



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

(13) **A1**

(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2018/06/29  
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2019/01/03  
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2019/12/27  
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 2018/051619  
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2019/002799  
(30) Priorité/Priority: 2017/06/30 (FR1756106)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *C12N 15/63* (2006.01),  
*C12P 7/22* (2006.01)  
(71) Demandeur/Applicant:  
COMPAGNIE GENERALE DES ETABLISSEMENTS  
MICHELIN, FR  
(72) Inventeurs/Inventors:  
LAFQUIERE, VINCENT, FR;  
RAMAEN, ODILE, FR;  
LOUIS, DOMINIQUE, FR  
(74) Agent: ROBIC

(54) Titre : UTILISATION DES POLYKETIDE SYNTHASES DE TYPE III DE BACTERIES COMME PHLOROGLUCINOL SYNTHASES

(54) Title: USE OF TYPE III POLYKETIDE SYNTHASES FROM BACTERIA AS PHLOROGLUCINOL SYNTHASES

(57) **Abrégé/Abstract:**

La présente invention concerne l'utilisation des polykétide synthases de type III de bactéries, telles que des bactéries actinomycètes, comme phloroglucinol synthases. La présente invention concerne également les molécules d'acides nucléiques isolées codant ces polykétide synthases de type III, ainsi que les vecteurs et les cellules hôtes comprenant de telles molécules d'acides nucléiques. La présente invention concerne en outre des méthodes de production du phloroglucinol.

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

(19) Organisation Mondiale de la  
Propriété Intellectuelle  
Bureau international(10) Numéro de publication internationale  
**WO 2019/002799 A1**(43) Date de la publication internationale  
03 janvier 2019 (03.01.2019)

WIPO | PCT

(51) Classification internationale des brevets :  
C12N 15/63 (2006.01) C12P 7/22 (2006.01)MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI  
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,  
MR, NE, SN, TD, TG).(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR2018/051619(22) Date de dépôt international :  
29 juin 2018 (29.06.2018)**Publiée:**

- avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))
- avec la partie de la description réservée au listage des séquences (règle 5.2(a))

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
1756106 30 juin 2017 (30.06.2017) FR(71) Déposant : COMPAGNIE GENERALE DES ÉTA-  
BLISSEMENTS MICHELIN [FR/FR] ; 23 place des  
Carnes-Déchaux, 63000 Clermont-Ferrand (FR).(72) Inventeurs : LAFAQUIERE, Vincent ; MANU-  
FACTURE FRANCAISE DES PNEUMATIQUES MI-  
CHELIN, CBS/CORP/J/PI - F35 - Ladoux, 63040 CLER-  
MONT FERRAND CEDEX 9 (FR). RAMAEN, Odile ; 32  
chemin de l'Orme Aigu, 78660 Ablis (FR). LOUIS, Domi-  
nique ; 22, rue Saint Jean - Le Chardonnet, 91470 Forges  
Les Bains (FR).(74) Mandataire : REGIMBEAU ; 20, rue de Chazelles, 75847  
PARIS CEDEX 17 (FR).(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de  
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO,  
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA,  
CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ,  
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR,  
HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR,  
KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG,  
MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM,  
PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC,  
SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,  
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de  
protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM,  
KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG,  
ZM, ZW), eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM),  
européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES,  
FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK,

(54) Title: USE OF TYPE III POLYKETIDE SYNTHASES FROM BACTERIA AS PHLOROGLUCINOL SYNTHASES

(54) Titre : UTILISATION DES POLYKÉTIDE SYNTHASES DE TYPE III DE BACTÉRIES COMME PHLOROGLUCINOL SYNTHASES

(57) Abstract: The invention relates to the use of type III polyketide synthases from bacteria, such as actinomycete bacteria, as phloroglucinol synthases. The invention also relates to isolated nucleic acid molecules which encode the aforementioned type III polyketide synthases, as well as the vectors and host cells that comprise such nucleic acid molecules. The present invention also relates to methods for producing phloroglucinol.

(57) Abrégé : La présente invention concerne l'utilisation des polykétide synthases de type III de bactéries, telles que des bactéries actinomycètes, comme phloroglucinol synthases. La présente invention concerne également les molécules d'acides nucléiques isolées codant ces polykétide synthases de type III, ainsi que les vecteurs et les cellules hôtes comprenant de telles molécules d'acides nucléiques. La présente invention concerne en outre des méthodes de production du phloroglucinol.



WO 2019/002799 A1

Utilisation des polykétide synthases de type III de bactéries comme phloroglucinol synthases

## DOMAINE DE L'INVENTION

5

La présente invention se situe dans les domaines de la biochimie microbienne et plus particulièrement dans le domaine de la synthèse par des enzymes microbiennes du phloroglucinol. Elle concerne l'utilisation des polykétide synthases de type III de bactéries, notamment de bactéries actinomycètes, comme phloroglucinol synthases.

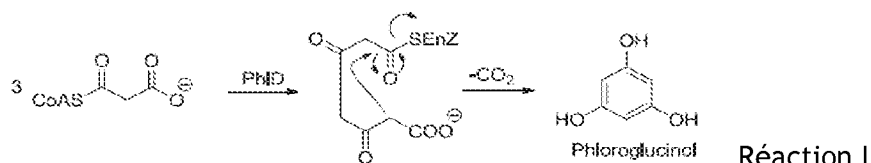
10

## ART ANTERIEUR

Le phloroglucinol est un composé organique aromatique utilisé notamment dans la fabrication de produits pharmaceutiques et d'explosifs.

15

La synthèse de phloroglucinol est catalysée par des polykétide synthases de type III appelées phloroglucinol synthases. Les phloroglucinol synthases réalisent la condensation de trois molécules de malonyl-CoA pour former une molécule de phloroglucinol selon le schéma réactionnel suivant (Réaction I):



20

De nombreux oligomères peuvent ensuite être synthétisés à partir du phloroglucinol, tels que les phlorotannins. Les phlorotannins incluent notamment les fucols, les phloretols et les fucophloretols, qui sont des produits dérivés du phloroglucinol composant la paroi des algues brunes. En outre, diverses activités protectrices des algues brunes ont également été attribuées aux phlorotannins.

25

A ce jour, la synthèse du phloroglucinol a été décrite uniquement chez les bactéries Gram-*Pseudomonas fluorescens* (Achkar et al., 2005 ; Zha et al., 2006) et chez l'algue brune *Ectocarpus siliculosus* (Meslet-Cladière et al., 2013). L'enzyme phloroglucinol synthase impliquée dans la synthèse du phloroglucinol a été identifiée chez ces deux espèces. Ce sont les deux seules phloroglucinol synthases identifiées et caractérisées à ce jour.

30

Chez *Pseudomonas fluorescens*, la phloroglucinol synthase est codée par le gène PHLD (Achkar et al., 2005 ; Zha et al., 2006).

35

Chez *Ectocarpus siliculosus*, la phloroglucinol synthase est codée par le gène **PKS1** (Meslet-Cladière et al., 2013).

L'activité de phloroglucinol synthase de **PHLD** a pu être démontrée chez *Escherichia coli* exprimant un gène **PHLD** hétérologue (Achkar et al., 2005). Cette activité a été confirmée *in vitro*, par des tests enzymatiques à petite échelle réalisés avec une **PHLD** recombinante exprimée et purifiée à partir de cultures d'*Escherichia coli* (Zha et al., 2006).

L'activité de phloroglucinol synthase de **PKS1** a été démontrée *in vitro*, à partir de **PKS1** recombinante exprimée et purifiée chez *Escherichia coli* et à partir d'extraits cellulaires d'*E. siliculosus* (Meslet-Cladière et al., 2013, WO 2013/045510).

Toutefois, les enzymes **PHLD** et **PKS1** présentent des activités enzymatiques faibles. En outre, la possibilité de synthétiser le phloroglucinol *in vitro* à grande échelle en utilisant ces enzymes n'a jamais été prouvée. Enfin, les phloroglucinol synthases utilisées dans ces travaux ont été produites par des bactéries *E. coli* ou *P. fluorescens*. L'activité de ces enzymes lorsqu'elles sont produites par des eucaryotes, tels que des levures ou des cellules d'insectes ou de mammifères, n'est ainsi pas connue. Or, les systèmes eucaryotes peuvent être avantageux, notamment pour des productions à grande échelle. Ils permettent en effet l'obtention d'enzymes pouvant être modifiées au niveau post-traductionnel.

Ainsi, il existe toujours le besoin d'identifier de nouvelles phloroglucinol synthases présentant une activité enzymatique *in vitro* ou *in vivo* élevée de synthèse de phloroglucinol, adaptées pour une production à l'échelle industrielle et pouvant être produites par des systèmes eucaryotes.

La caractérisation fonctionnelle exacte d'une polykétide synthase est cependant compliquée par le fait que cette classe d'enzymes rassemble des protéines présentant de grandes similarités de séquences alors qu'elles peuvent catalyser des réactions sensiblement dissemblables et reconnaître des substrats tout à fait différents.

Malgré ces difficultés, les présents Inventeurs ont pu identifier des polypeptides présents chez les bactéries ayant une activité phloroglucinol synthase. Ainsi, de nouvelles phloroglucinol synthases ont notamment été identifiées chez des bactéries Gram+. Elles constituent le premier exemple de phloroglucinol synthases chez ce type de bactéries. Les Inventeurs démontrent ici que ces nouvelles phloroglucinol synthases présentent une activité de synthèse de phloroglucinol élevée. Elles sont donc adaptées à la production à l'échelle industrielle. De plus, elles sont fonctionnelles lorsqu'elles sont produites en système eucaryote.

## RESUME DE L'INVENTION

Dans le cadre de la présente invention, les Inventeurs ont mis en évidence, de manière tout à fait surprenante, que des bactéries, outre *Pseudomonas fluorescens*, contiennent dans leur  
5 génome un gène codant une polykétide synthase de type III ayant une activité de phloroglucinol synthase fonctionnelle.

La présente invention concerne donc des polypeptides choisis parmi les polykétide synthases de type III de bactéries, notamment les polykétide synthases de type III de bactéries gram+,  
10 notamment les polykétide synthases de type III de bactéries actinomycètes, utiles comme phloroglucinol synthases.

La présente invention concerne également des molécules d'acides nucléiques isolées codant pour des phloroglucinol synthases de bactéries, notamment pour des phloroglucinol synthases  
15 de bactéries gram+, notamment pour des polykétide synthases de type III de bactéries actinomycètes, ainsi que les phloroglucinol synthases ainsi codées.

L'invention concerne en outre des vecteurs comprenant au moins une molécule d'acides nucléiques isolée codant pour une telle phloroglucinol synthase.  
20

L'invention concerne également des cellules hôtes comprenant au moins une molécule d'acides nucléiques isolée ou au moins un vecteur selon l'invention.

L'invention concerne également des méthodes pour produire une phloroglucinol synthase  
25 fonctionnelle.

L'invention concerne également des méthodes pour produire du phloroglucinol.

## DESCRIPTION DES FIGURES

30 La **Figure 1** présente l'alignement des séquences protéiques des enzymes candidates identifiées. L'alignement des dix enzymes sélectionnées avec l'enzyme PKS1.Es (PHLD.Es) a été réalisé en employant le logiciel Clustal W.

35 La **Figure 2** présente un exemple de séparation du phloroglucinol / résorcinol sur colonne propyl-pentafluorophenyl (PFP).

La **Figure 3** montre un exemple de la structure d'une unité génique construite pour un candidat donné (PHLD.ii), permettant d'exprimer les gènes PHLD chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

- 5 La **Figure 4** montre les niveaux de production de phloroglucinol dans les souches de levure exprimant les différents gènes candidats PHLD.ii et les gènes contrôles PHLD.Pf et PKS1.Es (plusieurs copies) sous le contrôle du promoteur ADH2, après 48 heures de culture en plaque 24 puits en présence de 20 g.L<sup>-1</sup> d'éthanol comme source de carbone à 30°C. (A) Récapitulatif des différentes données mesurées. (B) Densités optiques (DO) des différentes cultures mesurées  
10 à 600 nm (DO<sub>600</sub>), indiquant le niveau de croissance de chaque souche. (C) Niveau de production de phloroglucinol (en mg.L<sup>-1</sup>) mesuré dans le milieu de culture. (D) Niveau de production de phloroglucinol (en mg.L<sup>-1</sup>) normalisé par rapport au nombre de copies de gènes intégrées dans le génome.
- 15 La **Figure 5** montre la structure des constructions géniques intégrées dans le génome de la levure au locus JLP1. Le gène codant pour chaque PHLD/PKS1 est sous contrôle du promoteur pADH2 ou du promoteur pCCW12.

- La **Figure 6** montre les niveaux de production de phloroglucinol dans les souches de levure  
20 exprimant les différents gènes PHLD.ii (1 seule copie) sous le contrôle du promoteur ADH2 après 48 heures de culture en plaque 24 puits en présence de 20 g.L<sup>-1</sup> d'éthanol comme source de carbone à 30°C. (A) Récapitulatif des différentes données mesurées. (B) Densités optiques (DO) des différentes cultures mesurées à 600 nm (DO<sub>600</sub>), indiquant le niveau de croissance de chaque souche. (C) Niveau de production de phloroglucinol (en mg.L<sup>-1</sup>) mesuré dans le milieu de  
25 culture.

- La **Figure 7** montre les niveaux de production de phloroglucinol dans les souches de levure exprimant les différents gènes PHLD (1 seule copie) sous le contrôle du promoteur CCW12 après  
30 48 heures de culture en plaque 24 puits en présence de 20 g.L<sup>-1</sup> de glucose comme source de carbone à 30°C. (A) Récapitulatif des différentes données mesurées. (B) Densités optiques (DO) des différentes cultures mesurées à 600 nm (DO<sub>600</sub>), indiquant le niveau de croissance de chaque souche. (C) Niveau de production de phloroglucinol (en mg.L<sup>-1</sup>) mesuré dans le milieu de culture.

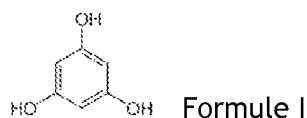
## DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

## Définitions

5 Par « **polykétide synthase de type III** », on entend une enzyme multifonctionnelle ou un complexe enzymatique produisant des polykétides et qui n'utilise pas de domaine de protéine porteuse d'acyle (ou ACP, pour « acyl carrier protein »).

10 Par « **polykétide** », on entend une grande famille de métabolites secondaires chez les bactéries, les mycètes, les plantes et certaines lignées d'animaux qui proviennent de la condensation itérative de sous-unités acétyle ou malonyle par des enzymes polykétide-synthases. Les polykétides servent également de matières premières pour la fabrication d'un éventail large de produits naturels et semi-synthétiques.

