

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication : **2 862 068**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **03 13056**

⑤1 Int Cl⁷ : C 12 N 15/09, C 12 N 1/21, 1/19, C 12 P 7/18, 33/16 /
/ (C 12 N 1/19, C 12 R 1:865) (C 12 N 1/21, C 12 R 1:19)
(C 12 P 7/18, C 12 R 1:865) (C 12 P 7/18, C 12 R 1:19) (C 12 P
33/16, C 12 R 1:865)

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 06.11.03.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 13.05.05 Bulletin 05/19.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : METABOLIC EXPLORER — FR.

⑦2 Inventeur(s) : BOISART CEDRIC, CHATEAU
MICHEL, GONZALEZ BENJAMIN, SOUCAILLE PHI-
LIPPE NOEL PAUL et ZINK OLIVIER.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : REGIMBEAU.

⑤4 SOUCHES DE MICROORGANISMES OPTIMISEES POUR DES VOIES DE BIOSYNTHESES
CONSOMMATRICES DE NADPH.

⑤7 La présente invention concerne des souches de mi-
croorganismes optimisées pour la production par biotrans-
formation de molécules ayant des voies de biosynthèse
consommatrices de NADPH. Les souches selon l'invention
sont utilisables dans des procédés de biotransformation
consommatrices de NADPH. Les souches définies selon
l'invention peuvent être procaryotiques ou eucaryotiques.
Les souches selon l'invention sont caractérisées en ce quel-
le comprennent une délétion du gène *udhA* et/ou du gène
qor et/ou du gène *pgi*, à la condition que lorsque ledit mi-
croorganisme est une bactérie, elle comprend au moins une
délétion choisie parmi le gène *udhA* ou le gène *qor*.

FR 2 862 068 - A1



La présente invention concerne des souches de microorganismes optimisées pour la production par biotransformation de molécules ayant des voies de biosynthèse consommatrices de NADPH. Les souches selon l'invention sont utilisables dans des procédés de biotransformation consommatrices de NADPH. Les souches définies selon
5 l'invention peuvent être procaryotiques ou eucaryotiques. Dans un mode de réalisation préféré, ladite souche procaryotique est une souche *d'E. coli*. Dans un autre mode de réalisation, ladite souche eucaryotique est une souche de *Saccharomyces*, en particulier *S. cerevisiae*.

La présente invention concerne également un procédé de préparation de
10 molécules par biotransformation comprenant la culture dans un milieu approprié d'une souche optimisée selon l'invention, ladite souche optimisée comprenant également les éléments génétiques nécessaires à la préparation de ladite molécule.

Les procédés de biotransformation ont été développés pour permettre la production de molécules en grande quantité à des coûts faibles, tout en permettant
15 également la valorisation de différents sous-produits industriels ou de l'agriculture.

Pour produire des molécules d'intérêt par biotransformation *in vivo* on distinguera deux grandes approches :

- d'une part la fermentation qui permet la production de molécules par un microorganisme à partir d'une source de carbone simple (*e.g.* WO0102547 qui décrit
20 la production de lysine par fermentation de *C. glutamicum* en présence de glucose),
- d'autre part la bioconversion par un microorganisme d'un co-substrat donné en une molécule d'intérêt (*e.g.* WO0012745 qui décrit la production de dérivés R-pipéridine, WO0068397 qui décrit la production de tagatose) Le co-substrat est non assimilable ; il est différent de la source de carbone qui est utilisé seulement pour
25 produire la biomasse et le NADPH nécessaire à la bioconversion.

L'amélioration d'un procédé de biotransformation peut porter sur différents facteurs comme la température, l'oxygénation, la composition du milieu, le procédé de récupération, etc. On peut aussi envisager de modifier le microorganisme de telle sorte que la production de la molécule d'intérêt et/ou son excrétion soit augmentée.

Dans le cadre d'une fermentation on s'attachera par exemple à optimiser la voie de biosynthèse, par exemple en modifiant la régulation des gènes ou en modifiant le gène afin de modifier les caractéristiques enzymatiques ou encore en optimisant la régénération des cofacteurs.

5 Dans le cadre de la bioconversion on s'attachera davantage à réduire la formation de co-produits et à optimiser la régénération de cofacteurs impliqués dans la ou les étapes de bioconversion.

Parmi les cofacteurs impliqués dans les biotransformations, le NADPH prend une part importante notamment pour la production des acides aminés (*e.g.* arginine, 10 proline, isoleucine, méthionine, lysine), de vitamine (*e.g.* panthotenate, phyloquinone, tocopherol), de molécules aromatiques (*e.g.* WO9401564), de polyols (*e.g.* xylitol), de polyamine (*e.g.* spermidine) ou d'autres molécules à haute valeur ajoutée.

La présente invention concerne donc une souche de microorganismes optimisée pour la production de molécules ayant des voies de biosynthèse consommatrices de 15 NADPH.

Au lieu d'essayer d'optimiser pour chaque biotransformation le ratio NADPH/NADP dans le microorganisme, les inventeurs ont opté pour la production de microorganismes modifiés afin d'obtenir différents ratios NADPH/NADP, lesdits microorganismes modifiés étant ensuite employés pour réaliser les biotransformations 20 consommatrices de NADPH.

Le principe de l'optimisation du ratio NADPH/NADP consiste à limiter les activités enzymatiques impliquées dans l'oxydation du NADPH notamment au profit de la réduction du NAD ainsi qu'à favoriser les activités enzymatiques permettant la réduction du NADP en NADPH. On limite les activités impliquées dans l'oxydation du 25 NADPH au profit de la réduction du NAD en diminuant, plus particulièrement en inactivant, les activités transhydrogénase (UdhA, Qor). On favorise les activités enzymatiques permettant la réduction du NADP en imposant le flux de carbone via le cycle des pentoses phosphate et/ou en modifiant la spécificité de co-facteur d'une enzyme de telle sorte qu'elle utilise le NADP préférentiellement au NAD, son cofacteur 30 habituel.

Par souche de microorganismes, on entend selon l'invention un ensemble de microorganismes d'une même espèce comprenant au moins un microorganisme de ladite espèce. Ainsi, les caractéristiques décrites pour la souche s'appliquent à chacun des microorganismes de ladite souche. De même, les caractéristiques décrites pour l'un des
5 microorganismes de la souche s'appliqueront à l'ensemble desdits microorganismes la composant.

Parmi les microorganismes optimisés selon l'invention, on citera les bactéries et les levures, les champignons filamenteux et notamment les bactéries et les levures des espèces suivantes : *Aspergillus sp.*, *Bacillus sp.*, *Brevibacterium sp.*, *Clostridium sp.*,
10 *Corynebacterium sp.*, *Escherichia sp.*, *Gluconobacter sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Rhodococcus sp.*, *Saccharomyces sp.*, *Streptomyces sp.*, *Xanthomonas sp.*, *Candida sp.*

L'optimisation du NADPH est décrite ci-après pour *E. coli* et *S. cerevisiae*. Le même principe peut être appliqué de manière similaire à tous les microorganismes cultivés en conditions aérobies.

15 Les souches optimisées pour la production de NADPH (*i.e.* capacité accrue de réduction du NADP+) selon l'invention comprennent une délétion du gène *udhA* et/ou du gène *gor*. Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, les gènes *udhA* et *gor* sont tous deux délétés.

Par « délétion », on entend selon l'invention une suppression de l'activité du
20 gène « délété ». Cette suppression peut être une inactivation du produit d'expression du gène concerné par un moyen approprié, ou bien l'inhibition de l'expression du gène concerné, ou encore la délétion d'au moins une partie du gène concerné de manière soit que son expression n'ait pas lieu (par exemple délétion d'une partie ou de l'ensemble de la région promotrice nécessaire à son expression) soit que le produit d'expression ait
25 perdu sa fonction (par exemple délétion dans la partie codante du gène concerné).

De manière préférentielle, la délétion d'un gène comprend la suppression de l'essentiel dudit gène, et le cas échéant son remplacement par un gène marqueur de sélection permettant de faciliter l'identification, l'isolement et la purification des souches optimisées selon l'invention.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, la souche optimisée selon l'invention comprend également une délétion d'un gène pris parmi *pgi* ou *pfkA* et/ou *pfkB* et/ou une modification d'au moins un gène pris parmi *lpd*, *gapA* ; la modification consistant à modifier la préférence de l'enzyme au profit du NADP au lieu du NAD, son

5 cofacteur habituel.

Les souches selon l'invention ayant la délétion du gène *pfkA* sont plus particulièrement adaptées pour les procédés de biotransformation.

