

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

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
02 août 2018 (02.08.2018)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2018/138289 A1

(51) Classification internationale des brevets :

C12N 1/13 (2006.01) C12N 9/88 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) C12N 9/12 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01) C12N 9/04 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01) C12N 9/02 (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01) C12N 9/18 (2006.01)

(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), eurasien (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, 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/EP2018/052005

(22) Date de dépôt international :

26 janvier 2018 (26.01.2018)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

1750694 27 janvier 2017 (27.01.2017) FR

(71) Déposant : ENOBRAQ [FR/FR] ; TWB Parc Technologique du Canal Bâtiment NAPA CENTER B, 3 rue Ariane, 31520 RAMONVILLE-SAINT-AGNE (FR).

(72) Inventeurs : BOISART, Cédric ; 7B rue du Cers, 31450 Belberaud (FR). MORIN, Nicolas ; 6 Cheminement du Docteur Didier Dasque Appt B17, Résidence Le Carré aux Etoiles, 31400 Toulouse (FR).

(74) Mandataire : TETAZ, Franck ; 9, rue Paul Chevre, 69370 Saint Didier au Mont d'Or (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.

Publiée:

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

(54) Title: GENETICALLY OPTIMISED MICROORGANISM FOR PRODUCING MOLECULES OF INTEREST

(54) Titre : MICROORGANISME GÉNÉTIQUEMENT OPTIMISÉ POUR LA PRODUCTION DE MOLÉCULES D'INTÉRÊT

(57) Abstract: The invention relates to a genetically modified microorganism expressing a functional type I or II RuBisCO enzyme and a functional phosphoribulokinase (PRK), and in which the glycolysis pathway is at least partially inhibited, said microorganism being genetically modified such that it produces an exogenous molecule and/or overproduces an endogenous molecule. According to the invention, the oxidative branch of the pentose phosphate pathway can also be at least partially inhibited. The invention further relates to the use of such a genetically modified microorganism for producing or overproducing a molecule of interest, and to methods for the synthesis or bioconversion of molecules of interest.

(57) Abrégé : L'invention concerne un microorganisme génétiquement modifié exprimant une enzyme RuBisCO de type I ou II et une phosphoribulokinase (PRK) fonctionnelles, et dans lequel la voie de glycolyse est au moins partiellement inhibée, ledit microorganisme étant génétiquement modifié de manière à produire une molécule exogène et/ou à surproduire une molécule endogène. Selon l'invention la branche oxydative de la voie des pentoses phosphates peut également être au moins partiellement inhibée. L'invention concerne également l'utilisation d'un tel microorganisme génétiquement modifié, pour la production ou la surproduction d'une molécule d'intérêt et des procédés de synthèse ou bioconversion de molécules d'intérêt.



WO 2018/138289 A1

Microorganisme génétiquement optimisé pour la production de molécules d'intérêt

Domaine de l'invention

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

Etat de la technique

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

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

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

En parallèle, le dioxyde de carbone (CO₂), dont les émissions dans l'atmosphère ne cessent de croître, n'est pas ou peu utilisé dans les procédés microbiologiques actuels, alors que sa consommation par les microorganismes pour la production de molécules d'intérêt permettrait
30 non seulement de réduire les coûts de production, mais également de répondre à des problématiques écologiques certaines.

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

Résumé de l'invention

5 L'intérêt d'utiliser des microorganismes non-photosynthétiques génétiquement modifiés pour pouvoir capturer le CO₂ et l'utiliser comme source de carbone principale, au même titre que les plantes et les microorganismes photosynthétiques a déjà été démontré. Ainsi, des microorganismes modifiés de manière à exprimer une RuBisCO (Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase - EC 4.1.1.39) et une PRK (phosphoribulokinase - EC 2.7.1.19)
10 fonctionnelles pour pouvoir ainsi reproduire un cycle de Calvin partiel et convertir le ribulose-5-phosphate en deux molécules de 3-phosphoglycérate par capture d'une molécule de dioxyde de carbone ont été développés.

En travaillant sur les solutions apportées par le cycle de Calvin pour produire des molécules d'intérêt en utilisant le CO₂ comme source de carbone, les inventeurs ont découvert qu'il est
15 possible d'augmenter le rendement de production de molécules d'intérêt en couplant une partie du cycle de Calvin (PRK/RuBisCO) à une inhibition au moins partielle de la glycolyse. Les inventeurs ont également découvert qu'il est possible d'augmenter la consommation de CO₂ exogène lors de la production de molécules d'intérêt, en inhibant également au moins partiellement la branche oxydative de la voie des pentoses phosphates. Les microorganismes
20 ainsi développés permettent de produire à grande échelle et avec un rendement industriellement intéressant un grand nombre de molécules d'intérêt, telles que des acides aminés, acides organiques, terpènes, terpénoïdes, peptides, acides gras, polyols, etc.

L'invention a donc pour objet un microorganisme génétiquement modifié exprimant une enzyme RuBisCO et une phosphoribulokinase (PRK) fonctionnelles, et dans lequel la voie de
25 la glycolyse est au moins partiellement inhibée, ledit microorganisme étant génétiquement modifié de manière à produire une molécule exogène d'intérêt et/ou à surproduire une molécule endogène d'intérêt, autre que l'enzyme RuBisCO ou phosphoribulokinase.

Dans un mode de réalisation particulier, le microorganisme génétiquement modifié présente une branche oxydative de la voie des pentoses phosphates également au moins partiellement
30 inhibée.

L'invention concerne également l'utilisation d'un microorganisme génétiquement modifié selon l'invention, pour la production ou la surproduction d'une molécule d'intérêt,

préférentiellement choisie parmi les acides aminés, les peptides, les protéines, les vitamines, les stérols, les flavonoïdes, les terpènes, les terpénoïdes, les acides gras, les polyols et les acides organiques.

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

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

Description des figures

Figure 1 : Schéma général de la glycolyse, de la voie des pentoses phosphates et de la voie Entner-Doudoroff ;

Figure 2 : Représentation schématique de l'inhibition de la voie de la glycolyse, selon
20 l'invention ;

Figure 3 : Représentation schématique de l'inhibition de la voie de la glycolyse, combinée à l'inhibition de la branche oxydative de la voie des pentoses phosphates, selon l'invention.

Description détaillée de l'invention

Définitions

25 Les termes «*microorganisme recombinant*», «*microorganisme modifié*» et «*cellule hôte recombinante*» sont utilisés ici de manière interchangeable et désignent des microorganismes qui ont été génétiquement modifiés pour exprimer ou pour surexprimer des séquences nucléotidiques endogènes, pour exprimer des séquences nucléotidiques hétérologues, ou qui ont une altération de l'expression d'un gène endogène. Par «altération», on entend que
30 l'expression du gène, ou niveau d'une molécule d'ARN ou molécules d'ARN équivalentes

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

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

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

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

l'inhibition peut être totale, c'est-à-dire que la protéine codée par ledit gène n'est plus du tout produite. L'inhibition de l'expression d'un gène peut notamment être obtenue par délétion, mutation, insertion et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides dans le gène considéré. Préférentiellement, l'inhibition de l'expression du gène est obtenue par délétion totale de la

5 séquence nucléotidique correspondante. Selon l'invention, toute méthode d'inhibition d'un gène, connue en soi par l'homme de l'art et applicable à un microorganisme peut être utilisée. Par exemple, l'inhibition de l'expression d'un gène peut être obtenue par recombinaison homologue (Datsenko *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 ; 97:6640-5 ; Lodish *et al.*, Molecular Cell Biology 4th ed. 2000. W. H. Freeman and Company. ISBN 0-7167-3136-3) ;

10 mutagenèse aléatoire ou dirigée pour modifier l'expression d'un gène et/ou l'activité de la protéine encodée (Thomas *et al.*, Cell. 1987;51:503-12) ; modification d'une séquence promotrice du gène pour altérer son expression (Kaufmann *et al.*, Methods Mol Biol. 2011;765:275-94. doi: 10.1007/978-1-61779-197-0_16) ; ciblage induit des lésions locales dans les génomes (TILLING) ; conjugaison, etc. Une autre approche particulière est

15 l'inactivation génique par insertion d'une séquence étrangère, par exemple par mutagenèse de transposon en utilisant des éléments génétiques mobiles (transposons), d'origine naturelle ou artificielle. Selon un autre mode de réalisation préféré, l'inhibition de l'expression du gène est obtenue par des techniques knock-out. L'inhibition de l'expression du gène peut également être

20 obtenue par extinction du gène en utilisant des ARN interférents, ribozymes ou antisens (Daneholt, 2006. Nobel Prize in Physiology or Medicine). Dans le contexte de la présente invention, le terme "ARN interférent" ou "ARNi" désigne toute molécule d'ARNi (par exemple ARN monocaténaire ou ARN bicaténaire) qui peut bloquer l'expression d'un gène cible et/ou faciliter la dégradation de l'ARNm correspondants. L'inhibition du gène peut également être

25 obtenue par des méthodes d'édition génomique qui permettent de directement apporter des modifications génétiques à un génome donné, via l'utilisation de nucléases à doigts de zinc (Kim *et al.*, PNAS; 93: 1156-1160), de nucléases effectrices de type activateur de transcription, dites « TALEN » (Ousterout *et al.*, Methods Mol Biol. 2016;1338:27-42. doi: 10.1007/978-1-4939-2932-0_3), d'un système combinant des nucléases de type Cas9 avec des courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées dites 'CRISPR' (Mali *et al.*, Nat

30 Methods. 2013 Oct;10(10):957-63. doi: 10.1038/nmeth.2649), ou encore de méganucléases (Daboussi *et al.*, Nucleic Acids Res. 2012. 40:6367-79). L'inhibition de l'expression du gène peut également être obtenue par inactivation de la protéine codée par ledit gène.

Par voie de biosynthèse ou bioconversion « *NADPH-dépendante* » ou « *consommatrice de NADPH* », on entend dans le contexte de l'invention l'ensemble des voies de biosynthèse ou

35 bioconversion dont une ou plusieurs enzymes nécessitent l'apport concomitant d'électrons obtenus par l'oxydation d'un cofacteur NADPH. Les voies de biosynthèse ou bioconversion

« *NADPH-dépendantes* » concernent notamment la synthèse d'acides aminés (e.g. arginine, lysine, méthionine, thréonine, proline, glutamate, homosérine, isoleucine, valine) acide γ -aminobutyrique, de terpénoïdes et de terpènes (e.g. farnésène), de vitamines et précurseurs (e.g. pantoate, pantothénate, transneurosporène, phylloquinone, tocophérols), de stérols (e.g. squalène, cholestérol, testostérone, progestérone, cortisone), de flavonoïdes (e.g. frambinone, vestinone), d'acides organiques (e.g. acide citrique, acide succinique, acide oxalique, acide itaconique, acide coumarique, acide 3-hydroxypropionique), de polyols (e.g. sorbitol, xylitol, glycérol), de polyamines (e.g. spermidine), de molécules aromatiques à partir d'une hydroxylation stéréospécifique, via un cytochrome p450 NADP-dépendant (e.g. phénylpropanoïdes, terpènes, lipides, tannins, arômes, hormones).

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

Microorganismes

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Expression d'une RuBisCO et d'une PRK fonctionnelles

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

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

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

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

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

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

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

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

Tableau 1 : Exemples de séquences codant pour une RuBisCO

Gène	GenBank	GI	Organisme
<i>rbcL</i>	BAD78320.1	56685098	<i>Synechococcus elongatus</i>
<i>rbcS</i>	BAD78319.1	56685097	<i>Synechococcus elongatus</i>
<i>cbbL2</i>	CAJ96184.1	113529837	<i>Cupriavidus necator</i>
<i>cbbS</i>	P09658.2	6093937	<i>Cupriavidus necator</i>
<i>cbbM</i>	YP_427487.1	132036	<i>Rhodospirillum rubrum</i>
<i>cbbM</i>	Q21YM9.1	115502580	<i>Rhodoferax ferrireducens</i>
<i>cbbM</i>	Q479W5.1	115502578	<i>Dechloromonas aromatica</i>
<i>rbcL</i>	O93627.5	37087684	<i>Thermococcus kodakarensis</i>
<i>cbbL</i>	CQR50548.1	811260688	<i>Haloferax sp. Arc-Hr</i>

Tableau 2 : Exemples de séquences codant pour une PRK

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

Inhibition de la glycolyse

Selon l'invention, la voie de la glycolyse est au moins partiellement inhibée, de sorte que le microorganisme n'est plus en mesure d'utiliser normalement cette voie métabolique (figure 1 - glycolyse). Autrement dit, le microorganisme n'a plus la capacité d'assimiler le glucose de manière similaire à un microorganisme sauvage, dans lequel la voie de la glycolyse n'a pas été inhibée (indépendamment de toute autre modification génétique).

Dans un mode de réalisation particulier, le microorganisme est génétiquement modifié de manière à inhiber, totalement ou partiellement, la glycolyse en aval de la production de glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P).

Par exemple, la glycolyse est inhibée en amont de la production de 1,3-biphospho-D-glycérate (1,3-BPG) ou en amont de la production de 3-phosphoglycérate (3PG).

Selon le microorganisme, les réactions impliquées entre le glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P) et le 3-phosphoglycérate (3PG) peuvent être prises en charge (i) par deux enzymes agissant de façon concomitante, la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (EC 1.2.1.12, abrégée GAPDH ou plus rarement G3PDH) et la phosphoglycérate kinase (E.C. 2.7.2.3, abrégée PGK), ou bien (ii) par une seule enzyme de type glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase non phosphorylante (EC 1.2.1.9, abrégée GAPN).

La glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) catalyse la conversion réversible du G3P en 1,3-biphospho-D-glycérate (1,3-BPG), en utilisant le couple NAD^+/NADH comme donneur/accepteur d'électron selon le sens de la réaction. Selon l'organisme les gènes codant pour la GAPDH peuvent s'appeler *gapA*, *gapB*, *gapC* (e.g. *Escherichia coli*, *Arabidopsis thaliana*), *GAPDH*, *GAPD*, *G3PD*, *GAPDHS* (e.g. *Homo sapiens*), *TDH1*, *TDH2*, *TDH3* (e.g. *Saccharomyces cerevisiae*), *gap*, *gap2*, *gap3* (e.g. *Mycobacterium* sp., *Nostoc* sp.).

La phosphoglycérate kinase (PGK) catalyse la conversion réversible du 1,3-BPG en 3PG, en utilisant le couple ATP/ADP comme cofacteur. Selon l'organisme, les gènes codant pour la PGK peuvent s'appeler PGK, PGK1, PGK2, PGK3, pgkA, PGKB, PGKC, cbbK, cbbKC, cbbKP (*e.g. Cupriavidus necator*).

- 5 La glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase non-phosphorylante (GAPN) catalyse la conversion du G3P en 3PG, sans passer par l'intermédiaire 1,3-BPG. Cette réaction est catalysée en présence du couple de cofacteur NADP⁺/NADPH qui joue le rôle d'accepteur d'électron. Selon l'organisme les gènes codant pour la GAPN peuvent s'appeler GAPN (*e.g. Bacillus sp., Streptococcus sp.*), GAPN1 (*e.g. Chlamydomonas sp.*).
- 10 Dans un exemple particulier, le microorganisme est génétiquement modifié de manière à ce que l'expression du gène codant la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase soit au moins partiellement inhibée. Préférentiellement, l'expression du gène est complètement inhibée.

De manière alternative ou additionnelle, l'expression du gène codant la phosphoglycérate kinase peut également être au moins partiellement inhibée. Préférentiellement, l'expression du

15 gène est complètement inhibée.

De manière alternative, le microorganisme est génétiquement modifié de manière à ce que l'expression du gène codant la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase non-phosphorylante soit au moins partiellement inhibée. Préférentiellement, l'expression du gène est complètement inhibée.

- 20 Les tableaux 3, 4 et 5 ci-dessous listent, à titre d'exemples, les séquences codant une glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase, une phosphoglycérate kinase et une glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase non-phosphorylante qui peuvent être inhibées en fonction du microorganisme cible. L'homme du métier sait quel gène correspond à l'enzyme d'intérêt à inhiber en fonction du microorganisme.

Tableau 3 : Exemples de séquences codant pour une GAPDH

Gène	GenBank	GI	Organisme
<i>gapA</i>	NP_416293.1	947679	<i>Escherichia coli</i>
TDH1	NP_012483.3	398364523	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
TDH2	NP_012542.1	6322468	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
TDH3	NP_011708.3	398366083	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>gap</i>	CCE36949.1	378544675	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>gap2</i>	P34917.2	92090599	<i>Nostoc sp</i>

Tableau 4 : Exemples de séquences codant pour une PGK

Gène	GenBank	GI	Organisme
<i>pgk</i>	AKL94701.1	831186507	<i>Clostridium aceticum</i>
PGK1	NP_009938.2	10383781	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>pgk</i>	BAG04189.1	166089481	<i>Microcystis aeruginosa</i>
PGKA	AAG34561.2	22711882	<i>Dictyostelium discoideum</i>
PGKB	CAJ03534.1	68126221	<i>Leishmania major</i>
<i>cbbKC</i>	AAC43444.1	976365	<i>Cupriavidus necator</i>
<i>pgk</i>	CAK45271.1	4982539	<i>Aspergillus niger</i>
<i>pgk</i>	EAU38870.1	4354973	<i>Aspergillus terreus</i>

5 Tableau 5 : Exemples de séquences codant pour une GAPN

Gène	GenBank	GI	Organisme
<i>gapN</i>	CUB58597.1	924094571	<i>Bacillus subtilis</i>
GAPN	NP_358622.1	933338	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
GAPN1	EDP03116.1	542583	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>

D'une manière générale, la production de 3-phosphoglycérate (3PG) n'est plus possible par le biais de la glycolyse, ou au moins fortement diminuée, dans le microorganisme génétiquement modifié selon l'invention.

Dans un exemple de réalisation particulier, le microorganisme est une levure de genre *Saccharomyces cerevisiae* dans laquelle l'expression du gène TDH1 (Gene ID: 853395), TDH2 (Gene ID : 853465) et/ou TDH3 (Gene ID : 853106) est au moins partiellement inhibée.

5 Dans un autre exemple de réalisation particulier, le microorganisme est une levure de genre *Saccharomyces cerevisiae* dans laquelle l'expression du gène PGK1 (Gene ID : 5230) est au moins partiellement inhibée.

Dans un autre exemple de réalisation, le microorganisme est une levure de genre *Saccharomyces cerevisiae* dans laquelle l'expression du gène PGK1 (Gene ID : 5230), l'expression du gène TDH1 (Gene ID: 853395), TDH2 (Gene ID : 853465) et/ou l'expression
10 du gène TDH3 (Gene ID : 853106) sont au moins partiellement inhibées.

Dans un exemple de réalisation particulier, le microorganisme est une bactérie de genre *Escherichia coli* dans laquelle l'expression du gène *gapA* (Gene ID : 947679) est au moins partiellement inhibée.

15 Dans un autre exemple de réalisation particulier, le microorganisme est une bactérie de genre *Escherichia coli* dans laquelle l'expression du gène *pgk* (Gene ID : 947414) est au moins partiellement inhibée.

Dans un autre exemple de réalisation, le microorganisme est une bactérie de genre *E. coli* dans laquelle l'expression du gène *pgk* (Gene ID : 947414), et/ou l'expression du gène *gapA* (Gene ID : 947679) sont au moins partiellement inhibées.

20 Selon l'invention, le microorganisme génétiquement modifié, qui exprime une RuBisCO et une PRK fonctionnelles, est par contre apte à produire du 3PG par capture du CO₂, à partir du ribulose-5-phosphate produits par la voie des pentoses phosphates (figure 2).

Les enzymes nécessaires à la métabolisation du 3PG en pyruvate n'étant pas inhibées dans le microorganisme, ledit microorganisme peut alors métaboliser le 3PG de manière à produire du
25 pyruvate et de l'ATP.

Ainsi, le microorganisme génétiquement modifié est apte à produire du pyruvate et des cofacteurs NADPH en utilisant du CO₂ comme source de carbone complémentaire.

Dans le contexte de l'invention, on entend par source de carbone « complémentaire », le fait que le microorganisme utilise le CO₂ comme source de carbone partielle, en complément des
30 atomes de carbone fournis par des sucres fermentescibles (glucose, galactose, saccharose,

fructose, etc.), qui constituent la source de carbone majoritaire, ou principale, pour la production de pyruvate.

Ainsi, le microorganisme génétiquement modifié selon l'invention permet d'augmenter le rendement carbone, en fixant et en utilisant le CO₂ normalement perdu lors du métabolisme du glucose par la voie des pentoses phosphates, pour la production de pyruvate (et par la suite de molécules d'intérêt).

Inhibition de branche oxydative de la voie des pentoses phosphates

Dans un mode de réalisation particulier, le microorganisme génétiquement modifié selon l'invention est également modifié de manière à ce que la branche oxydative de la voie des pentoses phosphates soit également au moins partiellement inhibée.

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

L'interruption de la branche oxydative de la voie des pentoses phosphates en amont de la production de ribulose-5-phosphate (Ru5P) cible spécifiquement une ou plusieurs réactions dans le processus de synthèse du Ru5P à partir de glucose-6-phosphate (G6P). Cette synthèse est généralement catalysée par les actions successives de trois enzymes : (i) la glucose-6-phosphate déshydrogénase (EC. 1.1.1.49, abrégée G6PDH), (ii) la 6-phosphogluconolactonase (E.C. 3.1.1.31, abrégée PGL), et (iii) la 6-phosphogluconate déshydrogénase (EC 1.1.1.44, abrégée PGD).

La glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) catalyse la première réaction de la voie des pentoses phosphates, c'est-à-dire l'oxydation du glucose-6-phosphate en 6-phosphogluconolactone (6PGL), avec réduction concomitante d'une molécule de NADP⁺ en NADPH. Selon l'organisme les gènes codant pour la G6PDH peuvent s'appeler G6PD (par exemple chez *Homo sapiens*), G6pdx (par exemple chez *Mus musculus*), gsdA (par exemple chez *Aspergillus nidulans*), zwf (par exemple chez *Escherichia coli*), ou encore ZWF1 (par exemple chez *Saccharomyces cerevisiae*).

La 6-phosphogluconolactonase (PGL) est une hydrolase catalysant la synthèse de 6-phosphogluconate (6PGA) à partir de 6PGL. Selon l'organisme les gènes codant pour la PGL peuvent s'appeler *pgl* (par exemple chez *Escherichia coli*, *Synechocystis sp.*) *pgls* (par exemple

chez *Rhodobacteraceae bacterium*), ou encore SOL (par exemple chez *Saccharomyces cerevisiae*).

La 6-phosphogluconate déshydrogénase (PGD) est une oxydoréductase catalysant la synthèse de Ru5P à partir de 6PGA, avec réduction concomitante d'une molécule de NADP⁺ en NADPH et émission d'une molécule de CO₂. Selon l'organisme, les gènes codant pour la PGD peuvent s'appeler *gnd* (par exemple chez *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*), PGD (par exemple chez *Homo sapiens*), *gntZ* (par exemple chez *Bacillus subtilis*), ou encore 6-PGDH (par exemple chez *Lactobacillus paracollinoides*).

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

De manière alternative ou additionnelle, le microorganisme est génétiquement modifié de manière à ce que l'expression du gène codant la 6-phosphogluconolactonase soit au moins partiellement inhibée. Préférentiellement, l'expression du gène est complètement inhibée.

De manière alternative ou additionnelle, le microorganisme est génétiquement modifié de manière à ce que l'expression du gène codant la 6-phosphogluconate déshydrogénase soit au moins partiellement inhibée. Préférentiellement, l'expression du gène est complètement inhibée.

Les tableaux 6, 7 et 8 ci-dessous listent, à titre d'exemples, les séquences codant une glucose-6-phosphate déshydrogénase, une 6-phosphogluconolactonase et 6-phosphogluconate déshydrogénase qui peuvent être inhibées en fonction du microorganisme cible. L'homme du métier sait quel gène correspond à l'enzyme d'intérêt à inhiber en fonction du microorganisme.

Tableau 6 : Exemples de séquences codant pour une G6PDH

Gène	GenBank	GI	Organisme
<i>zwf</i>	BAA15660.1	946370	<i>Escherichia coli</i>
ZWF1	NP_014158.1	6324088	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>gsdA</i>	CAA54841.1	1523786	<i>Aspergillus nidulans</i>
<i>gsdA</i>	CAK37895.1	4979751	<i>Aspergillus niger</i>
<i>gsdA</i>	EAU38380.1	4316232	<i>Aspergillus terreus</i>

Tableau 7 : Exemples de séquences codant pour une PGL

Gène	GenBank	GI	Organisme
<i>pgl</i>	BAA35431.1	4062334	<i>Escherichia coli</i>
<i>pgl</i>	BAK51770.1	339275283	<i>Synechocystis</i>
<i>pgls</i>	KPQ07176.1	938272062	<i>Rhodobacteraceae</i> <i>bacterium</i>
SOL3	KZV10901.1	1023943655	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Tableau 8 : Exemples de séquences codant pour une PGD

Gène	GenBank	GI	Organisme
<i>gnd</i>	ALI40222.1	937519736	<i>Escherichia coli</i>
GND1	EDN62420.1	151944127	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>gntZ</i>	NP_391888.1	16081060	<i>Bacillus subtilis</i>
6-PGDH	WP_054711110.1	938929230	<i>Lactobacillus</i> <i>paracollinoides</i>

- 5 D'une manière générale, la production de ribulose-5-phosphate (Ru5P) n'est plus possible par le biais des pentoses phosphates, ou au moins fortement diminuée, dans le microorganisme génétiquement modifié selon l'invention.