15 Par « **phloroglucinol** », on entend un composé organique aromatique **benzène-1,3,5-triol** présentant la formule chimique suivante (Formule I) :



20 Par « **phloroglucinol synthase** », on entend une enzyme multifonctionnelle ou un complexe enzymatique appartenant à la famille des **polykétide synthases de type III** et catalysant la synthèse du phloroglucinol. Une phloroglucinol synthase catalyse la condensation de trois molécules de malonyl-CoA pour former une molécule de phloroglucinol.

25 Par « **activité enzymatique** » ou « **activité catalytique** » ou encore « **activité** » d'une enzyme, on entend l'efficacité d'une enzyme à convertir un substrat en produit dans un environnement donné. L'efficacité de l'enzyme prend en compte ici la vitesse de conversion du substrat en produit par l'enzyme et le taux de conversion du substrat en produit par l'enzyme. Par « **taux de conversion du substrat en produit par l'enzyme** » on entend ici le ratio entre la quantité  
30 de produit final obtenu par rapport à la quantité initiale de substrat pour une quantité définie d'enzyme. Par exemple, une activité enzymatique au sens de l'invention peut être exprimée en quantité de phloroglucinol produit dans un volume donné (en g/L).

35 Par « **bactérie** », on entend un organisme microscopique et procaryote présent dans tous les milieux.

Par « **bactérie Gram+** » ou « **bactérie Gram-positive** », on entend une bactérie positive à la coloration de Gram (c'est-à-dire qui retient le violet de gentiane, appelé aussi le cristal violet, et reste colorée en mauve-violet ou bleu-pourpre foncé).

5 Par « **bactérie actinomycète** » ou « **bactérie actinomycète Gram+** » ou « **bactérie actinomycète Gram-positive** », on entend une bactérie appartenant à l'ordre des *Actinomycetales* au sein de la classe des actinobactéries, positive à la coloration de Gram. Les actinomycètes sont des bactéries dont la croissance donne lieu à des colonies constituées d'hyphes, c'est-à-dire de filaments qui irradiant, par croissance centrifuge, tout autour du  
10 germe qui leur a donné naissance.

Par « ***Tsukamurella sp.*** », on entend une bactérie actinomycète asporulée, en forme de bâtonnet et aérobic obligatoire, du genre *Tsukamurella*. Le genre *Tsukamurella* comprend notamment les espèces *Tsukamurella paurometabola* (appelée aussi Tp ci-après), *Tsukamurella*  
15 *tyrosinosolvans* (appelée aussi Tt ci-après), *Tsukamurella pseudospumae* (appelée aussi Tps ci-après), *Tsukamurella pulmonis* (appelée aussi Tpu ci-après) et *Tsukamurella sp.* 1534 (appelée aussi Tsp ci-après).

Par « ***Nocardia sp.*** », on entend une bactérie actinomycète filamenteuse, du genre *Nocardia*.  
20 Le genre *Nocardia* comprend notamment l'espèce *Nocardia farcinica* (appelée aussi Nf ci-après).

Par « ***Mycobacterium sp.*** », on entend une bactérie actinomycète asporulée et aérobic, en forme de bacilles, du genre *Mycobacterium*. Le genre *Mycobacterium* comprend notamment les  
25 espèces *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium kansasii* et *Mycobacterium tuberculosis* (appelées aussi, respectivement, Mma, Mk et Mt ci-après).

Par « ***Gordonia sp.*** », on entend une bactérie actinomycète, du genre *Gordonia*. Le genre  
30 *Gordonia* comprend notamment l'espèce *Gordonia hydrophobica* (appelée aussi Gh ci-après).

Par « ***Pseudomonas sp.*** », on entend une bactérie Gram négative (Gram-) ne formant pas de spores (ou asporulées), en forme de bacille et aérobic obligatoire, du genre *Pseudomonas*. Le genre *Pseudomonas* comprend notamment l'espèce *Pseudomonas fluorescens* (appelée aussi Pf  
35 ci-après).

Par « ***Ectocarpus sp.*** » on entend une algue du genre *Ectocarpus*, de la classe des algues brunes, appartenant à la famille des *Ectocarpaceae*. Le genre *Ectocarpus* comprend notamment l'espèce *Ectocarpus siliculosus*.

Par « **PHLD.Pf** », on entend indifféremment le gène codant pour la phloroglucinol synthase PHLD de *P. fluorescens*, ou le polypeptide codé par ce gène.

- 5 Par « **PKS1.Es** » ou « **PHLD.Es** », on entend indifféremment le gène codant pour la phloroglucinol synthase PKS1 d'*E. siliculosus*, ou le polypeptide codé par ce gène.

« **PhID** » ou « **PHLD** » désigne ici un gène candidat codant pour une enzyme phloroglucinol synthase candidate, ou le polypeptide codé par ce gène. Selon la nomenclature choisie par les  
10 Inventeurs, « **PhID.ii** » ou « **PHLD.ii** » désigne ici le gène candidat ou le polypeptide candidat issu d'un organisme donné. Les lettres « ii » représentent le genre et l'espèce auxquels ledit organisme appartient.

Par « **molécule d'acides nucléiques** », on entend un polymère de n'importe quelle longueur  
15 d'acide désoxyribonucléique (ADN), ou polydésoxyribonucléotides, incluant notamment les ADN complémentaires ou ADNc, les ADN génomiques, les plasmides, les vecteurs, les génomes viraux, l'ADN isolé, les sondes, les amorces et tout mélange de ceux-ci ; ou un polymère de n'importe quelle longueur d'acide ribonucléique (ARN), ou polyribonucléotides, incluant notamment les ARN messagers ou ARNm, ARN antisens ; ou des polyribo-  
20 polydésoxyribonucléotides mélangés. Ils englobent des polynucléotides simples ou à double brins, linéaires ou circulaires, naturels ou synthétiques. En outre, un polynucléotide peut comprendre des nucléotides non naturels et peut être interrompu par des composants non nucléotidiques.

Dans le cadre de la présente invention, les termes "acide nucléique", "molécule d'acides  
25 nucléiques", "polynucléotide" et "séquence nucléotidique" sont utilisés de manière interchangeable.

Par « **molécule isolée** », on entend une molécule, notamment une protéine, un polypeptide, un peptide, une molécule d'acides nucléiques, un vecteur plasmidique, un vecteur viral ou une  
30 cellule hôte, qui est extrait de son environnement naturel (c'est-à-dire séparé d'au moins un autre composant auquel il est naturellement associé).

Par « **polypeptide** », « **protéine** » et « **peptide** », on entend des polymères de résidus d'acides aminés qui comprennent au moins neuf acides aminés liés par des liaisons peptidiques. Le  
35 polymère peut être linéaire, ramifié ou cyclique. Le polymère peut comprendre des acides aminés naturels et/ou analogues d'acides aminés et il peut être interrompu par des résidus non-acides aminés. Comme indication générale et sans y être cependant lié dans la présente demande, si le polymère d'acides aminés contient plus de 50 résidus d'acides aminés, il est de

préférence appelé un polypeptide ou une protéine, alors que si le polymère est constitué de 50 acides aminés ou moins, il est de préférence appelé "peptide".

5 Par « **vecteur** », on entend un véhicule, de préférence une molécule d'acide nucléique ou une particule virale, qui contient les éléments nécessaires pour permettre l'administration, la propagation et/ou l'expression d'une ou plusieurs molécule(s) d'acides nucléiques dans une cellule hôte ou un organisme.

10 D'un point de vue fonctionnel, ce terme englobe des vecteurs pour la maintenance (vecteurs de clonage), des vecteurs pour l'expression dans diverses cellules ou organismes hôtes (vecteurs d'expression), des vecteurs extrachromosomiques (par exemple des plasmides multicopie) ou des vecteurs d'intégration (par exemple conçus pour s'intégrer dans le génome d'une cellule hôte et produire des copies supplémentaires de la molécule d'acides nucléiques qu'il contient lorsque la cellule hôte se réplique). Ce terme englobe également des vecteurs navettes (par  
15 exemple, fonctionnant à la fois dans des hôtes procaryotes et/ou eucaryotes) et des vecteurs de transfert (par exemple pour le transfert de molécule(s) d'acides nucléiques dans le génome d'une cellule hôte).

20 D'un point de vue structurel, les vecteurs selon l'invention peuvent être des sources génétiques naturelles, synthétiques ou artificielles, ou une combinaison d'éléments génétiques naturels et artificiels.

Ainsi, dans le contexte de l'invention, le terme "vecteur" doit être compris de manière large en incluant des vecteurs plasmidiques (ou plasmides) et viraux.

25 Un "**plasmide**" tel qu'utilisé ici désigne une construction d'ADN répliquable. Habituellement, les vecteurs plasmidiques contiennent des gènes marqueurs de sélection qui permettent aux cellules hôtes portant le plasmide d'être identifiées et/ou sélectionnées de manière positive ou négative en présence du composé correspondant au marqueur de sélection. Une variété de  
30 gènes marqueurs de sélection positifs et négatifs sont connus dans la technique. À titre d'illustration, un gène de résistance aux antibiotiques peut être utilisé comme un gène marqueur de sélection positif permettant de sélectionner une cellule hôte en présence de l'antibiotique correspondant.

35 Le terme "**vecteur viral**" tel qu'utilisé ici se réfère à un vecteur d'acide nucléique qui comprend au moins un élément d'un génome du virus et peut être conditionné dans une particule virale ou une particule virale. Les vecteurs viraux peuvent être compétents pour la réplication ou sélectifs (par exemple, conçus pour se répliquer mieux ou sélectivement dans des cellules hôtes

spécifiques), ou peuvent être génétiquement désactivés de manière à être défectueux ou déficients pour la réplication.

5 Par « **cellule hôte** », on entend une cellule contenant une molécule d'acides nucléiques selon l'invention. Avantageusement, la cellule hôte est capable d'exprimer un polypeptide à activité de phloroglucinol synthase et/ou de produire le vecteur de l'invention. Avantageusement encore, la cellule hôte est capable de synthétiser du phloroglucinol.

10 La cellule hôte peut être constituée d'un type unique de cellules ou d'un groupe de différents types de cellules. La cellule hôte peut également être une cellule hybride, c'est-à-dire résultant de la fusion d'au moins deux cellules de types différents.

15 La cellule hôte peut appartenir à des lignées cellulaires cultivées, à des cellules primaires, à des cellules souches ou à des cellules prolifératives. Dans le cadre de l'invention, le terme "cellules hôtes" comprend des cellules procaryotes, des cellules eucaryotes inférieures telles que des cellules de levures, et d'autres cellules eucaryotes telles que des cellules d'insectes, des plantes et des cellules de mammifères (par exemple humaines ou non humaines, de préférence non humaines).

20 Le terme « cellule hôte » comprend plus largement des cellules qui contiennent ou ont contenu la molécule d'acides nucléiques selon l'invention, ainsi que la descendance de telles cellules. La cellule hôte peut par exemple être isolée ou organisée en tissu, en organe ou encore être au sein d'un organisme complet. Dans le cas où la cellule hôte est au sein d'un organisme complet, ledit organisme n'est pas humain.

25 Il est ainsi clair qu'une « cellule hôte » selon la présente invention est une cellule hôte recombinante, i.e., une cellule hébergeant un matériel génétique exogène. Ainsi, une cellule hôte n'est pas une cellule qui existe à l'état naturel mais est un outil de biologie moléculaire obtenu par les techniques de manipulations génétiques.

30 Par « **identité** », on entend une correspondance exacte de séquence entre deux polypeptides ou deux molécules d'acides aminés. Le « **pourcentage d'identité** » entre deux séquences est fonction du nombre de résidus identiques communs aux deux séquences, et prend en compte le nombre d'intervalles qui doivent être introduits pour un alignement optimal et la longueur de chaque intervalle. Divers programmes informatiques et algorithmes mathématiques sont disponibles dans l'état de l'art pour déterminer le pourcentage d'identité entre les séquences d'acides aminés, comme par exemple le programme Blast disponible sur la base NCBI ou ALIGN (Atlas of Protein Sequence and Structure, Dayhoff (ed.), 1981, Suppl. 3 482-489). Des

programmes pour déterminer l'homologie entre les séquences nucléotidiques sont également disponibles dans une base de données spécialisée (par exemple Genbank, le Wisconsin Sequence Analysis Package, les programmes BESTFIT, FASTA et GAP). À titre illustratif, "au moins 80% d'identité de séquence", tel qu'utilisé ici, représente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 5 88%, 89%, 90%, 91 %, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100%.

Dans la description détaillée qui suit, les modes de réalisation pourront être pris seuls ou combinés de manière appropriée par l'homme du métier.

## 10 Polypeptides isolés et leur utilisation comme phloroglucinol synthases

On s'intéresse ici aux polypeptides isolés choisis parmi les polykétide synthases de type III de bactéries, notamment parmi les polykétide synthases de type III de bactéries gram+, notamment parmi les polykétide synthases de type III de bactéries actinomycètes.

15 En effet, les Inventeurs ont identifié, de manière tout à fait surprenante, des gènes codant de nouvelles polykétide synthases de type III dans le génome de bactéries qui n'était pas connu pour coder ce type d'enzyme. Les Inventeurs ont notamment mis en évidence, de manière tout à fait surprenante, que ces nouvelles polykétide synthases de type III ont une activité de  
20 phloroglucinol synthase.

La présente invention concerne en particulier l'utilisation de polypeptides isolés choisis parmi les polykétide synthases de type III de bactéries comme phloroglucinol synthases, de préférence à l'exclusion de la polykétide synthase de type III de *Pseudomonas fluorescens* PHLD.Pf. La  
25 présente invention concerne notamment l'utilisation de polypeptides isolés choisis parmi les polykétide synthases de type III de bactéries comme phloroglucinol synthases, à l'exclusion de la polykétide synthase de type III de *Pseudomonas fluorescens* PHLD.Pf.

La présente invention concerne également notamment l'utilisation de polypeptides isolés  
30 choisis parmi les polykétide synthases de type III de bactéries gram+, notamment parmi les polykétide synthases de type III de bactéries actinomycètes, comme phloroglucinol synthases. De manière avantageuse, ledit polypeptide comprend au moins une séquence d'acides aminés ayant au moins 50% d'identité avec une séquence choisie parmi SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID  
35 NO: 9 et SEQ ID NO: 10.