Pour augmenter davantage la quantité de NADPH disponible dans les microorganismes optimisés selon l'invention, il peut être également avantageux de

10 surexprimer au moins un gène choisi parmi *zwf*, *gnd*, *pntA*, *pntB*, *icd* et/ou de déléter au moins un gène choisi parmi *edd*, *aceA*, *aceB*, *aceK*.

Les gènes ci-dessus sont bien connus de l'homme du métier et décrits dans la littérature scientifique, notamment pour *E. coli* et *S. cerevisiae* :

Gènes et références dans *E. coli* :

- 15 *udhA* : X66026 soluble pyridine transhydrogenase;
gor : L02312 quinone oxidoreductase;
pgi : X15196 phosphoglucose isomerase (EC 5.3.1.9);
pfkA : X02519 phosphofructokinase-1;
pfkB : K02500 phosphofructokinase-2 ;
- 20 *edd* : X63694 6-phosphogluconate dehydratase ;
aceA : X12431 isocitrate lyase (EC 4.1.3.1);
aceB : X12431 malate synthase (EC 4.1.3.2);
aceK : M18874 isocitrate dehydrogenase kinase/phosphatase ;
zwf : M55005 glucose 6-phosphate dehydrogenase;
- 25 *gnd* : K02072 6-phosphogluconate dehydrogenase;
pntAB : X04195 pyridine nucleotide transhydrogenase subunits alpha and beta (EC 1.6.1.1.);
icd : J02779 isocitrate dehydrogenase.
lpd : V01498 lipoamide dehydrogenase (= EC 1.8.1.4) impliquée dans le complexe
- 30 Pyruvate dehydrogenase;

gapA : [AE000273](#) (201...1196) glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A (EC 1.2.1.12).

Gènes et références dans *S. cerevisiae* :

zta1 : [NC_001134](#) NADPH:quinone reductase ;

pgi1 : [NC_001134](#) Phosphoglucoisomerase;

5 *pfk1* : [M26943](#) phosphofructokinase, alpha subunit ;

pfk2 : [M26944](#) phosphofructokinase, beta subunit;

tdh1 : [NC_001142](#) glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase;

tdh2: [NC_001142](#) glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase;

tdh3: [NC_001139](#) glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase.

10 Les gènes susceptibles d'être délétés ou surexprimés pour les souches optimisées selon l'invention sont définis principalement par l'emploi de la dénomination du gène de *E. coli*. Cependant, cet emploi a une signification plus générale selon l'invention et englobe les gènes correspondants d'autres microorganismes. En effet en utilisant les références GenBank des gènes d'*E. coli* , l'homme du métier est capable de déterminer

15 les gènes équivalents dans d'autres souches bactériennes qu'*E. coli*. Les moyens d'identification des séquences homologues et de leurs pourcentages d'homologie sont bien connus de l'homme du métier, comprenant notamment le programme BLAST qui peut être utilisé à partir du site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> avec les paramètres indiqués par défaut sur ce site. Les séquences obtenues peuvent alors être

20 exploitées (e.g. alignées) en utilisant par exemple les programmes CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) ou MULTALIN ((<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/cgi-bin/multalin.pl>), avec les paramètres indiqués par défaut sur ces sites.

Alternativement il est possible d'utiliser les PFAM ou les COG.

25 Les PFAM (Protein families database of alignments and Hidden Markov Models ; <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>) représentent une large collection d'alignements de sequences protéiques. Chaque PFAM permet de visualiser des alignements multiples, de voir des domaines protéiques, d'évaluer la répartition entre les organismes, d'avoir accès à d'autres bases de données, de visualiser des structures

30 connues de protéines.

Les COGs (Clusters of Orthologous Groups of proteins ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>) sont obtenus en comparant les séquences protéiques issus de 43 génomes complètement séquencés représentant 30 lignées phylogénétiques majeurs. Chaque COG est défini à partir d'au moins trois lignées ce qui permet ainsi
5 d'identifier des domaines conservés anciens.

Il est alors possible d'identifier des séquences consensus, et de dessiner des sondes dégénérées permettant de cloner le gène correspondant dans un autre organisme. Ces techniques de routine de biologie moléculaire sont bien connues dans l'art et sont décrites par exemple dans Sambrook *et al.* (1989 Molecular cloning : a laboratory
10 manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.).

Protéines analogues à la pyridine transhydrogenase soluble codée par *udhA* de *E. coli* (P27306)

- NP_709766 : soluble pyridine transhydrogenase [*Shigella flexneri* 2a str. 301]
E65203 : probable dehydrogenase (EC 1.8.1.-) *udhA* - *Escherichia coli* (strain K-12)
15 NP_463005 : soluble pyridine nucleotide transhydrogenase [*Salmonella typhimurium* LT2]
Q8ZA97: soluble pyridine nucleotide transhydrogenase (STH) *Yersinia pestis*
P57112: soluble pyridine nucleotide transhydrogenase (STH) *Pseudomonas aeruginosa* PA01]
20 AF159108: soluble pyridine nucleotide transhydrogenase (sth) gene, *Azotobacter vinelandii*
AAN67764: soluble pyridine nucleotide transhydrogenase [*Pseudomonas putida* KT2440]
AAB50562: soluble pyridine nucleotide transhydrogenase [*Pseudomonas fluorescens*]
25 U91523: soluble pyridine nucleotide, *Pseudomonas fluorescens*
NC_003143: probable *sthA*, *Yersinia pestis* strain CO92,
P50529 : soluble pyridine nucleotide transhydrogenase *Vibrio cholera*

Protéines analogue à la quinone oxidoreductase codée par *qor* de *S. cerevisiae* (P38230, Zta1)

- 30 E87715 : quinone oxidoreductase CC3759 [imported] - *Caulobacter crescentus*

T40981: probable quinone oxidoreductase - fission yeast (*Schizosaccharomyces pombe*)

BAB48079: quinone oxidoreductase [*Mesorhizobium loti*]

A70871 : quinone oxidoreductase - *Mycobacterium tuberculosis* (strain H37RV)

NP_699755: quinone oxidoreductase [*Brucella suis* 1330]

5 BAC49848 : quinone oxidoreductase [*Bradyrhizobium japonicum* USDA 110]

S52923: NADPH2: quinone reductase (EC 1.6.5.5) - *Pseudomonas aeruginosa*

AI0039: NADPH2: quinone reductase (EC 1.6.5.5) - *Yersinia pestis* (strain CO92)

S45529: NADPH2: quinone reductase (EC 1.6.5.5) - *Escherichia coli* (strain K-12)

La présente invention a également pour objet un microorganisme optimisé pour
10 la production de NADPH telle que définie ci-dessus et ci-après, lequel comprend également, un ou plusieurs gènes codant des enzymes impliqués dans la biotransformation d'une molécule d'intérêt, ainsi qu'un ou plusieurs gènes marqueurs de sélection.

Ces gènes peuvent être natifs de la souche optimisée selon l'invention ou encore
15 introduits dans la souche optimisée selon l'invention par transformation avec un vecteur approprié, soit par intégration dans le génome du microorganisme ou encore par un vecteur répliatif, ledit vecteur approprié portant un ou plusieurs gènes codant pour lesdites enzymes impliqués dans la biotransformation de ladite molécule d'intérêt et/ou lesdits marqueurs de sélection.

20 Ces gènes comprennent une séquence d'acide nucléique codant pour une enzyme impliquée dans la biotransformation de la molécule d'intérêt et/ou pour un marqueur de sélection, la séquence codante étant fusionnée à des séquences promotrices efficaces dans la cellule procaryote et/ou eucaryote choisie pour la biotransformation. Le vecteur (ou plasmide) peut-être un vecteur navette entre *E. coli* et un autre microorganisme.

25 La présente invention concerne également un procédé de préparation des souches optimisées selon l'invention telle que définie ci-dessus et ci-après, dans lequel on délète les gènes *udhA* et/ou *qor*, et le cas échéant on délète un gène pris parmi *pgi* ou *pfkA* et/ou *pfkB* et/ou on modifie au moins un gène codant des enzymes à NAD, en particulier *lpd* et/ou *gapA*, afin qu'elles utilisent préférentiellement le NADP (Bocanegra, J.A.
30 Scrutton, N.S. ; Perham, R.N. (1993) Creation of an NADP-dependent pyruvate

dehydrogenase multienzyme complex by protein engineering. *Biochemistry* **32** : 2737-2740), et le cas échéant on délète au moins un gène choisi parmi *edd*, *aceA*, *aceB*, *aceK* ; ces délétions et modifications étant réalisées par un moyen approprié, et/ou on surexprime au moins un gène choisi parmi *zwf*, *gnd*, *pntA*, *pntB*, *icd* soit en transformant
5 la souche avec un vecteur approprié permettant la surexpression, soit en modifiant la force du promoteur endogène contrôlant le gène à surexprimer.