Dans un exemple de réalisation particulier, le microorganisme est une levure du genre *Saccharomyces cerevisiae* dans laquelle l'expression du gène ZWF1 est au moins partiellement inhibée.

10

Dans un exemple particulier, la levure du genre *Saccharomyces cerevisiae* est génétiquement modifiée de manière à ce que l'expression des gènes TDH1, TDH2, TDH3 et/ou PGK1, et l'expression du gène ZWF1 soient au moins partiellement inhibées.

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

15

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

Dans un autre exemple, le microorganisme est un champignon filamenteux du genre *Aspergillus*, tel que *Aspergillus niger* ou *Aspergillus terreus*, génétiquement modifié de manière à ce que l'expression des gènes *pgk* et *gsdA* soit partiellement inhibée.

5 Selon l'invention, le microorganisme génétiquement modifié, qui exprime une RuBisCO et une PRK fonctionnelles, et dont la voie de la glycolyse et la branche oxydative de la voie des pentoses phosphates sont au moins partiellement inhibées n'est plus apte à produire du 3PG par la voie de la glycolyse ni du Ru5P par la branche oxydative de la voie des pentoses phosphates. Il est par contre apte à produire du Ru5P en déviant la production de fructose-6-phosphate (F6P) et/ou glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P), produits en début de glycolyse (en amont de l'inhibition). Cette production est notamment possible grâce aux enzymes transcétolase (EC 10 2.2.1.1), transaldolase (EC 2.2.1.2), ribose-5-phosphate isomérase (EC 5.3.1.6), et ribulose-5-phosphate épimérase (EC 5.1.3.1) naturellement présentes et actives chez les microorganismes (figure 3).

15 Les enzymes nécessaires à la métabolisation du 3PG en pyruvate n'étant pas inhibées dans le microorganisme selon l'invention, ledit microorganisme peut alors métaboliser le 3PG de manière à produire du pyruvate et de l'ATP.

Ainsi, le microorganisme génétiquement modifié est apte à produire du pyruvate en utilisant du CO₂ exogène comme source de carbone complémentaire.

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

Inhibition de la voie d'Entner-Doudoroff

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

Préférentiellement, le microorganisme est génétiquement modifié de manière à inhiber les 30 réactions de la voie d'Entner-Doudoroff en aval de la production de 6-phosphogluconate. Cette

inhibition permet d'éliminer une possible voie compétitrice, et d'assurer la disponibilité du 6-phosphogluconate comme substrat pour l'ingénierie PRK/RuBisCO.

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

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

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

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

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

Les tableaux 9 et 10 ci-dessous listent, à titre d'exemples, les séquences codant une 6-phosphogluconate déshydratase et une 2-déshydro-3-désoxy-phosphogluconate aldolase qui peuvent être inhibées en fonction du microorganisme cible. L'homme du métier sait quel gène correspond à l'enzyme d'intérêt à inhiber en fonction du microorganisme.

Tableau 9 : Exemples de séquences codant pour une EDD

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

Tableau 10 : Exemples de séquences codant pour une EDA

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

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

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

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

- 15 Selon l'invention, le microorganisme génétiquement modifié, qui exprime une RuBisCO et une PRK fonctionnelles, et dont la voie de la glycolyse et la voie Entner-Doudoroff sont au moins partiellement inhibées n'est plus apte à produire du 3PG par la voie de la glycolyse ni du pyruvate par la voie Entner-Doudoroff. Le flux de carbone à partir du glucose est par conséquent orienté de façon préférentielle vers l'ingénierie PRK/RuBisCO.

Production de molécules d'intérêt

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

- 20 Dans le contexte de l'invention, on désigne préférentiellement par molécule d'intérêt une petite molécule organique, de masse moléculaire inférieure ou égale à 0,8 kDa.

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

Dans le contexte de l'invention, un rendement « amélioré » s'entend en termes de quantité de produit fini. D'une manière générale, le rendement carbone correspond dans le contexte de l'invention au ratio quantité de produit fini / quantité de sucre fermentescible, notamment en poids. Selon l'invention, le rendement carbone est augmenté chez les microorganismes génétiquement modifiés selon l'invention, comparativement aux microorganismes sauvages, placés dans des conditions de culture identiques. Avantageusement, le rendement carbone est augmenté de 2%, 5%, 10%, 15%, 18%, 20%, ou plus. Le microorganisme génétiquement modifié selon l'invention peut produire une plus grande quantité des molécules d'intérêt (produit fini) comparativement aux molécules hétérologues produites par un microorganisme modifié génétiquement simplement pour produire ou surproduire cette molécule. Selon l'invention, le microorganisme génétiquement peut également surproduire une molécule endogène comparativement au microorganisme sauvage. La surproduction d'une molécule endogène s'entend principalement en termes de quantités. Avantageusement, le microorganisme génétiquement modifié produit au moins 20%, 30%, 40%, 50%, ou plus en poids de la molécule endogène que le microorganisme sauvage. Avantageusement, le microorganisme selon l'invention est génétiquement modifié de manière à produire ou surproduire au moins une molécule parmi les acides aminés, les terpénoïdes, les terpènes, les vitamines et/ou précurseurs de vitamines, les stérols, les flavonoïdes, les acides organiques, les polyols, les polyamines, les molécules aromatiques obtenues à partir d'une hydroxylation stéréospécifique, via un cytochrome p450 NADP-dépendant, etc.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

25 Le terme « milieu de culture approprié » désigne d'une manière générale un milieu de culture stérile apportant les nutriments essentiels ou bénéfiques à la maintenance et/ou à la croissance dudit microorganisme, tels que les sources carbonées ; les sources azotées telles que le sulfate d'ammonium ; les sources de phosphores, par exemple, le potassium phosphate monobasique ; les oligo-éléments, par exemple, les sels de cuivre, d'iodure, de fer, de magnésium, de zinc ou de molybdate ; les vitamines et autres facteurs de croissance tels que des acides aminés ou autres promoteurs de croissance. Un antimousse peut être ajouté selon les besoins. Selon l'invention, 30 ce milieu de culture approprié peut être chimiquement défini ou complexe. Le milieu de culture peut ainsi être de composition identique ou similaire à un milieu synthétique, tel que défini par

Verduyn *et al.*, (Yeast. 1992. 8:501–17), adapté par Visser *et al.*, (Biotechnology and bioengineering. 2002. 79:674–81), ou commercialement disponible tel que le milieu YNB (Yeast Nitrogen Base, MP Biomedicals ou Sigma-Aldrich).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Par exemple, il est possible de faire surproduire du citrate par un champignon, notamment un champignon filamenteux, tel qu'*Aspergillus niger*, génétiquement modifié pour exprimer une
30 PRK et une RuBisCO de type I ou II fonctionnelles, et dans lequel l'expression des gènes pgk (Gene ID : 4982539) et gsdA (Gene ID : 4979751) est au moins partiellement inhibée.

Il est également possible de faire surproduire de l'acide itaconique par un champignon, notamment un champignon filamenteux, tel qu'*Aspergillus terreus* ou *Aspergillus niger*, génétiquement modifié pour exprimer une PRK et une RuBisCO de type I ou II fonctionnelles, et dans lequel l'expression des gènes *pgk* (Gene ID : 4354973) et *gsdA* (Gene ID : 4316232) est au moins partiellement inhibée.

De même, il est possible de faire produire du farnésène par une levure telle qu'une levure du genre *Saccharomyces cerevisiae* génétiquement modifiée pour exprimer une PRK et une RuBisCO de type I ou II fonctionnelles, une farnésène synthase et dans laquelle l'expression d'un gène PGK1 (Gene ID : 5230) est au moins partiellement inhibée.

Il est également possible de faire surproduire du glutamate par une bactérie, telle qu'une bactérie du genre *Escherichia coli*, génétiquement modifiée pour exprimer une PRK et une RuBisCO de type I ou II fonctionnelles, et dans laquelle l'expression du gène *gapA* (Gene ID : 947679) est au moins partiellement inhibée. Cette surproduction peut également se réaliser dans une souche où l'inhibition au moins partielle du gène *gapA* est combinée avec l'inhibition au moins partielle du gène *zwf* (Gene ID : 946370).

De même, il est également possible de faire surproduire de l'acide γ -aminobutyrique par une bactérie, telle qu'une bactérie du genre *Escherichia coli*, génétiquement modifiée pour exprimer une PRK et une RuBisCO de type I ou II fonctionnelles, ainsi qu'une glutamate décarboxylase *gadB* (Gene ID : 946058), et dans laquelle l'expression du gène *gapA* (Gene ID : 947679) est au moins partiellement inhibée. Cette surproduction peut également se réaliser dans une souche où l'inhibition au moins partielle du gène *gapA* est combinée avec l'inhibition au moins partielle du gène *zwf* (Gene ID : 946370).

De même il est possible de faire surproduire de l'acide succinique et de l'acide oxalique par une bactérie, telle qu'une bactérie du genre *Escherichia coli*, génétiquement modifiée pour exprimer une PRK et une RuBisCO de type I ou II fonctionnelles, ainsi qu'une activité enzymatique permettant l'oxydation du glyoxylate en oxalate, préférentiellement une glyoxylate déshydrogénase FPGLOXDH1 (ARNm : BAH29964.1), une glyoxylate oxydase GLO (ARNm: AOW73106.1), ou une lactate déshydrogénase LDHA (Gene ID : 3939), et dans laquelle l'expression des gènes *gapA* (Gene ID : 947679) et *zwf* (Gene ID : 946370) est au moins partiellement inhibée.

EXEMPLES

Exemple 1: Analyse bio-informatique

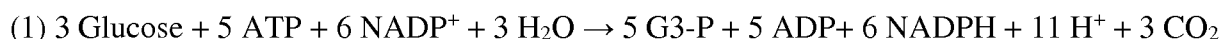
a) Calcul de rendements théoriques

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

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

- 10 Deux cas de figure ont été analysés : l'amélioration apportée par l'ingénierie PRK-RuBisCO (i) dans une souche inhibée pour la glycolyse sur le rendement d'une voie de biosynthèse NADPH-dépendante (par exemple, synthèse de farnésène), et (ii) dans une souche inhibée pour la glycolyse et pour la branche oxydative de la voie des pentoses phosphates sur le rendement d'une voie de biosynthèse d'intérêt (par exemple, synthèse de citrate).

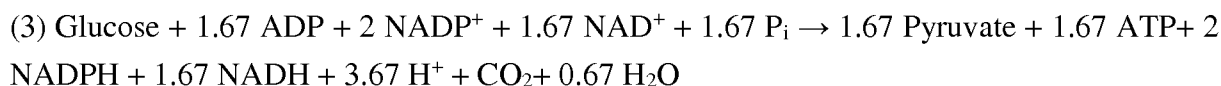
- 15 Dans le cadre de l'amélioration des voies de biosynthèse NADPH-dépendante, le bilan théorique de la formation de NADPH et de glycéraldéhyde-3-phosphate (G3-P) à partir de glucose par la voie des pentoses phosphates a été calculé selon l'équation ci-dessous (1) :



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

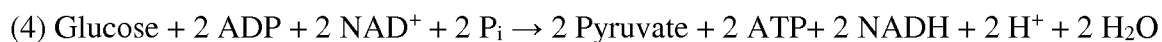
- 20 $(2) 3 \text{ Glucose} + 5 \text{ ADP} + 6 \text{ NADP}^+ + 5 \text{ NAD}^+ + 5 \text{ P}_i \rightarrow 5 \text{ Pyruvate} + 5 \text{ ATP} + 6 \text{ NADPH} + 5 \text{ NADH} + 11 \text{ H}^+ + 3 \text{ CO}_2 + 2 \text{ H}_2\text{O}$

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



- 25 Ainsi, en utilisant par la voie des pentoses phosphates, 1.67 moles de pyruvate et 2 moles de NADPH sont produites à partir d'une mole de glucose. Une mole de carbone est par contre perdue par décarboxylation, lors de la formation de ribulose-5-phosphate par la 6-

phosphogluconate déshydrogénase (EC 1.1.1.44). En comparaison, la formation de pyruvate par la voie de la glycolyse donne le rendement suivant :

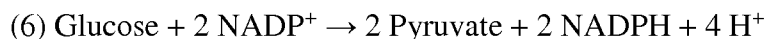


Le rendement maximum théorique de production de pyruvate par la voie des pentoses phosphates est par conséquent de 0.82 g_{pyruvate}/g_{glucose} (g de pyruvate synthétisé, par g de glucose consommé), alors qu'il est de 0.98 g_{pyruvate}/g_{glucose} par la voie de la glycolyse.

En intégrant l'ingénierie PRK/RuBisCO dans une souche inhibée pour la glycolyse (par exemple ΔPGK1 dans le cadre de la levure *S. cerevisiae*), le flux de fixation de carbone est redirigé vers la branche oxydative de la voie des pentoses phosphates, puis vers l'ingénierie PRK/RuBisCO (cf. figure 2). Ce flux se rattache à la fin de la voie de la glycolyse, au niveau de la formation de 3-phosphoglycérate (3PG), avec le rendement suivant :

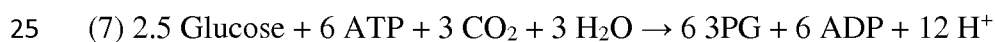


En descendant jusqu'à la formation de pyruvate à partir de 3PG, on arrive au bilan suivant :

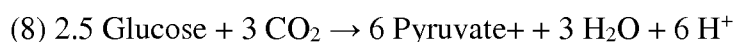


L'intégration des modifications selon l'invention dans un microorganisme permet de récupérer la molécule de carbone autrement perdue par la décarboxylation dans la voie des pentoses. Le rendement maximum théorique de fixation de carbone est par conséquent de 0.98 g_{pyruvate}/g_{glucose}, ce qui permet d'améliorer de 20.5% le rendement obtenu par la production de pyruvate par la voie des pentoses phosphates, tout en produisant du NADPH.

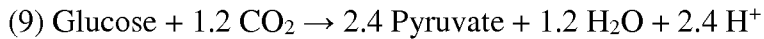
Dans un second cas de figure (cf. figure 3), l'ingénierie PRK/RuBisCO est intégrée dans une souche à la fois inhibée pour la glycolyse (par exemple ΔPGK1 dans le cadre de la levure *S. cerevisiae*), et pour la branche oxydative de la voie des pentoses phosphates (par exemple ΔZWF1 dans le cadre de la levure *S. cerevisiae*). Le bilan théorique de la formation de NADPH et de 3-phosphoglycérate (3PG) à partir de glucose devient alors



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



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

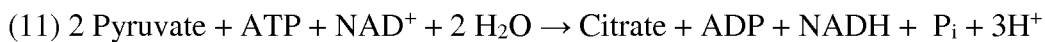


L'intégration des modifications selon l'invention permet de fixer 1.2 molécule de carbone supplémentaire par mole de glucose consommée. Le rendement maximum théorique correspondant est de $1.17 \text{ g}_{\text{pyruvate}}/\text{g}_{\text{glucose}}$, soit *ca.* 20 % d'amélioration, comparé au rendement de fixation de carbone de la glycolyse.

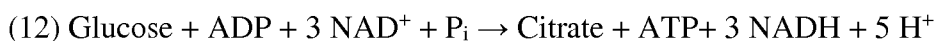
ii) Application à la production de citrate

Dans un second cas de figure, on applique le calcul à la production de citrate chez la levure *S. cerevisiae*, dans une souche sauvage et dans une souche modifiée selon l'invention intégrant une ingénierie PRK/RuBisCO et délétée pour le gène PGK1 de façon à inhiber la voie de la glycolyse, et pour le gène ZWF1 pour inhiber la branche oxydative de la voie des pentoses.

La production de citrate à partir de pyruvate se résume par l'équation bilan suivante :

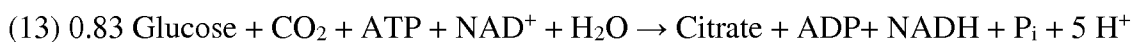


Cette synthèse ne nécessite pas de NADPH, mais 2 moles de pyruvate. De façon optimale, une souche sauvage obtient ces 2 moles de pyruvate par la glycolyse, à partir d'une mole de glucose d'après l'équation (4), avec le bilan suivant :



Le rendement $\text{g}_{\text{citrate}}/\text{g}_{\text{glucose}}$ correspondant est de 1.07

Dans le cadre d'une souche modifiée selon l'invention, inhibée pour la voie de la glycolyse et la voie des pentoses phosphates, les 2 pyruvates nécessaires sont obtenus avec seulement 0.83 mole de glucose (cf. équation 9), avec le bilan suivant :



Le rendement $\text{g}_{\text{citrate}}/\text{g}_{\text{glucose}}$ correspondant est de 1.28, soit une augmentation théorique maximale d'environ 20 % par rapport au rendement de la souche sauvage.

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

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

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

i) Procédure

- Les simulations ABF ont été réalisées avec le logiciel OptFlux (Rocha *et al.*, BMC Syst Biol. 2010 Apr 19;4:45. doi: 10.1186/1752-0509-4-45), et le modèle métabolique de *Saccharomyces cerevisiae* iMM904 (Mo *et al.*, BMC Syst Biol. 2009 Mar 25;3:37. doi: 10.1186/1752-0509-3-37). Ce modèle a été modifié pour inclure les améliorations décrites selon l'invention,
- 15 notamment une voie hétérologue de fixation de CO₂ avec (i) ajout d'une réaction de type PRK, (ii) ajout d'une réaction de type RuBisCO.

- Dans des exemples de réalisation particuliers, les réactions nécessaires pour simuler la production de molécules par des voies hétérologues ont également été ajoutées au modèle.
- 20

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

- Dans un second exemple de réalisation particulier, les réactions de type acetoacetyl-CoA réductase (EC 1.1.1.36), et poly-β-hydroxybutyrate synthase (EC 2.3.1.B2 ou 2.3.1.B5), ont été
- 25 rajoutées au modèle pour simuler une voie de production hétérologue de β-hydroxybutyrate, le monomère du polyhydroxybutyrate.

Dans un autre exemple de réalisation particulier, une réaction de type glutamate décarboxylase (EC 4.1.1.15) a notamment été rajoutée pour la production hétérologue de l'acide γ-aminobutyrique.

Dans un autre exemple de réalisation particulier, une réaction de type aconitate décarboxylase (EC 4.1.1.6) a notamment été rajoutée pour la production hétérologue de l'acide itaconique.

Dans un autre exemple de réalisation particulier, une réaction de type lactate déshydrogénase (EC 1.1.1.27) a notamment été rajoutée pour la production hétérologue d'oxalate

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

- 10 Dans des exemples de réalisation particuliers, les simulations sont réalisées en inactivant virtuellement les réactions des enzymes PGK1 (par exemple, glutamate, acide β -hydroxybutyrique, farnésène) et ZWF1 (par exemple, production de citrate), de façon à simuler les diminutions d'activité de la glycolyse et de la voie des pentoses phosphates, décrites selon l'invention.

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

ii) Résultats

Les rendements théoriques obtenus et les pourcentages d'amélioration apportés par l'invention sont décrits dans le tableau 11 ci-dessous.

Tableau 11 : Rendements de production maximums théoriques évalués par ABF sur une souche sauvage et une souche modifiée selon les modifications du brevet, pour la production de différentes molécules.

Molécule cible	Conditions de simulation	Rendements de production maximums théoriques avec une souche sauvage			Rendements de production maximums théoriques avec une souche modifiée selon l'invention			Pourcentage d'amélioration du rendement massique théorique $\frac{gX}{g_{GLUC}}$ apporté par l'invention
		Mol _X /Mol _{GLUC}	CMol _X / CMol _{GLUC}	g _X /g _{GLUC}	Mol _X /Mol _{GLUC}	CMol _X / CMol _{GLUC}	g _X /g _{GLUC}	
Citrate	ΔPGK1, ΔZWF1,	1	1	1.07	1.2	1.2	1.28	+ 20 %
Itaconate	ΔPGK1, ΔZWF1,	1	0.83	0.72	1.2	1	0.87	+ 20 %
Glutamate	ΔPGK1	0.92	0.77	0.75	1.09	0.91	0.89	+ 18.7 %
	ΔPGK1, ΔZWF1,	1	0.83	0.82	1.2	1	0.98	+ 20 %
GABA	ΔPGK1, ΔZWF1,	1	0.67	0.57	1.2	0.8	0.69	+20 %
Acide β-hydroxybutyrique	ΔPGK1	0.92	0.61	0.53	1.09	0.73	0.63	+ 18.2 %
Farnésène	ΔPGK1	0.21	0.54	0.24	0.24	0.59	0.27	+12.5 %
Coproductio - Succinate - Oxalate	ΔPGK1, ΔZWF1,	1	0.67	0.66	1.2	0.8	0.79	+20 %
		1	0.33	0.5	1.2	0.4	0.6	+20 %

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

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

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

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

10 Une souche de levure *Saccharomyces cerevisiae*, CEN.PK 1605 (Mat a HIS3 leu2-3.112 trp1-289 ura3-52 MAL.28c) issue de la souche commerciale CEN.PK 113-7D (GenBank :

JRIV00000000) est ingénierée pour produire du NADPH sans perte de CO₂ et ainsi permettre l'amélioration de la production d'alpha-farnésène à partir de glucose.

a) Inactivation de la voie de la glycolyse

Pour cela, la voie de la glycolyse a été inactivée par délétion du gène PGK1. Une fois la glycolyse inhibée, la souche de levure obtenue n'est plus à même d'utiliser le glucose comme source de carbone et d'énergie. Il est donc nécessaire d'alimenter les voies de synthèse de biomasse par du glycérol et les voies énergétiques par de l'éthanol. Les souches délétées pour PGK1 sont cultivées sur milieu YPGE (yeast extract peptone glycérol éthanol).

La délétion du gène PGK1 a été obtenue de la manière suivante :

10 La phase codante du gène de résistance au G418, issue de la cassette KanMX contenue sur le plasmide pUG6 (P30114 - Euroscarf) a été amplifiée avec les oligonucléotides CB101 (SEQ ID N°1) et CB102 (SEQ ID N°2) :

SEQ ID N°1 : CB101 (forward): 5'-
ACAGATCATCAAGGAAGTAATTATCTACTTTTTACAACAAATATAAAACAATGGG
15 TAAGGAAAAGACTCACGTTTC-3'
SEQ ID N°2 : CB102 (reverse): 5'-
GGGAAAGAGAAAAGAAAAAATTGATCTATCGATTTC AATTCAATTCAATTTTAGA
AAAACTCATCGAGCATCAAATGAAAC -3'

20 La partie soulignée des oligonucléotides est parfaitement homologue à la séquence Kan et le reste de la séquence correspond aux régions adjacentes à la phase codante du gène PGK1 sur le génome de *Saccaromyces cerevisiae* de manière à générer un amplicon PCR contenant aux extrémités des séquences de recombinaison homologues du locus du gène PGK1.

Pour la réaction de transformation selon l'homme de l'art (Methods in Yeast Genetics, Cold
25 Spring Harbor lab course manual, 1997 ; Gietz and Schiest, 1995, Methods in Molecular and Cellular Biology 5[5]:225-269), la souche CEN.PK 1605 a été cultivée dans un volume de 50 ml de milieu riche complexe YPD (yeast extract peptone dextrose) à 30°C jusqu'à une densité optique à 600 nm de 0,8. Les cellules ont été centrifugées pendant 5 minutes à 2 500 tr / min à la température ambiante. Le surnageant a été éliminé et les cellules ont été remises en
30 suspension dans 25 ml d'eau stérile et centrifugées de nouveau pendant 5 minutes à 2 500 tr / min à température ambiante. Après avoir éliminé le surnageant, les cellules ont été remises en suspension dans 400 µl d'acétate de lithium stérile 100 mM.

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

5 50 µl des cellules remises en suspension ont été ajoutés au mélange de transformation et incubés à 42 ° C pendant 40 minutes dans un bain d'eau.