Avantageusement, ledit polypeptide isolé est choisi parmi les polykétide synthases de type III des bactéries gram+. Avantageusement, ledit polypeptide isolé est choisi parmi les polykétide

synthases de type III des bactéries actinomycètes choisis dans le groupe constitué par *Tsukamurella sp.*, *Nocardia sp.*, *Mycobacterium sp.*, et *Gordonia sp.*, en particulier *Tsukamurella paurometabola*, *Tsukamurella tyrosinosolvens*, *Tsukamurella pseudospumae*, *Tsukamurella pulmonis*, *Tsukamurella sp. 1534*, *Nocardia farcinica*, *Mycobacterium marinum*,  
5 *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium tuberculosis* et *Gordonia hydrophobica*.

Selon un mode de réalisation, ledit polypeptide comprend au moins une séquence d'acides aminés ayant de préférence au moins 60% d'identité, de préférence encore au moins 65% d'identité, de manière encore préférée au moins 70% d'identité, de manière encore plus  
10 préférée au moins 75% d'identité, de manière toujours plus préférée au moins 80% d'identité, de manière plus préférentielle encore au moins 85% d'identité, de manière encore plus préférentielle au moins 90% d'identité, de manière davantage préférée au moins 95% d'identité, de manière encore préférée au moins 96% d'identité, de manière encore plus préférée au moins 97% d'identité, de manière toujours plus préférée au moins 98% d'identité,  
15 et de manière plus préférentielle encore au moins 99% d'identité, avec une séquence choisie parmi SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 et SEQ ID NO: 10.

Selon un mode de réalisation particulièrement avantageux, ledit polypeptide comprend au  
20 moins une séquence d'acides aminés choisie parmi SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 et SEQ ID NO: 10.

Dans un mode de réalisation préféré, le polypeptide isolé à activité de phloroglucinol synthase  
25 possède une séquence d'acides aminés choisie parmi SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 et SEQ ID NO: 10.

Avantageusement, le polypeptide isolé à activité de phloroglucinol synthase est choisi parmi le  
30 polypeptide isolé à activité de phloroglucinol synthase PHLD.Tp de *Tsukamurella paurometabola*, le polypeptide isolé à activité de phloroglucinol synthase PHLD.Tt de *Tsukamurella tyrosinosolvens*, le polypeptide isolé à activité de phloroglucinol synthase PHLD.Tps de *Tsukamurella pseudospumae*, le polypeptide isolé à activité de phloroglucinol synthase PHLD.Tpu de *Tsukamurella pulmonis*, le polypeptide isolé à activité de phloroglucinol  
35 synthase PHLD.Tp de *Tsukamurella sp. 1534*, le polypeptide isolé à activité de phloroglucinol synthase PHLD.Nf de *Nocardia farcinica*, le polypeptide isolé à activité de phloroglucinol synthase PHLD.Mma de *Mycobacterium marinum*, le polypeptide isolé à activité de phloroglucinol synthase PHLD.Mk de *Mycobacterium kansasii*, le polypeptide isolé à activité de

phloroglucinol synthase PHLD.Mt de *Mycobacterium tuberculosis* et le polypeptide isolé à activité de phloroglucinol synthase PHLD.Gh de *Gordonia hydrophobica*.

### Molécules d'acides nucléiques isolées

5

La présente invention concerne des molécules d'acides nucléiques isolées codant au moins un polypeptide choisi parmi les polykétide synthases de type III de bactéries, notamment les polyketide synthases de type III de bactéries actinomycètes.

10 De manière avantageuse, ledit polypeptide est tel que défini ci-dessus.

Selon un mode de réalisation, la molécule d'acides nucléiques isolée comprend un promoteur contrôlant l'expression d'au moins une séquence d'acides nucléiques codant un polypeptide tel que défini ci-dessus. Ainsi, selon un mode de réalisation, la présente invention concerne une  
15 molécule d'acides nucléiques isolée comprenant au moins une séquence d'acides nucléiques codant un polypeptide choisi parmi les polykétide synthases de type III tel que défini ci-dessus et comprenant en outre un promoteur contrôlant l'expression de ladite au moins une séquence d'acides nucléiques.

20 De manière avantageuse, le promoteur est un promoteur exogène, en particulier un promoteur de levure, de préférence un promoteur choisi parmi ADH2 (pADH2) et CCW12 (pCCW12), de préférence encore un promoteur choisi parmi ADH2 (pADH2) de *Saccharomyces cerevisiae* et CCW12 de *S. cerevisiae*, de préférence encore un promoteur choisi parmi ADH2 de SEQ ID NO: 13 et CCW12 de SEQ ID NO: 14.

25

Selon un mode de réalisation, la molécule d'acides nucléiques isolée comprend un terminateur de transcription d'au moins une séquence d'acides nucléiques codant un polypeptide tel que défini ci-dessus. Ainsi, selon un mode de réalisation, la présente invention concerne une  
30 molécule d'acides nucléiques isolée comprenant au moins une séquence d'acides nucléiques codant un polypeptide choisi parmi les polykétide synthases de type III tel que défini ci-dessus et comprenant en outre un terminateur contrôlant l'expression de ladite au moins une séquence d'acides nucléiques.

De manière avantageuse, le terminateur est un terminateur exogène, en particulier un  
35 terminateur de levure, de préférence le terminateur RPL3 (tRPL3), de préférence encore le terminateur RPL3 de *S. cerevisiae*, de préférence encore le terminateur RPL3 de SEQ ID NO: 15.

Selon un mode de réalisation préféré, la molécule d'acides nucléiques isolée comprend à la fois un promoteur et un terminateur qui sont tels que définis ci-dessus. Ainsi, selon un mode de réalisation, la présente invention concerne une molécule d'acides nucléiques isolée comprenant au moins une séquence d'acides nucléiques codant un polypeptide choisi parmi les polykétide synthases de type III tel que défini ci-dessus et comprenant en outre un promoteur et un terminateur contrôlant l'expression de ladite au moins une séquence d'acides nucléiques. Selon un mode de réalisation, la molécule d'acides nucléiques comprend en outre une séquence d'export. Avantageusement, cette séquence d'export permet la sécrétion ou l'excrétion du ou des polypeptides codés par ladite molécule d'acides nucléiques, dans le milieu cellulaire.

10 Selon un mode de réalisation, la molécule d'acides nucléiques est isolée à partir de souches homologues en culture, de préférence choisies parmi *Tsukamurella sp.*, *Nocardia sp.*, et *Mycobacterium sp.*, en particulier en particulier *Tsukamurella paurometabola*, *Tsukamurella tyrosinosolvans*, *Tsukamurella pseudospumae*, *Tsukamurella pulmonis*, *Tsukamurella sp. 1534*,  
15 *Nocardia farcinica*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium tuberculosis* et *Gordonia hydrophobica*.

Selon un mode de réalisation, la molécule d'acides nucléiques est isolée à partir d'un vecteur ou d'une cellule hôte hétérologue comprenant ladite molécule, ledit vecteur ou ladite cellule hôte étant tel(le) que défini(e) plus haut et que décrit(e) ci-après dans les sections « Cellules hôtes » ou « Vecteurs ».

Selon un mode de réalisation, la molécule d'acides nucléiques isolée est synthétisée *in vitro* par des techniques de synthèse nucléaire que l'homme du métier sait parfaitement définir.  
25 Selon un mode de réalisation, la molécule d'acides nucléiques isolée est recombinante.

### **Vecteurs**

La présente invention concerne des vecteurs comprenant au moins une molécule d'acides nucléiques telle que défini ci-dessus.  
30

Avantageusement, le vecteur est un plasmide.

Les vecteurs qui sont appropriés dans le cadre de la présente invention comprennent, sans limitation, des vecteurs bactériophages, plasmides ou cosmides pour l'expression dans des cellules hôtes procaryotes telles que des bactéries (par exemple *E. coli*, ou des bactéries du genre *Pseudomonas*); des vecteurs pour l'expression chez la levure (par exemple *Saccharomyces cerevisiae*, *Schyzosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris*); des vecteurs de baculovirus pour

l'expression dans des systèmes de cellules d'insectes (par exemple, des cellules de Sf 9); des vecteurs viraux et plasmidiques pour l'expression dans des systèmes de cellules végétales (par exemple le plasmide Ti, le virus de la mosaïque du chou-fleur, CaMV, le virus de la mosaïque du tabac TMV); ainsi que des vecteurs viraux et plasmidiques pour l'expression dans des cellules  
5 ou des organismes eucaryotes supérieurs.

Ces vecteurs sont généralement disponibles dans le commerce (par exemple, auprès des fournisseurs tels Invitrogen, Stratagene, Amersham Biosciences, Promega, etc.), disponibles  
10 auprès d'institutions de dépôt telles que American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Md.), ou ont fait l'objet de nombreuses publications décrivant leur séquence, leurs structures et leurs méthodes de production, de sorte que l'homme du métier peut les appliquer sans difficultés.

Des exemples représentatifs de vecteurs plasmidiques appropriés comprennent, sans limitation,  
15 pREP4, pCEP4 (Invitrogen), pCI (Promega), pVAX (Invitrogen) et pgWiz (Gene Therapy System Inc).

### Cellules hôtes

20 Dans un autre aspect, la présente invention concerne des cellules hôtes comprenant au moins une molécule d'acides nucléiques ou au moins un vecteur tel que défini ci-dessus.

Selon divers modes de réalisation, ladite cellule hôte, en particulier ladite cellule hôte  
25 hétérologue mentionnée plus haut, peut être une cellule procaryote, une cellule eucaryote inférieure telle qu'une cellule de levures, et d'autres cellules eucaryotes telles que des cellules d'insectes, des plantes et des cellules de mammifères (par exemple humaines ou non humaines, de préférence non humaines).

30 De manière avantageuse, la cellule hôte est un microorganisme sélectionné parmi les bactéries, les levures, les champignons, les algues et les cyanobactéries.

La cellule hôte est de préférence une levure, ladite levure étant en particulier sélectionnée  
35 parmi les genres *Saccharomyces*, *Candida*, *Ashbya*, *Dekkera*, *Pichia* (*Hansenula*), *Debaryomyces*, *Clavispora*, *Lodderomyces*, *Yarrowia*, *Zigosaccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulasporea*, *Kluyveromyces*, *Brettanomyces*, *Cryptococcus* et *Malassezia*.

De manière encore plus particulière, la levure est sélectionnée parmi les espèces *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces bayanus*, *Zigosaccharomyces bailii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Dekkera brucelensis*, *Dekkera intermedia*, *Brettanomyces custersii*, *Brettanomyces intermedius*, *Kluyveromyces themotolerens*, *Torulaspora globosa* et *Torulaspora glabrata*.

Encore plus particulièrement, la levure est du genre *Saccharomyces*, de préférence de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*.

10 Selon un mode de réalisation, la cellule hôte comprend au moins une copie de la molécule d'acides nucléiques telle que définie ci-dessus intégrée dans son génome.

Selon un mode de réalisation, la cellule hôte comprend une copie unique de la molécule d'acides nucléiques telle que définie ci-dessus intégrée dans son génome.

15 Lorsque la cellule hôte est une cellule de levure, la ou les copies de la molécule d'acides nucléiques peut être intégrée à différents loci, préférentiellement au locus URA3, au locus JLP1, au locus LEU2, ou au locus TRP1 du génome de ladite cellule de levure. Lorsque la cellule hôte est une cellule de levure et que plusieurs copies de la molécule d'acides nucléiques sont  
20 intégrées, les différentes copies peuvent être intégrées au même locus, ou encore à différents loci, préférentiellement à l'une quelconque des combinaisons des loci URA3, JLP1, LEU2, et/ou TRP1.

Avantageusement, les codons utilisés dans la molécule d'acides nucléiques ont été adaptés  
25 pour une expression optimale dans la cellule hôte sélectionnée.

Une expression optimale peut notamment être obtenue lorsque les codons choisis sont ceux utilisés de manière préférentielle par l'organisme d'origine de la cellule hôte. Les codons utilisés de manière préférentielle sont connus pour la plupart des organismes couramment  
30 utilisés dans le domaine. L'homme du métier pourra aisément déterminer les codons les plus avantageux à utiliser en fonction de la cellule hôte choisie.

A cet effet, l'homme du métier sait quelle technique utiliser pour modifier les codons de la molécule d'acide nucléique. Les codons peuvent être par exemple modifiés par mutagenèse  
35 dirigée *in vitro* à partir d'un échantillon de la molécule d'acides nucléiques dont les codons sont à adapter, à l'aide d'une amplification par réaction en chaîne par polymérase (PCR). Alternativement, la molécule d'acides nucléiques peut être synthétisée *in vitro* directement avec les codons optimisés.

Les cellules hôtes peuvent être cultivées dans des bioréacteurs aérobie ou anaérobie, à petite et grande échelle, dans des flacons ou des boîtes de Petri. La culture peut être effectuée à une température, un pH, un milieu de culture et une teneur en oxygène appropriés pour une cellule hôte donnée.

5

## Méthodes

### *Méthode pour produire un polypeptide à activité de phloroglucinol synthase*

10 La présente invention concerne en outre une méthode pour produire un polypeptide à activité de phloroglucinol synthase tel que défini ci-dessus.

Selon un mode de réalisation, la méthode pour produire un polypeptide à activité de phloroglucinol synthase tel que défini ci-dessus comprend au moins les étapes consistant en :

15 (i) l'introduction d'une molécule d'acides nucléiques ou d'un vecteur tels que décrits ci-dessus dans une cellule hôte appropriée conforme à la description qui précède ; et

(ii) la culture *in vitro* de ladite cellule hôte obtenue à l'étape (i) dans des conditions permettant la croissance de ladite cellule hôte et/ou l'expression de ladite molécule d'acides nucléiques, de manière à produire ledit polypeptide.

20

Selon un autre mode de réalisation, la méthode pour produire un polypeptide à activité de phloroglucinol synthase tel que défini ci-dessus comprend au moins l'étape consistant en :

25 (i) la culture *in vitro* d'une cellule hôte exprimant ledit polypeptide, par exemple une cellule hôte telle que décrite ci-dessus, dans des conditions permettant la croissance de ladite cellule hôte et/ou l'expression de la molécule d'acides nucléiques contenue dans ladite cellule hôte, de manière à produire ledit polypeptide.

30 Selon un mode de réalisation possible, la méthode pour produire un polypeptide à activité de phloroglucinol synthase comprend au moins une étape additionnelle choisie parmi les étapes consistant en :

( $\alpha$ ) la récupération des cellules exprimant ledit polypeptide, obtenues après l'étape de culture ; et

( $\beta$ ) la purification du polypeptide à partir des cellules récupérées à l'étape ( $\alpha$ ).

35

### Méthode pour produire du phloroglucinol

La présente invention concerne également une méthode pour produire du phloroglucinol.