Le choix de la souche optimisée pour le ratio NADPH/NADP sera déterminé en fonction du type de biotransformation (fermentation ou bioconversion), de la demande totale en NADPH de la voie de bioconversion considérée, de la nature de(s) source(s)
10 carbonée(s), de la demande en flux de biomasse, ...

La délétion du gène *pgi* ou *pfkA* et/ou *pfkB* devrait s'imposer lorsque l'on n'est pas capable de maîtriser la répartition du flux de carbone entre la glycolyse et la voie des pentoses phosphate. La délétion du gène *pgi* sera préférentiellement retenue pour les fermentations ou lorsque la demande en NADPH nécessite, au minimum, un flux de réduction de 2 moles de NADP par mole de glucose importée. La délétion du gène *pfkA* sera préférentiellement choisie pour les bioconversions ou lorsque la demande en NADPH nécessite, au minimum, un flux de réduction de 3-4 moles de NADP par mole de glucose importée. La modification, telle que décrite ci-dessus et ci-après, des gènes *lpd* et/ou *gapA* sera réalisée pour optimiser les souches *E. coli* $\Delta(\textit{udhA}, \textit{qor})$ ou *E. coli*
15 $\Delta(\textit{udhA}, \textit{qor}, \textit{pgi})$ ou *E. coli* $\Delta(\textit{udhA}, \textit{qor}, \textit{pfkA})$ et notamment lorsque les biotransformations nécessiteront un flux de réduction, au minimum, supérieur à 3 moles de NADP par mole de glucose importé. Les autres modifications citées, à savoir délétion d'au moins un gène pris parmi *edd*, *aceA*, *aceB*, *aceK* ou surexpression d'au moins un gène pris parmi *zwf*, *gnd*, *pntA*, *pntB*, *icd*, pourront être réalisées afin d'affiner
20 l'optimisation du ratio NADPH/NADP aux besoins de la cellule et du procédé de biotransformation considéré.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, le procédé de préparation des souches selon l'invention comprend également la transformation des souches optimisées avec au moins un vecteur approprié comprenant un ou plusieurs gènes codant

une ou des enzymes impliqués dans la biotransformation d'une molécule d'intérêt, ainsi qu'un ou plusieurs gènes marqueurs de sélection.

La souche optimisée pour la production de NADPH est obtenue par biologie moléculaire. L'homme du métier connaît les protocoles permettant de modifier le caractère génétique des microorganismes. Les techniques de transformation sont documentées et sont à la portée de l'homme du métier (Sambrook *et al.*, 1989 Molecular cloning : a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.).

L'inactivation d'un gène chez *E. coli* se fait préférentiellement par recombinaison homologe (Datsenko, K.A. ; Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97** : 6640-6645). Le principe d'un protocole en est rappelé brièvement : on introduit dans la cellule un fragment linéaire, obtenu *in vitro*, comprenant les deux régions flanquant le gène, et au moins un gène de sélection entre ces deux régions (généralement un gène de résistance à un antibiotique), ledit fragment linéaire présentant donc un gène inactivé. On sélectionne les cellules ayant subies un événement de recombinaison et ayant intégré le fragment introduit par étalement sur milieu sélectif. On sélectionne ensuite les cellules ayant subi un événement de double recombinaison, dans lesquelles le gène natif a été remplacé par le gène inactivé. Ce protocole peut être amélioré en utilisant des systèmes de sélections positive et négative, afin d'accélérer la détection des événements de double recombinaisons.

L'inactivation d'un gène chez *S.cerevisiae* se fait préférentiellement par recombinaison homologe (Baudin *et al.*, *Nucl. Acids Res.* **21**, 3329-3330, 1993; Wach *et al.*, *Yeast* **10**, 1793-1808, 1994; Brachmann *et al.*, *Yeast.* **14** :115-32, 1998).

La surexpression d'un gène peut être effectuée par changement du promoteur de ce gène *in situ*, par un promoteur fort ou inductible. De façon alternative, on introduit, dans la cellule, un plasmide répliatif (simple ou multicopies) dans lequel le gène que l'on désire surexprimer est sous le contrôle du promoteur adéquat. Dans le cas de modification d'*Escherichia coli*, on pourra par exemple utiliser les promoteurs *Plac-o*, *P_{trc}-o*, *ptac-o*, trois promoteurs forts bactériens pour lesquels l'opérateur lac (*lacO*) a été

déléché pour les rendre constitutifs. Dans le cas de modifications de *Saccharomyces cerevisiae*, on pourra par exemple utiliser les promoteurs *Ppgk*, *Padh1*, *Pgal1*, *Pgal10*.

Un autre aspect de l'invention concerne l'utilisation de ces souches optimisées selon l'invention pour les biotransformations NADPH-dépendantes permettant ainsi une
 5 amélioration du rendement de biotransformation par rapport à une souche non optimisée pour le NADPH.

Les biotransformations seront réalisées en utilisant des souches définies selon l'invention dans lesquelles seront exprimés des gènes codants des enzymes catalysant des réactions NADPH-dépendantes. L'homme du métier saura aisément identifier de
 10 telles enzymes, on citera pour exemples et sans que cette liste soit limitative les enzymes suivantes : EC 1.1.1.10 L-xylulose reductase, EC 1.1.1.51 3(or 17) β -hydroxysteroid dehydrogenase, EC 1.1.1.54 allyl-alcohol dehydrogenase, EC 1.1.1.80 isopropanol dehydrogenase, EC 1.1.1.134 dTDP-6-deoxy-L-talose 4-dehydrogenase, EC 1.1.1.149 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase, EC 1.1.1.151 21-hydroxysteroid dehydrogenase,
 15 EC 1.1.1.189 prostaglandin-E₂ 9-reductase, EC 1.1.1.191 indole-3-acetaldehyde reductase EC 1.1.1.207 (-)-menthol dehydrogenase, EC 1.1.1.234 flavanone 4-reductase, EC 1.2.1.50 long-chain-fatty-acyl-CoA reductase, EC 1.3.1.4 cortisone α -reductase, EC 1.3.1.23 cholestenone 5 β -reductase, EC 1.3.1.70 Δ^{14} -sterol reductase, EC 1.4.1.12 2,4-diaminopentanoate dehydrogenase, EC 1.5.1.10 saccharopine dehydrogenase, L-
 20 glutamate-forming, EC 1.7.1.6 azobenzene reductase, EC 1.8.1.5 2-oxopropyl-CoM reductase (carboxylating), EC 1.10.1.1 *trans*-acenaphthene-1,2-diol dehydrogenase, EC 1.14.12.3 benzene 1,2-dioxygenase, EC 1.14.12.8 4-sulfobenzoate 3,4-dioxygenase, EC 1.14.12.15 terephthalate 1,2-dioxygenase, EC 1.14.12.18 biphenyl 2,3-dioxygenase, EC 1.14.13.7 phenol 2-monooxygenase, EC 1.14.13.12 benzoate 4-monooxygenase, EC 1.14.13.26 phosphatidylcholine 12-monooxygenase, EC 1.14.13.64 4-hydroxybenzoate
 25 1-hydroxylase, EC 1.14.13.70 sterol 14-demethylase, EC 1.16.1.5 aquacobalamin reductase, EC 1.17.1.1 CDP-4-dehydro-6-deoxyglucose reductase, EC 1.18.1.2 ferredoxin—NADP reductase.

L'invention concerne aussi un procédé de production d'une molécule d'intérêt dont au moins une des réactions de la voie de biosynthèse est NADPH dépendante caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

5 a) mise en culture des microorganismes optimisés selon l'invention dans un milieu de culture approprié favorisant leur croissance et comprenant les substances nécessaires pour la réalisation de la biotransformation par fermentation ou biotransformation, à l'exception du NADPH, et

b) extraction de la molécule d'intérêt du milieu et le cas échéant purification.

De manière préférentielle, la molécule d'intérêt est choisie parmi des acides aminés, des
10 vitamines, des stérols, des flavonoides, des acides gras, les polyols, les acides organiques. Pour les acides aminés ou leurs précurseurs on citera en particulier lysine, méthionine, thréonine, proline, acide glutamique, homoserine, isoleucine, valine. Pour les vitamines ou leurs précurseurs on citera notamment le pantoate, le *trans*-neurosporène, la phylloquinone, les tocopherols. Pour les stérols on citera notamment le
15 squalène, le cholestérol, la testostérone, la progesterone, la cortisone. Pour les flavonoides on citera notamment la frambinone et la vestitone. Pour les acides organiques on citera l'acide coumarique, l'acide 3-hydroxypropionique. Pour les polyols on citera le sorbitol, le xylitol, le glycérol.

