UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

INRS – INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

OPTIMISATION DE LA PRODUCTION D'ACIDE SUCCINIQUE CHEZ *METHYLOBACTERIUM EXTORQUENS* PAR LE BIAIS DE PETITS ARN REGULATEURS

Par

Roqaya IMANE

Mémoire présenté pour obtenir le grade de

Maître ès sciences, M.Sc.

Maîtrise en microbiologie appliquée

Avril, 2016

© Roqaya IMANE, 2016

Ce mémoire intitulé

OPTIMISATION DE LA PRODUCTION D'ACIDE SUCCINIQUE CHEZ *METHYLOBACTERIUM EXTORQUENS* PAR LE BIAIS DE PETITS ARN REGULATEURS.

et présentée par

Roqaya IMANE

a été évaluée par un jury composé de

M. Eric DÉZIEL, président du jury et examinateur interne, INRS – Institut Armand Frappier

M. Jonathan PERREAULT, directeur de recherche, INRS – Institut Armand Frappier

M. Eric MASSÉ, examinateur externe, Université de Sherbrooke

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le professeur Jonathan Perreault pour m'avoir épaulée et d'avoir été présent tout au long de mon parcours de maîtrise. Je tiens également à remercier Carlos Miguez, Martin Lamarche et Marie-Anne Gauriat pour toutes les techniques que j'ai pu apprendre grâce à eux.

Je remercie la compagnie BioAmber ainsi que Mitacs pour le financement.

Je désire aussi remercier mes examinateurs, Eric Déziel et Eric Massé pour le temps qu'ils ont consacré à la correction de ce mémoire.

Je voudrais aussi exprimer ma reconnaissance envers tous les membres de mon laboratoire avec qui j'ai passé deux années extraordinaires riches en découvertes.

Finalement, je tiens aussi à remercier mes amis, ma famille et surtout mes parents qui m'ont permis et aidé à aller aussi loin dans mes études. Merci d'être là et pour votre support.

RÉSUMÉ

Les ARN régulateurs (sARN) sont des petits ARN qui ont la capacité de réguler l'expression de gènes chez les bactéries. Du fait de leur grande capacité de régulation, ils pourraient être utilisés comme outil en ingénierie métabolique dans la production de certains métabolites, tel que l'acide succinique. Ce dernier est un diacide carboxylique présent dans tous les êtres vivants. Il est aussi utilisé dans de nombreux domaines tels que l'agro-alimentaire, le textile, la pharmaceutique, les cosmétiques ou encore la production de plastiques. La synthèse de l'acide succinique peut se faire de façon chimique à partir de matières premières fossiles tels que le pétrole et le gaz naturel. Toutefois, ces matières deviennent de plus en plus rares et chères, et elles sont polluantes. Il est donc préférable d'avoir recours à la biotechnologie, si possible en évitant l'utilisation de produits provenant de l'agriculture comme source de carbone pour les microorganismes. *Methylobacterium extorquens* est une bactérie à Gram négatif et méthylotrophe, donc capable de croître sur le méthanol. L'hypothèse de ce projet est qu'il est possible d'avoir recours aux sARN pour favoriser la production d'acide succinique par cette bactérie. Cependant, la taille du sARN à synthétiser est importante dans la mesure où plus sa séquence est longue, plus il peut avoir des interactions non spécifiques ou une efficacité réduite de liaison de la séquence désirée avec la cible choisie. Il est donc nécessaire de minimiser les séquences inutiles qui peuvent se trouver sur le promoteur. Étant donné que ce système a été testé avec succès chez *Escherichia coli*, il faut aussi tester la preuve de concept d'inhibition des gènes chez *M. extorquens* avec des petits ARNs contre le gène gfp aussi, et finalement cibler les gènes dont l'inhibition a le potentiel de permettre une augmentation de la production d'acide succinique. Une version tronquée du promoteur P_{mxaF} a pu induire l'expression des sARN. Il a toutefois été difficile de prouver l'effet sur sARN sur le gène gfp dû à la non concordance des contrôles.

