm1

<400> 4

agtggatat atatattat atatataagt aggtacctct actcttaatg attattcctt 60

tgccctcgga cg 72

<210> 5

<211> 12

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> séquence RBS

<400> 5

aggaggtttg ga 12

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> séquence RBS

<400> 6

aacaaaatga ggaggtactg ag 22

<210> 7

<211> 16

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> séquence RBS

<400> 7
aagttaagag gcaaga 16

<210> 8
<211> 14
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> séquence RBS

<400> 8
ttcgagggg gaag 14

<210> 9
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> séquence RBS

<400> 9
taagcaggac cggcggcg 18

<210> 10
<211> 12
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> séquence RBS

<400> 10
caccatacac tg 12

RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

L'I.N.P.I. annexe à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention, au sens des articles L. 611-11 (nouveau) et L. 611-14 (activité inventive) du code de la propriété intellectuelle. Ce rapport porte sur les revendications du brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

CONDITIONS D'ETABLISSEMENT DU PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

☒ Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.

☐ Le demandeur a maintenu les revendications.

☒ Le demandeur a modifié les revendications.

☐ Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.

☐ Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.

☐ Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

DOCUMENTS CITES DANS LE PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

☒ Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.

☒ Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.

☐ Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.

☐ Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

1. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION

YA-HAN LI ET AL: "The coupling of glycolysis and the Rubisco-based pathway through the non-oxidative pentose phosphate pathway to achieve low carbon dioxide emission fermentation", BIORESOURCE TECHNOLOGY., vol. 187, 1 juillet 2015 (2015-07-01), pages 189-197, XP55409282, GB ISSN: 0960-8524, DOI: 10.1016/j.biortech.2015.03.090

PENG-FEI XIA ET AL: "Recycling Carbon Dioxide during Xylose Fermentation by Engineered *Saccharomyces cerevisiae*", ACS SYNTHETIC BIOLOGY, vol. 6, no. 2, 31 octobre 2016 (2016-10-31), pages 276-283, XP055405751, Washington, DC, USA ISSN: 2161-5063, DOI: 10.1021/acssynbio.6b00167

HAYDAR KARAKAYA ET AL: "Mutagenesis of the tal gene-encoding Transaldolase in the Cyanobacterium, *Anabaena* sp. PCC7120", TURK J BIOL, vol. 32, 1 janvier 2008 (2008-01-01), pages 135-141, XP055411721,

OSANAI TAKASHI ET AL: "Positive regulation of sugar catabolic pathways in the cyanobacterium *Synechocystis* sp PCC 6803 by the group 2 sigma factor sigE", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, US, vol. 280, no. 35, 2 septembre 2005 (2005-09-02), pages 30653-30659, XP002484760, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/JBC.M505043200

BENJAMIN E. RUBIN ET AL: "The essential gene set of a photosynthetic organism", PROCEEDINGS NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES PNAS, vol. 112, no. 48, 27 octobre 2015 (2015-10-27), pages E6634-E6643, XP055411990, US ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1519220112

2. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE GENERAL

XI CHEN ET AL: "The Entner-Doudoroff pathway is an overlooked glycolytic route in cyanobacteria and plants", PROCEEDINGS NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES PNAS, vol. 113, no. 19, 25 avril 2016 (2016-04-25), pages 5441-5446, XP055407296, US ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1521916113

VÍCTOR GUADALUPE-MEDINA ET AL: "Carbon dioxide fixation by Calvin-Cycle enzymes improves ethanol yield in yeast", BIOTECHNOLOGY FOR BIOFUELS, vol. 6, no. 1, 1 janvier 2013 (2013-01-01), page 125, XP055405759, GB ISSN: 1754-6834, DOI: 10.1186/1754-6834-6-125

WO 2015/107496 A1 (AGRONOMIQUE INST NAT RECH [FR]; INST NAT SCIENCES APPLIQU [FR]; CENTRE) 23 juillet 2015 (2015-07-23)

OLIVER JOHN W K ET AL: "A carbon sink pathway increases carbon productivity in cyanobacteria", METABOLIC ENGINEERING, ACADEMIC PRESS, US, vol. 29, 14 mars 2015 (2015-03-14), pages 106-112, XP029590695, ISSN: 1096-7176, DOI: 10.1016/J.YMBEN.2015.03.006

WEI XIONG ET AL: "Phosphoketolase pathway contributes to carbon metabolism in cyanobacteria", NATURE PLANTS, vol. 2, no. 1, 7 décembre 2015 (2015-12-07), page 15187, XP055409715, ISSN: 2055-026X, DOI: 10.1038/nplants.2015.187

3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND DE LA VALIDITE DES PRIORITES

NEANT