Après incubation, le tube a été centrifugé pendant 1 minute à 5 000 tr / min à température ambiante et le surnageant a été jeté. Les cellules ont été remises en suspension dans 2 mL de milieu YPGE (yeast extract peptone glycérol éthanol), transférées dans un tube de 14 mL et incubées pendant 2 heures à 30 °C 200 tours par minute. Les cellules ont ensuite été centrifugées pendant 1 minute à 5 000 tr / min à température ambiante. Le surnageant a été éliminé et les 10 cellules ont été remises en suspension dans 1 ml d'eau stérile et centrifugées de nouveau pendant 1 minute et resuspendues dans 100 µl d'eau stérile et étalé sur YPGE+G418 180 µg/mL.

Les colonies obtenues ont été génotypées pour la validation de la délétion du gène PGK1 et référencées EQ-0134 (CEN.PK1605 $\Delta pgk1::kan$).

15 *b) Introduction des enzymes PRK - RuBisCO - alpha-farnésène synthase*

Afin de reconstituer une voie alternative à la glycolyse et permettre à la souche $\Delta pgk1$ de pousser sur glucose, ladite souche a été modifiée de manière à permettre l'expression combinatoire :

- d'un gène codant pour une phosphoribulokinase PRK qui se greffe sur la voie des pentoses phosphates en consommant le ribulose-5P pour donner le ribulose-1.5bisP et
- d'une RuBisCO de type I (avec les gènes structuraux RbcL et RbcS et les chaperonnes RbcX, GroES et GroEL). La RuBisCO consomme le ribulose-1.5bisP et une mole de CO₂ pour former le 3-phosphoglycerate en aval de la délétion PGK1 dans la voie de la glycolyse.

25 Cette voie alternative permet de nouveau à la souche de consommer le glucose comme source principale de carbone et d'énergie.

Pour produire de l'alpha-farnésène, il manque à la levure le gène de l'alpha-farnésène synthase (AFS1; SEQ ID N° 71 ; GenBank accession number AY182241).

30 Aussi, les sept gènes nécessaires à l'ingénierie PRK-RuBisCO (Tableau 12) ont été clonés sur quatre vecteurs plasmidiques capables de se répliquer de manière autonome, avec des origines de répllication compatibles et portant chacun un gène différent de complémentation

d'auxotrophie ou de résistance à un antibiotique, permettant de sélectionner les souches contenant les trois ou quatre constructions plasmidiques.

Deux de ces plasmides sont monocopies, avec une origine de réplication de type Ars/CEN et le troisième est multicopie avec une origine 2 μ .

Tableau 12 : Description des cassettes d'expression et de la composition des plasmides

	GenBank	Optimisation de codons	Promoteur	Terminateur	ori	Marqueur auxotrophie	Plasmides		
RbcL	BAD78320.1	Oui	TDH3p	ADH1t	2μ	URA3	pFPP45		
RbcS	BAD78319.1	Oui	TEF1p	PGK1t	2μ	URA3	pFPP45		
RbcX	BAD80711.1	Oui	TEF1p	PGK1t	ARS-CEN6	LEU2	pFPP56		
GroES	U00096	Non	PGI1p	CYC1t	ARS-CEN6	LEU2	pFPP56		
GroEL	AP009048	Non	TDH3p	ADH1t	ARS-CEN6	LEU2	pFPP56		
PRK	BAD78757.1	Oui	Tet-OFF	CYC1t	ARS416-CEN4	TRP1	pFPP20		
alpha-farnésène synthase (AFS1)	AY182241	Oui	TEF1p	PGK1t	2μ	NatMX		pL4	
Vide			Tet-OFF	CYC1t	ARS416-CEN4	TRP1	pCM185		
Vide					ARS-CEN6	LEU2	pFL36		
Vide			TEF1p	PGK1t	2μ	URA3	pV51TEF		

5 Les gènes issus de *Synechococcus elongatus* tels que *rbcL*, *rbcS*, *rbcX* et *prk* (tels que décrits dans WO 2015107496 A1) et l'alpha-farnésène synthase de *Malus domestica* (Tippmann *et al.*,

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

Selon le protocole précédemment décrit pour la transformation des levures, la souche EQ-0134 a été cultivée dans un volume de 50 ml de milieu riche complexe YPGE (yeast extract peptone glycérol éthanol) à 30°C. Les cellules sont centrifugées pendant 5 minutes à 2 500 tr / min à la température ambiante. Le surnageant est éliminé et les cellules sont remises en suspension dans 25 ml d'eau stérile et centrifugées de nouveau pendant 5 minutes à 2 500 tr / min à température ambiante. Après avoir éliminé le surnageant, les cellules sont remises en suspension dans 400 µl d'acétate de lithium stérile 100 mM. Parallèlement, le mix de transformation suivant est préparé 250 µL de 50% de PEG, 10 µL d'ADN « porteur » à 5 mg / mL, 36 µL d'acétate de lithium 1 M, 10 µL (3 µg d'une des combinaisons suivantes, pFPP45+pFPP56+pFPP20 ou pL4+pFPP45+pFPP56+pFPP20) et de l'eau à 350 µl.

50 µl des cellules remises en suspension ont été ajoutés au mélange de transformation et incubés à 42 ° C pendant 40 minutes dans un bain d'eau. Après incubation, le tube a été centrifugé pendant 1 minute à 5 000 tr / min à température ambiante et le surnageant a été jeté. Les cellules ont été remises en suspension dans 2 mL de YNB (yeast nitrogen base incluant le sulfate d'ammonium) avec glycérol et éthanol, transférées dans un tube de 14 mL et incubées pendant 2 heures à 30 °C sous atmosphère enrichie à 10% CO₂. Le mix final est étalé sur milieu gélosé YNB incluant le sulfate d'ammonium + CSM sans LUW (leucine uracile, tryptophane) + nourséothricine le cas échéant, avec glycérol et éthanol comme sources carbonées.

Selon le protocole précédemment décrit, la souche CEN.PK 1605 est transformée avec la combinaison de plasmides suivante : pL4+pFL36+pCM185+pV51TEF.

Les clones obtenus ont été génotypés pour tous les gènes de l'ingénierie puis adaptés sur milieu liquide YNB sulfate d'ammonium et glucose.

- EQ-0153 (CEN.PK1605 $\Delta pgl::kan$) (pFPP45+pFPP56+pFPP20)
- EQ-0253 (CEN.PK1605 $\Delta pgl::kan$) (pL4+pFPP56+ pFPP20+pFPP45)
- EQ-0353 (CEN.PK1605) (pL4+ pFL36+ pCM185+pV51TEF)

c) Adaptation des souches EQ-0153 et EQ-0253 à la croissance en milieu liquide avec glucose et CO₂.

Les cultures en mode batch effectuées en erlenmeyers sont réalisées avec le milieu de culture approprié et un apport de CO₂ exogène de 10%, en incubateur agité (120 RPM, 30°C), avec une

inoculation à 0,05 D.O. 600 nm mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre EON (BioTek Instruments). La souche d'intérêt est cultivée sur milieu YNB+CSM-LUW avec 10 g/L de glycérol et 7,5 g/L d'éthanol, dans des conditions où l'expression de la PRK n'est pas induite, et en présence le cas échéant de nouséothricine. Il est, dans ces conditions, nécessaire
5 d'alimenter la souche en amont et en aval de la délétion du gène PGK1.

Après obtention d'une quantité de biomasse suffisante, des cultures d'un volume supérieur ou égal à 50 mL en Erlenmeyer de 250 ml minimum sontensemencées afin d'effectuer l'adaptation de la souche à l'utilisation de l'ingénierie PRK/RuBisCO. Cette adaptation est effectuée sur le milieu de culture YNB+CSM-LUW avec 20 g/L de glucose, en présence le cas échéant de
10 nouséothricine et un apport en CO₂ exogène comme décrit ci-dessus.

Après observation d'un démarrage de croissance significatif, les souches sont adaptées à un milieu minéral minimum exempt des acides aminés et bases azotées inclus dans le CSM-LUW, soit uniquement du YNB avec 20 g/L de glucose, nouséothricine si nécessaire et un apport en CO₂ exogène comme décrit ci-dessus.

15 *d) Production de farnésène en fiole d'Erlenmeyer*

La souche EQ-0253 de *Saccharomyces cerevisiae*, délétée dans la voie glycolytique au niveau du gène PGK1, est cultivée afin de produire du farnésène en surproduisant du NADPH sans perte de CO₂, en utilisant une PRK et une RuBisCO.

Cette souche d'intérêt est comparée à une souche de référence EQ-0353 produisant du farnésène suite à l'introduction d'une alpha-farnésène synthase hétérologue, sans délétion de PGK1 ni
20 ajout de PRK et RuBisCO.

Les souches EQ-0253 (CEN.PK1605 $\Delta pgk1::kan$) (pL4+pFPP56+ pFPP20+pFPP45) et EQ-0353 (CEN.PK1605) (pL4+ pFL36+ pCM185+pV51TEF) ont été cultivées dans un milieu YNB avec 20 g/L de D-glucose, auquel a été ajouté 100 µg/L de nouséothricine. Une pré-
25 culture contenant 20 ml de milieu de culture a été inoculée à DO_{600nm} 0,05 dans une fiole d'Erlenmeyer bafflé de 250 ml, mis en agitation à 120 rpm durant 24 h à 30°C dans un incubateur Minitron dont l'atmosphère était régulée à 10% de CO₂. A partir de la première pré-culture, 50 ml de milieu a été inoculé à DO_{600nm} 0,05 dans un Erlenmeyer de 250 ml et mis en agitation, 120 rpm, 24 h à 30°C, 10% CO₂. La culture, menée également en fioles
30 d'Erlenmeyers (500 mL, bafflés) à partir de la deuxième pré-culture, a été inoculée à DO_{600nm} 0,05 dans 100 ml du même milieu de culture, auquel a été ajouté 50 µg/ml d'ampicilline, 10 µl d'antimousse (Antifoam 204, Sigma, A6426) et 10% (v/v) de dodécane (Tippman *et al.*, Talanta

(2016), 146: 100-106). Les cultures ont été agitées à 120 rpm à 30°C en présence de 10% CO₂. Un suivi de croissance a été effectué par mesure de la turbidité à 600 nm.

Pour extraire le farnésène, 500 µl de phase organique ont été collectés et centrifugés à 5,000 g pendant 5 min pour une séparation complète des deux phases. La phase organique a été conservée à 4°C jusqu'à l'analyse en GC-MS. La détection et la quantification de l' α -farnésène ont été réalisées par spectrométrie de masse simple quadripôle. Une colonne Zebtron ZB-FFAP a été utilisée avec l'hydrogène comme gaz vecteur à un débit fixé à 2,95 ml/min. La température d'entrée était de 260°C, 1 µl d'échantillon a été injecté en mode « splitless ». La température initiale du four était de 70°C (4 min) puis elle a été augmentée progressivement jusqu'à 160°C (7°C / min) puis jusqu'à 240°C (40°C / min) où elle a été maintenue pendant 1,05 min. Pour la détection en spectrométrie de masse, les températures de la ligne de transfert et de la source étaient respectivement de 250°C et 200°C. L'acquisition en masse a été faite entre t=10 min et t=20 min. Une calibration externe comprenant sept points a été réalisée à partir du mix d'isomères de farnésène (Sigma, W383902) pour la quantification de l' α -farnésène produit par les souches.

Pour quantifier le glucose consommé par les souches, 500 µl du milieu de culture ont été prélevés à la même DO d'extraction du farnésène, centrifugé à 5 000 g, 5 min à 4°C. Le surnageant a été filtré (Minicart RC4, sartorius 0.45µm) et conservé dans un vial à -20°C. Le glucose contenu dans cet échantillon a été quantifié par HPLC-UV Ultimate 3000 (Thermo Scientific) équipée d'une pompe, d'un autosampler réfrigérant à 8°C et d'un détecteur à indice de réfraction (RI, precision instruments IOTA 2). Une colonne Rezex ROA-Organic Acid H⁺ (8%) 150 x 7,8 mm, de granulométrie 8 µm (Phenomenex, 00H-0138-KO) a été utilisée avec une pré-colonne Carbo-H 4 x 3.0 mm. La température de la colonne était de 35°C et le débit était fixé à 0,5 mL/min. L'élution isocratique a été réalisée avec une phase mobile aqueuse à 5 mM d'H₂SO₄ et a duré 30 min. Un volume de 20 µL a été injecté pour chaque échantillon. L'identification des composés a été basée sur la comparaison des temps de rétention avec les standards. La calibration externe comprend 10 points de concentration variable en glucose (0-20 g/L).

Le rendement carbone Y _{α -farnésène/Glc} est calculé en gramme de farnésène produit par gramme de glucose consommé pour les deux souches EQ-0253 et EQ-0353,

$$Y_{\alpha\text{-farnésène/Glc}} = \frac{\text{farnésène (mg/L aqueux)}}{\text{glucose (mg/L aqueux)}}.$$

Tableau 13 : Rendement massique d' α -farnésène sur D-glucose

Souches	$Y_{\alpha\text{-farnésène/glucose}} \times 10^{-4}$ (g/g)	Amélioration de rendement
EQ-0253	12,5	+ 9,6%
EQ-0353	11,4	

L'augmentation du rendement massique d' α -farnésène sur D-glucose observée a été de 9,6% pour la souche EQ-0253, par rapport à la souche de contrôle EQ-0353.

Exemple 3 : Amélioration de la production de citrate chez *S. cerevisiae*

5 a) *Inactivation du gène ZWF1 et du gène IDH1 dans une souche haploïde de signe sexuel MAT a*

- *Inactivation du gène ZWF1*

10 La phase codante du gène de résistance à l'hygromycine B, issue de la cassette hphMX (loxP-pAgTEF1-hph-tAgTEF1-loxP) et contenue sur le plasmide pUG75 (P30671) - Euroscarf., est amplifiée avec les oligonucléotides Sdzwf1 et Rdzwf1 (Tableau 14). Cela permet de générer un amplicon PCR $\Delta zwf1$ contenant aux extrémités des séquences de recombinaisons homologues du locus du gène de la glucose-6-phosphate déshydrogénase ZWF1.

Tableau 14 : Oligonucléotides

Nom	Séquence
Sdzwf1 (SEQ ID N°3)	AAGAGTAAATCCAATAGAATAGAAAACACATAAGGCAAGATGGGTAAAAAGCCTGAAGCTC ACCG
Rdzwf1 (SEQ ID N°4)	ATTCAGTGACTTAGCCGATAAATGAATGTGCTTGCATTTTTTATTTCCTTGGCCCTCGGACG
Sdpgk1 (SEQ ID N°5)	ACAGATCATCAAGGAAGTAATTATCTACTTTTTACAACAAATATAAAACAATGGGTAAGGAA AAGACTCACGTTTC
Rdpgk1 (SEQ ID N°6)	GGGAAAGAGAAAAGAAAAAATTGATCTATCGATTTCATTCAATTCAATTTAGAAAACTC ATCGAGCATCAAATGAAAC
Sdidh1 (SEQ ID N°7)	TCTCCCTATCCTCATTCTTCTCCCTTTTCTCCATAATTGTAAGAGAAAAATGGGTACCACTCT TGACGACACGG
Rdidh1 (SEQ ID N°8)	AATTTGAACACACTTAAGTTGCAGAACAAAAAAGGGGAATTGTTTTATTAGGGGCAGG GCATGCTCATGTAGAGC

La partie soulignée des oligonucléotides correspond à la partie parfaitement homologue à la séquence du gène de sélection, le reste de la séquence correspondant aux régions adjacentes à la phase codante du gène cible à déléter sur le génome de *Saccharomyces cerevisiae*.

5 La souche précédemment décrite CEN.PK 1605 (Mat a HIS3 leu2-3.112 trp1-289 ura3-52 MAL.28c) issue de la souche commerciale CEN.PK 113-7D (GenBank : JRIV000000000) est transformée avec le fragment PCR $\Delta zwf1$ décrit ci-dessus.

10 Pour la réaction de transformation, la souche CEN.PK 1605 est cultivée dans un volume de 50 ml de milieu riche complexe YPD (yeast extract peptone dextrose, ici glucose 20 g/L) à 30°C jusqu'à une densité optique 600nm de 0,8. Les cellules sont centrifugées pendant 5 minutes à 2 500 tr / min à la température ambiante. Le surnageant est éliminé et les cellules sont remises en suspension dans 25 ml d'eau stérile et centrifugées de nouveau pendant 5 minutes à 2 500 tr / min à température ambiante. Après avoir éliminé le surnageant, les cellules sont remises en suspension dans 400 µl d'acétate de lithium stérile 100 mM.

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

20 50 µl des cellules remises en suspension sont ajoutés au mélange de transformation et incubés à 42 ° C pendant 40 minutes dans un bain d'eau. Après incubation, le tube est centrifugé pendant 1 minute à 5000 tr / min à température ambiante et le surnageant est jeté. Les cellules sont remises en suspension dans 2 mL de milieu YPD (yeast extract peptone dextrose), transférées dans un tube de 14 mL et incubées pendant 2 heures à 30 °C 200 tours par minute. Les cellules sont ensuite centrifugées pendant 1 minute à 5 000 tr / min à température ambiante. Le surnageant est éliminé et les cellules sont remises en suspension dans 1 ml d'eau stérile et centrifugées de nouveau pendant 1 minute et resuspendues dans 100 µl d'eau stérile et étalé sur
25 YPD + HygromycineB 200 µg/mL.

Les colonies obtenues ont été génotypées pour la validation de la délétion du gène ZWF1 et référencées EQSC-002 (CEN.PK 1605 $\Delta zwf1::hph$).

- *Inactivation du gène IDH1*

30 L'inactivation de ce gène permet d'accumuler du citrate (Rodriguez *et al.*, Microb Cell Fact. 2016 Mar 3;15:48).

La phase codante du gène de résistance à la *nourséothricine*, issue de la cassette natMX (loxP-pAgTEF1-nat-tAgTEF1-loxP) contenue sur le plasmide (pUG74 (P30670) - Euroscarf) est amplifiée avec les oligonucléotides Sdidh1 et Rdidh1 (tableau 13). Cela permet de générer un amplicon PCR *Δidh1* contenant aux extrémités des séquences de recombinaisons homologues du locus du gène de la sous unité de l'isocitrate déshydrogénase IDH1.

Les souches précédemment décrites, EQSC-002 (CEN.PK 1605 *Δzwf1::hph*) et CEN.PK 1605 (Mat a HIS3 leu2-3.112 trp1-289 ura3-52 MAL.28c) issue de la souche commerciale CEN.PK 113-7D (GenBank : JRIV000000000) sont transformées avec le fragment PCR pour l'inactivation du gène IDH1.

Pour la réaction de transformation les souches EQSC-002 et CEN.PK1605 sont cultivées dans un volume de 50 ml de milieu riche complexe YPD (yeast extract peptone dextrose, ici glucose 20 g/L) à 30°C jusqu'à une densité optique 600nm de 0.8. Les cellules sont centrifugées pendant 5 minutes à 2500 tr / min à la température ambiante. Le surnageant est éliminé et les cellules sont remises en suspension dans 25 ml d'eau stérile et centrifugées de nouveau pendant 5 minutes à 2500 tr / min à température ambiante. Après avoir éliminé le surnageant, les cellules sont remises en suspension dans 400 µl d'acétate de lithium stérile 100 mM.

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

50 µl des cellules remises en suspension sont ajoutés au mélange de transformation et incubés à 42 ° C pendant 40 minutes dans un bain d'eau. Après incubation, le tube est centrifugé pendant 1 minute à 5 000 tr / min à température ambiante et le surnageant est jeté. Les cellules sont remises en suspension dans 2 mL de YPD (yeast extract peptone dextrose), transférées dans un tube de 14 mL et incubées pendant 2 heures à 30 ° C 200 tours par minute. Les cellules sont ensuite centrifugées pendant 1 minute à 5 000 tr / min à température ambiante. Le surnageant est éliminé et les cellules sont remises en suspension dans 1 ml d'eau stérile et centrifugées de nouveau pendant 1 minute et resuspendues dans 100 µl d'eau stérile et étalées sur YPD + HygromycineB 200 µg/mL, 50 µg/mL *nourséothricine*.

Les colonies obtenues ont été génotypées pour la validation de la délétion du gène IDH1 et se nomment EQSC-003 (CEN.PK 1605 *Δzwf1::hph*, *Δidh1::nat*) et EQSC-005 (CEN.PK 1605 *Δidh1::nat*)

b) Inactivation du gène PGK1 dans une souche haploïde de signe sexuel MAT alpha

La phase codante du gène de résistance au G418 issue de la cassette KanMX (loxP-pAgTEF1-kanMX-tAgTEF1-loxP) contenue sur le plasmide pUG6 (P30114) - Euroscarf est amplifiée avec les oligonucléotides Sdpgk1 et Rdpkg1 (Tableau 13) permettant de générer un amplicon PCR *Δpgk1* contenant aux extrémités des séquences de recombinaisons homologues du locus du gène de la 3-phosphoglycerate kinase PGK1.

La souche CEN.PK 1606 (*Mat alpha HIS3 leu2-3.112 trp1-289 ura3-52 MAL.28c*) issue de la souche commerciale CEN.PK 113-7D (GenBank : JRIV000000000) est transformée avec le fragment PCR pour l'inactivation du gène PGK1.

Pour la réaction de transformation la souche CEN.PK 1606 est cultivée dans un volume de 50 ml de milieu riche complexe YPD (yeast extract peptone dextrose, ici glucose 20g/L) à 30°C jusqu'à une densité optique 600 nm de 0,8. Les cellules sont centrifugées pendant 5 minutes à 2 500 tr / min à la température ambiante. Le surnageant est éliminé et les cellules sont remises en suspension dans 25 ml d'eau stérile et centrifugées de nouveau pendant 5 minutes à 2 500 tr / min à température ambiante. Après avoir éliminé le surnageant, les cellules sont remises en suspension dans 400 µl d'acétate de lithium stérile 100 mM.

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

50 µl des cellules remises en suspension sont ajoutés au mélange de transformation et incubés à 42 ° C pendant 40 minutes dans un bain d'eau. Après incubation, le tube est centrifugé pendant 1 minute à 5 000 tr / min à température ambiante et le surnageant est jeté. Les cellules sont remises en suspension dans 2 mL de YPGE (yeast extract peptone glycérol 20 g/L, éthanol 30g/L), transférées dans un tube de 14 mL et incubées pendant 2 heures à 30 ° C 200 tours par minute. Les cellules sont ensuite centrifugées pendant 1 minute à 5 000 tr / min à température ambiante. Le surnageant est éliminé et les cellules sont remises en suspension dans 1 ml d'eau stérile et centrifugées de nouveau pendant 1 minute et resuspendues dans 100 µl d'eau stérile et étalé sur YPGE + 150 µg/mL G418.

Les colonies obtenues ont été génotypées pour la validation de la délétion du gène *PGK1* et référencées EQSC-008 (CEN.PK 1605, *Δpgk1::kan*).

c) Construction d'une souche inactivée pour *IDH1*, *ZWF1* et *PGK1* par croisement

Les souches haploïdes de signes sexuels opposés EQSC-003 (CEN.PK 1605 $\Delta zwf1::hph$, $\Delta idh1::nat$) et EQSC-008 (CEN.PK1606 $\Delta pgk1::kan$) sont mises à pousser une nuit sur un milieu gélosé : YPD (yeast extract peptone dextrose) pour la souche EQSC-008 et YPGE (yeast extract peptone glycérol éthanol) pour la souche EQSC003, à 30°C. Puis les 2 souches sont

5 croisées par mise en contact direct sur un milieu gélosé YPGE (yeast extract peptone glycérol éthanol) + G418 150 $\mu\text{g/mL}$ + hygromycine B 200 $\mu\text{g/mL}$. La double sélection G418 et hygromycine B permet d'éliminer les deux souches parentales, seules les souches diploïdes MAT a/MAT alpha, ZWF1/ $\Delta zwf1::hph$, IDH1/ $\Delta idh1::nat$, PGK1/ $\Delta pgk1::kan$ poussent sur ce milieu. Un clone isolé diploïde issu de ce croisement est prélevé. La présence des 3 cassettes

10 $\Delta zwf1::hph$, $\Delta idh1::nat$, $\Delta pgk1::kan$ est validée par des tests de croissance sur milieu gélosé YPGE (yeast extract peptone glycérol éthanol) supplémenté en G418 150 $\mu\text{g/mL}$ ou Hygromycine B 200 $\mu\text{g/mL}$ ou nourséothricine 50 $\mu\text{g/mL}$. La souche obtenue est référencée EQSC-009 (CEN.PK 1607, MAT a/MAT alpha, ZWF1/ $\Delta zwf1::hph$, IDH1/ $\Delta idh1::nat$, PGK1/ $\Delta pgk1::kan$).