Dans le cas d'une bioconversion, le procédé comprend aussi l'ajout du substrat à
20 « convertir » dans le milieu de culture approprié.

Le milieu de culture cité à l'étape b) du procédé selon l'invention défini ci-dessus comprend au moins un carbohydrate assimilable choisi parmi différents sucres assimilables, tels le glucose, le galactose, le saccharose, le lactose, ou les mélasses, ou les sous-produits de ces sucres. Une source de carbone simple tout particulièrement
25 préférée est le glucose. Une autre source de carbone simple préférée est le saccharose. Le milieu de culture peut en outre contenir une ou plusieurs substances (e.g. acides aminés, vitamines, sels minéraux, ...) favorisant la croissance du microorganisme et/ou la production de la molécule d'intérêt. En particulier, le milieu minéral de culture pour *E. coli* pourra ainsi être de composition identique ou similaire à un milieu M9
30 (Anderson, 1946, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **32**:120-128), un milieu M63 (Miller,

1992 ; A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York) ou un milieu tel que défini par Schaefer *et al.* (1999, *Anal. Biochem.* **270** : 88-96).

5 La définition des conditions de biotransformation est du ressort de l'homme du métier. On fermente notamment les microorganismes à une température comprise entre 20°C et 55°C, de préférence entre 25°C et 40°C, plus particulièrement d'environ 30°C pour *S. cerevisiae* et d'environ 37°C pour *E. coli*.

Les exemples ne sont donnés qu'à titre d'illustration de l'invention et ne limitent
10 en aucun le mode de réalisation ni la portée de l'invention.

EXEMPLES

Exemple 1 : Optimisations à réaliser afin d'améliorer le rendement de bioconversion du xylose en xylitol par *E. coli* ou par *S. cerevisiae*.

15 a) bioconversion avec *E. coli*.

Des modélisations prédictives sont réalisées en utilisant l'algorithme MetOpt®-Coli, un modèle stœchiométrique développé par la société Metabolic Explorer, qui permet de définir 1) le rendement maximal de production en xylitol à partir du xylose 2) la meilleure distribution de flux à partir du glucose pour assurer les besoins de
20 croissance et d'équilibres redox nécessaire pour le développement de la cellule et l'atteinte du rendement maximal de bioconversion.

Les paramètres imposés au modèle sont notamment 1) un flux d'import de glucose à 3 mmol.g⁻¹.h⁻¹, 2) un taux de croissance variable de 0, 0.15 et 0.25 h⁻¹, 3) un flux de la transhydrogénase membranaire (*pntAB*) variable et inférieur ou égal à 1
25 mmol.g⁻¹.h⁻¹. La valeur limite de flux de la transhydrogénase membranaire est déterminée à partir de la littérature (Hanson, 1979 ; Anderlund *et al.*, 1999 ; Emmerling *et al.*, 2002) ; 4) le flux de maintenance a été limité entre 5 et 22 mmol.g⁻¹.h⁻¹.

Les optimisations réalisées selon l'invention permettent d'améliorer la quantité de NADPH pouvant être produite (par réduction du NADP) et donc d'améliorer le flux
30 de bioconversion de xylitol (tableau 1). A titre d'information, les quantités maximales

théoriques de NADPH pouvant être produites (moles de NADPH produites pour 3 moles de glucose) à $\mu=0$ sont indiquées dans la dernière colonne du tableau 1. Les quantités maximales théoriques de NADPH pouvant être produites pour $\mu>0$ peuvent être déduite en tenant compte des besoins et productions liés à la synthèse de la biomasse. Lorsque le flux de biotransformation du xylose en xylitol est inférieur à la quantité de NADPH produite, cela signifie que d'autres facteurs (*e.g.* maintenance) limitent la biotransformation.

Dans tous les cas le modèle suggère la délétion des gènes *udhA* et *qor*. On observe que la souche *E. coli* [$\Delta(\textit{udhA}, \textit{qor})$] permet une bioconversion optimale de xylose en xylitol (donnée non montrée). Cependant, en pratique cette souche ne permettra pas d'obtenir le rendement optimum théorique car il sera difficile de maintenir la répartition adéquate de flux de carbone entre la voie des pentoses phosphate et celle de la glycolyse, cette répartition étant variable avec le taux de croissance. En pratique, on préférera donc utiliser les souches *E. coli* N°8 [*gapA*-NADP dépendent, *lpd*-NADP dépendent, $\Delta(\textit{udhA}, \textit{qor}, \textit{pfkA})$] ou N°4 [*gapA*-NADP dépendent, *lpd*-NADP dépendent, $\Delta(\textit{udhA}, \textit{qor}, \textit{pgi})$], le choix entre ces deux souches étant fonction du taux de croissance de la souche lors du procédé de bioconversion. Cependant en fonction des caractéristiques réelles du procédé de bioconversion, d'autres souches du tableau peuvent être considérées, en outre il est possible d'affiner les souches modélisées, notamment en effectuant des modifications supplémentaires telles que la surexpression d'au moins un gène choisi parmi *zwf*, *gnd*, *pntA*, *pntB* et *icd* et/ou la délétion d'au moins un gène choisi parmi *edd*, *aceA*, *aceB*, *aceK*.

N°	μ (h ⁻¹)	0	0.15	0.25	Quantité NADPH
1	Δpgi	5,47	5,21	3,67	12,00
2	$\Delta pgi +$ <i>gapA</i> NADP dependant	12,87	10,91	7,28	17,00
3	$\Delta pgi +$ <i>lpd</i> NADP dependant	17,00	10,39	5,98	17,00
4	$\Delta pgi +$ <i>gapA</i> NADP dependant + <i>lpd</i> NADP dependant	20,58	14,88	9,99	22,00
5	$\Delta pfkA$	20,27	13,94	0,56	28,00
6	$\Delta pfkA +$ <i>gapA</i> NADP dependant	24,47	16,63	3,05	29,50
7	$\Delta pfkA +$ <i>lpd</i> NADP dependant	25,00	16,79	5,32	31,00
8	$\Delta pfkA +$ <i>gapA</i> NADP dependant + <i>lpd</i> NADP dependant	28,00	19,13	7,80	32,50

Tableau 1: Flux optimal théorique de conversion du xylose en xylitol (mmol.g⁻¹.h⁻¹) par des souches d'*E. coli* optimisées dans leur capacité de réduction du NADPH.

b) bioconversion avec *S. cerevisiae*

Les modélisations prédictives sont réalisées en utilisant l'algorithme MetOpt@-Scere, un modèle stœchiométrique développé par la société, qui permet de définir 1) le rendement maximal de production en xylitol à partir du xylose 2) la meilleure distribution de flux à partir du glucose pour assurer les besoins de croissance et d'équilibres redox nécessaire pour le développement de la cellule et l'atteinte du rendement maximal de bioconversion.

Les paramètres imposés au modèle sont notamment 1) un flux d'import de glucose à 3 mmol.g⁻¹.h⁻¹, 2) un taux de croissance variable de 0, 0.15 et 0.25 h⁻¹, 3) un flux de maintenance inférieur ou égal à 22 mmol.g⁻¹.h⁻¹; 4) les réactions des aldéhydes déshydrogénases (ALD2, ALD3, ALD6) sont irréversibles et imposées dans le sens acétate + NAD(P)H → acétaldehyde + NAD(P); 5) la levure ne possède pas d'activités équivalentes à *udhA* ou *pntA,B*.

Le modèle permet de prendre en compte la compartimentation mitochondriale et peroxisomale.

Les optimisations réalisées selon l'invention permettent d'améliorer la quantité de NADPH pouvant être produite (par réduction du NADP) et donc d'améliorer le flux de bioconversion de xylitol (tableau 2). A titre d'information, les quantités maximales théoriques de NADPH pouvant être produites (moles de NADPH produites pour 3 moles de glucose) à $\mu=0$ sont indiquées dans la dernière colonne du tableau 2. Les quantités maximales théoriques de NADPH pouvant être produites pour $\mu>0$ peuvent être déduites en tenant compte des besoins et productions liés à la synthèse de la biomasse. Lorsque le flux de biotransformation du xylose en xylitol est inférieur à la quantité de NADPH produite, cela signifie que d'autres facteurs (*e.g.* maintenance) limitent la biotransformation.