- 5 Selon un mode de réalisation M1, la méthode pour produire du phloroglucinol comprend au moins les étapes consistant en :
- (i) l'obtention de cellules par la mise en œuvre de l'une des méthodes décrites ci-dessus ;
  - (ii) la mise en contact des cellules obtenues à l'étape (i) avec un substrat approprié ;
  - 10 (iii) l'incubation du mélange issu de l'étape (ii) dans des conditions adaptées pour produire du phloroglucinol;
  - (iv) optionnellement la récupération du milieu réactionnel comprenant le phloroglucinol, obtenu après l'étape (iii) ; et
  - (v) optionnellement, la purification du phloroglucinol à partir du milieu réactionnel de
  - 15 l'étape (iv).

Selon un autre mode de réalisation M2, la méthode pour produire du phloroglucinol comprend les étapes consistant en :

- (i) la mise en contact d'une cellule hôte exprimant le polypeptide à activité de
- 20 phloroglucinol synthase tel que défini ci-dessus, par exemple une cellule hôte telle que définie ci-dessus, avec un substrat approprié ;
- (ii) la culture *in vitro* de la cellule hôte de l'étape (i) dans des conditions permettant la croissance de ladite cellule hôte et/ou l'expression de la molécule d'acides nucléiques contenue dans ladite cellule hôte, de manière à produire du phloroglucinol ;
- 25 (iii) optionnellement la récupération du milieu de culture comprenant le phloroglucinol, obtenu après l'étape (ii) ; et
- (iv) optionnellement, la purification du phloroglucinol à partir du milieu de culture de l'étape (iii).

- 30 Aux fins des méthodes M1 et M2, le substrat est une source de carbone. Avantageusement, la source de carbone est une source de carbone pure ou un coproduit industriel (tel que la mélasse ou les égouts pauvres, par exemple issus de l'industrie sucrière). De préférence, le substrat dans la source de carbone pure ou le coproduit industriel est un sucre simple, tel que le glucose (ou dextrose), le fructose, le galactose, le mannose, le saccharose, le lactose, ou le maltose ;
- 35 un sucre complexe, tel qu'un monosaccharide, un disaccharide ou trisaccharides, ou encore un polysaccharide comme l'amidon ; un alcool, tel que l'éthanol ; un acide ; un acide gras et leur dérivé d'ester ; ou un mélange de sucres, d'alcools, d'acides et/ou d'acides gras ou leurs dérivés d'ester.

De préférence, le substrat est le glucose. Alternativement, le substrat est l'éthanol.

Selon un autre mode de réalisation M3, la méthode pour produire du phloroglucinol comprend au moins les étapes consistant en :

- 5 (i) la mise en contact d'au moins un polypeptide obtenu à l'étape (B) de la méthode telle que décrite ci-dessus, avec un substrat approprié ;
- (ii) l'incubation du mélange issu de l'étape (i) dans des conditions adaptées pour produire du phloroglucinol ;
- (iii) optionnellement la récupération du milieu réactionnel comprenant le  
10 phloroglucinol, obtenu après l'étape (ii) ; et
- (iv) optionnellement, la purification du phloroglucinol à partir du milieu réactionnel de l'étape (iii).

Selon un autre mode de réalisation M4, la méthode pour produire du phloroglucinol comprend  
15 au moins les étapes consistant en :

- (i) la mise en contact d'au moins un polypeptide tel que défini ci-dessus avec un substrat approprié ;
- (ii) l'incubation du mélange issu de l'étape (i) dans des conditions adaptées pour  
20 produire du phloroglucinol ;
- (iii) optionnellement la récupération du milieu réactionnel comprenant le phloroglucinol, obtenu après l'étape (ii) ; et
- (iv) optionnellement, la purification du phloroglucinol à partir du milieu réactionnel de l'étape (iii).

25 Aux fins de ces méthodes M3 et M4, le substrat est un thioester. Avantageusement, le substrat est un acyl-Coenzyme A (ou acyl-CoA) tel que le malonyl-CoA, l'acétyl-CoA, l'hexanoyl-CoA, le decanoyl-CoA, le lauroyl-CoA et le palmitoyl-CoA, ou un mélange de ceux-ci. De préférence, le substrat est le malonyl-CoA.

Selon un mode de réalisation préféré, la purification du phloroglucinol est réalisée par  
30 extraction liquide-liquide.

Les exemples qui suivent visent à illustrer la présente invention sans aucune limitation.

Les enzymes respectivement codées par le gène **PHLD** de *Pseudomonas fluorescens* (Zha et al., 2006), par le gène **PKS1** d'*Ectocarpus siliculosus* (Meslet-Cladière et al., 2013) y sont utilisées  
35 comme contrôles.

## EXEMPLES

### Exemple 1 : Identification de nouvelles phloroglucinol synthases candidates

5 Jusqu'à la présente invention, seules deux phloroglucinol synthases avaient été identifiées et caractérisées :

- l'enzyme codée par le gène **PHLD** de *Pseudomonas fluorescens* (Zha et al., 2006), et
- l'enzyme codée par le gène **PKS1** d'*Ectocarpus siliculosus* (Meslet-Cladière et al., 2013).

10

Les inventeurs ont à présent découvert et caractérisé de nouvelles phloroglucinol synthases en utilisant des analyses génétiques et fonctionnelles.

15

Comme indiqué dans l'introduction ci-dessus, la caractérisation fonctionnelle exacte d'une polykétide synthase est complexe car cette classe d'enzymes rassemble des protéines présentant de grandes similarités de séquences alors qu'elles peuvent catalyser des réactions sensiblement dissemblables et reconnaître des substrats tout à fait différents.

#### 1.1. Sélection de nouvelles enzymes candidates

20

Afin d'identifier de nouvelles phloroglucinol synthases, les Inventeurs ont identifié des séquences codant pour des polykétide synthases de type III putatives. Les séquences de ces polykétide synthases de type III putatives ainsi identifiées par les Inventeurs ont été analysées et alignées entre elles en utilisant notamment comme base l'alignement des polykétide synthases de type III publié par Meslet-Cladière *et al.* 2013.

25

L'analyse de cet alignement de séquence a conduit à la sélection d'un groupe d'enzymes candidates, dont les séquences protéiques sont proches de celle du produit du gène PKS1. Es de l'algue *Ectocarpus siliculosus* (Tableaux 1 et 2).

30

**Tableau 1** : Polykétide synthases de type III putatives identifiées. Les lignes grisées montrent les enzymes ayant une activité connue de phloroglucinol synthase.

Nom	Référence dans les bases de données	Fonction connue ou putative	Espèce	Règne
PHLD.Pf	AA95147.1	type III polyketide synthase PhLD	<i>Pseudomonas fluorescens Pf-5</i>	gammaproteobactéries/pseudomonales (bactéries)
PKS1.Es	CBN76919.1	Polyketide Synthase III sans peptide signal 2-32	<i>Ectocarpus siliculosus</i>	Ochrophytes (Algues)
PHLD.Tp	WP_013126955.1	polyketide synthase	<i>Tsukamurella paurometabola</i>	Actinobactéries/tsukamurella (bactéries)
PHLD.Tt	WP_068525790.1	polyketide synthase	<i>Tsukamurella tyrosinosolvans</i>	Actinobactéries/tsukamurella (bactéries)
PHLD.Tps	WP_068569959.1	polyketide synthase	<i>Tsukamurella pseudospumae</i>	Actinobactéries/tsukamurella (bactéries)
PHLD.Tpu	WP_068567598.1	polyketide synthase	<i>Tsukamurella pulmonis</i>	Actinobactéries/tsukamurella (bactéries)
PHLD.Tsp	WP_019202763.1	polyketide synthase	<i>Tsukamurella sp. 1534</i>	Actinobactéries/tsukamurella (bactéries)
PHLD.Nf	WP_011211464.1	polyketide synthase	<i>Nocardia farcinica</i>	Actinobactéries/corynébactéries (bactéries)
PHLD.Mma	WP_012393954.1	polyketide synthase	<i>Mycobacterium marinum</i>	Actinobactéries/corynébactéries (bactéries)
PHLD.Mk	ZP_04749411.1	polyketide synthase	<i>Mycobacterium kansasii ATCC 12478</i>	Actinobactéries/corynébactéries (bactéries)
PHLD.Mt	WP_031677738.1	polyketide synthase	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Actinobactéries/corynébactéries (bactéries)
PHLD.Gh	WP_066172590.1	polyketide synthase	<i>Gordonia hydrophobica</i>	Actinobactéries/actinomycétales (bactéries)

**Tableau 2** : Séquences protéiques des polykétide synthases de type III putatives identifiées.

SEQ ID NO:	Nom	Séquence protéique
SEQ ID NO: 1	PHLD.Tp	MIAPQIRLGEPTTPLPDPLWHGAPPAPPTTVAVIESLATGSPAQAHGQSVSAERV AARFADPIQAERIRRVYANTAVATRHAIPLSDDFADFSARPDTIRQRMDLYFEHA APLAIETARRALGAVDATEVQGLIFVTSTGFLAPGVDVAVTRSLGLPASTSRVINFM GCAAAMNLRVASDFVRAHPDRKSLLVCLSSVNAVAFAGDPNDVVISLFDGCG AALIGASEVGHPLPAGHIVRDTFAHLLDDAEDGIVLGVNANGITCELAHSLPRYILD

SEQ ID NO:	Nom	Séquence protéique
		GVSPVIDGVLARNGLGREDVAHWAIHPGGPKIIESASAALGLPRSASQTSWAVLAE HGNMLSVSLLFVLERLLGARAAGGTQETGLAFSFPAGVTVVEGFLFDVVGPS
SEQ ID NO: 2	PHLD.Tt	MTMNAGSQGAPALDVPAPVLPAPGTWLGAPPAPPTSVAVIESLATGSPAQTYGQ AESADRVAARFDDPRQAERIRRVYAKTRVDERHLAIDPLTPEFAEFSTRPDTVRERM DLFYEAAPLAVDTARRALGVGTEHEFDPADVGQLVFTSTGFLAPGVDVAVIRAL GLAPQTSRVVINFMGCAAAMNLRVSTDYVRAHPDRKSLMICLELSSVNAVFSGDP NDVVISSLFADGCGAAVIGASEVGHPLPGGRIVVRDTFTHLLDGAEDGIVLGVNANG ITCELAESLPQYIVDGVAPVIDEVLGRNDLGREAVAHWAIHPGGPKIIESAATALGLP DEASRTSWDVLAEHGNMLSVSLLFVLERLLAQVADGAATQPDGAPTGMFAFSFAP GVTVEGFLFDVVTGDQPGE
SEQ ID NO: 3	PHLD.Tps	MAAPELPGTSVWRGAPPAPPTSVAVIESLATGSPSQAYDQAESADRVASRFDDPR QAERIRRVYAKTRVAERHLAIDPLTPEFAAFSTRPDTIRERMDLFFEHAAPLAIDTARR ALGTVDPADVGQLVFTSTGFLAPGVDVAVIRALGLSPGTSRVVINFMGCAAAMN ALRVSTDYVRAHPDRKSLMICLELSSVNAVFSGDPNDVVISSLFADGCGAALIGASEV GHPLPAGNIVVRDTFSHLLDGAEDGIVLGVNADGITCELAESLPQYIVDGVAPVVDG VLRNGLDRDAVAHWAIHPGGPKIIESASTALGLPDEASRLSWDVLAGHGNMLSVS LLFVLERLLAQVADGADGAPSTGMFAFSFAPGVTVEGFLFDVVTGGE
SEQ ID NO: 4	PHLD.Tpu	MNTTEQQSVLPQQAWLGAPPAPPTSVAVIESLATSSPTQTYGQAESADRVAARFD DPRQAERIRRVYAKTRVTERHLAIDPLTPEFAEFSARPDTVRERMDLFFEHAAPLAIE TARRALGDNAATDIGQLVFTSTGFLAPGVDVAVIRALGLAPQTSRVVINFMGCAA AMNLRVSTDYVRAQPDRKSLMICLELSSVNAVFSGDPNDVVISSLFADGCGAAVI GASEVGHPLPSGQIVVRDTFTHLLDGAEDGIVLGVNANGITCELAESLPQYIVNGVA PVVDAVLDNRNGLGREAVAHWAIHPGGPKIIESAAAAALGLPDDASRLSWDVLAEHG NMLSVSLLFVLERLRAQVADGADGAPSTGMFAFSFAPGVTVEGFLFDVVTGGE
SEQ ID NO: 5	PHLD.Tsp	MNIQDRSTVAPDSPALGFPPAPPTSVAVIESLATGSPSGVHAQAESADRVASRFDD PAQAERIRRVYTKTRVARRHLAIDPLDEDFAAFSARPDTIRERMDLFAEHASPLAVDT ARRALGAVDPADVGQLVFTSTGFLAPGVDVAIVRALGLPATTSRVIVNFMGCAA MNLRVASDFVRAHPDRKSLMVCLELSSVNAVFSGDPNDVVISSLFADGCGAAVIG ASEVGHPLPGGSIVVRDTFAHLLDGAEDGIVLGVNANGITCELAESLPYIVDGVVPV IDGVLARNGLGHADVAHWAIHPGGPKIIESASAALGLPAAASATSWQVLAEHGNM LSVSLFVLERMLSGLPDGPSTGMFAFSFAPGVTVEGFLFDIVRDGAPRPGALGGRP A
SEQ ID NO: 6	PHLD.Nf	MSITVDEGGARPATEPRQRIHPDLGHAHTPMPPAPPVTIGVVEGIATGSPAQIVDQ AEEAERVAALFTDPAQRARIARVYEKTRIERRMAMDPTAPEFRSFRSQPGLRERM NLFYRHAAPLAVDVAGRALADSGAAAADIGLLVFTSTGFIAPGVDVAVLRELGLVP TVGRVVVNFMGCAAAMNGIRTGVVYVRAHPDKKALVVCLELSSVNAVFAADDVND VIIHSLFGDGCAGVVLGASQARQPLAPGRVVVRDSFSLFDAEDGIVLGVVDHNGIT CELSENLPRYIYRGVDPVVREVLARNGLRKSDIDLWAIHPGGPKIIEESVRSLSPEQ