15 La souche précédemment décrite EQSC-009 (CEN.PK 1607, MAT a/MAT alpha, ZWF1/ $\Delta zwf1::hph$, IDH1/ $\Delta idh1::nat$, PGK1/ $\Delta pgk1::kan$) est mise à pousser sur un milieu gélosé YPGE (yeast extract peptone glycérol éthanol) une nuit à 30°C. Les cellules sont ensuite mises en culture liquide dans un milieu carencé (Sporulation Medium, 1% potassium acétate + leucine + uracile + tryptophane) permettant d'induire la méiose des cellules diploïdes et

20 conduisant ainsi à la formation de tétrades contenant quatre spores haploïdes. Les tétrades sont étalées sur le milieu YNB.GE (yeast nitrogen base, glycerol, ethanol) + leucine + uracile + tryptophane + acide glutamique 1g/L + méthionine 20mg/L + cystéine 40mg/L et immédiatement disséquées (à l'aide d'un micro-dissecteur) pour isoler les spores sur le même milieu. Les spores sont mises à germer plusieurs jours à 30°C. Le contenu génétique des cellules

25 haploïdes ainsi obtenues est testé par croissance sur milieux sélectifs : YPGE (yeast extract peptone glycérol éthanol) supplémenté en G418 150 $\mu\text{g/mL}$ ou Hygromycine B 200 $\mu\text{g/mL}$ ou nourséothricine 50 $\mu\text{g/mL}$ et leur signe sexuel est testé par croisement avec deux souches tectrices de signe sexuel MAT a ou MAT alpha. Les colonies obtenues sont génotypées pour la validation de la délétion des gènes *PGK1*, *IDH1*, *ZWF1* et l'absence de transcrits

30 correspondants à ces gènes est validée par PCR en temps réel après rétro-transcription des acides ribonucléiques. L'une des souches obtenues est référencée EQSC-004 (CEN.PK 1606 MAT alpha $\Delta zwf1::hph$, $\Delta idh1::nat$, $\Delta pgk1::kan$)

d) Introduction des enzymes PRK-RuBisCO

Les six gènes nécessaires à l'ingénierie PRK-RuBisCO (tableau 15 ci-dessous) sont clonés sur trois vecteurs plasmidiques capables de se répliquer de manière autonome, avec des origines de réplication compatibles et portant chacun un gène de complémentation d'auxotrophies différent, permettant de sélectionner les souches contenant les trois constructions plasmidiques (voir WO 2015107496). Deux de ces plasmides sont monocopie avec une origine de réplication de type ARS/CEN et le troisième est multicopie avec une origine 2μ.

Tableau 15 : Description des cassettes d'expression et de la composition des plasmides

	GenBank	Optimisation de codons	Promoteur	Terminateur	ori	Marqueur auxotrophie	Plasmides
RbcL	BAD78320.1	Oui	TDH3p	ADH1t	2μ	URA3	pFPP45
RbcS	BAD78319.1	Oui	TEF1p	PGK1t	2μ	URA3	pFPP45
RbcX	<u>BAD80711.1</u>	Oui	TEF1p	PGK1t	ARS-CEN6	LEU2	pFPP56
GroES	<u>U00096</u>	Non	PGI1p	CYC1t	ARS-CEN6	LEU2	pFPP56
GroEL	<u>AP009048</u>	Non	TDH3p	ADH1t	ARS-CEN6	LEU2	pFPP56
PRK	BAD78757.1	Oui	Tet-OFF	CYC1t	ARS416-CEN4	TRP1	pFPP20
Vide			Tet-OFF		ARS416-CEN4	TRP1	pCM185
Vide			TEF1p	PGK1t	2μ	URA3	pV51TEF
Vide					ARS-CEN6	LEU2	pFL36

Selon le protocole de transformation précédemment décrit la souche **EQSC-004 (CEN.PK 1606 $\Delta zwf1::hph$, $\Delta idh1::nat$, $\Delta pgk1::kan$)** a été cultivée dans un volume de 50 ml de milieu riche complexe YPGE (yeast extract peptone glycérol éthanol) à 30°C jusqu'à une densité optique 600nm de 0.8. Les cellules sont centrifugées pendant 5 minutes à 2500 tr / min à la température ambiante. Le surnageant est éliminé et les cellules sont remises en suspension dans 25 ml d'eau stérile et centrifugées de nouveau pendant 5 minutes à 2500 tr / min à température ambiante. Après avoir éliminé le surnageant, les cellules sont remises en suspension dans 400 μl d'acétate de lithium stérile 100 mM.

Parallèlement, on prépare un mix de transformation dans un tube de 2 ml comme suit: 250 µL de 50% de PEG, 10 µL d'ADN « porteur » à 5 mg / mL, 36 µL d'acétate de lithium 1 M, 10 µL (3µg) d'une combinaison pFPP45+pFPP56+pFPP20 et de l'eau à 350 µl.

5 50 µl des cellules remises en suspension sont ajoutés au mélange de transformation et incubés à 42 ° C pendant 40 minutes dans un bain d'eau. Après incubation, le tube est centrifugé pendant 1 minute à 5 000 tr / min à température ambiante et le surnageant est jeté. Les cellules sont remises en suspension dans 2 mL de YPGE (yeast extract peptone glycérol éthanol) + Doxycycline à 2 mg/L, transférées dans un tube de 14 mL et incubées pendant 2 heures à 30°C à 200 tours par minute. Les cellules sont ensuite centrifugées pendant 1 minute à 5 000 tr / min
10 à température ambiante. Le surnageant est éliminé et les cellules sont remises en suspension dans 1 ml d'eau stérile et centrifugées de nouveau pendant 1 minute et resuspendues dans 100 µl d'eau stérile et étalées sur YNB.GE (yeast nitrogen base, glycérol, éthanol) + acide glutamique 1 g/L + méthionine 20 mg/L + cystéine 40 mg/L + doxycycline à 2 mg/L. La souche obtenue est référencée : **EQSC-006 (CEN.PK 1606 $\Delta zwf1::hph$, $\Delta idh1::nat$, $\Delta pgk1::kan$) (pFPP45+pFPP56+pFPP20).**
15

Selon le protocole de transformation précédemment décrit la souche **EQSC-005 (CEN.PK 1605 $\Delta idh1::nat$)** a été cultivée dans un volume de 50 ml de milieu riche complexe YPGE (yeast extract peptone glycérol éthanol) à 30°C jusqu'à une densité optique 600nm de 0.8. Les cellules sont centrifugées pendant 5 minutes à 2500 tr / min à la température ambiante. Le
20 surnageant est éliminé et les cellules sont remises en suspension dans 25 ml d'eau stérile et centrifugées de nouveau pendant 5 minutes à 2500 tr / min à température ambiante. Après avoir éliminé le surnageant, les cellules sont remises en suspension dans 400 µl d'acétate de lithium stérile 100 mM.

Parallèlement, on prépare un mix de transformation dans un tube de 2 ml comme suit: 250 µL de 50% de PEG, 10 µL d'ADN « porteur » à 5 mg / mL, 36 µL d'acétate de lithium 1 M, 10 µL
25 (3µg) d'une combinaison pV51TEF+pFL36+pCM185 et de l'eau à 350 µl.

50 µl des cellules remises en suspension sont ajoutés au mélange de transformation et incubés à 42 ° C pendant 40 minutes dans un bain d'eau. Après incubation, le tube est centrifugé pendant 1 minute à 5 000 tr / min à température ambiante et le surnageant est jeté. Les cellules sont
30 remises en suspension dans 2 mL de YPD (yeast extract peptone dextrose), transférées dans un tube de 14 mL et incubées pendant 2 heures à 30 ° C à 200 tours par minute. Les cellules sont ensuite centrifugées pendant 1 minute à 5 000 tr / min à température ambiante. Le surnageant est éliminé et les cellules sont remises en suspension dans 1 ml d'eau stérile et centrifugées de nouveau pendant 1 minute et resuspendues dans 100 µl d'eau stérile et étalées sur YNBD (yeast

nitrogen base dextrose) + doxycycline à 2 mg/L. La souche obtenue est référencée : **EQSC-007 (CEN.PK 1605 $\Delta idh1::nat$) (pV51TEF+pFL36+pCM185).**

d) Phase d'adaptation et d'évolution des souches EQSC-006 et EQSC-007

Adaptation des souches **EQSC-006 et EQSC-007** à la croissance sur milieu liquide YNB (yeast
5 nitrogen base) avec glucose et CO₂.

Les cultures en mode batch effectuées en erlenmeyers sont réalisées avec le milieu de culture approprié et un apport de CO₂ exogène de 10%, en incubateur agité (120 RPM, 30°C), avec une inoculation à 0,05 D.O. 600 nm mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre EON (BioTek Instruments). La souche d'intérêt est cultivée sur milieu YNB+CSM-LUW avec 10 g/L de
10 glycérol et 7,5 g/L d'éthanol, + glutamate à 50 mg/L dans des conditions où l'expression de la PRK n'est pas induite.

Après obtention d'une quantité de biomasse suffisante, des cultures d'un volume supérieur ou égal à 50 mL en Erlenmeyer de 250 ml minimum sontensemencées afin d'effectuer l'adaptation de la souche à l'utilisation de l'ingénierie PRK/RuBisCO. Cette adaptation est effectuée sur le
15 milieu de culture YNB+CSM-LUW avec 20 g/L de glucose, glutamate à 50 mg/L et un apport en CO₂ exogène comme décrit ci-dessus.

Après observation d'un démarrage de croissance significatif, les souches sont adaptées à un milieu minéral minimum exempt de tous les acides aminés sauf ceux indiqués ci-après, et bases azotées inclus dans le CSM-LUW, soit uniquement du YNB avec en concentrations finales, 20
20 g/L de glucose, glutamate à 1 g/L, L-cystéine à 40 mg/L et L-méthionine à 20 mg/L et un apport en CO₂ exogène comme décrit ci-dessus.

e) Production de citrate en fioles d'Erlenmeyer

La souche **EQSC-006** de *Saccharomyces cerevisiae*, délétée dans la voie glycolytique au niveau du gène PGK1, dans la partie oxydative des pentoses phosphate et dans le cycle de Krebs
25 est cultivée afin de produire du citrate sans perte de CO₂, en utilisant une PRK et une RuBisCO. Cette souche d'intérêt est comparée à une souche de référence **EQSC-007** produisant du citrate suite à l'inactivation du gène IDH1, sans délétion de PGK1 ou ZWF1 ni ajout de PRK et RuBisCO.

Les souches EQSC-006 (CEN.PK 1605 $\Delta zwf1::hph$, $\Delta idh1::nat$, $\Delta pgk1::kan$,
30 pFPP45+pFPP56+pFPP20) et EQSC-007 (CEN.PK 1605 $\Delta idh1::nat$,

pV51TEF+pFL36+pCM185) ont été mises en culture dans le milieu Yeast Nitrogen Base (YNB) supplémenté avec 20 g/L de D-glucose (YNB D20).

Afin d'établir les rendements massiques citrate sur glucose, une pré-culture contenant 20 ml de milieu de culture a été inoculée à DO_{600nm} 0,05 dans une fiole d'Erlenmeyer bafflée de 250 ml, mise en agitation à 120 rpm à 30°C. A partir de la première pré-culture, 50 ml de milieu ont été inoculés à DO_{600nm} 0,05 dans une fiole d'Erlenmeyer de 250 ml et mis en agitation à 120 rpm, à 30°C. La culture a été faite en fioles d'Erlenmeyer (500 ml, bafflées) à partir de la deuxième pré-culture, inoculée à DO_{600nm} 0,05 dans 100 ml du même milieu, à 30°C, 120 rpm. Les suivis de croissance ont été effectués par mesure de la turbidité à 600 nm.

Pour la quantification du citrate, 500 µL du milieu de culture ont été prélevés, centrifugés à 5 000 g, 5 min, 4°C. Le surnageant a été filtré (Minicart RC4, sartorius 0,45µm) et conservé dans un vial à -20°C avant analyse en HPLC (Thermo Scientific UltiMate 3000 HPLC) couplée à un spectromètre de masse simple quadripôle. 20 µL de chaque échantillon ont été injectés sur une colonne Aminex HPX-87H H⁺, 300 mm x 7,8 mm (Biorad, 125-0140). Une élution isocratique à un débit de 0,5 ml/min a été réalisée avec une solution aqueuse d'acide formique 0,037% (v/v) dont le pH a été ajusté à 4,5 avec de l'hydroxyde d'ammonium. La température du four de la colonne était de 65°C. Les conditions d'analyse en spectrométrie de masse étaient : mode électrospray négatif, température de la source 450°C, tension de l'aiguille 3 kV, tension du cône 50 V. Une calibration externe comprenant sept points a été réalisée à partir d'une solution commerciale de citrate de sodium.

Pour quantifier le glucose consommé par les souches, 500 µl du milieu de culture ont été prélevés, à la même $DO_{600 nm}$ de culture que pour la quantification du citrate, centrifugés à 5 000 g, 5 min à 4°C. Le surnageant a été filtré (Minicart RC4, sartorius 0,45µm) et conservé dans un vial à -20°C. Le glucose contenu dans cet échantillon a été quantifié par HPLC-RI Ultimate 3000 (Thermo Scientific) équipée d'une pompe, d'un autosampler réfrigérant à 8°C et d'un détecteur à indice de réfraction (RI, precision instruments IOTA 2). Une colonne Rezex ROA-Organic Acid H⁺ (8%) 150 x 7,8 mm, de granulométrie 8 µm (Phenomenex, 00H-0138-KO) a été utilisée avec une pré-colonne Carbo-H 4 x 3,0 mm. La température du four pour la colonne était de 35°C et le débit a été fixé à 0,5 mL/min. Une élution isocratique de 30 min a été réalisée avec une phase mobile aqueuse à 5 mM H₂SO₄. Un volume de 20 µl a été injecté pour chaque échantillon. L'identification des composés a été basée sur la comparaison des temps de rétention avec les standards. La calibration externe comprenait 10 points de concentration variable en glucose (0 à 20 g/L).

Le rendement massique $Y_{\text{citrate/Glc}}$ a été calculé en gramme de citrate produit par gramme de glucose consommé pour les deux souches EQSC-006 et EQSC-007, $Y_{\text{citrate/Glc}} = \frac{\text{citrate (mg/Laqueux)}}{\text{glucose (mg/Laqueux)}}$.

Tableau 16 : Rendement massique, citrate sur D-glucose

Souches	$Y_{\text{citrate/glucose}} (x 10^{-3}) (g/g)$	Amélioration de rendement
EQSC-006	2,1	+19,5%
EQSC-007	1,8	

5

Une augmentation du rendement massique, citrate sur D-glucose, de 19,5% a été observée pour la souche EQSC-006 par rapport à la souche de contrôle EQSC-007.

Exemple 4 : Amélioration de la production de glutamate chez *E. coli*

- 10 La délétion du gène de l'alpha-cétoglutarate déshydrogénase augmente la production de glutamate (Usuda *et al.* J Biotechnol. 2010 May 3;147(1):17-30. doi: 10.1016/j.jbiotec.2010.02.018).

- Dans ces exemples, une souche d'*Escherichia coli* K12 MG1655 dont le gène *sucA* a été délété a donc été utilisée. Cette souche est issue d'une banque de délétion de gènes (Baba *et al.* Mol Syst Biol. 2006;2:2006.0008) chez *Escherichia coli* et fournie par le Coli Genetic Stock Center sous le nom JW0715-2 et avec la référence 8786. (JW0715-2 : MG1655 $\Delta\text{sucA} :: \text{Kan}$)
- 15

4A] Amélioration de la production de glutamate par inactivation de la glycolyse

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

- 20 Afin de pouvoir réutiliser la même stratégie de délétion que celle utilisée pour construire la souche JW0715-2 ci-dessus (Rodriguez *et al.*, 2016), la cassette de sélection a été supprimée à l'aide d'une recombinaison.

Le plasmide p707-Flpe (fournit dans le kit Quick&Easy *E. coli* Gene Deletion Red®/ET® Recombination par Gene bridges) est transformé par électroporation selon le protocole du kit. Les cellules sont sélectionnées sur LB agar complémenté avec 0,2% glucose, tétracycline 0,0003% et additionné de 0,3% L-arabinose. Une contre-sélection des clones obtenus est effectuée en vérifiant qu'ils ne sont plus capables de pousser sur le même milieu supplémenté par kanamycine 0,0015%.

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

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

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

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

c) Délétion du gène gapA

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

- 5 1. Des oligonucléotides dessinés pour amplifier une cassette d'expression d'un gène de résistance FRT-PKG-gb2-neo-FRT et possédant une séquence 5' homologues sur 50 nucléotides aux régions adjacentes du locus de délétion c'est à dire la phase codante du gène (*gapA*) (GenBank: X02662.1) générant ainsi des bras de recombinaison de la cassette sur le génome bactérien.
- 10 2. La souche d'*Escherichia coli* K-12, EQ.EC003 est transformée par électroporation avec le plasmide pRedET selon le protocole du kit. Les colonies obtenues sont sélectionnés sur milieu riche complexe LB agar 0,2% glucose, tétracycline 0,0003%.
- 15 3. La transformation de l'amplicon obtenu lors de la première étape en présence de la recombinase RedET qui sera induite par l'arabinose 0,3% en LB liquide pendant 1 h. Pour se faire, une seconde électroporation des cellules exprimant RedET par la cassette de délétion est effectuée et les colonies sont sélectionnées sur LB agar complémenté avec 0,2% glycérol et pyruvate 0,3%, tétracycline 0,0003% et additionné de 0,3% L-arabinose et kanamycine 0,0015%.

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

- EQ.EC002 : MG1655_Δ*sucA*
- 20 • EQ.EC003 : MG1655_Δ*sucA* Δ*edd-eda*
- EQ.EC004 : MG1655 Δ*sucA* Δ*edd-eda* Δ*gapA::kan*

d) Insertion de l'ingénierie nécessaire à la fixation du CO₂

- 25 Pour l'expression recombinante des différents composants d'une RuBisCO de type I chez *E. coli* les gènes décrits dans le tableau 17 ci-dessous sont clonés sous la forme d'un opéron synthétique contenant les gènes décrits dans le tableau 18 ci-dessous.

Tableau 17 : gènes codant pour un système PRK et RuBisCO de type I

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

Tableau 18 : Composition des cassettes d'expression

Plasmide	Structure de l'opéron synthétique dans vecteur pZA11								
	Gène A	RBS1	GèneB	RBS2	Gène C	RBS3	Gène D	RBS4	Gène E
pZA11									
pEQEC005	<i>rbcS</i>	D	<i>rbcL</i>	B	<i>rbcX</i>	F			
pEQEC006	<i>rbcS</i>	D	<i>rbcL</i>	B	<i>rbcX</i>	F	<i>prk</i>		
pEQEC008	<i>prk</i>								

- 5 Pour contrôler le niveau d'expression de ces gènes, des séquences de liaison aux ribosomes (RBS) présentées dans le tableau 19 ci-dessous, ayant des efficacités de traduction variables (Levin-Karp *et al.*, ACS Synth Biol. 2013 Jun 21;2(6):327-36. doi: 10.1021/sb400002n ; Zelcbuch *et al.*, Nucleic Acids Res. 2013 May;41(9):e98) sont insérées entre la phase codante de chaque gène. La succession de chaque phase codante intercalée par une séquence RBS est
- 10 construite par insertions successives dans un vecteur pZA11 (Expressys) qui contient un promoteur PLtetO-1, une origine de répllication moyenne p15A et un gène de résistance à l'ampicilline.

Tableau 19 : Séquences intercistroniques RBS

Nom	Séquences RBS
A (SEQ ID N°9)	AGGAGGTTTGGA
B (SEQ ID N°10)	AACAAAATGAGGAGGTACTGAG
C (SEQ ID N°11)	AAGTTAAGAGGCAAGA
D (SEQ ID N°12)	TTCGCAGGGGGAAG
E (SEQ ID N°13)	TAAGCAGGACCGGCGGCG
F (SEQ ID N°14)	CACCATACACTG

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

EQ.EC 005 → (EQ.EC 003+ pZA11) : MG1655 Δ sucA Δ edd-eda

EQ.EC 006 → (EQ.EC 004+ pEQEC005) : MG1655 Δ sucA Δ edd-eda Δ gapA ::kan (RuBisCO)

5 EQ.EC 007 → (EQ.EC 004+ pEQEC006) : MG1655 Δ sucA Δ edd-eda Δ gapA ::kan (RuBisCO+PRK)

EQ.EC 009 → (EQ.EC 004+ pEQEC008) : MG1655 Δ sucA Δ edd-eda Δ gapA ::kan (PRK)

10 Les clones sont sélectionnés sur milieu LB supplémenté glycérol 2 g/L et pyruvate 5 g/L et par 100 mg/L d'ampicilline. Après obtention d'une quantité de biomasse suffisante, des cultures d'un volume supérieur ou égal à 50 mL en fiole d'Erlenmeyer de 250 ml minimum sont ensemencées afin d'effectuer l'adaptation de la souche à l'utilisation de l'ingénierie PRK/RuBisCO. Cette adaptation est effectuée sur le milieu de culture LB avec 2 g/L de glucose, et un apport en CO₂ exogène à 37°C comme décrit ci-dessus.

e) Production de glutamate

15 Pour la production de glutamate, les cellules issues de 500 ml de culture en LB sont inoculées dans 20 ml de milieu MS (40 g/L de glucose, 1 g/L MgSO₄.7H₂O, 20 g/L de (NH₄)₂SO₄, 1 g/L KH₂PO₄, 10 mg/L FeSO₄.7H₂O, 10 mg/L MnSO₄.7H₂O, 2 g/L d'extrait de levure, 30 g/L de CaCO₃, 100 mg/L d'ampicilline à une pression 0,1 atmosphère CO₂.

20 Le glutamate et le glucose résiduels sont mesurés avec un bio analyseur (Sakura seiki). Le rendement carbone Y_{p/s} est calculé en gramme de glutamate produit par gramme de glucose consommé.

Ce rendement augmente significativement de 10% pour les souches EQ.EC 007 (RuBisCO+PRK) par comparaison avec les souches contrôles EQ.EC 005 (vide), EQ.EC 006 (RuBisCO seule). La souche contrôle EQ.EC 009 (PRK seule) n'est pas viable.

25 4B] Amélioration de la production par inactivation de la glycolyse et de la voie oxydative des pentoses phosphates

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

Cette étape est réalisée de manière identique à l'exemple 4A] ci-dessus.

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

b) Délétion du gène zwf

La délétion du gène *zwf* (GeneID : 946370) est réalisée par recombinaison homologue et l'utilisation du kit Quick&Easy *E. coli* Gene Deletion Red®/ET® Recombination Kit selon le protocole du fournisseur Gene bridges, comme détaillé à l'exemple 4A].

La souche obtenue se nomme **EQ.EC010 : MG1655 Δ sucA Δ zwf**

c) Délétion du gène gapA

La délétion du gène *gapA* dans la souche de *Escherichia coli* K-12, EQ.EC010 est réalisée par recombinaison homologue et l'utilisation du kit Quick&Easy *E. coli* Gene Deletion Red®/ET® Recombination Kit selon le protocole du fournisseur Gene bridges, comme détaillé à l'exemple 4A].

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

- EQ.EC002 : MG1655 Δ sucA
- EQ.EC010 : MG1655 Δ sucA Δ zwf
- EQ.EC011 : MG1655 Δ sucA Δ zwf Δ gapA

d) Insertion de l'ingénierie nécessaire à la fixation du CO₂

Pour l'expression recombinante des différents composants du système PRK/RuBisCO fonctionnel chez *E. coli* les gènes décrits dans le Tableau 20 et codant pour une RuBisCO de type I, une phosphoribulokinase, une chaperonne et une anhydrase carbonique sont clonés sous la forme d'un opéron synthétique contenant les gènes décrits ci-avant (Tableau 21).

Tableau 20 : gènes codant pour une RuBisCO de type I, une phosphoribulokinase et une anhydrase carbonique

Gènes	GenBank	Organism
rbcL	BAD78320.1	<i>Synechococcus elongatus</i>
rbcS	BAD78319.1	<i>Synechococcus elongatus</i>
rbcX	BAD80711.1	<i>Synechococcus elongatus</i>
Prk	BAD78757.1	<i>Synechococcus elongatus</i>
icfA	WP_011378036.1	<i>Synechococcus elongatus</i>

Tableau 21 : Nom de plasmides et composition des cassettes d'expression

Plasmide	Structure de l'opéron synthétique dans vecteur pZA11								
	Gène A	RBS1	Gène B	RBS2	Gène C	RBS3	Gène D	RBS4	Gène E
pZA11									
pEQEC006	<i>rbcS</i>	D	<i>rbcL</i>	B	<i>rbcX</i>	F	<i>prk</i>		
pEQEC007	<i>rbcS</i>	D	<i>rbcL</i>	B	<i>rbcX</i>	F	<i>prk</i>	A	<i>icfA</i>

5

Pour contrôler le niveau d'expression de ces gènes, des séquences de liaison aux ribosomes (RBS) présentées dans le tableau 17 (voir l'exemple 4A)], ayant des efficacités de traduction variables (Levin-Karp *et al.*, ACS Synth Biol. 2013 Jun 21;2(6):327-36. doi: 10.1021/sb400002n ; Zelcbuch *et al.*, Nucleic Acids Res. 2013 May;41(9):e98) sont insérées entre la phase codante de chaque gène. La succession de chaque phase codante intercalée par une séquence RBS est construite par insertions successives dans un vecteur pZA11 (Expressys) qui contient un promoteur PLtetO-1, une origine de répllication moyenne p15A et un gène de résistance à l'ampicilline. L'ajout d'une anhydrase carbonique (*icfA*) permet en outre une inter-conversion d'ions bicarbonate en molécules de CO₂ disponibles et améliore l'efficacité de la RuBisCO.