Dans tous les cas, le modèle suggère la délétion du gène *zta1* (ubiquinone oxido-réductase, homologue de QOR). On observe que l'on pourrait utiliser la souche optimisée *S. cerevisiae* N°4 [*tdh1,2,3*-NADP dépendant, *lpd1*-NADP dépendant, $\Delta(zta1)$] où *tdh1,2,3* correspond respectivement aux gènes *tdh1*, *tdh2*, *tdh3* codant la glycéraldéhyde 3-P dehydrogenase NAD-dépendante dont la spécificité de co-substrat a été modifiée au profit du NADP. Cependant, en pratique il devrait être difficile d'obtenir le rendement optimum théorique avec cette souche car il sera difficile de maintenir la répartition adéquate de flux de carbone entre la voie des pentoses phosphate et celle de la glycolyse, cette répartition étant variable avec le taux de croissance. En pratique, on préférera donc utiliser la souche *E. coli* N°8 [*tdh1,2,3*-NADP dépendant, *lpd1*-NADP dépendant, $\Delta(zta1, pfkA)$]. Enfin, il sera possible d'affiner les souches en réalisant des modifications supplémentaires, notamment en effectuant des modifications supplémentaires telles que la surexpression d'au moins un gène choisi parmi *zwf*, *gnd*, *pntA*, *pntB* et *icd* et/ou la délétion d'au moins un gène choisi parmi *edd*, *aceA*, *aceB*, *aceK*..

N°	μ (h ⁻¹)	0	0.15	0.25	Quantité NADPH
1	Δpgi	7,25	6,01	5,19	7,25
2	$\Delta pgi +$ <i>tdh1,2,3</i> NADP dependant	12,67	10,51	9,08	12,67
3	$\Delta pgi +$ <i>lpd1</i> NADP dependant	12,25	9,88	8,31	12,25
4	$\Delta pgi +$ <i>tdh1,2,3</i> NADP dependant + <i>lpd1</i> NADP dependant	18,50	15,02	12,70	18,50
5	$\Delta pfk1,2$	36,00	24,55	16,91	36,00
6	$\Delta pfk1,2 +$ <i>tdh1,2,3</i> NADP dependant	36,00	27,34	21,56	36,00
7	$\Delta pfk1,2 +$ <i>lpd1</i> NADP dependant	36,00	25,32	18,19	36,00
8	$\Delta pfk1,2 +$ <i>tdh1,2,3</i> NADP dependant + <i>lpd1</i> NADP dependant	36,00	27,84	22,39	36,00

Tableau 2 : Flux optimal théorique de conversion du xylose en xylitol (mmol.g⁻¹.h⁻¹) par des souches de *S. cerevisiae* optimisées dans leur capacité à réduire le NADPH.

Exemple 2 : Construction de la souche *E. coli* Δ (*udhA*, *qor*)

L'inactivation des gènes *udhA* et *qor* est réalisée en insérant une cassette de résistance à un antibiotique (chloramphénicol et kanamycine) tout en délétant la majeure partie du gène concerné. La technique utilisée est décrite par Datsenko, K.A. ; Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97** : 6640-6645. Pour cela on synthétise une paire d'oligonucléotides, chacun étant constitués de 100 pb dont 80 pb sont homologues avec le gène à déleter (e.g. *udhA*) et 20 pb sont homologues avec la cassette antibiotique porté par les plasmides pKD3 et pKD4 et que l'on amplifie par PCR en utilisant ces oligonucléotides.

Le produit PCR obtenu est alors introduit par électroporation dans la souche *E. coli* répliquant le plasmide pKD46 qui porte le gène codant la Red recombinase qui catalyse la recombinaison homologue. Les transformants résistants à chacun des

antibiotiques sont alors sélectionnés et l'insertion de la cassette de résistance est vérifiée par une analyse PCR.

Les cassettes de résistance au chloramphénicol et à la kanamycine peuvent ensuite être éliminées. Pour cela, Le plasmide pCP20 porteur de la recombinase FLP agissant au niveau des sites FRT de la cassette de résistance au chloramphénicol ou à la kanamycine, est introduit dans les souches recombinantes par électroporation. Puis, après une série de cultures à 42°C, la perte de la cassette de résistance à l'antibiotique est vérifiée par une analyse PCR avec les mêmes oligonucléotides que ceux utilisés précédemment.

10 Pour des raisons pratiques, il peut être intéressant de déléter d'abord un gène, de supprimer le gène de résistance à l'antibiotique et de déléter le deuxième gène ensuite.

La souche obtenue est donc *E. coli* Δ (*udhA*, *gor*)

Exemple 3 : Introduction du plasmide *pxyl1* codant la xylose réductase dans la souche obtenue et biotransformation de xylytol

15 Le plasmide *pxyl1* a été construit par insertion du gène *xy1* dans le vecteur Zero Blunt TOPO PCR cloning kit for sequencing (PCR4 TOPO vector, Invitrogen). Pour cela, le gène *xy1* (X59465) de *Pichia stipitis* a été amplifié par PCR avec la polymérase *Pwo* à partir de l'ADN chromosomique

Le produit PCR obtenu est ensuite directement cloné dans le vecteur Topo pour donner le plasmide *pxyl1*. Le vecteur Topo porte une origine de répllication pour *E. coli*, un gène de résistance à l'ampicilline et un gène de résistance à la kanamycine.

Le plasmide *pxyl1* est alors introduit dans la souche *E. coli* DH5 α pour vérification de la construction. Le séquençage du gène *xy1* du plasmide *pxyl1* avec les oligonucléotides universels M13 reverse et M13 forward est ensuite réalisé pour confirmer la construction.

25 Le plasmide validé est alors introduit dans la souche *E. coli* Δ (*udhA*, *gor*) (exemple 2) par électroporation.

La souche obtenue *E. coli* [Δ (*udhA*, *gor*) *pxyl1*] est alors cultivée en fed-batch, le milieu initial (milieu minimum) et le fed contenant du glucose et du xylose. Une souche *E. coli* [*pxyl1*] est cultivée dans les mêmes conditions.

Lorsque les cultures sont achevées on compare :

- l'évolution de la biomasse de chaque souche pendant la phase de bioconversion
- la quantité de xylitol produit dans le milieu extracellulaire.
- 5 - La quantité de xylitol accumulé dans les cellules
- la productivité en xylitol,
- le rendement glucose/xylitol

On pourra observer que la souche *E. coli* [$\Delta(\text{udhA}, \text{qor}) \text{pxyl1}$] présente un rendement de production de xylitol accru par rapport à la souche non optimisée.

10

Exemple 4 : Construction de la souche *E. coli* $\Delta(\text{udhA}, \text{qor}, \text{pgi})$ et biotransformation

L'inactivation du gène *pgi* est conduite en utilisant la technique décrite dans l'exemple 2 sauf que la souche initiale est la souche de l'exemple 2 au lieu d'être une souche sauvage. La construction est réalisée en milieu riche (e.g. LB). On introduit alors dans la souche obtenue *E. coli* $\Delta(\text{udhA}, \text{qor}, \text{pgi})$ le plasmide *pxyl1* (exemple 3) par électroporation, et la souche résultante *E. coli* [$\Delta(\text{udhA}, \text{qor}, \text{pgi}) \text{pxyl1}$] est sélectionnée sur milieu riche.

20 La souche obtenue *E. coli* [$\Delta(\text{udhA}, \text{qor}, \text{pgi}) \text{pxyl1}$] est alors cultivée en fed-batch, le milieu initial (milieu minimum) et le fed contenant du glucose et du xylose. La souche *E. coli* [*pxyl1*] est cultivée dans les mêmes conditions.

Lorsque les cultures sont achevées on compare :

- l'évolution de la biomasse de chaque souche pendant la phase de bioconversion
- 25 - la quantité de xylitol produit dans le milieu extracellulaire.
- La quantité de xylitol accumulé dans les cellules
- la productivité en xylitol,
- le rendement glucose/xylitol

On pourra observer que la souche *E. coli* [$\Delta(udhA, qor, pgi)$ pxy11] présente un rendement de production de xylitol accru par rapport à la souche non optimisée.

Exemple 5 : Construction de la souche *E. coli* $\Delta(udhA, qor, pfkA)$ et

5 **biotransformation**

L'inactivation du gène *pfkA* est conduite en utilisant la technique décrite dans l'exemple 2 sauf que la souche initiale est la souche de l'exemple 2 au lieu d'être une souche sauvage. La construction est réalisée en milieu riche (e.g. LB). On introduit alors dans la souche obtenue *E. coli* $\Delta(udhA, qor, pfkA)$ le plasmide pxy11 (exemple 3) par
10 électroporation, et la souche résultante *E. coli* [$\Delta(udhA, qor, pfkA)$ pxy11] est sélectionnée sur milieu riche.