ABSTRACT

Small regulatory RNAs (sRNAs) are short, noncoding RNAs that control gene expression in bacteria and have the ability to bind the messenger RNA and inhibit translation. They can be used in any application that requires the modification of gene expression, such as metabolic engineering: an approach that aims to produce high yields of chosen metabolites like succinic acid. This consists in identifying potential genetic targets whose inhibition would allow increased production of succinic acid. It is a diacarboxylic acid found in all living organisms and used in several industries such as food, pharmaceutical, cosmetic, textile and plastic production. Succinic acid can be synthesised chemically from fossil fuels such as oil and natural gas. However, these materials are becoming increasingly scarce, expensive, and polluting. It is therefore preferable to use biotechnology, thanks to which it is possible to avoid the use of products from agriculture as a carbon source for microorganism. *Methylobacterium extorquens* is a methylotrophic Gram-negative bacterium, able to grow on methanol. It is thus a good candidate to avoid using agricultural products as a carbon source for microorganisms used in large-scale biotechnology production. The hypothesis of the project is that it is possible to use small RNA to enhance succinic acid production via this bacterium. Several different types of sRNA(s) can be synthesized to target distinct genes within the metabolic pathways necessary for the production of the succinic acid. The key element of the synthesized sRNA is a sequence complementary to the target. sRNA transcription also requires a promoter which will needs to be carefully cloned to avoid unnecessary sequences in the sRNA. The longer the sRNA sequence, the higher the possibility for non-specific interactions or a reduced binding efficiency with the desired target sequence can occur. While the engineered sRNA-system has been proven useful in *E. coli*, it has not been used in other bacteria yet. We have built such a system in *Methylobacterium extorquens*. A shortened-promoter was cloned and shown to function to express the Green Fluorescent Protein (GFP) reporter gene. The next

step was to target a gfp reporter with appropriate sRNAs in order to prove the feasibility of targeting any genes but it was difficult to prove the effect of sARN on the *gfp* gene due to the mismatch controls.

TABLE DES MATIÈRES

1. Introduction 1

1.1 Contexte 1

1.2. L'acide succinique 2

1.2.1 Applications alimentaires 3

1.2.2 Applications pharmaceutiques 3

1.2.3 Applications industrielles 4

1.3 Production de l'acide succinique 5

1.3.1 Procédé pétrochimique 5

1.3.2 Procédé utilisant la biomasse 7

1.3.3 Microorganismes producteurs d'acide succinique 8

1.4 La fermentation 13

1.5 Méthode d'extraction de l'acide succinique 15

1.6 La méthylotrophie 16

1.6.1 Les méthanotrophes 17

1.6.2 Les méthylotrophes 17

1.6.3 *Methylobacterium extorquens* 18

1.6.4 Provenance du méthanol 21

1.7 Les acides ribonucléiques 22

1.7.1 Les ARN codants 23

1.7.2 Les ARN non codants 23

1.7.3 Les sARN : outil pour l'ingénierie métabolique 26

2. Objectifs et hypothèses 29

3. Matériels et méthodes 29

3.1 Premier objectif : Tester un bon promoteur pour induire l'expression du sARN. 31

3.1.1 Souche bactérienne, plasmide et conditions de croissance 32

3.1.2 Extraction de plasmide pCM110-GFP 33

3.1.3 Tronquage du promoteur p*mxaF* 33

3.1.4 Clonage de la version tronquée du promoteur P*mxaF* 34

3.1.5 Transformation de *Escherichia coli* DH5α 35

3.1.6 Préparation de cellules compétentes de *M. extorquens* et transformation par électroporation 36

3.1.7 Tester l'expression de GFP 36

3.2 Deuxième objectif : Tester le sARN sur le gène rapporteur GFP 37

3.2.2 Assemblage des sARN par PCR d'assemblage 38

3.2.3 Précipitation des inserts 42

3.2.4 Insertion chromosomique du vecteur d'expression des sARN dans le chromosome. . 42

3.2.4 Digestion des sARN et du plasmide 43

3.2.5 Tester l'inhibition de la fluorescence 45

3.3 Troisième objectif : Inhiber les gènes cibles dans les voies métaboliques par les sARN pour optimiser la production d'acide succinique 45

3.3.1 Construction des sARN spécifiques aux gènes cibles 45

3.3.2 Mesure de la concentration d'acide succinique par HPLC 46

3.3.3 Buvardage Northern 46

4. Résultats 47

4.1 Premier objectif : Tester un bon promoteur pour induire l'expression du sARN 47

4.2 Deuxième objectif : Vérifier l'effet inhibiteur de sARN synthétiques sur l'expression du gène rapporteur GFP 49

4.3 Troisième objectif : Inhiber les gènes cibles dans les voies métaboliques par les sARN pour optimiser la production d'acide succinique 54

5. Discussion 56

6. Conclusion 59

7. Références 60

8. Annexe 65

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques de l'acide succinique 2
Tableau 2 : Exemple d'utilisation de sARN synthétiques dans la littérature 27
Tableau 3 : Souches et plasmides 29