15

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

EQ.EC 012 → (EQ.EC 002+ pZA11) : MG1655 Δ *sucA*

EQ.EC 014 → (EQ.EC 011+ pEQEC006) : MG1655 Δ *sucA* Δ *zwf* Δ *gapA* (*RuBisCO*+*PRK*)

EQ.EC 015 → (EQ.EC 011+ pEQEC007) : MG1655 $\Delta sucA \Delta zwf \Delta gapA$ (*RuBisCO+PRK+Anhydrase carbonique*)

Après transformation, les clones sont sélectionnés sur milieu LB glycérol, pyruvate, supplémenté par 100 mg/L d'ampicilline. Une phase d'adaptation et évolution des souches ayant l'ingénierie PRK et RuBiSCO est réalisée tel que décrit dans l'exemple 4A].

e) Production de glutamate

Pour la production de glutamate, les cellules issues de 500 ml de culture en LB sont inoculées dans 20 ml de milieu MS (40 g/L de glucose, 1 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 20 g/L de $(NH_4)_2SO_4$, 1 g/L KH_2PO_4 , 10 mg/L $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 10 mg/L $MnSO_4 \cdot 7H_2O$, 2 g/L d'extrait de levure, 30 g/L de $CaCO_3$, 100 mg/L d'ampicilline à une pression 0,1 atmosphère CO_2).

Le glutamate et le glucose résiduels sont mesurés avec un bio-analyseur (YSI Inc.). Le rendement carbone $Y_{p/s}$ est calculé en gramme de glutamate produit par gramme de glucose consommé.

Ce rendement augmente significativement de 15% pour les souches EQ.EC 014 (RubisCO+PRK) et EQ.EC 015 (RubisCO+PRK+Anhydrase carbonique) par comparaison avec les souches contrôles EQ.EC 012 (vide).

4C] Amélioration de la production par inactivation de la glycolyse et de la voie oxydative des pentoses phosphates, et surexpression d'une pyruvate décarboxylase et d'une glutamate déshydrogénase.

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

Cette étape est réalisée de manière identique à l'exemple 4A] ci-dessus.

La souche obtenue se nomme **EQ.EC002 : MG1655 $\Delta sucA$**

b) Délétion du gène zwf

La délétion du gène *zwf* (GeneID : 946370) est réalisée par recombinaison homologue et l'utilisation du kit Quick&Easy *E. coli* Gene Deletion Red®/ET® Recombination Kit selon le protocole du fournisseur Gene bridges, comme détaillé à l'exemple 4A]. La souche obtenue se nomme **EQ.EC010 : MG1655 $\Delta sucA \Delta zwf$**

c) *Délétion du gène gapA*

La délétion du gène *gapA* dans la souche de *Escherichia coli* K-12, EQ.EC010 est réalisée par recombinaison homologue et l'utilisation du kit Quick&Easy *E. coli* Gene Deletion Red®/ET® Recombination Kit selon le protocole du fournisseur Gene bridges, comme détaillé à l'exemple 4A]. Les délétions sont vérifiées par génotypage et séquençage et le nom des souches obtenues est :

- EQ.EC002 : MG1655 Δ *sucA*
- EQ.EC010 : MG1655 Δ *sucA* Δ *zwf*
- EQ.EC011 : MG1655 Δ *sucA* Δ *zwf* Δ *gapA*

10 d) *Insertion de l'ingénierie notamment nécessaire à la fixation du CO₂*

Pour l'expression recombinante des différents composants du système PRK/RuBisCO fonctionnel chez *E. coli* les gènes décrits dans le Tableau 22 et codant pour une RuBisCO de type II, une phosphoribulokinase et une anhydrase carbonique sont clonés sous la forme d'un opéron synthétique contenant les gènes décrits ci-avant (Tableau 23).

15 **Tableau 22 : gènes codant pour une RuBisCO de type II, une phosphoribulokinase, une anhydrase carbonique, une glutamate déshydrogénase et une pyruvate carboxylase.**

Gènes	GenBank	Organism
<i>cbbM</i>	YP_427487.1	<i>Rhodospirillum rubrum</i>
<i>Prk</i>	BAD78757.1	<i>Synechococcus elongatus</i>
<i>CA</i>	YP_427143.1	<i>Rhodospirillum rubrum</i>
<i>gdhA</i>	NP_416275.1	<i>Escherichia coli</i> K-12
<i>pycA</i>	NP_389369.1	<i>Bacillus subtilis</i>

Tableau 23 : Nom de plasmides et composition des cassettes d'expression

Plasmide	Structure de l'opéron synthétique dans vecteur pZA11								
	Gène A	RBS1	Gène B	RBS2	Gène C	RBS3	Gène D	RBS 4	Gène E
pZA11									
pEQEC009	<i>cbbM</i>	B	<i>gdhA</i>	C	<i>pycA</i>	E	<i>prk</i>		
pEQEC010	<i>cbbM</i>	B	<i>gdhA</i>	C	<i>pycA</i>	E	<i>prk</i>	D	CA
pEQEC011		B	<i>gdhA</i>	C	<i>pycA</i>				

5 Pour contrôler le niveau d'expression de ces gènes, des séquences de liaison aux ribosomes (RBS) présentées dans le tableau 17 (voir l'exemple 4A)], ayant des efficacités de traduction variables sont insérées entre la phase codante de chaque gène. La succession de chaque phase codante intercalée par une séquence RBS est construite par insertions successives dans un vecteur pZA11 (Expressys) qui contient un promoteur PLtetO-1, une origine de réplication moyenne p15A et un gène de résistance à l'ampicilline. L'ajout d'une glutamate déshydrogénase (*gdhA*) et d'une pyruvate carboxylase (*pycA*) permettent une meilleure production d'acide glutamique. L'ajout d'une anhydrase carbonique (CA) permet en outre une inter-conversion d'ions bicarbonate en molécules de CO₂ disponibles et améliore l'efficacité de la RuBisCO.

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

15 EQ.EC 016 →(EQ.EC 002+ pEQEC011) : MG1655 Δ*sucA* (*glutamate déshydrogénase*+*pyruvate carboxylase*)

EQ.EC 017 →(EQ.EC 011+ pEQEC009) : MG1655 Δ*sucA* Δ*zwf* Δ*gapA* (*RuBisCO*+*PRK*+*glutamate déshydrogénase*+*pyruvate carboxylase*)

20 EQ.EC 018 →(EQ.EC 011+ pEQEC010) : MG1655 Δ*sucA* Δ*zwf* Δ*gapA* (*RuBisCO*+*PRK*+*Anhydrase carbonique*+*glutamate déshydrogénase*+*pyruvate carboxylase*+*anhydrase carbonique*)

Après transformation, les clones sont sélectionnés sur milieu LB glycérol, pyruvate, supplémenté par 100 mg/L d'ampicilline. Une phase d'adaptation et évolution des souches ayant l'ingénierie PRK et RuBisCO est réalisée tel que décrit dans l'exemple 4A].

e) Production de glutamate

Pour la production de glutamate, les cellules issues de 500 ml de culture en LB sont inoculées dans 20 ml de milieu MS (40 g/L de glucose, 1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g/L KH_2PO_4 , 10 mg/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 mg/L $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g/L d'extrait de levure, 30 g/L de CaCO_3 , 100 mg/L d'ampicilline à une pression 0,1 atmosphère CO_2 .

Le glutamate et le glucose résiduels sont mesurés avec un bio-analyseur (YSI Inc.). Le rendement carbone $Y_{p/s}$ est calculé en gramme de glutamate produit par gramme de glucose consommé.

Ce rendement augmente significativement de 15% pour les souches EQ.EC 017 et EQ.EC 018 par comparaison avec la souche contrôle EQ.EC 016.

Exemple 5 : Amélioration de la production de polyhydroxybutyrate chez *C. necator*

L'augmentation du pouvoir réducteur obtenu grâce aux modifications génétiques proposées selon l'invention peut aussi avoir un gain considérable sur des voies métaboliques déjà existantes.

C'est le cas pour la souche bactérienne *Cupriavidus necator* ATCC 17699 qui produit naturellement du polyhydroxybutyrate (PHB). Cette bactérie est capable de se développer aussi bien en conditions d'autotrophie qu'en conditions d'hétérotrophie. La délétion du gène *gapA* (glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogenase NC_008313.1) permet de dévier le flux métabolique sur la voie des pentoses phosphates et d'augmenter le pool de nucléotides réduits NADPH permettant d'augmenter le rendement de production de PHB.

Cette souche *C. necator* H16 possède un méga plasmide pHG1 et deux chromosomes. La délétion du gène *gapA* est réalisée en générant un vecteur contenant le gène suicide *sacB* de *Bacillus subtilis* pour les bactéries gram négatives (Quandt *et al.*, Gene. 1993 May 15;127(1):15-21 ; Lindenkamp *et al.*, Appl Environ Microbiol. 2010 Aug;76(16):5373-82 et Appl Environ Microbiol. 2012 Aug;78(15):5375-83).

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

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

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

Les délétions sont validées par génotypage et séquençage. La souche EQCN_002 obtenue est donc délétée pour les gènes de la voie métabolique d'Entner-Doudoroff *edd-eda*. **EQCN_002 : H16 Δedd-eda.**

b) Inactivation de la voie de la glycolyse

Deux amplicons PCR correspondants aux régions adjacentes du gène *gapA* sont clonés par restriction selon la procédure décrite dans Lindenkamp *et al.* 2012, dans le plasmide *pjQ200mp18Tc*.

Le plasmide modifié *pjQ200mp18Tc::ΔgapA* est alors transformé dans une souche d'*E.coli* S17-1 par transformation par la méthode du chlorure de calcium. Le transfert du matériel génétique est fait par conjugaison en déposant sur gélose un point de dépôt de culture de *C. necator* sur une boîte contenant un tapis cellulaire de bactéries S17-1. La sélection se fait sur milieu NT (Nutrient growth) à 30° en présence de 10% sucrose à titre de sélection (Hogrefe *et al.*, J Bacteriol. 1984 Apr;158(1):43-8.) et validé sur un milieu minéral contenant 25 µg/ml tétracycline.

Les délétions sont validées par génotypage et séquençage. La souche EQCN_003 obtenue est donc délétée pour le gène *gapA*. **EQCN_003 : H16 Δedd-eda ΔgapA.**

La souche EQCN_003, délétée dans la voie glycolytique au niveau du gène *gapA* et dans la voie d'Entner Doudoroff au niveau des gènes *edd-eda* est cultivée afin d'améliorer le rendement de production du PHB en fixant du CO₂ exogène *via* l'utilisation des enzymes PRK et RuBisCO.

b) Production de PHB en bioréacteur

L'inoculum issu d'un stock congelé est étalé sur milieu solide à raison de 50 à 100 µL issus d'un cryotube mis en incubation à 30°C pendant 48 à 96 h, en présence de fructose. L'expression des gènes codant pour la RuBisCO et la PRK sont maintenus chez *C. necator* en

conditions aérobies hétérotrophes (Rie Shimizu *et al.*, Sci Rep. 2015; 5: 11617. Published online 2015 Jul 1.).

Des cultures en mode batch effectuées en fiole d'Erlenmeyers (10 mL dans 50 mL, puis 50 mL dans 250 mL) sont réalisées avec le milieu de culture approprié, en fructose 20 g/L et un apport de CO₂ exogène de 10% en incubateur agité (100-200 RPM, 30°C), avec une inoculation minimale de 0.01.

La souche d'intérêt EQCN_003 améliorant le rendement de production de PHB est comparée à une souche H16 de référence accumulant naturellement du PHB en conditions hétérotrophes en présence d'une limitation nutritionnelle.

- 10 La productivité des souches est comparée en bioréacteurs. Les cultures effectuées en bioréacteurs sontensemencées à partir de chaînes d'amplifications solides et/ou liquides en fioles d'Erlenmeyers dans les conditions décrites précédemment. Les bioréacteurs, de type My-control (Applikon Biotechnology, Delft, Netherlands) de 750 ml ou Biostat B (Sartorius Stedim, Goettingen, Germany) de 2,5 L, sontensemencés à densité équivalente à 0.01 DO_{620nm}.
- 15 L'accumulation de PHB est découplée de la croissance. La culture est régulée à 30°C, l'aération est comprise entre 0,1 VVM (volume gaz/volume liquide/min) et 1 VVM afin de maintenir une concentration minimale en oxygène dissous supérieure à 20% (30°C, 1 bar), l'agitation est adaptée en fonction de l'échelle du bioréacteur utilisé. Le débit de gazage en entrée est constitué d'air éventuellement supplémen-té en CO₂. La supplémentation en CO₂ est comprise entre 1 et
- 20 10%. Le pH est régulé à 7 par une solution d'ammoniaque à 14 ou 7 %. Le mode de culture en fed-batch permet un apport en substrat carboné non limitant associé à une limitation en phosphore ou en azote, en conservant un ratio carbone/phosphore ou carbone/azote constant. L'extraction et la quantification de PHB sont réalisées selon la méthode de Brandl *et al.* (Appl Environ Microbiol. 2013 Jul;79(14):4433-9). Le protocole consiste à rajouter 1ml de
- 25 chloroforme à 10 mg de cellules lyophilisées, suivi d'un ajout de 850 µl de méthanol et de 150 µl d'acide sulfurique. Le mélange est chauffé 2.5 h à 100°C, refroidi et 500 µl d'eau sont rajoutés. Les deux phases sont séparées par centrifugation et la phase organique est séchée par l'ajout de sulfate de sodium. Les échantillons sont filtrés et analysés comme décrit par Müller *et al.* (Appl Environ Microbiol. 2013 Jul;79(14):4433-9).
- 30 En comparant les cultures *C. necator* **sauvage H16** et la souche **EQCN_003 : H16 Δedd-eda ΔgapA**, on constate une augmentation de 5% du rendement carbone, correspondant ici au ratio gramme de PHB par gramme de fructose consommé.

Exemple 6 : Amélioration de la production de GABA chez *E. coli*

Une souche *Escherichia coli* K-12, génétiquement modifiée pour accroître le rendement de sa production en glutamate selon l'exemple 4B], peut encore être modifiée pour permettre l'expression constitutive d'une glutamate décarboxylase *gadB* (Gene ID : 946058) et ainsi
5 augmenter le rendement de production de l'acide γ -aminobutyrique.

La délétion du gène de l'alpha-cétoglutarate déshydrogénase permet en outre d'augmenter la production de glutamate (Usuda *et al.* J Biotechnol. 2010 May 3;147(1):17-30. doi: 10.1016/j.jbiotec.2010.02.018).

Dans cet exemple, on utilise les souches ci-dessous, obtenues selon l'exemple 4B] :

- 10 • **EQ.EC002 : MG1655 Δ sucA**
- **EQ.EC010 : MG1655 Δ sucA Δ zwf**
- **EQ.EC011 : MG1655 Δ sucA Δ zwf Δ gapA**

*a) Surexpression constitutive du gène *gadB**

- 15 La surexpression du gène *gadB* est sous cloné dans un vecteur d'expression bactérien pZE21MCS (EXPRESSYS). Ce vecteur possède une origine de réplication de type ColE1 et un gène de résistance à l'antibiotique kanamycine.

- Rapidement, la phase codante gène *gadB* (Gene ID : 946058) est amplifiée à partir du génome de la souche MG1655 Δ sucA avec des amorces homologues au génome d'*Escherichia coli* K-
20 12 couvrant des positions 1570595 à 1570645 et 1572095 à 1572045. Chacune de ces amorces est couplée à des séquences flottantes homologues sur 18 nucléotides aux extrémités du fragment obtenu par l'amplification du vecteur pZE21MCS excluant le site multiple de clonage. Les deux amplicons sont associés selon le protocole du kit In-Fusion® HD Cloning Kit User Manual – Clontech pour former le **plasmide pEQEC030** permettant la surexpression
25 constitutive du gène *gadB*.

b) *Insertion de l'ingénierie nécessaire à la fixation du CO₂*

Pour l'expression recombinante des différents composants d'une RuBisCO de type I fonctionnelle chez *E. coli*, les gènes décrits dans le tableau 17 (exemple 4A)], sont clonés sous la forme d'un opéron synthétique en suivant la structure de construction décrite dans le

5 Tableau 22.

L'assemblage des différents vecteurs

Les séquences codantes (CDS) des gènes décrits dans le

Tableau 24 sont amplifiées et assemblées en blocs selon le protocole fourni avec le kit NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix (E2321) de manière à obtenir 3 blocs
10 d'intégration décrits dans le

Tableau 24. Chaque bloc est ensuite amplifié selon le protocole du kit In-Fusion® HD Cloning Kit User Manual – Clontech pour former les plasmides décrits ci-dessous dans le

Tableau 24.

15 **Tableau 24 : Composition des cassettes d'expression**

Plasmide	Structure de l'opéron synthétique dans vecteur pZA11						
	Bloc I			Bloc II		Bloc III	
	CDS A	RBS1	CDS B	RBS2	CDS C	RBS3	CDS D
pZA11							
pEQEC006	<i>rbcS</i>	D	<i>rbcL</i>	B	<i>rbcX</i>	F	<i>prk</i>

Pour contrôler le niveau d'expression de ces gènes, des séquences de liaison aux ribosomes (RBS) présentées dans le tableau 19 (exemple 4B)], ayant des efficacités de traduction variables (Levin-Karp *et al.*, ACS Synth Biol. 2013 Jun 21;2(6):327-36. doi: 10.1021/sb400002n ;
20 Zelcbuch *et al.*, Nucleic Acids Res. 2013 May;41(9):e98) sont insérées entre la phase codante de chaque gène. La succession de chaque phase codante intercalée par une séquence RBS est construite par insertions successives dans un vecteur pZA11 (Expressys) qui contient un promoteur PLtetO-1, une origine de répllication moyenne p15A et un gène de résistance à l'ampicilline. L'ajout d'une glutamate décarboxylase (*gadB*) permet en outre une conversion
25 de glutamate en gamma-aminobutyrate (GABA).

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

EQ.EC 013 → (EQ.EC 002+ pZA11+pEQ030) : MG1655 Δ sucA + (*gadB*)

EQ.EC 020 → (EQ.EC 011+pEQ030+pEQEC006) : MG1655 Δ sucA Δ zwf Δ gapA + (*gadB*) + (*RuBisCO*+*PRK*)

Après transformation, les clones sont sélectionnés sur milieu LB glycérol, pyruvate, supplémenté par 100 mg/L d'ampicilline et 30 mg/L kanamycine. Une phase d'adaptation et évolution des souches ayant l'ingénierie PRK et RuBiSCO est réalisée tel que décrit dans l'exemple 4A].

10 c) *Production de GABA*

Pour la production de GABA, les cellules issues de 500ml de culture en LB sont inoculées dans 20ml de milieu MS (40 g/L de glucose, 1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g/L KH_2PO_4 , 10 mg/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 mg/L $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g/L d'extrait de levure, 30 g/L de CaCO_3 , 100 mg/L d'ampicilline et 30mg/L de kanamycine à une pression 0,1 atmosphère CO_2 , à 30 ° C à un pH de 3,5.

La concentration de GABA est mesurée par chromatographie liquide à haute performance (HPLC), à l'aide d'une colonne OptimaPak C18 (4,6 x 150 mm, RS tech Corporation, Daejeon, Corée). Les échantillons sont centrifugés à 12 000 tr / min pendant 5 minutes, 100 μL du surnageant transféré dans un nouveau tube Eppendorf. Dans ces tubes sont rajoutés les réactifs suivants : 200 μL de tampon bicarbonate de sodium 1 M de pH 9,8, 100 μL de chlorure de dansyle 80 g / L dans l'acétonitrile et 600 μL d'eau bidistillée. Le mélange est incubé à 80 ° C pendant 40 minutes. On arrête la réaction par l'ajout de 100 μL d'acide acétique 2%. Le mélange est centrifugé à 12 000 tr / min pendant 5 minutes. Le surnageant est ensuite filtré à travers un filtre Millipore de 0,2 μm et analysé par HPLC sur un système Agilent en utilisant un détecteur UV. Les échantillons dérivatisés sont séparés en utilisant un gradient non linéaire binaire en utilisant l'éluant A [tétrahydrofurane / méthanol / acétate de sodium 50 mM à pH 6,2 (5: 75: 420, en volume)] et l'éluant B (méthanol). Le glucose résiduel est mesuré avec un bio-analyseur (YSI Inc.).

Le rendement carbone $Y_{p/s}$ est calculé en gramme de GABA produit par gramme de glucose consommé.

Ce rendement augmente significativement de 15% pour la souche EQ.EC 020 $\Delta sucA \Delta zwf \Delta gapA$ (RubisCO+PRK)+(GadB) par comparaison avec les souches contrôles EQ.EC 013 $\Delta sucA$ (GadB).

5 **Exemple 7 : Amélioration de la production de succinate et oxalate chez *E. coli***

Une souche *Escherichia coli* K-12, génétiquement modifiée pour permettre l'expression constitutive d'une glyoxylate déshydrogénase FPGLOXDH1 (Gene ID : 946058) de *Fomitopsis palustris*, pour réduire l'expression du gène *icd* (Gene ID : 945702), et pour inactiver les gènes *aceB* (GeneID 948512) et *sdhA* (Gene ID : 945402), permettrait
10 d'augmenter le rendement de production de succinate et d'acide oxalique.

La réduction d'expression de l'isocitrate déshydrogénase (*icd*) permet de rediriger le flux métabolique vers le shunt glyoxylique. L'inactivation de la malate synthase (*aceB*) et de la succinate déshydrogénase (*sdhA*) permettent de ne pas reconsommer respectivement le glyoxylate et le succinate produits. La délétion du gène de la succinate déshydrogénase
15 augmente la production succinate en conditions aérobie (Yang *et al.*, Microbiol res. 2014 May-Jun ; 169(5-6) :432-40). La délétion du gène de la malate synthase permet l'accumulation de glyoxylate qui sera converti en oxalate par l'expression constitutive de la glyoxylate déshydrogénase.

Dans cet exemple, une souche d'*Escherichia coli* K-12 MG1655 dont le gène *sdhA* a été délété
20 est utilisée. Cette souche est issue d'une banque de délétion de gènes (Baba *et al.* Mol Syst Biol. 2006 ;2 :2006.0008) chez *Escherichia coli* K-12 et fournie par le Coli Genetic Stock Center sous le nom JW0715-2 et avec la référence 8302. (JW0713-1 : **MG1655 $\Delta sdhA$::Kan**).

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

25 Afin de pouvoir réutiliser la même stratégie de délétion que celle utilisée pour construire la souche JW0715-2 ci-dessus (Rodriguez *et al.*, 2016), la cassette de sélection est supprimée à l'aide d'une recombinaison.

Le plasmide p707-Flpe (fournit dans le kit Quick&Easy *E. coli* Gene Deletion Red®/ET® Recombination par Gene bridges) est transformé par électroporation selon le protocole du kit.
30 Les cellules sont sélectionnées sur LB agar complété avec 0,2% glucose, tétracycline 0,0003% et additionné de 0,3% L-arabinose. Une contre sélection des clones obtenus est

effectuée en vérifiant qu'ils ne sont plus capables de pousser sur le même milieu supplémenté par kanamycine 0,0015%.

La souche obtenue se nomme **EQ.EC040 : MG1655 Δ sdhA**

b) Délétion du gène aceB

- 5 La délétion du gène *aceB* (GeneID 948512) est réalisée par recombinaison homologue et l'utilisation du kit Quick&Easy E. coli Gene Deletion Red®/ET® Recombination Kit selon le protocole du fournisseur Gene bridges.

Des oligonucléotides dessinés pour amplifier une cassette d'expression d'un gène de résistance FRT-PKG-gb2-neo-FRT et possédant une séquence 5' homologues sur 50 nucléotides aux
10 régions adjacentes du locus de délétion, c'est-à-dire aux positions de 4215428 à 4215478. et de 4217129.à 4217079 sur le chromosome générant ainsi des bras de recombinaison de la cassette sur le génome bactérien de part et d'autre de la séquence codante du gène *aceB*.

La souche d'*Escherichia coli* K-12, EQ.EC040 est transformée par électroporation avec le plasmide pRedET selon le protocole du kit. Les colonies obtenues sont sélectionnées sur milieu
15 riche complexe LB agar 0,2% glucose, tétracycline 0,0003%.