La souche obtenue *E. coli* [$\Delta(udhA, qor, pfkA)$ pxy11] est alors cultivée en fed-batch, le milieu initial (milieu minimum) et le fed contenant du glucose et du xylose. La souche *E. coli* [pxy11] est cultivée dans les mêmes conditions.

15 Lorsque les cultures sont achevées on compare :

- l'évolution de la biomasse de chaque souche pendant la phase de bioconversion
- la quantité de xylitol produit dans le milieu extracellulaire.
- La quantité de xylitol accumulé dans les cellules
- 20 - la productivité en xylitol,
- le rendement glucose/xylitol

On pourra observer que la souche *E. coli* [$\Delta(udhA, qor, pfkA)$ pxy11] présente un rendement de production de xylitol accru par rapport à la souche non optimisée.

25 **Exemple 6 : Construction de la souche *E. coli* $\Delta(udhA, qor, pfkA, lpd)$ *lpd** et biotransformation**

Le gène *lpd* codant la dihydrolipoamide dehydrogenase NADH dépendante, impliquée dans le complexe multienzymatique pyruvate dehydrogénase, est délété en utilisant la technique décrite dans l'exemple 2 sauf que la souche initiale est la souche

décrite dans l'exemple 4 *E. coli* $\Delta(\text{udhA}, \text{qor}, \text{pgi})$ au lieu d'être une souche sauvage. La construction et la sélection de la souche modifiée est réalisée en milieu riche (e.g. LB). La souche obtenue est *E. coli* $\Delta(\text{udhA}, \text{qor}, \text{pgi}, \text{lpd})$.

Par ailleurs on construit le plasmide *plpd** qui permet la surexpression d'une dihydrolipoamide dehydrogenase NADPH dépendente. Il existe différentes possibilités pour modifier la spécificité de cosubstrat d'une enzyme. Par exemple Bocanegra *et al.* (1993) divulguent une méthode pour créer une dihydrolipoamide dehydrogenase NADPH dépendente.

Les plasmides *plpd** et *pxyl1* sont alors introduit par électroporation dans la souche *E. coli* $\Delta(\text{udhA}, \text{qor}, \text{pgi}, \text{lpd})$, alternativement, on peut choisir de cloner *lpd** sur *pxyl1*; on obtiendrait alors le plasmide *plpd*xy11* que l'on introduirait par électroporation dans la souche *E. coli* $\Delta(\text{udhA}, \text{qor}, \text{lpd})$. La construction et la sélection de la souche modifiée est réalisée en milieu riche (e.g. LB).

La souche obtenue *E. coli* [$\Delta(\text{udhA}, \text{qor}, \text{pgi}, \text{lpd})$ *pxyl1*, *plpd**] est alors cultivée en fed-batch, le milieu initial (milieu minimum) et le fed contenant du glucose et du xylose. La souche *E. coli* [*pxyl1*] est cultivée dans les mêmes conditions.

Lorsque les cultures sont achevées on compare :

- l'évolution de la biomasse de chaque souche pendant la phase de bioconversion.
- la quantité de xylitol produite.
- La quantité de xylitol accumulé dans les cellules
- la productivité en xylitol,
- le rendement glucose/xylitol

On pourra observer que la souche *E. coli* [$\Delta(\text{udhA}, \text{qor}, \text{pgi}, \text{lpd})$ *pxyl1*, *plpd**] présente un rendement de production de xylitol accru par rapport à la souche non optimisée.

Exemple 7 : Construction de la souche *S. cerevisiae* [$\Delta(\text{pgi1})$, pRSGK-*xy11*] et biotransformation

Le plasmide pRSGK1-*xy11* résulte du clonage du gène *xy11* de *Pichia stiptis*, amplifié par PCR en utilisant une polymérase thermorésistante de *Pyrococcus woesei* (*Pwo*), dans le vecteur pRSGK, sous le contrôle du promoteur P_{GK}. Le plasmide est ensuite introduit dans *S. cerevisiae*. La souche *S. cerevisiae* [pRSGK-*xy11*] obtenue est
 5 ensuite utilisée pour déléter le gène *pgi*. L'inactivation du gène *pgi* est réalisée en insérant un marqueur (résistance à un antibiotique, auxotrophie) tout en déléant la majeure partie du gène concerné. La technique utilisée est décrite par Brachmann, C.B. ; Davies, A. ; Cost, G.J. ; Caputo, E. ; Li, J. ; Hieter, P. ; Boeke, J.D. (1998) Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C : a useful set of strains
 10 and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications, *Yeast*, **14**: 115-32; on peut aussi utiliser la technique décrite par Wach, A., Brachat, A., Pohlmann, R. , and Philippsen, P. (1994), New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*, **10** : 1793-1808. Dans tous les cas on obtient une souche finale *S. cerevisiae* [Δ (*pgi*) pRSGK-*xy11*].

15 Alternativement, on peut aussi choisir d'introduire le plasmide pRSGK-*xy11* dans une souche mutée disponible, par exemple la souche Y23336 (EUROSCARF ; <http://www.rz.uni-frankfurt.de/FB/fb16/mikro/euroscarf/>) hétérozygote pour le gène *pgi* (Mat α/a ; his3D1/his3D1; leu2D0/leu2D0; lys2D0/LYS2; MET15/met15D0; ura3D0/ura3D0; YBR196c::kanMX4/YBR196c). Il est alors possible après sporulation
 20 de récupérer une souche homozygote *S. cerevisiae* [Δ (*pgi*) pRSGK-*xy11*].

La souche obtenue *S. cerevisiae* [Δ (*pgi*) pRSGK-*xy11*] est alors cultivée en fed-batch , le milieu initial (YNB supplémenté) et le fed contenant du glucose et du xylose. Alternativement, le milieu initial pourrait être un milieu riche.

La souche contrôle *S. cerevisiae* [pRSGK-*xy11*] est cultivée dans les mêmes
 25 conditions.

Lorsque les cultures sont achevées on compare :

- l'évolution de la biomasse de chaque souche pendant la phase de bioconversion.
- la quantité de xylitol produite.
- 30 - la quantité de xylitol accumulé dans les cellules

- la productivité en xylitol,
- le rendement glucose/xylitol

On pourra observer que la souche *S. cerevisiae* [$\Delta(pgi)$ pRSGK-*xy11*] présente un rendement de production de xylitol accru par rapport à la souche non optimisée.

5

Exemple 8 : Construction de la souche *S. cerevisiae* $\Delta(zta1, pgi1)$ et biotransformation

On utilise la souche Y33183 (génotype : BY4743; Mat *a/α*; *his3D1/his3D1*; *leu2D0/leu2D0*; *lys2D0/LYS2*; *MET15/met15D0*; *ura3D0/ura3D0*;
 10 *YBR046c::kanMX4/YBR046c::kanMX4*) disponible auprès d'EUROSCARF et dont les deux gènes *zta1* (= *YBR046c*) sont délétés. La souche est alors transformée par le plasmide pRSGK-*xy11* (exemple 7) puis la délétion du gène *pgi* est réalisée selon l'approche employée dans l'exemple 7.

La souche obtenue *S. cerevisiae* [$\Delta(zta1, pgi1)$ pRSGK-*xy11*] est alors cultivée
 15 en fed-batch en milieu minimum (YNB) supplémenté avec un fed en glucose/xylose.

La souche contrôle *S. cerevisiae* [pRSGK-*xy11*] est cultivée dans les mêmes conditions.

Lorsque les cultures sont achevées on compare :

- l'évolution de la biomasse de chaque souche pendant la phase de
 20 bioconversion.
- la quantité de xylitol produite.
- la quantité de xylitol accumulé dans les cellules
- la productivité en xylitol,
- le rendement glucose/xylitol

25 On observe que la souche *S. cerevisiae* [$\Delta(zta1, pgi1)$ pRSGK-*xy11*] présente un rendement de production de xylitol accru par rapport à la souche non optimisée.

Exemple 9 : Construction de la souche *S. cerevisiae* $\Delta(zta1, pfk1, pfk2)$ et biotransformation

On utilise la souche Y33183 (génotype : BY4743; Mat a/α; his3D1/his3D1; leu2D0/leu2D0; lys2D0/LYS2; MET15/met15D0; ura3D0/ura3D0; YBR046c::kanMX4/YBR046c::kanMX4) disponible auprès d'EUROSCARF et dont les deux gènes *zta1* (= YBR046c) sont délétés. La souche est alors transformée par le

5 plasmide pRSGK-*xy11* (exemple 7) puis les délétions des gènes *pfk1* et *pfk2* sont réalisées selon l'approche employée dans l'exemple 7. On peut éventuellement avoir recouru aux souches Y35893 [BY4743 ; Mat a/α; his3D1/his3D1; leu2D0/leu2D0; lys2D0/LYS2; MET15/met15D0; ura3D0/ura3D0; YGR240c::kanMX4/YGR240c::kanMX4] dont les deux gènes *pfk1* sont délétés, et

10 Y30791 [BY4743 ; Mat a/α; his3D1/his3D1; leu2D0/leu2D0; lys2D0/LYS2; MET15/met15D0; ura3D0/ura3D0; YMR205c::kanMX4/YMR205c::kanMX4] dont les deux gènes *pfk2* sont délétés. Ces deux souches sont disponibles auprès d'EUROSCARF.