SEQ ID NO:	Nom	Séquence protéique
		AAPSWDVLARHGNMLSLSLIFVLEQMIAQSATAEPISTGVAFSFPAGVTLEGLIFDII RR
SEQ ID NO: 7	PHLD.Mma	MSTAAEGGAIRRAGHEPRYDLAQLPPAPPTTVAVIEGMATGAPQRRVVAQADAAA RVSELFVDPQQRERISRIYDKTRIDTRRMAVDPLDDEFDEFRRPATIRDRMNLFYQ HAVPLAVDVAARALDGLPYAPDEIGQLVFTSTGFIAPGVDVEIVKQLGLPRISRIVV VNFMGCAAAMNAIRTATNYVRAHPSMKALVVCIELSSVNAVFAADDINDVVIHSLFG DGCGALVIGASQVQQPLPAGNVVIRSSFSQLLDDSEGDGIVLGVNHGDCITCESENLP SYIYRSVDPVVAEMLRDNGLSKADIDLWAIHPGGPKIIEQSARSLGIPVGRAVQSWD VLAQFGNMLSLSLIFVLEMMVAQAESDKPISTGVAFSFPAGVTVEGMLFDIIRR
SEQ ID NO: 8	PHLD.Mk	MSSAADGGAPVADVPGYEPHYDLAQLPPAPPTTVAVIEGMATGVPQRRVVRQSDA AARVAQMFVDPQQRERVSRYAKTRIDTRRMAVNPLDAEFDAFRREPATIRDRMS LFYRHAVPLAVEVTRRALAGLSYGADEIGLLVFTSTGFIAPGVDVAIVKELGLSRAIS RVVVFNGCAAAMNAIRTATNYVRAHPAMKALVVCIELCSVNAVFAADNVKDVVI HSLFGDGAALVIGASQVQQQLPAGSVVIRSNFSQLLDDAEDGIVLGVNHGDCITCEL SENLPDIYIRGVAPVVANVLYDNGLQSQSDIDLWAIHPGGPKIIEQSVRSLGIGVECAA PSWDVLARYGNMLSLSLIFVLEMMVQQAESKPLSTGVAFSFPAGVTVEGMLFDI VRR
SEQ ID NO: 9	PHLD.Mt	MNVSAESGAPRRAGQRHEVGLAQLPPAPPTTVAVIEGLATGTPRRVNVNQSDAADR VAELFLDPGQRERIPRVYQKSRIITRRMAVDPLDAKFDVFRREPATIRDRMHLFYEY AVPLAVDVSKRALAGLPYRAAEIGLLVLATSTGFIAPGVDVAIVKELGLSFSFGDGCA ALVIGASQVQEKLEPGKVVVIRSSFSQLLDNTEGDGIVLGVNHGDCITCESENLPYIFG GVAPVVTEMLWDNGLQISDIDLWAIHPGGPKIIEQSVRSLGISAELAAQSWDVLAR FGNMLSLSLIFVLETMVQQAESAKAISTGVAFSFPAGVTVEGMLFDIIRR
SEQ ID NO: 10	PHLD.Gh	MPAPVTTVAVIEAVATGAPATVHPQTRAAEQVAELYDDPALQERIRRLRYNRTRVQT RHLAVDPMTPEFQEFSSRPATVTRRMNDYFHHAVPLAVDVARRALAGVTDPAEI GQIIFVTSTGFIAPGVDVAVITELGLAPTVMHRVINFMGCAAANGISTATDHVRANP DSRALLICLESSVNAVFGADPVELVTHSLFGDGCAMLIGASPVGRRRLAPGQLVVR DTFSLFHDTGDGIVLGVNDDGITCELAQELPSYIRRGVGPDAALNRSRLRRDDIA HWAIHPGGPAIIEQSVAALDLPDRAATSWEVLAEYGNMLSLSLIFVLEKLIAGAH GRGQAPETGVAFSFPAGVALEGMLFDLVC

La Figure 1 présente l'alignement des séquences protéiques des enzymes candidates listées dans le Tableau 1. L'alignement des dix enzymes candidates sélectionnées avec l'enzyme PKS1.Es a été réalisé en employant le logiciel Clustal W.

5

Le Tableau 3 présente la matrice des identités de séquence existant entre ces différentes enzymes candidates et PHLD.Pf et PKS1.Es.

**Tableau 3 :** Matrice des identités de séquence existant entre les différentes enzymes candidates.

	PHLD.Tt	PHLD.Tp	PHLD.Tps	PHLD.Tpu	PHLD.Tsp	PHLD.Nf	PHLD.Mma	PHLD.Mk	PHLD.Mt	PHLD.Gh	PHLD.Pf	PKS1.Es
PHLD.Tt	ID	74,7	84,2	85,4	75,7	58,2	55,8	55,3	44,6	55,8	19,3	36,3
PHLD.Tp	74,7	ID	76,3	76	76,5	55,4	55	54,7	42,7	58,4	21,3	34
PHLD.Tps	84,2	76,3	ID	87,2	77,9	57,6	57,7	56,3	45,2	58,3	20,4	37,3
PHLD.Tpu	85,4	76	87,2	ID	76,8	57,8	56,2	54,7	44,7	58,9	20,3	37
PHLD.Tsp	75,7	76,5	77,9	76,8	ID	56	56,3	55	45,3	54,8	19,9	35
PHLD.Nf	58,2	55,4	57,6	57,8	56	ID	67,5	67,2	55,5	55,7	19,1	35,9
PHLD.Mma	55,8	55	57,7	56,2	56,3	67,5	ID	82,7	65,6	54,9	19,9	35,8
PHLD.Mk	55,3	54,7	56,3	54,7	55	67,2	82,7	ID	66	52,8	19	35,4
PHLD.Mt	44,6	42,7	45,2	44,7	45,3	55,5	65,6	66	ID	44,3	15,1	27,7
PHLD.Gh	55,8	58,4	58,3	58,9	54,8	55,7	54,9	52,8	44,3	ID	21,1	35,9
PHLD.Pf	19,3	21,3	20,4	20,3	19,9	19,1	19,9	19	15,1	21,1	ID	23,1
PKS1.Es	36,3	34	37,3	37	35	35,9	35,8	35,4	27,7	35,9	23,1	ID

Les résultats montrent que la distance phylogénétique existant entre les enzymes candidates et l'enzyme bactérienne PHLD.Pf est importante puisque moins de 25 % d'identité sont observés entre ces deux groupes. Il n'est donc pas possible d'affecter *a priori* une fonction phloroglucinol synthase aux polykétide synthases putatives étudiées à cause de cette forte divergence de séquences.

## 10 1.2. Mesure des activités phloroglucinol synthases chez la levure

Afin d'identifier les phloroglucinol synthases parmi les candidats identifiés ci-dessus, une méthode d'extraction et de dosage du phloroglucinol a été mise au point comme détaillé ci-dessous.

15

### 1.2.1. Méthode d'extraction du phloroglucinol

La méthode a été développée en employant le résorcinol comme étalon interne. Différents tests ont conduit au développement d'une méthode d'extraction liquide-liquide réalisée à pH 4.0 en présence d'acétate d'éthyle comme solvant, et en saturant la phase aqueuse en NaCl. L'extraction est réalisée pendant 30 min sous agitation circulaire. La phase organique est prélevée et le solvant acétate d'éthyle est évaporé sous un flux d'azote N<sub>2</sub> à 30°C. L'extrait

20

sec obtenu après évaporation complète est alors repris dans un volume déterminé d'un mélange 50 % -50 % éthanol/H<sub>2</sub>O.

Le rendement d'extraction a été mesuré par spectroscopie de masse après chromatographie haute pression sur une colonne C18 (dimensions : 100mm\*2.1 mm ; granulométrie : 1.7 µm) en employant un gradient 0.03% acide méthanoïque (HCOOH)/ acétonitrile (ACN).

Les rendements d'extraction ont été déterminés en utilisant des solutions de phloroglucinol et résorcinol préparées dans le milieu de culture utilisé pour la croissance des levures. Les concentrations de phloroglucinol correspondent aux points bas (20 µg.mL<sup>-1</sup>) et haut (200 µg.mL<sup>-1</sup>) de la gamme de dosage. La concentration du résorcinol correspond à la concentration ajoutée en tant qu'étalon interne lors des dosages (200 µg.mL<sup>-1</sup>). Les résultats sont présentés dans le Tableau 4.

**Tableau 4** : Rendement d'extraction du phloroglucinol (20 et 200 µg.mL<sup>-1</sup>) et du résorcinol (200 µg.mL<sup>-1</sup>), extraits par l'acétate d'éthyle, selon la méthode décrite.

Produit	Phloroglucinol		Résorcinol (EI)
Concentration de phloroglucinol ou de résorcinol dans le milieu de culture (µg.mL <sup>-1</sup> )	20	200	200
RDT (%)	76	89	82

### 1.2.2. Développement d'une méthode d'analyse UPLC/UV et UPLC/MS

Une méthode d'analyse par chromatographie UPLC et mesure d'absorbance en UV (rayonnement ultraviolet) a été développée. L'extrait est chromatographié sur une colonne propyl-pentafluorophenyl (PFP) de dimensions 100mm\*2.1 mm ; granulométrie :1.8 µm selon un gradient de 0.1% HCOOH/ACN - 0.1% HCOOH. Le phloroglucinol est détecté en UV à 230 nm. Une méthode UPLC couplée à un spectromètre de masse (UPLC/Mass) a également été développée.

La quantification est réalisée en employant une gamme de 20 à 200 µg.ml<sup>-1</sup> de phloroglucinol dilué dans du milieu de culture de levure (Yeast Extract 1%, BactoPeptone 2 %) en présence d'une quantité fixe de résorcinol, employé comme témoin interne. La quantité de

phloroglucinol est déterminée en calculant les rapports de surface des pics de chromatographie phloroglucinol / résorcinol.

5 La Figure 2 présente un exemple de pics de chromatographie de phloroglucinol / résorcinol obtenus sur colonne PFP.

Cette méthode de dosage permet donc de mesurer qualitativement et quantitativement, de manière fiable, le phloroglucinol présent dans un échantillon.

10 La méthode UPLC couplée à un spectromètre de masse (UPLC/mass) permet de doser les échantillons contenant une concentration de phloroglucinol allant de 2 à 50  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ .

## Exemple 2 : Identification de nouvelles phloroglucinol synthases fonctionnelles

15 **2.1. Expression des gènes candidats dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* sous forme multicopies**

Les 10 gènes candidats (PHLD.Tp, PHLD.Tt, PHLD.Tps, PHLD.Tpu, PHLD.Tsp, PHLD.Nf, PHLD.Mma, PHLD.Mk, PHLD.Mt et PHLD.Gh) sélectionnés et décrits ci-dessus, ainsi que les  
20 gènes PHLD.Pf et PKS1.Es codant les deux phloroglucinol synthases identifiées à ce jour, utilisées comme contrôles (voir Tableaux 1 et 2), ont été synthétisés en adaptant les codons utilisés pour une expression optimale dans la levure *S. cerevisiae*.

Cette adaptation des codons a été réalisée afin d'optimiser l'expression de ces différents gènes  
25 dans les cellules de levure (ces 12 gènes synthétiques codent des protéines strictement identiques aux protéines exprimées par les organismes d'origine). Chacun de ces gènes a été placé sous le contrôle du même promoteur de levure ADH2 (pADH2) qui permet leur expression notamment lorsque le milieu de culture contient de l'éthanol comme source de carbone. Le terminateur de transcription du gène de levure RPL3 (tRPL3) a été placé en aval de chacun des  
30 12 gènes placés sous le contrôle du promoteur ADH2.

La Figure 3 montre un exemple d'unité génique ainsi construite pour un candidat ou un contrôle donné (PHLD.ii).

35 Les différentes unités géniques ainsi construites ont été intégrées de manière indépendante au locus URA3 du génome d'une souche sauvage de la levure *S. cerevisiae*. La souche de type sauvage utilisée est la souche commerciale W303 (génotype : MAT-a, his3, leu2, trp1, ura3, ade-). La technique d'intégration employée permet l'intégration d'un nombre variable de

copies de chaque unité génique. Pour chaque construction, le nombre de copies d'unités géniques intégrées a été déterminé par PCR quantitative selon la méthode classique Taqman. Les souches de levure exprimant différents nombres de copies de chacun des 10 gènes candidats PHLD.ii ou des gènes contrôles PHLD.Pf et PKS1.Es décrits ci-dessus, ont été cultivées en présence de 20 g.L<sup>-1</sup> d'éthanol comme source de carbone pendant 48 heures à 30 °C. Les 12 souches de levures obtenues de manière indépendante après transformation et intégration au locus *URA3* des unités géniques décrites ci-dessus ont ainsi été analysées pour leur capacité à produire du phloroglucinol. La souche parentale sauvage W303 a été cultivée dans les mêmes conditions et utilisée à titre de témoin.

10 Les densités optiques (DO) des différentes cultures ont été mesurées à 600 nm (DO<sub>600</sub>), indiquant ainsi le niveau de croissance de chaque souche (Figure 4A et B).

15 La capacité des différentes souches de levures exprimant les différents gènes PHLD.ii sous le contrôle du promoteur ADH2 à synthétiser du phloroglucinol a été testée en utilisant la méthode d'extraction et de dosage mise au point telle que décrite au paragraphe 1.2 ci-dessus. Le niveau de production de phloroglucinol (en mg.L<sup>-1</sup>) a été mesuré dans le milieu de culture (Figures 4A et C).

20 La Figure 4 montre que l'ensemble des souches exprimant des nombres différents de copies des gènes PHLD.Tp, PHLD.Tt, PHLD.Tps, PHLD.Tpu, PHLD.Tsp, PHLD.Nf, PHLD.Mma, PHLD.Mk, PHLD.Mt et PHLD.Gh produit une quantité significative de phloroglucinol qui est excrété dans le milieu de culture (Fig. 4A, C et D). Ces résultats indiquent donc que chacun de ces 10 gènes exprime une phloroglucinol synthase active chez la levure.

25 De plus, comme attendu, aucune production de phloroglucinol n'a été mesurée dans la souche parentale contrôle W303 (données non montrées).

30 Ainsi, cette étude fonctionnelle a permis d'identifier dix nouvelles phloroglucinol synthases, codées respectivement par les gènes PHLD.Tp, PHLD.Tt, PHLD.Tps, PHLD.Tpu, PHLD.Tsp, PHLD.Nf, PHLD.Mma, PHLD.Mk, PHLD.Mt et PHLD.Gh. Cette étude révèle pour la première fois que des bactéries Gram+, en particulier des bactéries actinomycètes, codent des phloroglucinol synthases fonctionnelles (PHLD.Tp, PHLD.Tt, PHLD.Tps, PHLD.Tpu, PHLD.Tsp, PHLD.Nf, PHLD.Mma, PHLD.Mk, PHLD.Mt et PHLD.Gh).

35 Cette étude révèle également pour la première fois que l'enzyme PKS1.ES est fonctionnelle lorsqu'elle est exprimée chez un système eucaryote hétérologue, la levure. Cette étude révèle en outre de manière inattendue que PHLD.Pf ne code pas une phloroglucinol synthase

fonctionnelles chez la levure. Ce résultat est surprenant car l'enzyme codée par PHLD.Pf présente une activité phloroglucinol synthase démontrée lorsqu'elle est exprimée chez *Escherichia coli* (Achkar et al., 2005).