La transformation de l'amplicon obtenu lors de la première étape en présence de la recombinase RedET, induite par l'arabinose 0,3% en LB liquide pendant 1H. Pour se faire, une seconde transformation de la cassette de délétion est effectuée par électroporation dans des cellules exprimant RedET et les colonies sont sélectionnées sur LB agar complémenté avec 0,2%
20 glucose, tétracycline 0,0003% et additionné de 0,3% L-arabinose et kanamycine 0,0015%.

Le plasmide p707-Flpe (fournit dans le kit Quick&Easy E. coli Gene Deletion Red®/ET® Recombinaison par Gene bridges) est transformé par électroporation selon le protocole du kit. Les cellules sont sélectionnées sur LB agar complémenté avec 0,2% glucose, tétracycline 0.0003% et additionné de 0,3% L-arabinose. Une contre sélection des clones obtenus est
25 effectuée en vérifiant qu'elles ne sont plus capables de pousser sur le même milieu supplémenté par kanamycine 0,0015%.

La souche obtenue se nomme **EQ.EC041 : MG1655 Δ sdhA Δ aceB**

c) Changement du promoteur du gène icd

i. Stratégie

Le remplacement du promoteur natif du gène *icd* (Gene ID : 945702) par un promoteur plus faible est réalisée par recombinaison homologue et l'utilisation du kit Quick&Easy E. coli Gene Deletion Red®/ET® Recombination Kit selon le protocole du fournisseur Gene bridges.

5 *ii. Introduction du promoteur faible P_{oxb1}*

Le promoteur du gène *icd* est remplacé par une cassette couplant le promoteur P_{oxb1}, caractérisé comme faible, et une cassette d'un gène de résistance à un antibiotique pour permettre la sélection de l'insertion de la cassette P_{oxb1} avec gène de résistance à un antibiotique.

Des oligonucléotides dessinés pour amplifier une cassette d'expression d'un gène de résistance FRT-PKG-gb2-neo-FRT et possédant une séquence 5' homologue sur 50 nucléotides à la 10 région adjacente gauche du locus du promoteur P_{icd} (Genomic target LA) pour l'oligo sens c'est-à-dire aux positions de 1194911 à 1194961 sur le génome, et la séquence Spacer R (Tableau 23) pour l'oligo reverse permettent l'amplification d'un fragment permettant l'assemblage avec le fragment P_{oxb1}.

15 Des oligonucléotides dessinés pour amplifier le promoteur P_{oxb1} à partir du plasmide PSF-OXB1 (Sigma #OGS553) et possédant une séquence 5' homologue sur 50 nucléotides à la région adjacente droite du locus du promoteur P_{icd} (Genomic target RA) pour l'oligo reverse c'est-à-dire aux positions de 1195173 à 1195123 sur le génome, et la séquence Spacer S (Tableau 25) pour l'oligo produisent l'amplification du fragment P_{oxb1}.

20 L'amplification d'un fragment de fusion à l'aide du kit NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix (E2321) permet d'associer le promoteur de substitution à une cassette de sélection antibiotique.

Tableau 25: Séquences des amorces pour amplifier le promoteur du gène OXB1

Nom	Séquences d'homologie avec le vecteur PSF-OXB1
POXB1-S (SEQ ID N°15)	TCGTTGCGTTACACACAC
POXB1-R (SEQ ID N°16)	TGTGTTCGAGTGGATGGTAG
Spacer S (SEQ ID N°17)	GCAATTCATGC
Spacer R (SEQ ID N°18)	GCATGAATTCG

La souche d'*Escherichia coli* K-12, EQ.EC041 est transformée par électroporation avec le plasmide pRedET selon le protocole du kit. Les colonies obtenues sont sélectionnées sur milieu riche complexe LB agar 0,2% glucose, tétracycline 0,0003%.

5 La transformation de l'amplicon obtenu lors de la première étape en présence de la recombinaise RedET, induite par l'arabinose 0,3% en LB liquide pendant 1h. Pour se faire, une seconde transformation de la cassette de délétion est effectuée par électroporation dans des cellules exprimant RedET et les colonies sont sélectionnées sur LB agar complémenté avec 0,2% glucose, tétracycline 0,0003% et additionné de 0,3% L-arabinose et kanamycine 0,0015%.

10 Le plasmide p707-Flpe (fournit dans le kit Quick&Easy E. coli Gene Deletion Red®/ET® Recombinaison par Gene bridges) est transformé par électroporation selon le protocole du kit. Les cellules sont sélectionnées sur LB agar complémenté avec 0,2% glucose, tétracycline 0,0003% et additionné de 0,3% L-arabinose. Une contre sélection des clones obtenus est effectuée en vérifiant qu'elles ne sont plus capables de pousser sur le même milieu supplémenté par kanamycine 0,0015%.

15 La souche obtenue se nomme **EQ.EC042 : MG1655 Δ sdhA Δ aceB $P_{icd}::P_{oxb1}$**

d) Délétion du gène zwf

La délétion du gène *zwf* (GeneID : 946370) est réalisée par recombinaison homologue et l'utilisation du kit Quick&Easy E. coli Gene Deletion Red®/ET® Recombination Kit selon le protocole du fournisseur Gene bridges.

20 Des oligonucléotides dessinés pour amplifier une cassette d'expression d'un gène de résistance FRT-PKG-gb2-neo-FRT et possédant une séquence 5' homologues sur 50 nucléotides aux régions adjacentes du locus de délétion, c'est-à-dire aux positions 1934789 à 1934839 et 1936364 à 1936314 sur le chromosome générant ainsi des bras de recombinaison de la cassette sur le génome bactérien de part et d'autre de la totalité de l'opéron.

25 La souche d'*Escherichia coli* K-12, EQ.EC042 est transformée par électroporation avec le plasmide pRedET selon le protocole du kit. Les colonies obtenues sont sélectionnées sur milieu riche complexe LB agar 0,2% glucose, tétracycline 0,0003%.

30 La transformation de l'amplicon obtenu lors de la première étape en présence de la recombinaise RedET, induite par l'arabinose 0,3% en LB liquide pendant 1 h. Pour se faire, une seconde transformation de la cassette de délétion est effectuée par électroporation dans des cellules

exprimant RedET et les colonies sont sélectionnées sur LB agar complémenté avec 0,2% glucose, tétracycline 0,0003% et additionné de 0.3% L-arabinose et kanamycine 0,0015%.

Le plasmide p707-Flpe (fournit dans le kit Quick&Easy E. coli Gene Deletion Red®/ET® Recombinaison par Gene bridges) est transformé par électroporation selon le protocole du kit.

- 5 Les cellules sont sélectionnées sur LB agar complémenté avec 0,2% glucose, tétracycline 0,0003% et additionné de 0,3% L-arabinose. Une contre-sélection des clones obtenus est effectuée en vérifiant qu'ils ne sont plus capables de pousser sur le même milieu supplémenté par kanamycine 0,0015%.

La souche obtenue se nomme **EQ.EC043 : MG1655 Δ sdhA Δ aceB $P_{icd}::P_{oxb1} \Delta$ zwf**

10 e) *Délétion du gène gapA*

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

- 15 Des oligonucléotides dessinés pour amplifier une cassette d'expression d'un gène de résistance FRT-PKG-gb2-neo-FRT et possédant une séquence 5' homologues sur 50 nucléotides aux régions adjacentes du locus de délétion c'est à dire la phase codante du gène (*gapA*) (GenBank: X02662.1) générant ainsi des bras de recombinaison de la cassette sur le génome bactérien.

- 20 La souche d'*Escherichia coli* K-12, EQ.EC043 est transformée par électroporation avec le plasmide pRedET selon le protocole du kit. Les colonies obtenues sont sélectionnées sur milieu riche complexe LB agar 0.2% glucose, tetracycline 0.0003%.

- 25 La transformation de l'amplicon obtenu lors de la première étape en présence de la recombinaise RedET est induite par l'arabinose 0.3% en LB liquide pendant 1H. Pour se faire, une seconde électroporation des cellules exprimant RedET par la cassette de délétion est effectuée et les colonies sont sélectionnées sur LB agar complémenté avec 0.2% glycérol et pyruvate 0.3%, tetracycline 0.0003% et additionné de 0.3% L-arabinose et kanamycin 0.0015%.

- 30 Le plasmide p707-Flpe (fournit dans le kit Quick&Easy E. coli Gene Deletion Red®/ET® Recombinaison par Gene bridges) est transformé par électroporation selon le protocole du kit. Les cellules sont sélectionnées sur LB agar complémenté avec 0.2% glucose, tetracycline 0.0003% et additionné de 0.3% L-arabinose. Une contre sélection des clones obtenus est effectuée en vérifiant qu'elles ne sont plus capables de pousser sur le même milieu supplémenté par kanamycin 0.0015%.

La souche obtenue se nomme **EQ.EC044 : MG1655 Δ sdhA Δ aceB $P_{icd} :: P_{oxb1} \Delta$ zwf Δ gapA**

f) Surexpression constitutive des gènes FPGLOXDH1 et aceA

Les séquences codantes (CDS) des gènes FPGLOXDH1 (Gene ID : 946058) et *aceA* (Gene ID: 948517) sous clonées dans un vecteur d'expression bactérien pZE21MCS (EXPRESSYS) sous

5

forme d'opérons synthétique selon la structure décrite dans le Tableau 24. Ce vecteur possède une origine de répllication de type ColE1 et un gène de résistance à l'antibiotique kanamycine.

Chacune de ces amorces est couplée à des séquences flottantes homologues sur 18 nucléotides aux extrémités du fragment obtenu par l'amplification du vecteur pZE21MCS excluant le site multiple de clonage. Les deux amplicons sont associés selon le protocole du kit In-Fusion® HD

10

g) Insertion de l'ingénierie nécessaire à la fixation du CO₂

Pour l'expression recombinante des différents composants d'une RuBisCO de type I fonctionnelle chez *E. coli*, les gènes décrits dans le Tableau 17 (exemple 4A)], sont clonés sous

15

la forme d'un opéron synthétique.

Les séquences codantes (CDS) des gènes décrits dans le Tableau 2 sont amplifiées et assemblées en blocs selon le protocole fournis avec le kit NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix (E2321) de manière à obtenir 3 blocs d'intégration décrits dans le Tableau 26. Chaque bloc est ensuite amplifié selon le protocole du kit In-Fusion® HD Cloning Kit User Manual – Clontech

20

Tableau 26 : Composition des cassettes d'expression

Plasmide	Type de vecteur	Structure de l'opéron synthétique						
		Bloc I			Bloc II		Bloc III	
		CDS A	RBS1	CDS B	RBS2	CDS C	RBS3	CDS D
pZA11	pZA11							
pEQEC006	pZA11	<i>rbcS</i>	D	<i>rbcL</i>	B	<i>rbcX</i>	F	<i>prk</i>
pZE21MCS	pZE21MCS							
pEQEC035	pZE21MCS	FPGLOXDH1	D	<i>aceA</i>				

Pour contrôler le niveau d'expression de ces gènes, des séquences de liaison aux ribosomes (RBS) présentées dans le Tableau 19 (exemple 4B)], ayant des efficacités de traduction variables (Levin-Karp *et al.*, ACS Synth Biol. 2013 Jun 21;2(6):327-36. doi: 10.1021/sb400002n ; Zelcbuch *et al.*, Nucleic Acids Res. 2013 May;41(9):e98) sont insérées
 5 entre la phase codante de chaque gène. La succession de chaque phase codante intercalée par une séquence RBS est construite par insertions successives dans un vecteur pZA11 (Expressys) qui contient un promoteur PLtetO-1, une origine de réplication moyenne p15A et un gène de résistance à l'ampicilline.

Plusieurs souches sont réalisées en électroporant les différents vecteurs présentés selon le plan
 10 ci-dessous

EQ.EC045 → (EQ.EC042+ pZA11+ pZE21MCS) : MG1655 Δ *sdhA* Δ *aceB* *P_{icd}* ::*P_{oxb1}*

EQ.EC046 → (EQ.EC045 + pEQEC006+ pEQEC035) : MG1655 Δ *sdhA* Δ *aceB* *P_{icd}* ::*P_{oxb1}* Δ *zwf* Δ *gapA* + (FPGLOXDH1+*aceA*) + (*RuBisCO*+*PRK*)

Après transformation, les clones sont sélectionnés sur milieu LB glycérol, pyruvate,
 15 supplémenté par 100 mg/L d'ampicilline et 30 mg/L kanamycine. Une phase d'adaptation et évolution des souches ayant l'ingénierie PRK et RuBiSCO est réalisée tel que décrit dans l'exemple 4A].

h) Production de succinate et oxalate

Pour la production de succinate et d'oxalate, les cellules issues de 500 ml de culture en LB sont
 20 inoculées dans 20 ml de milieu MS (40 g/L de glucose, 1 g/L MgSO₄.7H₂O, 20 g/L de (NH₄)₂SO₄, 1 g/L KH₂PO₄, 10 mg/L FeSO₄.7H₂O, 10 mg/L MnSO₄.7H₂O, 2 g/L d'extrait de levure, 30 g/L de CaCO₃, 100 mg/L d'ampicilline et 30 mg/L de kanamycine à une pression 0,1 atmosphère CO₂, à 30 ° C à un pH de 3,5.

La concentration de succinate est mesurée par chromatographie liquide à haute performance
 25 (HPLC), les échantillons de culture sont centrifugés à 12 000 g pendant 5 min.

i. Dosage succinate

Le surnageant de culture est filtré à travers un filtre Millipore de 0,2 µm et analysé sur un système HPLC Agilent (série 1100) équipé d'une colonne échangeuse de cations. (Aminex HPX87-H, Bio-Rad, Hercules, CA, USA), un détecteur d'absorbance UV (Agilent
 30 Technologies, G1315D) et un détecteur d'indice de réfraction (RI) (Agilent Technologies,

HP1047A). Les échantillons sont séparés sur une phase mobile de H_2SO_4 à 5 mM à un débit de 0,4 ml / min. La température du four de la colonne est 65 ° C.

Le glucose résiduel est mesuré avec un bio analyseur (Ysi Inc.) ou par HPLC-réfractométrie avec une colonne Aminex HPX87-H.

- 5 Le rendement carbone $Y_{p/s}$ est calculé en gramme de succinate produit par gramme de glucose consommé.

Ce rendement augmente significativement de 6% pour la souche ingénierie EQ.EC046 par comparaison avec la souche contrôle EQ.EC045 (vide).

ii) dosage de l'oxalate

- 10 Les culots sont lavés deux fois avec du tampon phosphate de potassium 10 mM (pH 7,5) contenant de l'EDTA 2 mM et conservés à -20 ° C. Des échantillons (1 ml) sont transférés dans un tube de pré-refroidi avec 0,75 g de billes de verre (425-600 μm) et introduits dans une machine Fast Prep (Thermo Scientific, Erembodegem, Pays-Bas) et soumis à 4 des rafales de 20 s au réglage de la vitesse 6. Les lysats sont centrifugés pendant 20 min à 4 ° C et 36 000 g.
- 15 Les dosages de protéines totales sont effectués selon la méthode de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). L'activité oxaloacétate acétyl hydrolase (EC 3.7.1.1) est mesurée en utilisant une modification de la détermination optique directe de l'oxaloacétate (OAA) à 255 nm comme décrit dans (Lenz *et al.*, 1976). La disparition du tautomère énolique de l'OAA est contrôlée à 255 nm à 25 ° C dans un spectrophotomètre Hitachi modèle 100-60 (Hitachi, Tokyo, Japon), en utilisant des
- 20 cuvettes de quartz. Le mélange réactionnel de 1 ml contient 100 mM d'imidazole-HCl (pH 7,5), 0,9 mM de $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 mM d'OAA, 20 μl d'extrait cellulaire (témoins avec différents volumes d'extraits cellulaires confirment la linéarité entre l'activité enzymatique et la quantité d'extrait cellulaire). La réaction est démarrée par l'addition de l'extrait cellulaire.

- 25 Le rendement carbone $Y_{p/s}$ est calculé en gramme de doxalate produit par gramme de glucose consommé.

Ce rendement augmente significativement de 3% pour la souche ingénierie EQ.EC046 par comparaison avec la souche contrôle EQ.EC045 (vide).

Exemple 8 : Amélioration de la production de citrate chez *Aspergillus niger*

a) Stratégie

L'inactivation du gène *pgkA* (Locus tag An08g02260), conduisant à la non fonctionnalité de la voie de la glycolyse, et celle du gène *gsdA* (Locus tag An02g12140), inhibant la partie oxydative de la voie des pentoses phosphates, sont mises à profit pour intégrer les 6 gènes permettant l'expression fonctionnelle des enzymes PRK et RuBisCO, à savoir RbcS, RbcL, RbcX, GroES, GroEL et PRK permettant la fixation du CO₂.

b) Constructions ADN

i) Séquences des ARNguides pour cibler le gène à inactiver

Dans chacun de ces deux gènes une séquence de 20 nucléotides ponctuée par un motif NGG (séquence cible CRISPR soulignée) a été déterminée (Tableau 27). Dans chacun des deux cas, cette séquence est propre au gène ciblé mais aussi unique dans le génome d'*Aspergillus niger*. Ces séquences sont utilisées pour exprimer un ARNguide (ARNg) qui en formant un hétéro duplex avec la région homologue du génome d'*Aspergillus niger* dirige l'action de l'endonuclease CAS9 pour induire une cassure double brin spécifiquement sur le locus choisit.

Tableau 27: Séquence cible pour ARNg

Locus	Gène	Génome référence	Locus tag	Séquences pour CRISPR
1	<i>pgkA</i>	<i>A. niger</i> CBS 513-88	An08g02260)	CAACAAGGCCCACTGGTGGCC <u>AGG</u> (SEQ ID N°19)
2	<i>gsdA</i>	<i>A. niger</i> CBS 513-88	An02g12140)	CATTTCGGTCAATATGACA <u>AGG</u> (SEQ ID N°20)

Le plasmide pFC332 (Addgene #87845) décrit dans Sarkari *et al.* (Bioresour Technol. 2017 Dec;245(Pt B):1327-1333) contient une cassette d'expression d'un ARNg, une cassette permettant l'expression fonctionnelle de l'endonuclease Cas9 et une cassette Hph permettant la sélection de ce plasmide. Le plasmide contient en outre le fragment AMA1_2.8 qui permet une propagation transitoire du plasmide. Enfin, une origine de répllication pour *E. coli* est également présente.

Afin de cibler un autre gène, la cassette d'ARNg entre FS A et FS B peut être facilement échangée. Ce plasmide est modifié en amplifiant les différentes parties de ce plasmide, afin d'éliminer la cassette de sélection antibiotique et de modifier les 20 nucléotides permettant la spécificité de l'ARNg au profit des séquences décrites dans le Tableau 27 pour former les plasmides pEQ0610 pour cibler pgkA et pEQ0611 pour cibler gsdA.

Plasmide donneur

Régions d'homologies avec le génome

Le plasmide donneur consiste en un assemblage de type In-Fusion® HD Cloning Kit User Manual - Clontech entre le plasmide pUC19 (GenBank: M77789.2) et les séquences de ciblage génomique (LA et RA) d'environ 1500 bp chacune, homologues au locus choisi pour l'intégration. Les séquences LA et RA sont adjacents en 5' et 3' respectivement de la séquence du locus ciblée par l'ARNguide. L'hétérodimère ADN génomique/ARNguide est reconnu par l'endonuclease Cas9 pour clivage double brin (locus 1 : pgkA; locus2 : gsdA) (Tableau 28). Les fragments RA et LA sont amplifiés avec les amorces pour le gène pgkA et le gène gsdA (Tableau 29). Les séquences des amplicons sont données dans le sequence listing (SEQ ID N°55 à SEQ ID N°58). Une extension de 18 nucléotides sur toutes les amorces forward des trois fragments est rajoutée selon le protocole du kit In-Fusion® HD Cloning Kit User Manual - Clontech, afin de permettre un assemblage fonctionnel des plasmides (pEQ0600 ou pEQ0601) et l'introduction de deux sites de restriction pour des endonucléases de restriction de type II (Les enzymes de restriction I-CeuI et I-SceI qui ont de grands sites de reconnaissance asymétriques (12 à 40 paires de bases). Ce sont des séquences de reconnaissance de 18 paires de bases, donc rares. Le fait que le clivage soit asymétrique au site de reconnaissance permet de libérer un fragment dépourvu de séquences issues du vecteur bactérien pUC19. Ces deux enzymes permettent d'extraire par restriction le bloc d'intégration après amplification par clonage chez *E. coli*.

Tableau 28 : Amplification des régions d'homologies pour le gène pgkA

Amplicon	Alias	Primer position	Primer sequence
5'pgkA_A. niger	LA1	Forward	GGATCGCAGATACGGTCGC (SEQ ID N°21)
		Reverse	CCTCGGTGAAGACAACGCTG (SEQ ID N°22)
3'pgkA_A. niger	RA1	Forward	CTCCTTGAGAACCTGCGTTTCC (SEQ ID N°23)
		Reverse	CTGAAGTACGTTTTCCCAAGCC (SEQ ID N°24)

Tableau 29: Amplification des régions d'homologies pour le gène gsdA

Amplicon	Alias	Primer position	Primer sequence
5'gsdA_A. niger	LA2	Forward	CGTTATCACAAAGAAGCCAGGTCC (SEQ ID N°25)
		Reverse	GCTGCTCTTCGATTTCCTTGGT (SEQ ID N°26)
3'gsdA_A. niger	RA2	Forward	TCATCAACCTCAACAAGCACCTC (SEQ ID N°27)
		Reverse	GTGAAGACAGCGGCGGTCC (SEQ ID N°28)

5 *Cassettes d'expression de l'ingénierie*

Les promoteurs et les terminateurs sont identifiés sur la base des données GenBank. Les promoteurs choisis sont déterminés à partir du point +1 de transcription et remontent 1.4Kb en amont de manière à couvrir à la fois les séquences « core » (TATA box) et les séquences trans-activatrices permettant la fonctionnalité optimale du promoteur concerné.

10 Pour les terminateurs, la coupure est effectuée 500 bp après le codon stop du gène.

La structure de chaque bloc d'intégration de 4 cassettes d'expression est définie comme suit : le premier niveau comprend des éléments simples, à savoir des promoteurs, des séquences codantes (CDS) et des terminateurs. Les éléments promoteurs (

Tableau 30) et terminateurs (

15 **Tableau 31)**, dont les séquences sont fournies dans le sequence listing (SEQ ID N°59 à 62), sont amplifiés et assemblés avec les CDS de l'ingénierie selon le Tableau 32. Les CDS, dont les séquences sont fournies dans le sequence listing (SEQ ID N°63 à 66), sont amplifiés selon le protocole fournis avec le kit NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix (E2321) de manière à obtenir les cassettes d'expressions fonctionnelles compilées dans le tableau. Chaque

20 bloc d'intégration de 4 gènes est organisé pour inclure 4 couples différents (promoteur/terminateur) de façon à limiter les interférences trans. Chaque bloc d'intégration de 6 gènes est organisé pour inclure 6 couples différents (promoteur/terminateur) de façon à limiter les interférences transcriptionnelles

Fragment donneur pour insertion dans le locus cible du génome

Les différentes cassettes d'expression multiples (RbcS, RbcL et RbcX) ou (GroES, GroEL et PRK) sont amplifiées et assemblées autour d'une cassette de sélection antibiotiques (

Tableau), selon le protocole du kit In-Fusion® HD Cloning Kit User Manual - Clontech, pour former les plasmides donneurs (pEQ0602 ou pEQ0603).

Tableau 30 : Localisation native des promoteurs d'*Aspergillus niger* utilisés dans la combinatoire génomique pour insérer les 6 gènes de l'ingénierie de fixation du CO₂ dans le génome d'*Aspergillus niger*.

Promoteurs	Organism	Gene ID	Primer reverse	Primer forward
PmbfA	<i>A. niger</i> CBS 513-88	An02g12390	TTTGAAGATGGATGAGAAGTCGG (SEQ ID N°33)	GCCATGAAATCCAATCATTTCC (SEQ ID N°29)
PcoxA	<i>A. niger</i> CBS 513-88	An07g07390	TGTCCTGGTGGGTGGGTTG (SEQ ID N°34)	GACGGCATTGAGCAACATC (SEQ ID N°30)
PsrpB	<i>A. niger</i> CBS 513-88	An16g08910	CTCGAACGAGAATGGGAACC (SEQ ID N°35)	TTGGCAGGGTCACGTAGCC (SEQ ID N°31)
PtvdA	<i>A. niger</i> CBS 513-88	An04g01530	GGCGGAATGAGATGCGACAG (SEQ ID N°36)	TTAGTCCATTGAGCAAGCTGCC (SEQ ID N°32)

Tableau 31 : Localisation native des terminateurs d'*Aspergillus Niger* utilisés dans la combinatoire génomique pour insérer les 6 gènes de l'ingénierie de fixation du CO₂ dans le génome d'*Aspergillus niger*.