La souche obtenue *S. cerevisiae* [$\Delta(zta1, pfk1, pfk2)$ pRSGK-*xy11*] est alors

15 cultivée en fed-batch, le milieu initial (YNB supplémenté) et le fed contenant du glucose et du xylose. Alternativement, le milieu initial pourrait être un milieu riche.

La souche contrôle *S. cerevisiae* [pRSGK-*xy11*] est cultivée dans les mêmes conditions.

Lorsque les cultures sont achevées on compare :

- 20
- l'évolution de la biomasse de chaque souche pendant la phase de bioconversion.
 - la quantité de xylitol produite.
 - la quantité de xylitol accumulé dans les cellules
 - la productivité en xylitol,
- 25
- le rendement glucose/xylitol

On pourra observer que la souche *S. cerevisiae* [$\Delta(zta1, pfk1, pfk2)$ pYES-*xy11*] présente un rendement de production de xylitol accru par rapport à la souche non optimisée.

Exemple 10 : Comparaison entre valeurs expérimentales et prédictions par le modèle métabolique pour l'optimisation de la production de xylitol par *Escherichia coli*

On pourra observer une bonne corrélation entre les modélisations prédictives (exemple 1) et les réalisations expérimentales décrites dans les exemples 3,4,5 et 6.

Les exemples 1 à 9 ci-dessus sont des applications particulières du brevet et n'en limitent pas l'utilisation. L'homme de l'art saura aisément adapter ces exemples pour la biotransformation de molécules ayant une synthèse NADPH-dépendente. L'algorithme MetOpt[®] et la stratégie d'optimisation d'un procédé de bioconversion NADPH-dépendent via l'optimisation du ratio NADPH/NADP est validé ; cela nous permet en outre de revendiquer une application élargie à toutes les biotransformations NADPH dépendentes, qui pourront être modélisée et prévues par MetOpt[®] ou l'un de ses dérivés, en utilisant pour *E. coli*, *S. cerevisiae* ou tout autre microorganisme.

Exemple 11 : Prédiction des modifications permettant l'amélioration de procédés de fermentation chez *E. coli*.

L'exemple 10 montre que les modèles MetOpt[®] développés par la société sont applicables aux bioconversions et devraient plus généralement s'appliquer aux biotransformations telles que les fermentations.

A titre d'exemples, le modèle MetOpt[®]-Coli est appliqué à la production de cystéine (Tableau 3) ou de 3-hydroxypropionate (Tableau 4) par fermentation du glucose par *E. coli*. Nous appliquons les mêmes paramètres que ceux précédemment utilisés, notamment : 1) un flux d'import de glucose à 3 mmol.g⁻¹.h⁻¹, 2) un taux de croissance variable de 0, 0.15 et 0.25 h⁻¹, 3) un flux de la transhydrogénase membranaire (*pntAB*) variable et inférieur ou égal 1 mmol.g⁻¹.h⁻¹. La valeur limite de flux de la transhydrogénase membranaire est déterminée à partir de la littérature (Hanson, 1979 ; Anderlund *et al.*, 1999 ; Emmerling *et al.*, 2002) ; 4) le flux de maintenance a été limité entre 5 et 22 mmol.g⁻¹.h⁻¹.

a) cas de la production de cystéine par fermentation du glucose

Dans tous les cas le modèle suggère la délétion des gènes *udhA* et *qor*. On observe que la souche *E. coli* N°8 [*gapA*-NADP dépendant, *lpd*-NADP dépendant, $\Delta(\textit{udhA}, \textit{qor}, \textit{pgi})$] permet une production de cystéine optimale. Par ailleurs d'autres souches pourraient être tout aussi intéressantes (e.g. souches N° 2, 3). Enfin il est possible d'affiner les souches modélisées, notamment en effectuant des modifications supplémentaires telles que la surexpression d'au moins un gène choisi parmi *zwf*, *gnd*, *pntA*, *pntB* et *icd* et/ou la délétion d'au moins un gène choisi parmi *edd*, *aceA*, *aceB*, *aceK*.

N°	μ (h ⁻¹)	0	0.15	0.25
1	$\Delta\textit{pgi}$	1,99	1,12	0,27
2	$\Delta\textit{pgi}$ + <i>gapA</i> NADP dépendant	2,33	1,12	0,27
3	$\Delta\textit{pgi}$ + <i>lpd</i> NADP dépendant	2,33	1,12	0,27
4	$\Delta\textit{pgi}$ + <i>gapA</i> NADP dépendant + <i>lpd</i> NADP dépendant	2,33	1,12	0,27
5	$\Delta\textit{pfkA}$	1,20	0,55	0,02
6	$\Delta\textit{pfkA}$ + <i>gapA</i> NADP dépendant	1,85	0,89	0,19
7	$\Delta\textit{pfkA}$ + <i>lpd</i> NADP dépendant	2,13	1,08	0,38
8	$\Delta\textit{pfkA}$ + <i>gapA</i> NADP dépendant + <i>lpd</i> NADP dépendant	2,31	1,25	0,52

Tableau 3: Flux optimal théorique de production de cystéine (mmol.g⁻¹.h⁻¹) par fermentation du glucose par des souches d'*E. coli* optimisées dans leur capacité de réduction du NADPH.

b) cas de la production de 3-hydroxypropionate par fermentation du glucose

Dans tous les cas le modèle suggère la délétion des gènes *udhA* et *qor*. On observe que la souche N°4 [*gapA*-NADP dépendant, *lpd*-NADP dépendant, $\Delta(\textit{udhA},$

gor, pgi], enfin d'autres souches restent intéressantes (e.g. souches N° 2, 3). Enfin il reste possible d'affiner les souches modélisées, notamment en effectuant des modifications supplémentaires telles que la surexpression d'au moins un gène choisi parmi *zwf*, *gnd*, *pntA*, *pntB* et *icd* et/ou la délétion d'au moins un gène choisi parmi *edd*,
 5 *aceA*, *aceB*, *aceK*.

10

15

20

N°	μ (h ⁻¹)	0	0.15	0.25
1	Δpgi	4,00	2,37	0,89
2	Δpgi + <i>gapA</i> NADP dependant	5,29	2,98	0,89
3	Δpgi + <i>lpd</i> NADP dependant	5,45	2,98	0,89
4	Δpgi + <i>gapA</i> NADP dependant + <i>lpd</i> NADP dependant	5,47	2,98	0,89
5	$\Delta pfkA$	4,86	1,99	0,08
6	$\Delta pfkA$ + <i>gapA</i> NADP dependant	5,29	2,37	0,20
7	$\Delta pfkA$ + <i>lpd</i> NADP dependant	5,38	2,52	0,20
8	$\Delta pfkA$ + <i>gapA</i> NADP dependant + <i>lpd</i> NADP dependant	5,38	2,52	0,20

25

Tableau 4: Flux optimal théorique de production de 3-hydroxypropionate (mmol.g⁻¹.h⁻¹) par fermentation du glucose par des souches d'*E. coli* optimisées dans leur capacité de réduction du NADPH.

30

Exemple 12 : Prédiction des modifications permettant l'amélioration de procédé de fermentation impliquant *S. cerevisiae* ; application à la production d'hydrocortisone.

L'exemple 10 montre que les modèles MetOpt® développés par la société sont applicables aux bioconversions et devraient plus généralement s'appliquer aux biotransformations telles que les fermentations.

A titre d'exemple, Le modèle MetOpt®-Scere est appliqué à la production d'hydrocortisone (Tableau 5) par fermentation du glucose par *S. cerevisiae*. Nous appliquons les mêmes paramètres que ceux précédemment utilisés, notamment : 1) un flux d'import de glucose à $3 \text{ mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$, 2) un taux de croissance variable de 0, 0.15 et 0.25 h^{-1} , 3) un flux de maintenance inférieur ou égal à $22 \text{ mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$; 4) les réactions des aldéhydes déshydrogénases (ALD2, ALD3, ALD6) sont irréversibles et imposées dans le sens acétate + NAD(P)H \rightarrow acétaldéhyde + NAD(P); 5) la levure ne possède pas d'activités équivalentes à *udhA* ou *pntA,B*.