## 5 **2.2. Expression des gènes candidats dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* sous forme d'une copie unique**

La production de phloroglucinol par des souches n'ayant intégré qu'une seule copie du gène candidat PHLD sélectionnés et identifiées comme étant fonctionnels chez la levure (voir les résultats du paragraphe précédent et la Fig. 4) a également été évaluée. Le gène PKS1. Es codant la phloroglucinol synthase fonctionnelle chez la levure selon les résultats décrits au paragraphe 2.1 ci-dessus a été utilisé comme contrôle positif. Le gène PHLD.Pf codant la phloroglucinol synthase non fonctionnelle chez la levure selon les résultats décrits au paragraphe 2.1 ci-dessus a été utilisé comme contrôle négatif.

Chacun de ces gènes a été placé soit sous le contrôle du promoteur de levure ADH2 (pADH2), qui permet leur expression notamment lorsque le milieu de culture contient de l'éthanol comme source de carbone, soit sous contrôle du promoteur de levure CCW12 (pCCW12), qui permet leur expression, notamment lors de la glycolyse, lorsque le milieu de culture contient du glucose comme source de carbone. Le terminateur de transcription du gène de levure RPL3 (tRPL3) a été placé en aval de chacune des constructions.

Le détail des différentes constructions géniques réalisées est reporté en Figure 5.

Les souches de levure exprimant une copie unique de PHLD ou PKS1 ont été cultivées en présence de 20 g.L<sup>-1</sup> d'éthanol comme source de carbone (constructions contrôlées par le pADH2) ou en présence de 20g.L<sup>-1</sup> de glucose (constructions contrôlées par le pCCW12) pendant 48 heures à 30 °C (Figures 6 et 7). Les souches ont été cultivées et analysées pour leur capacité à produire du phloroglucinol.

Les densités optiques des différentes cultures ont été mesurées à 600 nm (indiquant le niveau de croissance de chaque souche, Figures 6A et B et Figures 7A et B) et la production de phloroglucinol (en mg.L<sup>-1</sup>) a été mesurée dans le milieu de culture, pour 2 transformants indépendants pour chaque construction (Figures 6A et C et Figures 7A et 9C).

La Figure 6 (A et C) montre que les souches exprimant une seule copie des gènes PHLD.Tp, PHLD.Tt, PHLD.Tps, PHLD.Tpu, PHLD.Tsp, PHLD.Nf, PHLD.Mma, PHLD.Mk, PHLD.Mt ou PHLD.Gh sous le contrôle du promoteur ADH2 synthétisent une quantité mesurable et significative de

phloroglucinol qui est excrété dans le milieu de culture, en présence d'éthanol comme source de carbone.

5 Pour les cultures réalisées en présence de glucose comme source de carbone, les souches exprimant une seule copie des gènes PHLD.Tp, PHLD.Tt, PHLD.Tps, PHLD.Tpu, PHLD.Tsp, PHLD.Nf, PHLD.Mma, PHLD.Mk, PHLD.Mt et PHLD.Gh sous le contrôle du promoteur CCW12 synthétisent toutes du phloroglucinol, en quantité comparable aux cultures réalisées en présence d'éthanol comme source de carbone (Figures 7A et C).

10 Les résultats obtenus ci-dessus confirment les résultats obtenus dans les souches contenant plusieurs copies des phloroglucinol synthases décrits dans le paragraphe 2.1 ci-dessus. Ainsi, l'expression des enzymes candidates PHLD.Tp, PHLD.Tt, PHLD.Tps, PHLD.Tpu, PHLD.Tsp, PHLD.Nf, PHLD.Mma, PHLD.Mk, PHLD.Mt et PHLD.Gh conduit à la production significative de phloroglucinol par les cellules de levure. Ces résultats montrent que ces gènes codent des  
15 phloroglucinol synthases et que ces phloroglucinol synthases sont actives dans des cellules de levure.

Ces résultats montrent en outre que les niveaux de production de phloroglucinol sont élevés même lorsqu'une seule copie du gène codant la phloroglucinol synthase est exprimée.

20 Ces résultats sont les premières démonstrations de l'existence d'une activité phloroglucinol synthase chez les bactéries de type gram+.

De manière plus générale, les résultats montrent que les enzymes candidates PHLD.ii testées  
25 présentent une activité globalement plus élevée que les deux seules phloroglucinol synthases connues avant cette étude, i.e. les enzymes d'*E. siliculosus* et *P. fluorescens*. Les enzymes candidates PHLD du genre *Tsukamurella* (PHLD.Tt, PHLD.Tps, PHLD.Tpu, PHLD.Tsp, PHLD.Tp) sont particulièrement actives lorsqu'elles sont exprimées chez la levure. En effet, la production de phloroglucinol normalisée par le nombre de copies démontre que les enzymes de  
30 *Tsukamurella* testées (PHLD.Tp, PHLD.Tt, PHLD.Tpu, PHLD.Tps et PHLD.Tsp) ont une activité phloroglucinol synthase au moins 10 fois plus importante que celle de l'enzyme PKS1 d'*Ectocarpus siliculosus* dans le système d'expression en levure testé ici. Selon ces résultats, l'enzyme PHLD.Tpu serait notamment l'enzyme la plus active, dans les différentes conditions testées.

35 Les 3 enzymes **PHLD.Mma** (de *Mycobacterium marinum*), **PHLD.Nf** (de *Nocardia farcinica*) et **PHLD.Gh** (de *Gordonia hydrophobica*) sont également significativement très actives.

La présente invention fournit donc plusieurs nouvelles voies originales et avantageuses de biosynthèse du phloroglucinol chez la levure.

### 2.3. Observations complémentaires

5

L'étude réalisée par les Inventeurs et rapportée ici a permis d'identifier **10 nouvelles enzymes** présentant une activité phloroglucinol synthase. Ces 10 nouvelles phloroglucinol synthase proviennent de bactéries gram+ de l'ordre des *Actinomycétales* dont le genre *Tsukamurella* (PHLD.Tt, PHLD.Tps, PHLD.Tpu, PHLD.Tsp, PHLD.Tp), le genre *Nocardia* (PHLD.Nf) ; le genre  
10 *Mycobacterium* (PHLD.Mma, PHLD.Mt et PHLD.Mk) et le genre *Gordonia* (PHLD.Gh) et n'ont jamais été décrites jusque-là comme produisant du phloroglucinol.

Ces résultats démontrent donc pour la première fois et de manière univoque qu'il est possible de synthétiser du phloroglucinol en cellules de levure.

15

Il est important de noter que le phloroglucinol synthétisé est sécrété à plus de 95 % dans le milieu de culture par les cellules de levure. Cette sécrétion particulièrement efficace est très favorable à la mise en œuvre d'un procédé de bio-production du phloroglucinol.

20

Les phloroglucinol synthases des bactéries actinomycètes du genre *Tsukamurella* seraient les plus actives d'après les résultats obtenus à ce jour. En effet, les résultats obtenus montrent que les enzymes PHLD de *Tsukamurella sp.*, exprimées au sein de cellules de levure, sont au moins 10 fois plus actives que la phloroglucinol synthase de l'algue brune *Ectocarpus siliculosus* de l'art antérieur, dans les conditions testées.

25

Les enzymes PHLD de *Tsukamurella sp.* pourraient donc représenter des enzymes de choix pour mettre en œuvre un procédé de bio-production du phloroglucinol chez la levure *S. cerevisiae*. Enfin, les enzymes identifiées par les Inventeurs sont originales en termes d'espèces d'origine et en termes de séquences protéiques. En effet, il est montré pour la première fois que des  
30 bactéries Gram+ codent des phloroglucinol synthase fonctionnelles. En outre, la séquence protéique de l'enzyme la plus active dans les conditions expérimentales testées par les Inventeurs, PHLD.Tpu de *Tsukamurella pulmonis*, diffère de manière significative de la séquence de l'enzyme connue PKS1.Es d'*Ectocarpus siliculosus* (différence de plus de 63 %, Tableau 3).

35

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Achkar J et al., (2005) « Biosynthesis of phloroglucinol » *J Am Chem Soc.* **127**:5332-5333.

Meslet-Cladière L, Delage L, Leroux CJ, Goulitquer S, Leblanc C, Creis E, Gall EA, Stiger-  
5 Pouvreau V, Czjzek M, and Potin P. (2013) "Structure/function analysis of a type III polykétide  
synthase in the brown alga *Ectocarpus siliculosus* reveals a biochemical pathway in  
phlorotannin monomer biosynthesis." *Plant Cell.* **25**:3089-3103.

Zha W, Rubin-Pitel SB and Zhao H. (2006) "Characterization of the substrate specificity of  
PHLD, a type III polykétide synthase from *Pseudomonas fluorescens*." *J Biol Chem.* **281**:32036-  
10 32047.

## REVENDICATIONS

1. Utilisation d'au moins un polypeptide choisi parmi les polyketide synthases de type III de bactéries, comme phloroglucinol synthase, à l'exclusion de la polyketide synthase de type III de *Pseudomonas fluorescens* PHLD.Pf.  
5
2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que ledit polypeptide est choisi parmi les polyketide synthases de type III de bactéries actinomycètes.  
10
3. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que ledit polypeptide comprend au moins une séquence d'acides aminés ayant au moins 50% d'identité avec une séquence choisie parmi SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 et SEQ ID NO: 10.  
15
4. Utilisation selon la revendication 2 ou 3, caractérisée en ce que lesdites bactéries actinomycètes Gram+ sont choisies dans le groupe constitué par *Tsukamurella sp.*, *Nocardia sp.*, *Mycobacterium sp.* et *Gordonia sp.*, en particulier *Tsukamurella pulmonis*, *Tsukamurella paurometabola* *Tsukamurella tyrosinosolvans*, *Tsukamurella pseudospumae*, *Tsukamurella sp.* 1534, *Nocardia farcinica*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium tuberculosis* et *Gordonia hydrophobica*.  
20
5. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que ledit polypeptide comprend au moins une séquence d'acides aminés ayant au moins 60% d'identité, de préférence encore au moins 65% d'identité, de manière encore préférée au moins 70% d'identité, de manière encore plus préférée au moins 75% d'identité, de manière toujours plus préférée au moins 80% d'identité, de manière plus préférentielle encore au moins 85% d'identité, de manière encore plus préférentielle au moins 90% d'identité, de manière davantage préférée au moins 95% d'identité, de manière encore préférée au moins 96% d'identité, de manière encore plus préférée au moins 97% d'identité, de manière toujours plus préférée au moins 98% d'identité, et de manière plus préférentielle encore au moins 99% d'identité, avec une séquence choisie parmi SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 et SEQ ID NO: 10.  
25  
30
6. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que ledit polypeptide comprend au moins une séquence d'acides aminés choisie parmi SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 et SEQ ID NO: 10.  
35

7. Molécule d'acides nucléiques isolée comprenant au moins une séquence d'acides nucléiques codant un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 6 et comprenant en outre un promoteur contrôlant l'expression de ladite au moins une séquence d'acides nucléiques.
8. Molécule d'acides nucléiques isolée selon la revendication 7, caractérisée en ce que le promoteur est un promoteur exogène, en particulier un promoteur de levure.
9. Molécule d'acides nucléiques isolée comprenant au moins une séquence d'acides nucléiques codant un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 6 et comprenant en outre un terminateur contrôlant l'expression de ladite au moins une séquence d'acides nucléiques.
10. Molécule d'acides nucléiques isolée selon la revendication 9, caractérisée en ce que le terminateur est un terminateur exogène, en particulier un terminateur de levure.
11. Molécule d'acides nucléiques isolée selon la revendication 7 ou 8, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un terminateur de transcription de ladite séquence d'acides nucléiques, de préférence un terminateur exogène, tel qu'un terminateur de levure.
12. Vecteur comprenant au moins une molécule d'acides nucléiques selon l'une quelconque des revendications 7 à 11, ledit vecteur étant de préférence un plasmide.
13. Cellule hôte comprenant au moins une molécule d'acides nucléiques selon l'une quelconque des revendications 7 à 11, ou au moins un vecteur selon la revendication 12.
14. Cellule hôte selon la revendication 13, caractérisée en ce que ladite cellule hôte est un microorganisme sélectionné parmi les bactéries, levures, champignons, algues, cyanobactéries, de préférence une levure, ladite levure étant en particulier sélectionnée parmi les genres *Saccharomyces*, *Candida*, *Ashbya*, *Dekkera*, *Pichia* (*Hansenula*), *Debaryomyces*, *Clavispora*, *Lodderomyces*, *Yarrowia*, *Zigosaccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspota*, *Kluyveromyces*, *Brettanomyces*, *Cryptococcus* et *Malassezia* ; de manière plus particulière parmi les espèces *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces bayanus*, *Zigosaccharomyces bailii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Dekkera brucelensis*, *Dekkera intermedia*, *Brettanomyces custersii*, *Brettanomyces intermedius*, *Kluyveromyces themotolerens*, *Torulaspota globosa* ou *Torulaspota glabrata* ;

encore plus particulièrement, la levure est du genre *Saccharomyces*, de préférence de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*.

5 15. Cellule hôte selon la revendication 13 ou 14, dans laquelle au moins une copie de ladite molécule d'acides nucléiques est intégrée dans le génome de ladite cellule hôte.

16. Méthode pour produire du phloroglucinol, comprenant les étapes consistant en :

10 (i) la mise en contact d'une cellule hôte exprimant le polypeptide à activité de phloroglucinol synthase tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 6, par exemple une cellule hôte selon l'une quelconque des revendications 13 à 15, avec un substrat approprié ;

15 (ii) la culture *in vitro* de la cellule hôte de l'étape (i) dans des conditions permettant la croissance de ladite cellule hôte et/ou l'expression de la molécule d'acides nucléiques contenue dans ladite cellule hôte, de manière à produire du phloroglucinol ;

(iii) optionnellement la récupération du milieu de culture comprenant le phloroglucinol, obtenu après l'étape (ii) ; et

20 (iv) optionnellement, la purification du phloroglucinol à partir du milieu de culture de l'étape (iii).

17. Méthode pour produire du phloroglucinol, comprenant au moins les étapes consistant en :

(i) la mise en contact d'au moins un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 6 avec un substrat approprié ;

25 (ii) l'incubation du mélange issu de l'étape (i) dans des conditions adaptées pour produire du phloroglucinol ;

(iii) optionnellement la récupération du milieu réactionnel comprenant le phloroglucinol, obtenu après l'étape (ii) ; et

30 (iv) optionnellement, la purification du phloroglucinol à partir du milieu réactionnel de l'étape (iii).