Terminateurs	Organism	Gene ID	Primer forward	Primer reverse
TtrpC	<i>A. nidulans</i> FGSC A4	AN0648	TGATTTAATAGCTCCATGTCAAC AAG (SEQ ID N°37)	GGGTAAACGACTCATAGGAGAGTTG (SEQ ID N°41)
TniaD	<i>A. nidulans</i> FGSC A4	AN1006	ACGGGTTCGCATAGGTTTGG (SEQ ID N°38)	GGGATATTTGACACGATTCTGAGG (SEQ ID N°42)
TglaA	<i>A. niger</i> CBS 513-88	An03g06550	CGACCGCGACGGTGACTGAC (SEQ ID N°39)	CCGGAGATCCTGATCATCCG (SEQ ID N°43)
TgpdA	<i>A. niger</i> CBS 513-88	An16g01830	GAATCAGGACGGCAAAGTGAAT (SEQ ID N°40)	CGTGGTCTAGCTGCCCTCC (SEQ ID N°44)

Tableau 32 : Assemblage des cassettes d'expression

Cassette d'expression	Gene	GenBank	Optimisation de codons	Promoteur	Terminateur
CAS 1	RbcL	BAD78320.1	Oui	PmbfA _p	trpct
CAS 2	RbcS	BAD78319.1	Oui	PcoxA _p	TniaD
CAS 3	RbcX	BAD80711.1	Oui	PsrpB _p	glaAt
CAS 4	Hph	pUG75(P30671)	Non	picdA _p	TgpdA
CAS 5	GroES	U00096	Non	PmbfA _p	trpct
CAS 6	GroEL	AP009048	Non	PcoxA _p	TniaD
CAS 7	PRK	BAD78757.1	Oui	PsrpB _p	glaAt
CAS 8	Ble	pUG66(P30116)	Non	picdA _p	TgpdA

Tableau 33 : Assemblage des plasmides

Plasmide	Séquence génomique	Promoteur	Gene	Terminateur	Séquence Génomique	ori	Marqueur selection
pEQ0600	LA1				RA1	coli	Ampiciline
pEQ0601	LA2				RA2	coli	Ampiciline
pEQ0602	LA2	PmbfA _p	RbcL	trpct	RA2	coli	Ampiciline et Hydromycine B
		PcoxA _p	RbcS	TniaD		coli	
		PsrpB _p	RbcX	glaAt		coli	
		picdA _p	Hph	TgpdA		coli	
pEQ0603	LA1	PmbfA _p	GroES	Trpct	RA1	coli	Ampiciline et Bleomycine
		PcoxA _p	GroEL	TniaD		coli	
		PsrpB _p	PRK	glaAt		coli	
		picdA _p	Ble	TgpdA		coli	

c) Transformation d'Aspergillus niger

La transformation de l'ADN dans *Aspergillus niger* est contrainte par la présence de la paroi cellulaire fongique, et est extrêmement inefficace par rapport à la levure ou à *Escherichia coli*. Néanmoins, la transformation de protoplastes préparés à partir de hyphes fongiques ou

5 conidiospores en germination par traitement avec des enzymes dégradant la paroi cellulaire telles que le cocktail « Lysing Enzyme® de *Trichoderma harzianum*, chitinase de *Streptomyces griseus* et β -glucuronidase » de *Helix pomatia* (de Bekker et al., J Microbiol Methods, 2009 Mar ; 76(3) :305-6) permet de donner des transformants.

La souche *A. niger* CBS 513-88 est cultivée à 30 ° C dans un Erlenmeyer de 1L avec 250 ml

10 de milieu de transformation (Kusters-van Someren et al., Curr Genet. 1991 Sep ;20(4) :293-9). Après une croissance de 16 h à 250 rpm, le mycélium est récolté par filtration sur Miracloth (Calbiochem) et lavé avec de l'eau désionisée. Les protoplastes sont réalisés en présence de 5 g.L⁻¹ d'enzymes de lyse provenant de *Trichoderma harzianum* (Sigma Saint Louis, MO, USA), de 0,075 Uml⁻¹ chitinase de *Streptomyces griseus* (Sigma) et de 460 Uml⁻¹ glucuronidase de

15 *Helix pomatia* (Sigma) dans KMC (KCl 0,7 M, CaCl₂ 50 mM, 20 mM de Mes / NaOH, pH 5,8) pendant 2 heures à 37 ° C et 120 tr / min. La protoplastation est surveillée toutes les 30 minutes avec un microscope. Les protoplastes sont filtrés à travers un filtre Miracloth et recueillis par centrifugation à 2000 x g et 4 ° C pendant 10 minutes. Les protoplastes sont lavés avec du STC froid (sorbitol 1,2 M, Tris / HCl 10 mM, CaCl₂ 50 mM, pH 7,5) et ensuite remis

20 en suspension dans 100 μ l de STC et directement utilisés pour la transformation.

Afin d'intégrer une voie métabolique dans le génome de *A. niger*, une co-transformation d'un plasmide et d'un fragment linéaire est nécessaire. Le plasmide pEQ0610 est co transformé avec un fragment donneur pour intégrer une partie de l'ingénierie dans le génome tout en inactivant le gène *pgkA*. De même, le plasmide pEQ0611 est co transformé avec un fragment donneur

25 pour intégrer l'autre partie de l'ingénierie dans le génome tout en inactivant le gène *gsdA*. Ces séquences servent d'une part de matrices pour la recombinaison homologue et d'autre part de marqueur de sélection : lors de l'intégration avec l'expression fonctionnelle des gènes de résistance antibiotique Hph ou Ble. Les souches sont directement sélectionnées sur des plaques de milieu minimal avec un ajout d'Hygromycine B ou de Bleomycine permettant une sélection

30 directe sur l'événement d'intégration. En raison de la présence de l'origine de réplication AMA1_2.8, le plasmide pCAS_pyrG2 est facilement perdu entraînant seulement une expression transitoire de la protéine Cas9, réduisant ainsi le risque d'effets indésirables non ciblés.

10 µg de cassettes linéaires et 5 µg de plasmide sont mélangés avec 100 µL de solution STC contenant au moins 10⁷ protoplastes et 330 µL de solution de polyéthylène glycol (PEG) fraîchement préparée (PEG 6000 25%, CaCl₂ 50 mM, Tris / HCl 10 mM, pH 7,5) et gardée sur la glace pendant 20 min. Après mélange avec une solution de 2 ml de PEG supplémentaire et
 5 une incubation à température ambiante pendant 10 minutes, le mélange de protoplastes est dilué avec 4 ml de STC.

La sélection des transformants est réalisée sur des plaques MM additionnées de 150 µg / mL d'hygromycine B ou de plaques MM additionnées de Bleomycine 50 µg / mL. Tous les transformants sont purifiés par isolement de colonies uniques sur le milieu de sélection au
 10 moins deux fois. L'insertion des fragments est vérifiée en séquençant le locus cible avec les amorces de contrôle appropriées.

L'ADN génomique des cellules fongiques est isolé avec un protocole modifié, en utilisant le kit de purification d'ADN génomique Wizard® (Promega, Wisconsin, États-Unis). Le mycélium est cultivé pendant une nuit dans CM (30 ° C, 150 tr / min) dans 290 pi de solution
 15 d'EDTA 50 mM et 10 pi de lyticase (10 mg / ml) pour éliminer la paroi cellulaire. Après 90 min d'incubation à 37 ° C, la suspension est centrifugée et le surnageant est jeté. Le culot de mycélium est remis en suspension dans 300 µl de solution de lyse de noyaux et 100 µl de solution de précipitation de protéine. Les échantillons sont incubés sur de la glace pendant 5 minutes et centrifugés. L'ADN est précipité à l'isopropanol et lavé avec de l'éthanol à 70%. Le
 20 culot d'ADN est réhydraté avec une solution de réhydratation d'ADN contenant de la RNase (100 µg / ml). La transformation et l'intégration réussies des cassettes d'expression ont été vérifiées par PCR.

Tableau 34 : Souches utilisées pour l'étude de rendement

Souches	Genome	Modification génétique
EQ1500	<i>A. niger</i> CBS 513-88	
EQ1501	<i>A. niger</i> CBS 513-88	<i>gsdA</i> :: PmbfA _p -RbcL-trpc ; PcoxA _p -RbcS-TniaD ; picdA _p -Hph-TgpdA ; PsrpB _p -RbcX-glaAt
EQ1502	<i>A. niger</i> CBS 513-88	<i>gsdA</i> :: PmbfA _p -RbcL-trpc ; PcoxA _p -RbcS-TniaD ; picdA _p -Hph-TgpdA ; PsrpB _p -RbcX-glaAt
		<i>pgkA</i> :: PmbfA _p -GrES-trpc ; PcoxA _p -GroEL-TniaD ; picdA _p -Ble-TgpdA ; PsrpB _p -PRK-glaAt

Des conidies ($10^8.L^{-1}$) issues des souches EQ1500 et EQ1502 sont inoculées et cultivées à 30 ° C sur un agitateur rotatif (180 tr / min) dans des flacons à agitation contenant du milieu de Vogel sans $MnSO_4$ avec une teneur totale en glucose de 15% et une teneur totale en azote de 0,2% et 10% de CO_2 . La détermination du glucose et des acides organiques a été réalisée
5 comme décrit précédemment (Blumhoff *et al.*, 2013; Steiger *et al.*, 2016) sur une HPLC (Shimadzu, Kyoto; Japon) équipée d'une colonne Aminex HPX-87 H (300 x 7,8 mm, BioRad, Hercules, CA). Un détecteur d'indice de réfraction (RID-10 A, Shimadzu) est utilisé pour la détection du glucose et de l'acide citrique, tandis qu'un détecteur PDA (SPD-M20A, Shimadzu)
10 à 300 nm est utilisé pour détecter l'acide cis-aconitique et trans-aconitique. La colonne est utilisée à 60 ° C à un débit de 0,6 ml / min et avec une solution aqueuse d' H_2SO_4 0,004 M en tant que phase mobile. La culture a été réalisée en trois réplicats biologiques.

d) Méthode analytique

Pour la quantification des métabolites extracellulaires, un échantillon de culture est centrifugé à 14 000 xg pendant 5 min. Le surnageant est filtré à travers un filtre ayant une taille de pores de
15 0,45 μm . Le filtrat est maintenu à -20 ° C jusqu'à l'analyse. La concentration de citrate et d'oxalate est détectée et quantifiée avec de la lumière ultraviolette à 210 nm en utilisant une colonne Améthyste C18-H (250 x 4,6 mm, Sepax Technologies, Newark, DE, USA). L'élution est réalisée à 30°C avec 0,03% de H_3PO_4 à un débit de 0,8 ml / min. Le sucre réducteur est détecté avec la méthode à l'acide 3,5-dinitrosalicylique. Détermination de la biomasse : 5 ml
20 d'échantillon sont filtrés à travers Miracloth (Calbiochem, San Diego, CA, USA) pour collecter les hyphes et lavés avec de l'eau distillée. Les hyphes sont chauffés à 105 °C dans un « Miracloth ». Pour le calcul du poids sec des cellules (DCW), le poids de Miracloth est mesuré précédemment et déduit du poids total pour générer le poids net, puis le poids net par unité de volume est calculé comme DCW.

25 Après analyse complète, la comparaison du rendement de production d'acide citrique en fonction de la consommation de glucose est supérieure de 18% dans la souche ingénierée EQ1502 en comparaison de la souche sauvage EQ1500.

Exemple 9 : Amélioration de la production d'itaconate chez *Aspergillus terreus*

30 a) Stratégie

L'inactivation du gène *pgkA* (Locus tag (ATEG_00224), conduisant à la non fonctionnalité de la voie de la glycolyse, et celle du gène *gsdA* (Locus tag ATEG_01623), inhibant la partie oxydative de la voie des pentoses phosphates, sont mises à profit pour intégrer les 6 gènes

permettant l'expression fonctionnelle des enzymes PRK et RuBisCO, à savoir *rbcS*, *rbcL*, *rbcX*, *groES*, *groEL* et *prk* permettant la fixation du CO₂.

b) Constructions ADN

i) Séquences des ARNguides pour cibler le gène à inactiver

5 Dans chacun de ces deux gènes une séquence de 20 nucléotides ponctuée par un motif NGG (séquence cible CRISPR soulignée) a été déterminée (Tableau 35). Dans chacun des deux cas, cette séquence est propre au gène ciblé mais aussi unique dans le génome d'*Aspergillus terreus*. Ces séquences sont utilisées pour exprimer un ARNguide (ARNg) qui en formant un hétéro-

10 l'endonuclease CAS9 pour induire une cassure double brin spécifiquement sur le locus choisit. Pour *pgkA*, la séquence identifiée dans le second intron, les 20 premiers nucléotides présentent un pattern unique dans le génome, même en autorisant 2 mismatches. Pour *gsdA* la séquence identifiée dans quatrième intron, les 20 premiers nucléotides présentent un pattern unique dans le génome, même en autorisant 2 mismatches.

15 **Tableau 35 : Séquence cible pour ARNguide**

Locus	Gène	Génome référence	Locus tag	Séquences pour CRISPR
3	<i>pgkA</i>	<i>A. terreus</i> NIH262	<u>(ATEG_00224)</u>	CTGCGTCGGCAAGGAAGTTG <u>AGG</u> (SEQ ID N°45)
4	<i>gsdA</i>	<i>A. terreus</i> NIH2624	<u>(ATEG_01623)</u>	CATCAGCGGCCAATATGACAAGG (SEQ ID N°46)

Le plasmide pFC332 (Addgene #87845) décrit dans Sakari *et al.* (Bioresour technol. 2017 ; 245(Pt B) :1327-1333) contient une cassette d'expression d'un ARNg, une cassette permettant l'expression fonctionnelle de l'endonuclease Cas9 et une cassette Hph permettant la sélection

20 de ce plasmide. Le plasmide contient en outre le fragment AMA1_2.8 qui permet une propagation transitoire du plasmide. Enfin, une origine de répllication pour *E. coli* est également présente.

Afin de cibler un autre gène, la cassette d'ARNg entre FS A et FS B peut être facilement échangée. Ainsi ce plasmide est modifié en amplifiant les différentes parties de ce plasmide

25 afin d'éliminer la cassette de sélection antibiotique et de modifier les 20 nucléotides permettant la spécificité de l'ARNg au profit des séquences décrites dans le

Tableau 35 pour former les plasmides pEQ0615 pour cibler *pgkA* et pEQ0616 pour cibler *gsdA* dans le génome d'*Aspergillus terreus*.

ii) *Plasmide donneur*

Régions d'homologie avec le génome

5 Le plasmide donneur consiste en un assemblage de type In-Fusion® HD Cloning Kit User Manual - Clontech entre le plasmide pUC19 (GenBank: M77789.2) et séquences de ciblage génomique (LA et RA) d'environ 1500 bp chacune homologues au locus choisi pour l'intégration. Les séquences LA et RA sont adjacents en 5' et 3' respectivement de la séquence du locus ciblée par l'ARNguide. L'hétérodimère ADN génomique/ARNguide est reconnu par l'endonuclease Cas9 pour clivage double brin (locus 1 : *pgkA*; locus2 : *gsdA*) (Tableau 35).
10 Les fragments RA et LA sont amplifiés avec les amorces décrites Tableau 36, pour le gène *pgkA*, et Tableau 37, pour le gène *gsdA*. Les séquences des amplicons sont dans le sequence listing (SEQ ID N°67 à 70).

15 Une extension de 18 nucléotides sur toutes les amorces forward des trois fragments est rajoutée selon le protocole du kit In-Fusion® HD Cloning Kit User Manual - Clontech afin de permettre un assemblage fonctionnel des plasmides (pEQ0604 ou pEQ0605) (33) et l'introduction de deux sites de restriction pour des endonucléases de restriction de type II (Les enzymes de restriction I-CeuI et I-SceI) qui ont de grands sites de reconnaissance asymétriques (12 à 40 paires de bases). Ce sont des séquences de reconnaissance de 18 paires de bases, donc rares et
20 non présentes dans l'assemblage décrit. Le fait que le clivage soit asymétrique au site de reconnaissance permet de libérer un fragment dépourvu de séquences du vecteur bactérien pUC19. Ces deux enzymes permettent d'extraire par restriction le bloc d'intégration après amplification par clonage chez *E. coli*.

Tableau 36 : Amplification des régions d'homologies pour le gène *pgkA*

Amplicon	Primer position	Primer sequence
5' <i>pgkA</i> _Aterreus	Forward	CTTGGGGAATTGGGACACG (SEQ ID N°47)
	Reverse	TCTTGCCGATGAGCTTCTCC (SEQ ID N°48)
3' <i>pgkA</i> _Aterreus	Forward	CAGATCATCCTCTGGAGAACC (SEQ ID N°49)
	Reverse	ACGGCACGAATGTTACCTG (SEQ ID N°50)

Tableau 37 : Amplification des régions d'homologies pour le gène gsdA

Amplicon	Primer position	Primer sequence
5'gsdA_Aterreus	Forward	ATTGGAAGCTGGCTCTATCTCACC (SEQ ID N°51)
	Reverse	GCTGTTCTTCGATTTCCTTGGTG (SEQ ID N°52)
3'gsdA_Aterreus	Forward	TCAACCTCACCAAGCACCTCG (SEQ ID N°53)
	Reverse	CAAACAGCCCGTCGCAACTG (SEQ ID N°54)

Cassettes d'expression de l'ingénierie

Les promoteurs et les terminateurs sont identifiés sur la base des données GenBank. Les promoteurs choisis sont déterminés à partir du point +1 de transcription et remontent 1.4Kb en amont de manière à couvrir à la fois les séquences « core » (TATA box) et les séquences trans-

activatrices permettant la fonctionnalité optimale du promoteur concerné.

Pour les terminateurs la coupure est effectuée 500 bp après le codon stop du gène.

La structure de chaque bloc d'intégration de 4 cassettes d'expression est définie comme suit : le premier niveau comprend des éléments simples, à savoir des promoteurs, des séquences codantes (CDS) et des terminateurs. Les éléments promoteurs (

Tableau 30) et terminateurs (

Tableau 31), sont amplifiés et assemblés avec les CDS de l'ingénierie selon le Tableau 32. Les CDS sont amplifiés selon le protocole fournis avec le kit NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix (E2321) de manière à obtenir les cassettes d'expressions fonctionnelles compilées dans le tableau. Chaque bloc d'intégration de 4 gènes est organisé pour inclure 4 couples différents promoteur terminateur de façon à limiter les interférences trans. Chaque bloc d'intégration de 6 gènes est organisé pour inclure 6 couples différents promoteur terminateur de façon à limiter les interférences transcriptionnelles.

Fragment donneur pour insertion dans le locus cible du génome

Les différentes cassettes d'expression multiples (RbcS, RbcL et RbcX ou GroES, GroEL et PRK) sont amplifiées et assemblées autour d'une cassette de sélection antibiotiques (Tableau 38), selon le protocole du kit In-Fusion® HD Cloning Kit User Manual - Clontech, pour former les plasmides donneurs (pEQ0606 ou pEQ0607).

Tableau 38 : Assemblage des plasmides

Plasmides	Séquence genomique	Promoteur	Gene	Termineur	Séquence genomique	ori	Marqueur selection
pEQ0604	LA4				RA4	coli	Ampiciline
pEQ0605	LA3				RA3	coli	Ampiciline
pEQ0606	LA4	PmbfA _p	<i>rbcL</i>	trpct	RA4	coli	Ampiciline et Hydromycine B
		PcoxA _p	<i>rbcS</i>	TniaD		coli	
		PsrpB _p	<i>rbcX</i>	glaAt		coli	
		picdA _p	Hph	TgpdA		coli	
pEQ0607	LA3	PmbfA _p	<i>groES</i>	trpct	RA3	coli	Ampiciline et Bleomycine
		PcoxA _p	<i>groEL</i>	TniaD		coli	
		PsrpB _p	<i>prk</i>	glaAt		coli	
		picdA _p	Ble	TgpdA		coli	

c) Transformation d'*Aspergillus terreus*

La transformation de l'ADN d'*Aspergillus terreus* est réalisée conformément à la stratégie appliquée pour *Aspergillus niger* (exemple 8) en utilisant la souche *A. terreus* NIH262.

Tableau 39 : Souches utilisées pour l'étude de rendement

Souches	Genome	Modification génétique
EQ1600	<i>A. terreus</i> NIH262	
EQ1601	<i>A. terreus</i> NIH262	<i>gsdA</i> :: PmbfA _p -RbcL-trpc ; PcoxA _p -RbcS-TniaD ; picdA _p -Hph-TgpdA ; PsrpB _p -RbcX-glaAt
EQ1602	<i>A. terreus</i> NIH262	<i>gsdA</i> :: PmbfA _p -RbcL-trpc ; PcoxA _p -RbcS-TniaD ; picdA _p -Hph-TgpdA ; PsrpB _p -RbcX-glaAt
		<i>pgkA</i> :: PmbfA _p -GroES-trpc ; PcoxA _p -GroEL-TniaD ; picdA _p -Ble-TgpdA ; PsrpB _p -PRK-glaAt

Culture de souches d'*A. terreus* EQ1600 et EQ1602 sur glucose 3%.

La composition de milieu optimisée décrite par Hevekerl *et al.* (Appl Microbiol Biotechnol. 2014 ; 98 :6983-6989) est utilisée. Il contient 0,8 g de KH_2PO_4 , 3 g de NH_4NO_3 , 1 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,67 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 8 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ et 15 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ par litre. Pour imiter la concentration de sucre typique obtenue à partir d'hydrolysats de paille de blé (150 g/L) prétraité à l'acide dilué (0,75% v / v, 160°C, 10 min) et saccharifié enzymatiquement (pH 5,0, 45°C, 72 h), une quantité adéquate de glucose à hauteur de 30 g L⁻¹ est utilisée. Les sucres et tous les autres composants sont ajoutés à partir de solutions mères stériles. Le pH du milieu sans CaCl_2 est ajusté à 3,1 avec du H_2SO_4 0,5 M avant d'inoculer la préparation de spores pour les souches EQ1600 et EQ1602. La culture est réalisée sous agitation avec 25 ml de milieu dans des fioles d'Erlenmeyer de 125 ml à 33°C dans un agitateur rotatif à 200 tr / min pendant 7-10 jours dans un environnement de 10% CO_2 . Le pH n'est pas contrôlé pendant la fermentation. L'agitation des flacons est maintenue pendant l'échantillonnage pour des études de temps afin d'assurer un apport continu d'oxygène. Toutes les expériences sont réalisées en triplicat. Tous les composants de milieu sont obtenus auprès de Sigma Chemical, St. Louis, Missouri. Pour ces expériences, chaque sucre a été dissous dans de l'eau désionisée et passé à travers une colonne (440 x 45 mm) de résine échangeuse de cations Dowex 50-X8 (100/200 mesh) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) pour éliminer le manganèse, le cas échéant.

d) Procédures analytiques

La concentration de la masse cellulaire est déterminée à partir du poids sec des cellules. La masse cellulaire présente dans le bouillon de fermentation est récoltée par centrifugation à 10 000 g pendant 10 minutes et rincée soigneusement trois fois avec de l'eau désionisée. La masse cellulaire rincée a été complètement séchée à 80°C jusqu'à obtention d'un poids constant. Le bouillon de fermentation après centrifugation (10 000 g, 10 min) est conservé à -20 ° C avant analyse du glucose, de l'acide itaconique et des sous-produits (acide succinique, acide α -cétoglutarique, acide malique, acide cis-aconitique, et l'acide trans-aconitique) en utilisant une chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Un équipement HPLC Shimadzu Prominence (Shimadzu America, Inc., Columbia, MD) est utilisé. Deux colonnes (colonne Aminex HPX-87P, 300 x 7,8 mm avec cartouche de décendrage et cartouche de protection Carbo-P, et une colonne Aminex HPX 87H, 300 x 7,8 mm avec cartouche Microguard Cation H (Bio-Rad)) sont respectivement utilisées pour l'analyse des sucres et acides organiques. La colonne Aminex HPX 87P est maintenue à 85°C et le glucose est élué avec de l'eau désionisée acidifiée Milli-Q (Millipore, Bedford, MA) à un débit de 0,6 ml min⁻¹.

La colonne Aminex HPX 87H est maintenue à 65°C et les sucres et les acides organiques sont élués avec du H₂SO₄ 5 mM préparé en utilisant de l'eau filtrée désionisée Milli-Q à un débit de 0,5 ml min⁻¹. La détection est effectuée en utilisant un détecteur d'indice de réfraction pour les sucres et un détecteur UV à 210 nm pour les acides organiques. L'acide propionique (1%, poids / volume) est utilisé comme étalon interne afin d'estimer le liquide perdu pendant la fermentation aérobique de 7-10 jours à 33°C sous 10% CO₂. Tous les standards de HPLC, y compris les acides organiques, sont achetés auprès de Sigma. La concentration de manganèse (niveau de ppb) est déterminée en utilisant un spectromètre d'émission à plasma à couplage inductif (ICP-OES) Optima 7000DV de Perkin-Elmer (Waltham, MA) par la procédure décrite par Bakota *et al.* (Eur J Lipid Sci Technol. 2015 ; 117 :1452-1462).