Le modèle permet de prendre en compte la compartimentation mitochondriale et peroxisomale.

Cette représentation des résultats (Tableau 5) permet de mettre en évidence l'apport réel de chacune des mutations dans l'amélioration de la production de NADPH et donc dans l'amélioration du flux de production d'hydrocortisone.

N°	$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0	0.15	0.25
1	Δpgi	0,12	0,08	0,06
2	$\Delta pgi +$ <i>tdh1,2,3</i> NADP dépendant	0,21	0,14	0,10
3	$\Delta pgi +$ <i>lpd1</i> NADP dépendant	0,20	0,14	0,10
4	$\Delta pgi +$ <i>tdh1,2,3</i> NADP dépendant + <i>lpd1</i> NADP dépendant	0,21	0,14	0,10
5	$\Delta pfk1,2$	/	/	/
6	$\Delta pfk1,2 +$ <i>tdh1,2,3</i> NADP dépendant	/	/	/
7	$\Delta pfk1,2 +$ <i>lpd1</i> NADP dépendant	/	/	/
8	$\Delta pfk1,2 +$ <i>tdh1,2,3</i> NADP dépendant + <i>lpd1</i> NADP dépendant	/	/	/

5 **Tableau 5: Flux optimal théorique de production d'hydrocortisone ($\text{mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) par fermentation du glucose par des souches de *S. cerevisiae* optimisées dans leur capacité de réduction du NADPH.**

Dans tous les cas le modèle suggère la délétion des gènes *udhA* et *qor*. On observe que la souche *S. cerevisiae* N°2 [*gapA*-NADP dépendent, $\Delta(\textit{udhA}, \textit{qor}, \textit{pgi})$], même si d'autres souches pourraient être tout aussi intéressantes (*e.g.* souches N° 3, 4). Par ailleurs, il est toujours possible d'affiner les souches modélisées, notamment en effectuant des modifications supplémentaires telles que la surexpression d'au moins un gène choisi parmi *zwf*, *gnd*, *pntA*, *pntB* et *icd* et/ou la délétion d'au moins un gène choisi parmi *edd*, *aceA*, *aceB*, *aceK*. Enfin, On remarque que les souches dont les gènes *pfk1* et *pfk2* sont délétés sont incapables de produire de l'hydrocortisone, voir ne sont pas viables. Ceci est dû au fait que la production d'hydrocortisone est davantage limitée par la demande en carbone que par le besoin en NADPH. Une solution consiste à permettre une légère expression d'une activité de type transhydrogénase chez la levure. Cependant, les modélisations montrent que le flux de production d'hydrocortisone ne seront jamais aussi bon que dans le cas d'une délétion du gène *pgi1*.

REFERENCES

- Anderson, E.H. (1946) Growth requirements of virus-resistant mutants of *Escherichia coli* strain "B", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **32**:120-128
- Baudin, A.; Ozier-Kalogeropoulos, O.; Denouel, A.; Lacroute, F. and Cullin, C. (1993)
 5 A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*,
Nucl. Acids Res. **21**, 3329-3330
- Bocanegra, J.A. Scrutton, N.S. ; Perham, R.N. (1993) Creation of an NADP-dependent pyruvate dehydrogenase multienzyme complex by protein engineering. *Biochemistry* **32** : 2737-2740
- 10 Brachmann CB, Davies A, Cost GJ, Caputo E, Li J, Hieter P, Boeke JD. (1998) Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast.* **14** :115-32.
- Datsenko, K.A. ; Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in
 15 *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97** : 6640-6645
- Miller, 1992 ; A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Sambrook et al. (1989) Molecular cloning : a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring
 20 Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York
- Schaefer U.; Boos, W.; Takors, R.; Weuster-Botz, D. (1999) Automated sampling device for monitoring intracellular metabolite dynamics., *Anal. Biochem.* **270** : 88-96
- Wach, A.; Brachat, A.; Pohlmann, R.; and Philippsen, P. (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*,
 25 *Yeast* **10**, 1793-1808, 1994.

REVENDEICATIONS

1. Souche de microorganismes caractérisée en ce quelle comprend une déléation du gène *udhA* et/ou du gène *qor* et/ou du gène *pgi*, à la condition que lorsque
5 ledit microorganisme est une bactérie, elle comprend au moins une déléation choisie parmi le gène *udhA* ou le gène *qor*.
2. Souche selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comprend également une déléation d'au moins un gène pris parmi un gène pris parmi *pgi* ou *pfkA* et/ou *pfkB* et/ou on modifie au moins un gène codant des enzymes à NAD, en particulier
10 *lpd* et/ou *gapA*, afin qu'elles utilisent préférentiellement le NADP.
3. Souche selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle comprend une surexpression d'au moins un gène choisi parmi *zwf*, *gnd*, *pntA*, *pntB* et *icd*.
4. Souche selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle
15 comprend la déléation d'au moins un gène choisi parmi *edd*, *aceA*, *aceB*, *aceK*.
5. Souche selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce qu'elle comprend un ou plusieurs gènes, endogène ou exogène, codant des enzymes impliqués dans la biotransformation d'une molécule d'intérêt.
6. Souche selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce qu'elle
20 comprend un ou plusieurs gènes marqueurs de sélection.
7. Souche selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi les bactéries, les levures et les champignons filamenteux.
8. Souche selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi les espèces suivantes : *Aspergillus sp.*, *Bacillus sp.*, *Brevibacterium sp.*,
25 *Clostridium sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Escherichia sp.*, *Gluconobacter sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Rhodococcus sp.*, *Saccharomyces sp.*, *Streptomyces sp.*, *Xanthomonas sp.* et *Candida sp.*
9. Procédé de préparation des souches optimisées selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que l'on délète les gènes *udhA* et/ou *qor*, et le cas
30 échéant on délète un gène pris parmi *pgi* ou *pfkA* et/ou *pfkB* et/ou on modifie au moins

un gène codant des enzymes à NAD, en particulier *lpd* et/ou *gapA*, afin qu'elles utilisent préférentiellement le NADP, et le cas échéant on délète au moins un gène choisi parmi *edd*, *aceA*, *aceB*, *aceK* ; ces délétions et modifications étant réalisées par un moyen approprié, et/ou on surexprime au moins un gène choisi parmi *zwf*, *gnd*, *pntA*,
5 *pntB*, *icd* soit en transformant la souche avec un vecteur approprié comprenant un ou plusieurs gènes codant une ou des enzymes impliquées dans la biotransformation d'une molécule d'intérêt et/ou un ou plusieurs gènes marqueur de sélection, soit en modifiant la force du promoteur endogène contrôlant le gène à surexprimer.

10 10. Procédé de production d'une molécule d'intérêt dont au moins une des réactions de la voie de biosynthèse est NADPH dépendante caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- c) mise en culture des microorganismes optimisés selon l'une des revendications 5 à 8 dans un milieu de culture approprié favorisant leur croissance et comprenant les substances nécessaires pour la réalisation de la biotransformation par fermentation ou biotransformation, à l'exception du NADPH, et
15
- d) extraction de la molécule d'intérêt du milieu et le cas échéant purification.

11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que la molécule d'intérêt est choisie parmi les acides aminés, les vitamines, les stérols, les flavonoides, les acides gras, les polyols et les acides organiques.



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 641112
FR 0313056

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	MORITA TEPPEI ET AL: "Accumulation of glucose 6-phosphate or fructose 6-phosphate is responsible for destabilization of glucose transporter mRNA in Escherichia coli." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 278, no. 18, 2 mai 2003 (2003-05-02), pages 15608-15614, XP002274626 ISSN: 0021-9258 * page 15613; tableaux I,IV *	1-3,6-9	
X	BOLES E ET AL: "THE ROLE OF THE NAD-DEPENDENT GLUTAMATE GEHYDROGENASE IN RESTORING GROWTH ON GLUCOSE OF A SACCHAROMYCES CEREVISIAE PHOSPHOGLUCOSE ISOMERASE MUTANT" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, BERLIN, DE, vol. 217, no. 1, 1 octobre 1993 (1993-10-01), pages 469-477, XP000960373 ISSN: 0014-2956 * abrégé *	1,7-9	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
X	NYUNOYA, HIROSHI ET AL: "Effects of sugars and polyols on basidiocarp formation in a phosphoglucose isomerase mutant of Coprinus cinereus" CANADIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY (1984), 30(1), 45-51 , XP009027484 * abrégé *	1,7-9	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
23 mars 2004		Espen, J	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS			
<p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>			

2

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)