Fig. 1

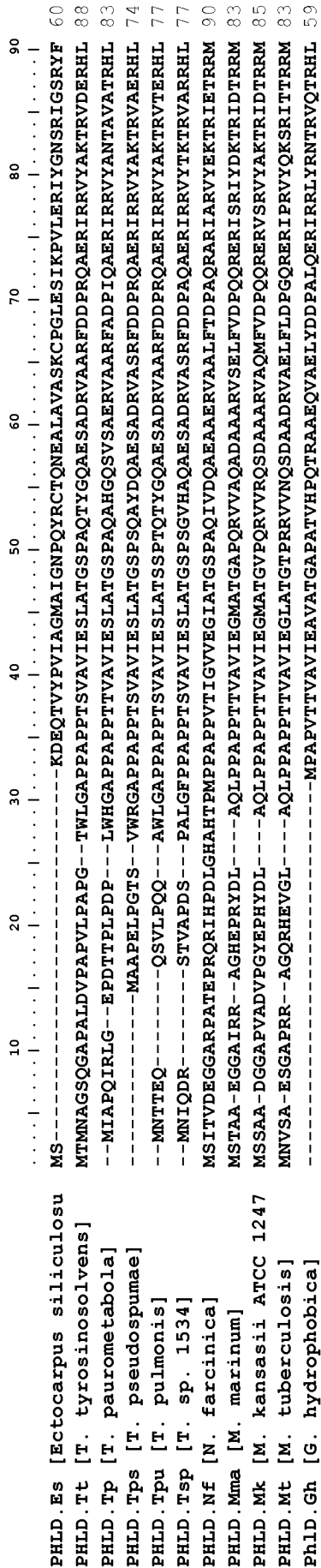


Fig. 1 Suite

	110	120	130	140	150	160	170	180	190
PHLD.1a [ <i>E. salicolicolus</i> ]	GRANKDPLFYPADGQSYQVYVLDKFKKAVFLVSVVARRPAIKE	AGLWVDEISKLVVYVSTGFLGSLDCELLKNDLGLVRS							
PHLD.1a1 [ <i>C. minutus</i> ]	EVDFEQQ	PSNKRQMDLYAERHAFVLAIVTAKALAIATLAKNRQERENDTKIKEDISGLIVFTVSTGFLAFQVETKVIENHGLGRN							
PHLD.1b [ <i>T. tyrosinosolvens</i> ]	EFKPFSTR	EDTVREMDLFFYHAAFLAVDTARRALG	HEFDREVSGQLVFTVSTGFLAFQVETKVIENHGLGRN						
PHLD.1c [ <i>T. paurometabolae</i> ]	DFADRKA	PDIIKQMDLYFERRAFLAIEIARRALG	AVDAIEVSQLIFVTSIGFLAFQVETKVIENHGLGRN						
PHLD.1d [ <i>T. pseudospumae</i> ]	EFRAFSTR	EDTIERMDLFFHAAFLAIDTARRALG	TVDRPVGQLVFTVSTGFLAFQVETKVIENHGLGRN						
PHLD.1e [ <i>T. pulmonis</i> ]	EFKAFSRA	EDTVREMDLFFHAAFLAIEIARRALG	DMAAIEISQLVFTVSTGFLAFQVETKVIENHGLGRN						
PHLD.1f [ <i>T. sp. 1534</i> ]	DERAFSTR	EDTIERMDLFAHHSFLAVDTARRALG	AVDRPVGQLVFTVSTGFLAFQVETKVIENHGLGRN						
PHLD.1g [ <i>M. farcinica</i> ]	EFKSTFQQ	PSILREMDLFFYHAAFLAVDTARRALG	SCAAADIGLLVFTVSTGFLAFQVETKVIENHGLGRN						
PHLD.1h [ <i>M. marinum</i> ]	EFDFEPE	FATIERMDLFFYHAAFLAVDTARRALG	LPYAFDEIGLLVFTVSTGFLAFQVETKVIENHGLGRN						
PHLD.1k [ <i>M. kansasii</i> ATCC 1247	EFDAFEE	FATIERMDLFFYHAAFLAVDTARRALG	LSYGADEIGLLVFTVSTGFLAFQVETKVIENHGLGRN						
PHLD.1l [ <i>M. tuberculosis</i> ]	KEDVFEPE	FATIERMDLFFYHAAFLAVDTARRALG	LPYPAEIGLLVLAIVTSTGFLAFQVETKVIENHGLGRN						
PHLD.1m [ <i>G. hydrophobica</i> ]	EFQKESRR	FATVTRPMNXYHHAHAFVLAIVDTARRALG	VIEPATEIGQLIFVTSIGFLAFQVETKVIENHGLGRN						



Fig. 1 Suite

	310	320	330	340	350	360	370	380	390
	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
PHL.D.Es [E. siliculosus]	KFWGICILSKELPQYIANKIAFFAGFLAKKH-LGRDQVDFWCVHFGGRRIIEEAQMGCLSEIEQIADSWAVLGEYGMMLSPFVLSRVFKR								
PHL.D.Cwi [C. minutus]	QANGICQLSPQIPGYIEAGVDPRIITIFLSEHQ-LAKADIDLMAVHFGGIRIIEEKVQRSICLIDEQVDSWEILLREYKRVLSCAVILFLEKMLIR								
PHL.D.It [I. tyrosinoscolvens]	NANGITCELAESELPQYIIVGVAEVIQEVLRND-LGREAVAHMAIHESGPKIIESAAIALSLPDEASPISEWVLAHGHMMLSVSLIFVLERLLAQ								
PHL.D.Tp [T. paucometabola]	NANGITCELAESELPRIYILDVSPVINGVLARMS-LGREVYAHMAIHESGPKIIESASALSLFESASQTSWAVLAHGHMMLSVSLIFVLERLLAQ								
PHL.D.Tps [T. pseudospyraeae]	NADGITCELAESELPQYIIVGVAEVIQEVLRNG-LERDAVHMAIHESGPKIIESASTALSLDEASLSWVLAHGHMMLSVSLIFVLERLLAQ								
PHL.D.Tpu [T. palmonis]	NANGITCELAESELPQYIIVGVAEVIQEVLRNG-LGREAVAHMAIHESGPKIIESAAIALSLPDDASPLSWEVLAHGHMMLSVSLIFVLERLLAQ								
PHL.D.Tpp [T. sp. 1634]	NANGITCELAESELPRIYIVDQVSPVINGVLARMS-LGHAEVYAHMAIHESGPKIIESASALSLFAASATSWQVLAHGHMMLSVSLIFVLERMLSG								
PHL.D.Mf [M. farcinica]	DHNGITCELSENLEPRYIIRGVDVFWAEVLRNG-LRKSIDIDLMAIHESGPKIIESVRSLSLSEFQRAFSWVLAHGHMMLSVSLIFVLEQMIAG								
PHL.D.Mma [M. marinum]	NHDGITCELSENLEPRYIIVRSVDVFWAEVLRNG-LSKADIDLMAIHESGPKIIEIQSARSLIPVGRATQSWVLAHGHMMLSVSLIFVLEMMVAQ								
PHL.D.Mk [M. kansasii ATCC 1247]	NHDGITCELSENLEPQYIIVGVAEVIQEVLRNG-LQQSDIDLMAIHESGPKIIEIQSVRSLSLIGVECAKPSWVLAHGHMMLSVSLIFVLEMMVQQ								
PHL.D.Mt [M. tuberculosis]	NHNGITCELSENLEPQYIIVGVAEVIQEVLRNG-LQISDIDLMAIHESGPKIIEIQSVRSLSLSAEIAGQSWVLAHGHMMLSVSLIFVLETMVQQ								
PHL.D.Sh [S. hydrophobica]	NEDGITCELAESELPQYIIVGVAEVIQEVLRNG-LRRDRIAHMAIHESGPKIIEIQSVVALELFFDRAITSWEVLAHGHMMLSVSLIFVLEKLIAG								



Fig. 2

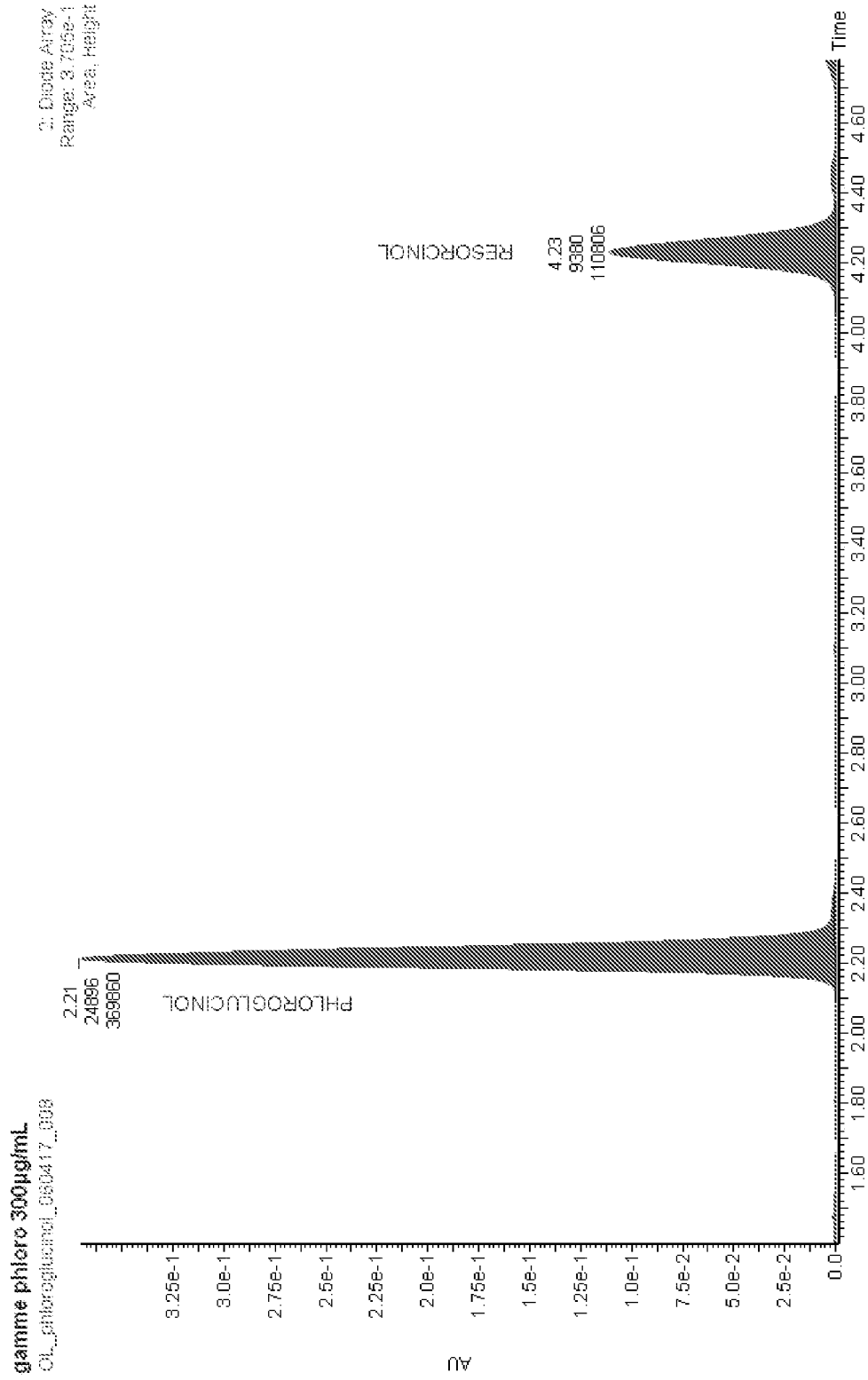


Fig. 3



Fig. 4A

Gène	phloroglucinol mg.L <sup>-1</sup>	DO <sub>600nm</sub>	nombre de copies	Phloroglucinol /copie (mg.L <sup>-1</sup> )
PHLD.Pf	0	50	7	0
PKS1.Es	64	51	9	7
PHLD.Tp	430	36	6	71
PHLD.Nf	465	48	17	27
PHLD.Mma	380	41	17	22
PHLD.Mk	155	45	28	5