Sur la base des résultats de la production d'acide itaconique à partir du glucose, un incrément de rendement massique, d'acide itaconique à partir de glucose, de 15% est observé pour la souche avec ingénierie EQ1602 par rapport à la souche référence EQ1600.

REVENDICATIONS

- 1- Microorganisme génétiquement modifié exprimant une enzyme RuBisCO et une phosphoribulokinase (PRK) fonctionnelles, et dans lequel la voie de la glycolyse est au moins
5 partiellement inhibée, en amont de la production de 1,3-biphospho-D-glycérate (1,3-BPG) ou en amont de la production de 3-phosphoglycérate (3PG), et en aval de la production de glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P), ledit microorganisme étant génétiquement modifié de manière à produire une molécule exogène d'intérêt et/ou à surproduire une molécule endogène d'intérêt, autre que l'enzyme RuBisCO ou phosphoribulokinase.
- 10 2- Microorganisme génétiquement modifié selon la revendication 1, dans lequel la branche oxydative de la voie des pentoses phosphates est également au moins partiellement inhibée.
- 3- Microorganisme génétiquement modifié selon la revendication 1 ou 2, ledit microorganisme étant génétiquement modifié pour exprimer une enzyme RuBisCO et/ou une PRK recombinantes.
- 15 4- Microorganisme génétiquement modifié selon l'une des revendications 2 à 3, ledit microorganisme étant génétiquement modifié de manière à inhiber la branche oxydative de la voie des pentoses phosphates en amont de la production de ribulose-5-phosphate.
- 5- Microorganisme génétiquement modifié selon la revendication 4, dans lequel la molécule exogène et/ou la molécule endogène est choisie parmi les acides aminés, les peptides, les
20 protéines, les vitamines, les stérols, les flavonoïdes, les terpènes, les terpénoïdes, les acides gras, les polyols et les acides organiques.
- 6- Microorganisme génétiquement modifié selon l'une des revendications 1 à 5, ledit microorganisme étant une cellule eucaryote, préférentiellement choisie parmi les levures, les champignons, les microalgues, ou une cellule procaryote, préférentiellement une bactérie.
- 25 7- Microorganisme génétiquement modifié selon l'une des revendications 1 à 6, dans lequel l'expression du gène codant la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase est au moins partiellement inhibée.
- 8- Microorganisme génétiquement modifié selon l'une des revendications 1 à 7, dans lequel l'expression du gène codant la phosphoglycérate kinase est au moins partiellement inhibée.

- 9- Microorganisme génétiquement modifié selon la revendication 7 ou 8, dans lequel l'expression du gène codant la glucose-6-phosphate déshydrogénase ou la 6-phosphogluconolactonase ou la 6-phosphogluconate déshydrogénase est au moins partiellement inhibée.
- 5 10- Microorganisme génétiquement modifié selon l'une des revendications 1 à 9, ledit microorganisme étant une levure du genre *Saccharomyces cerevisiae* génétiquement modifiée pour exprimer une RuBisCO de type I ou II et une phosphoribulokinase (PRK) fonctionnelles, et dans laquelle l'expression du gène TDH1, TDH2 et/ou TDH3 est au moins partiellement inhibée.
- 10 11- Microorganisme génétiquement modifié selon l'une des revendications 1 à 10, ledit microorganisme étant une levure *Saccharomyces cerevisiae* génétiquement modifiée pour exprimer une RuBisCO de type I ou II et une phosphoribulokinase (PRK) fonctionnelles, et dans laquelle l'expression du gène PGK1 est au moins partiellement inhibée.
- 15 12- Microorganisme génétiquement modifié selon la revendication 10 ou 11, dans lequel l'expression du gène ZWF1 est au moins partiellement inhibée.
- 13- Microorganisme génétiquement modifié selon l'une des revendications 1 à 9, ledit microorganisme étant un champignon filamenteux du genre *Aspergillus* génétiquement modifié pour exprimer une RuBisCO de type I ou II et une phosphoribulokinase (PRK) fonctionnelles, et dans lequel l'expression des gènes *pgk* et *gsdA* est au moins partiellement inhibée.
- 20 14- Microorganisme génétiquement modifié selon l'une des revendications 1 à 9, ledit microorganisme étant une bactérie *E. coli* génétiquement modifiée pour exprimer une RuBisCO de type I ou II et une phosphoribulokinase (PRK) fonctionnelles, et dans lequel l'expression du gène *gapA* et/ou *pgk*, et éventuellement du gène *zwf*, est au moins partiellement inhibée.
- 25 15- Utilisation d'un microorganisme génétiquement modifié selon l'une des revendications 1 à 14, pour la production ou la surproduction d'une molécule d'intérêt, préférentiellement choisie parmi les acides aminés, les peptides, les protéines, les vitamines, les stérols, les flavonoïdes, les terpènes, les terpénoïdes, les acides gras, les polyols et les acides organiques.
- 16- Utilisation selon la revendication 15, pour la production ou la surproduction de glutamate, citrate, itaconate ou GABA.
- 30 17- Procédé biotechnologique pour produire au moins une molécule d'intérêt, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de mise en culture d'un microorganisme génétiquement modifié selon

l'une des revendications 1 à 14, dans des conditions permettant la synthèse ou la bioconversion, par ledit microorganisme, de ladite molécule d'intérêt, et de manière optionnelle une étape de récupération et/ou purification de ladite molécule d'intérêt.

5 18- Procédé biotechnologique selon la revendication 17, selon lequel la molécule d'intérêt est choisie parmi les acides aminés, les peptides, les protéines, les vitamines, les stérols, les flavonoïdes, les terpènes, les terpénoïdes, les acides gras, les polyols et les acides organiques.

19- Procédé biotechnologique selon la revendication 17 ou 18, selon lequel la molécule d'intérêt est choisie le glutamate, citrate, itaconate ou GABA.

10 20- Procédé biotechnologique selon l'une des revendications 17 à 19, selon lequel le microorganisme est génétiquement modifié pour exprimer au moins une enzyme impliquée dans la bioconversion ou la synthèse de ladite molécule d'intérêt.

21- Procédé biotechnologique selon l'une des revendications 17 à 19, selon lequel le microorganisme est génétiquement modifié pour inhiber au moins partiellement une enzyme impliquée dans la dégradation de ladite molécule d'intérêt.

15 22- Procédé de production d'une molécule d'intérêt comprenant (i) l'insertion d'au moins une séquence codant une enzyme impliquée dans la synthèse ou la bioconversion de ladite molécule d'intérêt dans un microorganisme recombinant selon l'une des revendications 1 à 14, (ii) la culture dudit microorganisme dans des conditions permettant l'expression de ladite enzyme et de manière optionnelle (iii) la récupération et/ou purification de ladite molécule d'intérêt.

20 23- Procédé de production d'une molécule d'intérêt comprenant (i) l'inhibition de l'expression d'au moins un gène codant une enzyme impliquée dans la dégradation de ladite molécule d'intérêt dans un microorganisme recombinant selon l'une des revendications 1 à 14, (ii) la culture dudit microorganisme dans des conditions permettant l'expression de ladite enzyme et de manière optionnelle (iii) la récupération et/ou purification de ladite molécule d'intérêt.

1/3

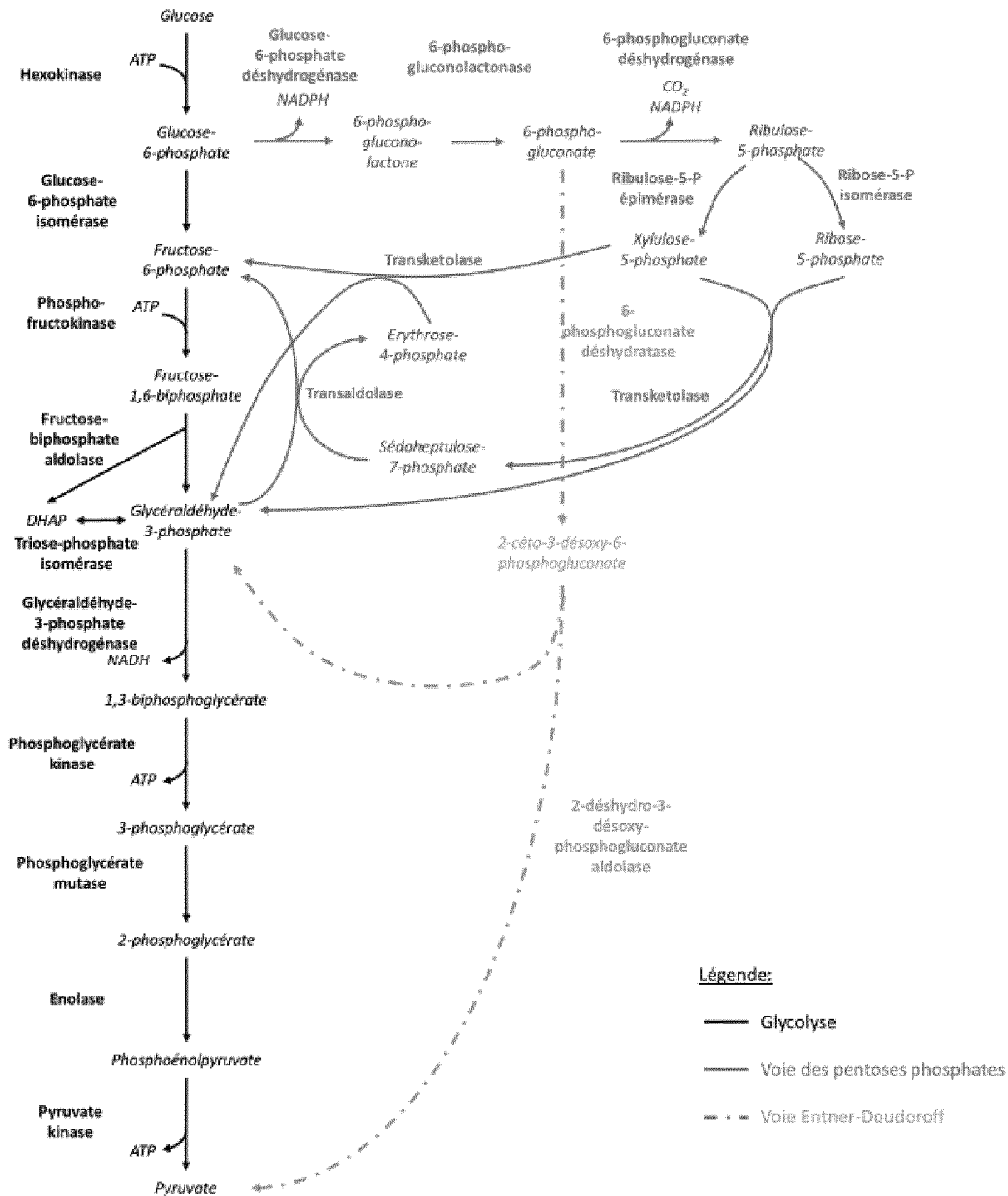


FIGURE 1

2/3

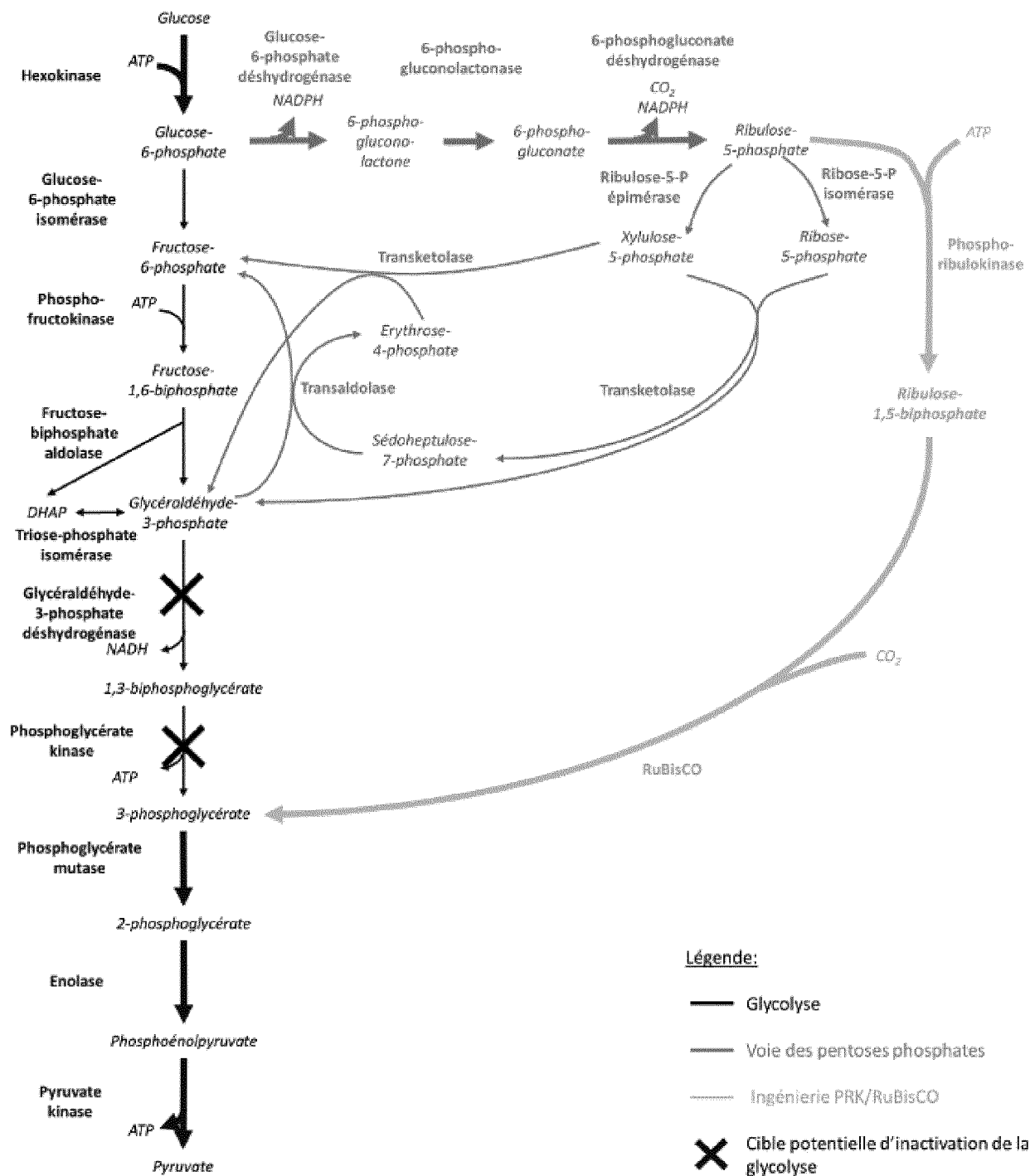


FIGURE 2

3/3

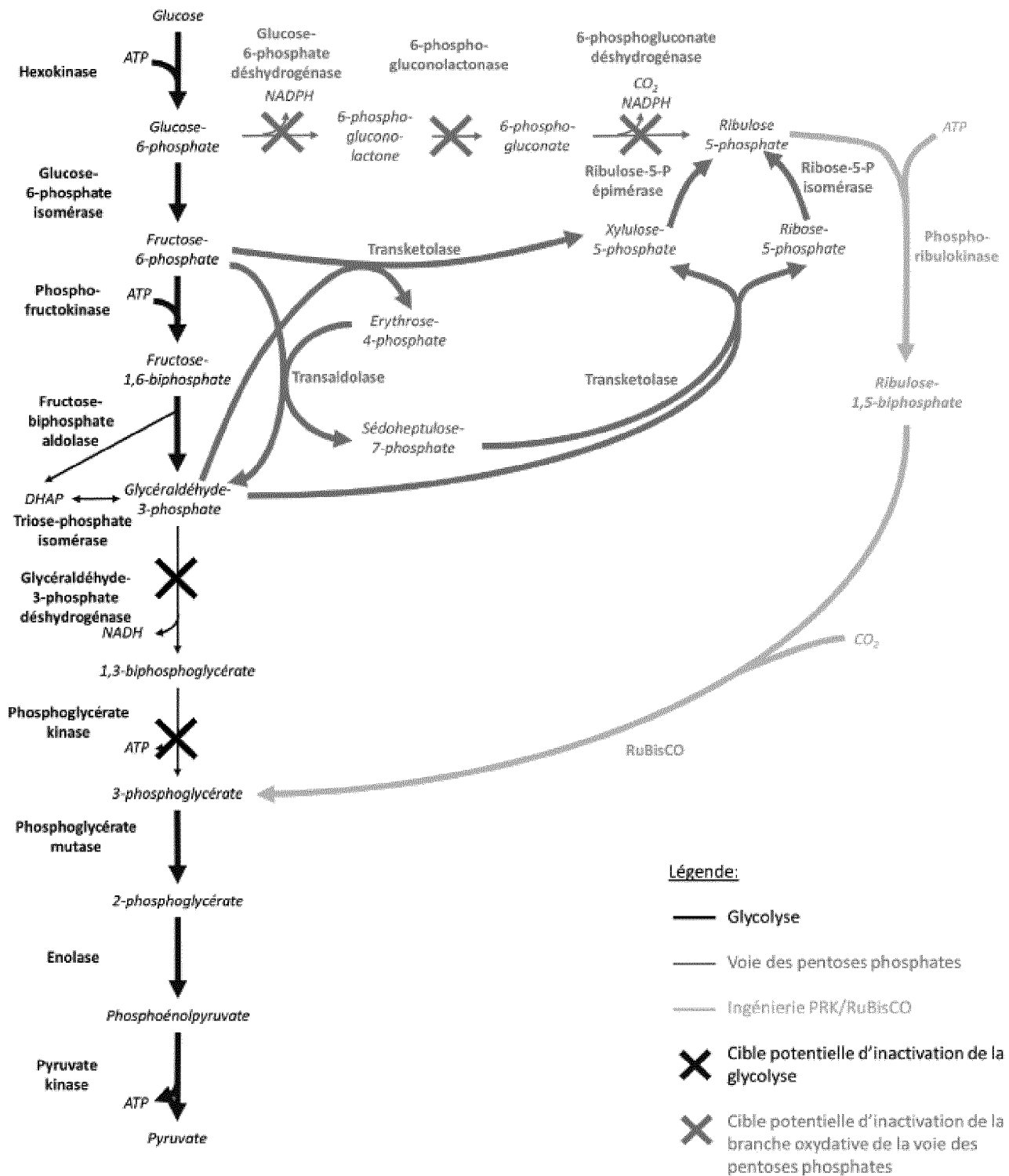


FIGURE 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2018/052005

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER					
INV.	C12N1/13	C12N1/15	C12N1/19	C12N1/21	C12N15/52
	C12N9/88	C12N9/12	C12N9/04	C12N9/02	C12N9/18
ADD.					
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC					
B. FIELDS SEARCHED					
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N					
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched					
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, COMPENDEX, EMBASE, FSTA, WPI Data					
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT					
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages				Relevant to claim No.
X	PENG-FEI XIA ET AL: "Recycling Carbon Dioxide during Xylose Fermentation by Engineered <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ", ACS SYNTHETIC BIOLOGY, vol. 6, no. 2, 31 October 2016 (2016-10-31), pages 276-283, XP055405751, Washington, DC, USA ISSN: 2161-5063, DOI: 10.1021/acssynbio.6b00167 the whole document				1-23
X	WO 2015/177800 A2 (YEDA RES & DEV [IL]) 26 November 2015 (2015-11-26) claims 15-21, 42 ----- -/-				1-23
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.					
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family					
Date of the actual completion of the international search 21 March 2018			Date of mailing of the international search report 28/03/2018		
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016			Authorized officer Lejeune, Robert		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2018/052005

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	XI CHEN ET AL: "The Entner-Doudoroff pathway is an overlooked glycolytic route in cyanobacteria and plants", PROCEEDINGS NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES PNAS, vol. 113, no. 19, 25 April 2016 (2016-04-25), pages 5441-5446, XP055407296, US ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1521916113 figure 2	1,2,5,6
A	----- VÍCTOR GUADALUPE-MEDINA ET AL: "Carbon dioxide fixation by Calvin-Cycle enzymes improves ethanol yield in yeast", BIOTECHNOLOGY FOR BIOFUELS, vol. 6, no. 1, 1 January 2013 (2013-01-01), page 125, XP055405759, GB ISSN: 1754-6834, DOI: 10.1186/1754-6834-6-125 the whole document	1-23
A	----- WO 2015/107496 A1 (AGRONOMIQUE INST NAT RECH [FR]; INST NAT SCIENCES APPLIQ [FR]; CENTRE) 23 July 2015 (2015-07-23) the whole document	1-23
T	----- YUN-JIE LI ET AL: "Engineered yeast with a CO ₂ -fixation pathway to improve the bio-ethanol production from xylose-mixed sugars", SCIENTIFIC REPORTS, vol. 7, 6 March 2017 (2017-03-06), page 43875, XP055406879, DOI: 10.1038/srep43875 the whole document -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2018/052005

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2015177800 A2	26-11-2015	EP 3145947 A2	29-03-2017
		US 2017183665 A1	29-06-2017
		WO 2015177800 A2	26-11-2015

WO 2015107496 A1	23-07-2015	AU 2015207758 A1	11-08-2016
		CA 2937079 A1	23-07-2015
		CN 106103694 A	09-11-2016
		EP 3094717 A1	23-11-2016
		FR 3016371 A1	17-07-2015
		JP 2017502682 A	26-01-2017
		KR 20160122735 A	24-10-2016
		US 2017002368 A1	05-01-2017
		WO 2015107496 A1	23-07-2015

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2018/052005

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. C12N1/13 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N15/52 C12N9/88 C12N9/12 C12N9/04 C12N9/02 C12N9/18 ADD.					
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB					
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) C12N					
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche					
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, BIOSIS, COMPENDEX, EMBASE, FSTA, WPI Data					
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS					
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents				no. des revendications visées
X	PENG-FEI XIA ET AL: "Recycling Carbon Dioxide during Xylose Fermentation by Engineered Saccharomyces cerevisiae", ACS SYNTHETIC BIOLOGY, vol. 6, no. 2, 31 octobre 2016 (2016-10-31), pages 276-283, XP055405751, Washington, DC, USA ISSN: 2161-5063, DOI: 10.1021/acssynbio.6b00167 le document en entier				1-23
X	WO 2015/177800 A2 (YEDA RES & DEV [IL]) 26 novembre 2015 (2015-11-26) revendications 15-21, 42 ----- -/-				1-23
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe					
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets					
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée			Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale		
21 mars 2018			28/03/2018		
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016			Fonctionnaire autorisé Lejeune, Robert		

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>XI CHEN ET AL: "The Entner-Doudoroff pathway is an overlooked glycolytic route in cyanobacteria and plants", PROCEEDINGS NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES PNAS, vol. 113, no. 19, 25 avril 2016 (2016-04-25), pages 5441-5446, XP055407296, US ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1521916113 figure 2</p> <p>-----</p>	1,2,5,6
A	<p>VÍCTOR GUADALUPE-MEDINA ET AL: "Carbon dioxide fixation by Calvin-Cycle enzymes improves ethanol yield in yeast", BIOTECHNOLOGY FOR BIOFUELS, vol. 6, no. 1, 1 janvier 2013 (2013-01-01), page 125, XP055405759, GB ISSN: 1754-6834, DOI: 10.1186/1754-6834-6-125 le document en entier</p> <p>-----</p>	1-23
A	<p>WO 2015/107496 A1 (AGRONOMIQUE INST NAT RECH [FR]; INST NAT SCIENCES APPLIQ [FR]; CENTRE) 23 juillet 2015 (2015-07-23) le document en entier</p> <p>-----</p>	1-23
T	<p>YUN-JIE LI ET AL: "Engineered yeast with a CO₂-fixation pathway to improve the bio-ethanol production from xylose-mixed sugars", SCIENTIFIC REPORTS, vol. 7, 6 mars 2017 (2017-03-06), page 43875, XP055406879, DOI: 10.1038/srep43875 le document en entier</p> <p>-----</p>	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2018/052005

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2015177800 A2	26-11-2015	EP 3145947 A2	29-03-2017
		US 2017183665 A1	29-06-2017
		WO 2015177800 A2	26-11-2015

WO 2015107496 A1	23-07-2015	AU 2015207758 A1	11-08-2016
		CA 2937079 A1	23-07-2015
		CN 106103694 A	09-11-2016
		EP 3094717 A1	23-11-2016
		FR 3016371 A1	17-07-2015
		JP 2017502682 A	26-01-2017
		KR 20160122735 A	24-10-2016
		US 2017002368 A1	05-01-2017
		WO 2015107496 A1	23-07-2015