Fig. 4B

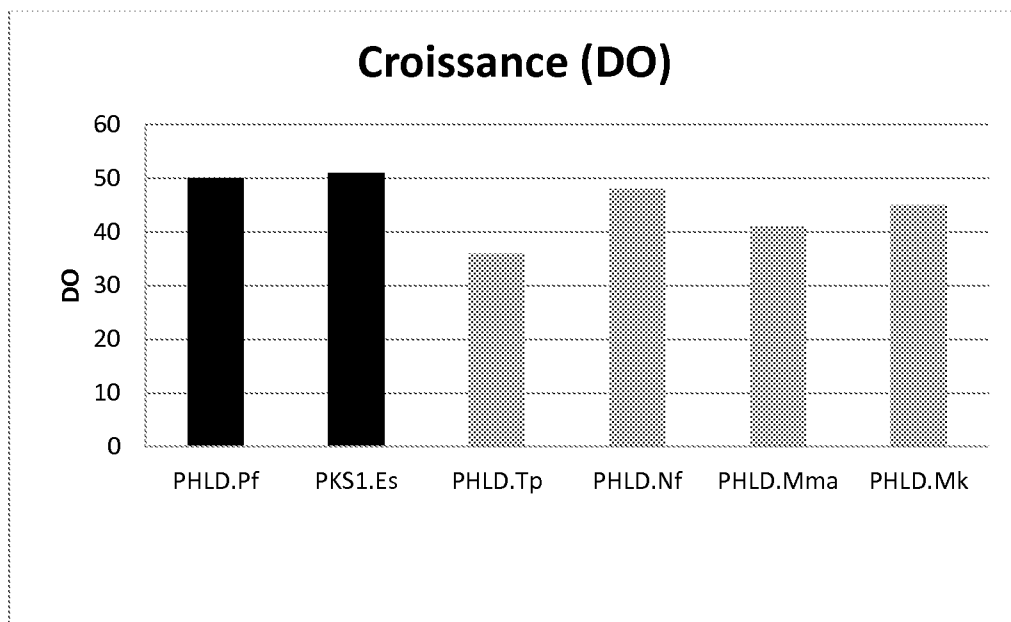


Fig. 4C

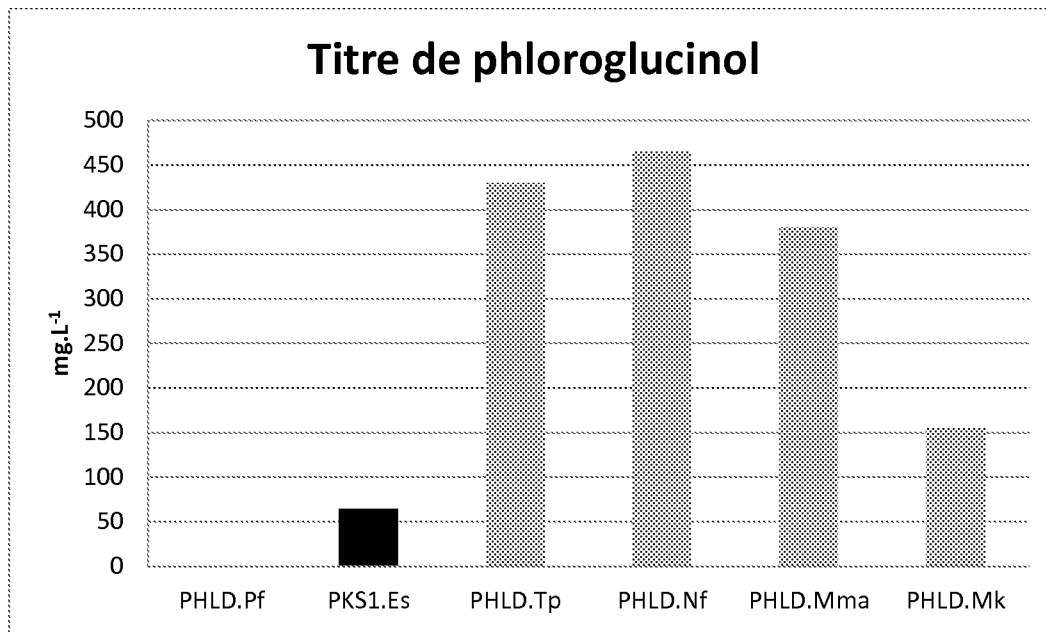


Fig. 4 D

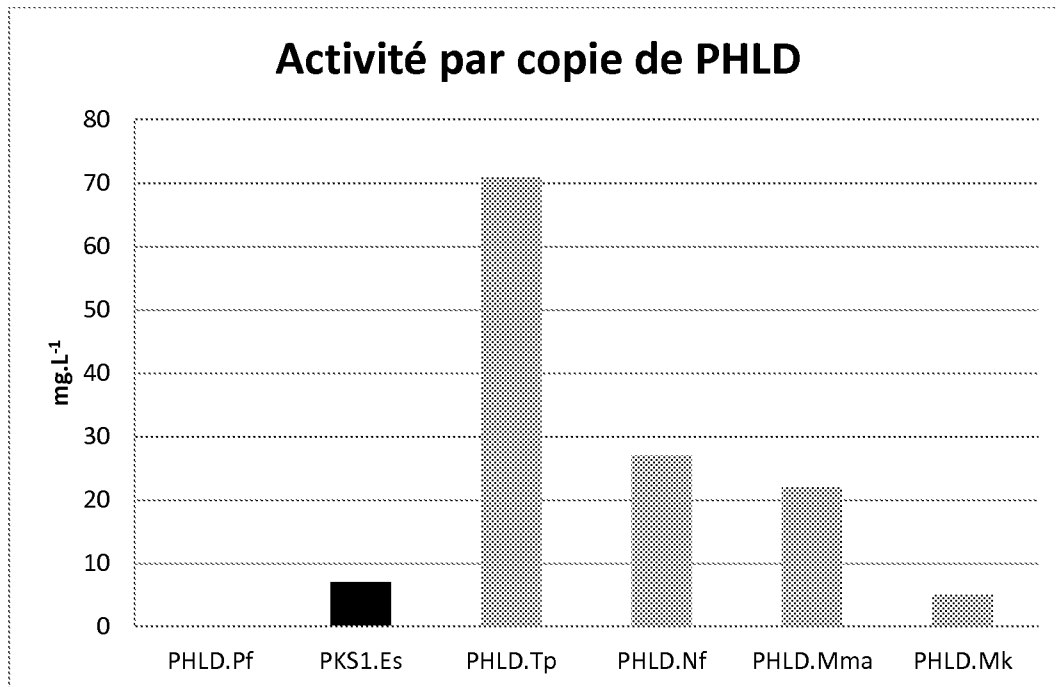


Fig. 5

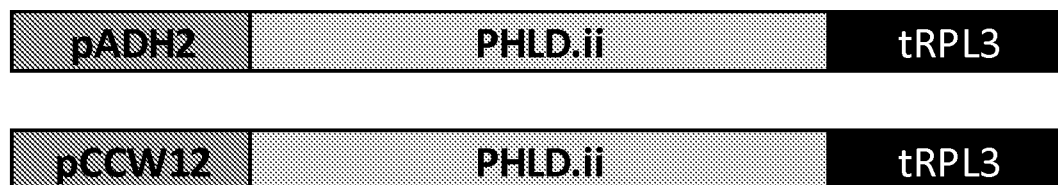


Fig. 6A

PHLD	phloroglucinol mg.L <sup>-1</sup>		DO 600nm	nombre de copies
	moyenne	écart type		
pADH2-PHLD.Pf	0,0	0,0	54	1
pADH2-PKS1.Es	2,7	1,0	57	1
pADH2-PHLD.Tp	86,0	16,0	56	1
pADH2-PHLD.Tt	220,0	6,0	59	1
pADH2-PHLD.Tps	41,0	2,2	55	1
pADH2-PHLD.Tpu	301,0	4,7	56	1
pADH2-PHLD.Tsp	131,0	5,6	56	1
pADH2-PHLD.Nf	40,0	7,2	54	1
pADH2-PHLD.Mma	49,6	9,7	58	1
pADH2-PHLD.Mk	6,0	0,5	57	1
pADH2-PHLD.Mt	17,5	11,0	51	1
pADH2-PHLD.Gh	24,8	6,7	59	1

Fig. 6B

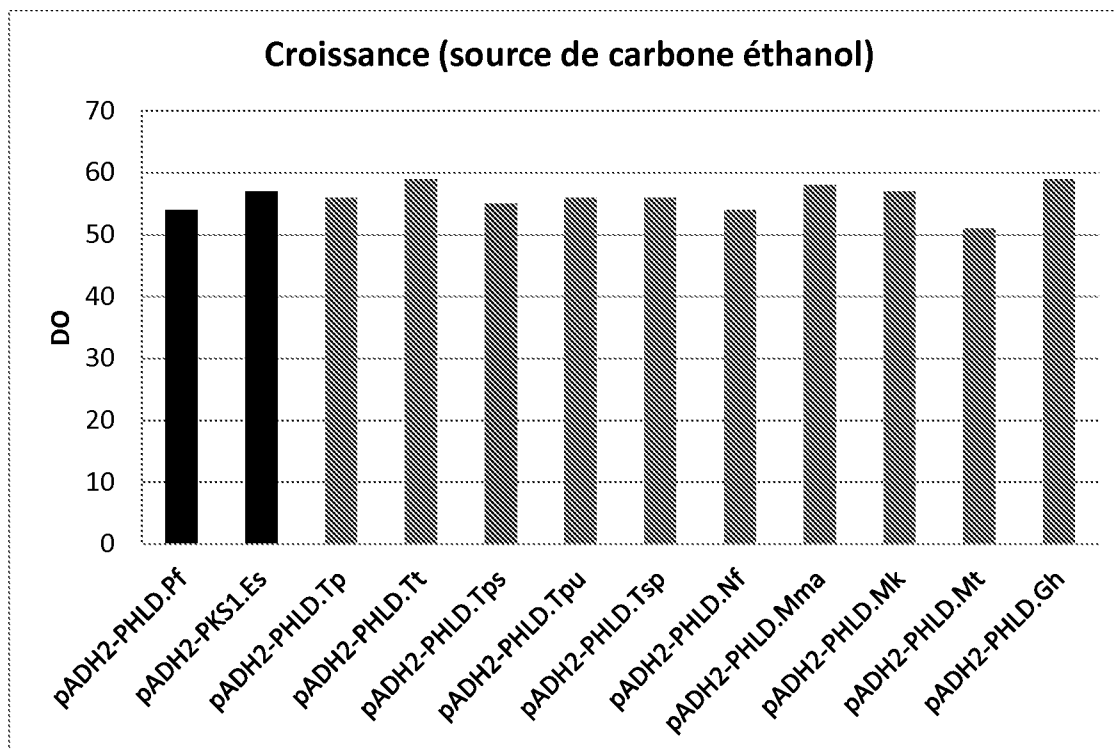


Fig. 6C

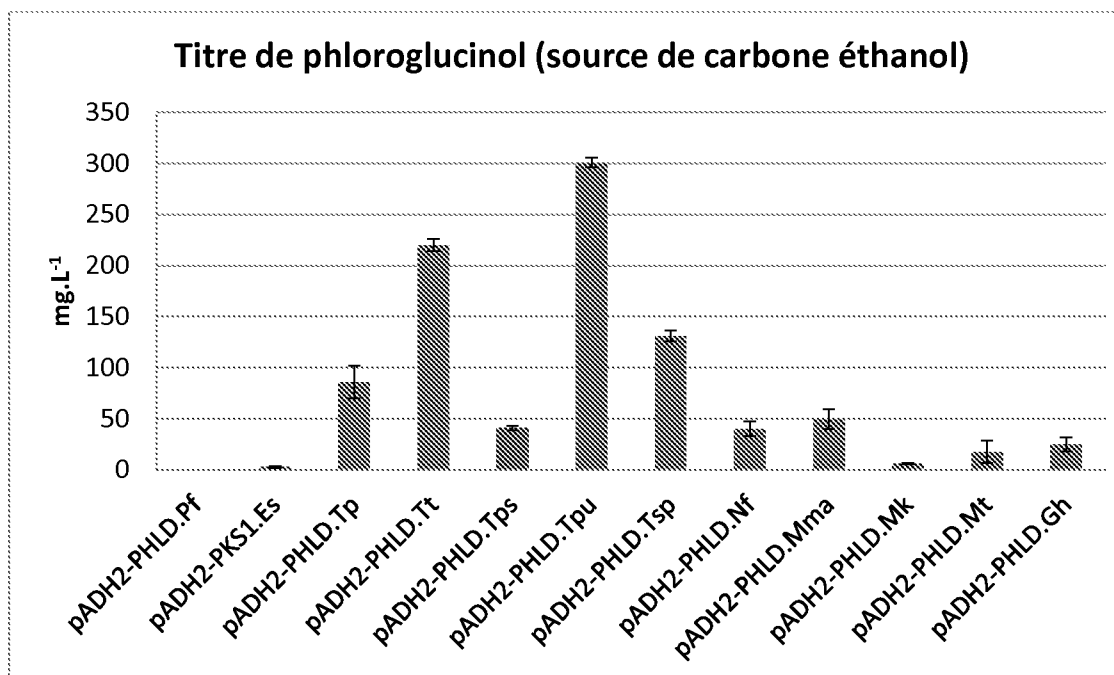


Fig. 7A

PHLD	phloroglucinol mg.L <sup>-1</sup>		DO 600nm	nombre de copies de gènes PHLD
	moyenne	écart type		
pCCW12-PHLD.Pf	0,0	0,0	57	1
pCCW12-PKS1.Es	8,4	2,7	57	1
pCCW12-PHLD.Tp	88,4	10,7	67	1
pCCW12-PHLD.Tt	340,3	28,0	63	1
pCCW12-PHLD.Tps	83,0	2,2	56	1
pCCW12-PHLD.Tpu	392,0	4,7	56	1
pCCW12-PHLD.Tsp	131,0	5,6	58	1
pCCW12-PHLD.Nf	11,4	3,5	61	1
pCCW12-PHLD.Mma	54,0	28,2	57	1
pCCW12-PHLD.Mk	5	0,5	56	1
pCCW12-PHLD.Mt	15,9	8,1	60	1
pCCW12-PHLD.Gh	31,6	18,4	57	1

Fig. 7B

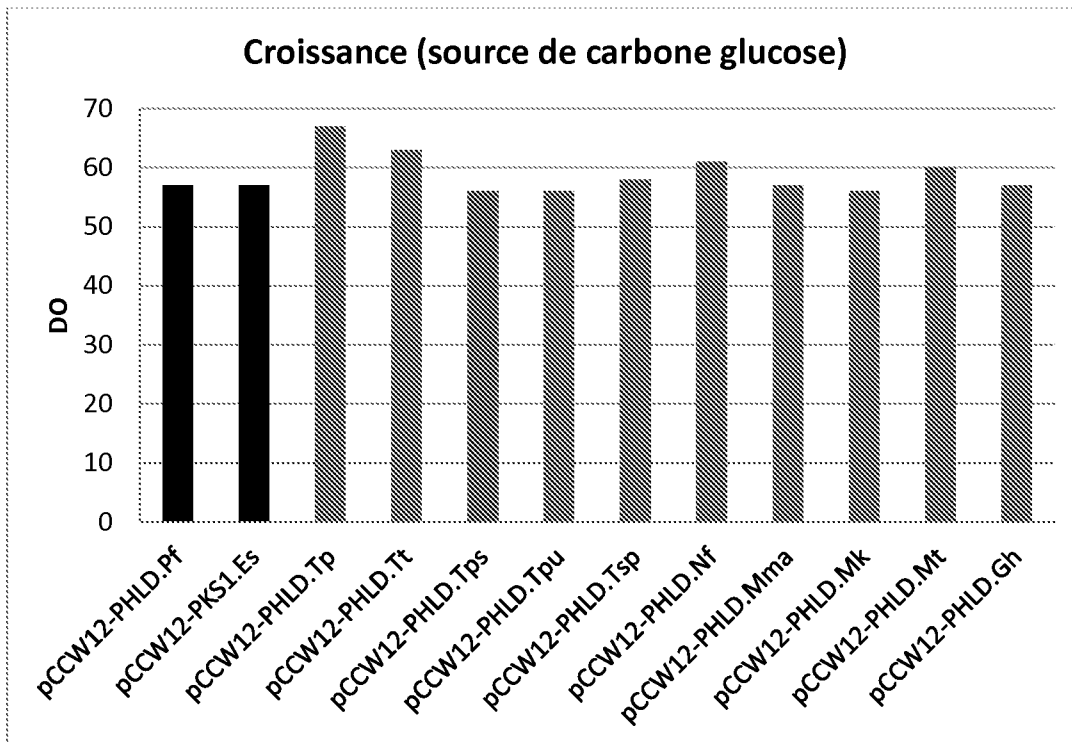


Fig. 7C