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Polyvalence des applications de l'acide succinique..... 5
Figure 2: Production de l'acide succinique à partir de l'anhydride maléique..... 6
Figure 3: Voie métabolique de la production d'acide succinique chez *A. succinogenes*..... 9
Figure 4: Voies d'assimilation du méthanol chez *M. extorquens*..... 20
Figure 5 : Régulation en cis versus régulation en trans des sRNA..... 24
Figure 6: Structure de la conception d'un petit ARN..... 28
Figure 7 : Plasmide pCM110-GFP avec le promoteur P_{mxaF} qui exprime le gène GFP..... 32
Figure 8 : Partie de la séquence du plasmide pCM110-GFP avec le promoteur P_{mxaF} qui exprime le gène GFP..... 34
Figure 9 : Plasmide pCM110-GFP avec le promoteur P_{mxaF} qui exprime le gène GFP..... 35
Figure 10 : Construction du sARN..... 38
Figure 11 : Exemple d'une séquence complète du sARN ainsi que le promoteur..... 38
Figure 12 : Représentation des séquences..... 39
Figure 13 : PCR d'assemblage pour la constrution du sARN..... 40
Figure 14 : Tronquage du promoteur P_{mxaF}..... 47
Figure 15 : Digestion du plasmide pCM110-GFP..... 48
Figure 16 : Efficacité du promoteur tronqué..... 49
Figure 17 : Séquence finale de la construction sARN GFP1..... 50
Figure 18 : Électrophorèse de l'amplicon *micC* avec le terminateur..... 50
Figure 19 : Électrophorèse de l'amplicon GFP+*micC.*..... 51
Figure 20 : Électrophorèse du sARN-GFP1, sARN-GF2, sARN-GFP3..... 52
Figure 21 : Électrophorèse de l'insert du sARN chez les clones *E. coli*..... 53
Figure 22 : Fluorescence en fonction de la D.O chez *M. extorquens*..... 53
Figure 23 : Fluorescence en fonction de la D.O chez *M. extorquens* :..... 54
Figure 24 : Northern Blot de l'expression des sARN dans les souches des sARN *sdhA* et *sdhB*..... 55

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

ARNr : ARN ribosomal

ARNt : ARN de transfert

ARNm : ARN messager

A. succinogenes : Actinobacillus succinogenes

cm : centimètre

CNRC : Conseil national de recherches Canada

DAP: Acide diaminopimelic

DO : densité optique

E. coli : Escherichia coli

GFP : protéine fluorescente verte

IUPAC : Union internationale de chimie pure et appliquée

Km : Kanamycine

M. extorquens : Methylobacterium extorquens

mA : milliampérage

mM: millimolaire

ml : millilitre

nm : nanomolaire

Numéro CAS : Chemical Abstracts Service

pKa : constante d'acidité

RBS : site de liaison avec le ribosome

Rpm : rotation par minute

sARN : petit ARN régulateur

scRNA : ARNs cytoplasmiques

SD : Shine Dalgarno

siARN : ARN interférents

Sm : Streptomycine

snoARN: ARNs nucléolaires

µl : microlitre

µM : micromolaire

UTR : régions non traduites

V : volt

v/v : volume sur volume

1. INTRODUCTION

1.1 Contexte

De nos jours, la pétrochimie est la base de presque toute l'industrie chimique. En effet, l'utilisation des matières fossiles tels que le gaz naturel et le pétrole représentent plus de 90% du marché (Mecking, 2004) et permettent de fournir des intermédiaires clés dans la fabrication de plusieurs produits indispensables à la vie quotidienne comme le plastique, les médicaments, les fibres, le textile, les détergents, les produits cosmétiques, etc.(http://www.planete-energies.com/fr/medias/decryptages/la-petrochimie-une-industrie-incontournable).

La dépendance des pays industriels à ces ressources naturelles ne fait qu'augmenter. Ceci devient problématique car selon l'estimation actuelle, le ratio des réserves de pétrole et du niveau de consommation conduira à l'épuisement des ressources de pétrole d'ici 2055 (Conti JJ, 2010). De plus, l'utilisation de ces matières à des fins industrielles est extrêmement polluante (http://www.planete-energies.com/fr/medias/decryptages/la-petrochimie-une-industrie-incontournable).

Une alternative peut donc être l'utilisation de combustibles utilisant des sources renouvelables qui remplaceraient l'utilisation du pétrole. Parmi ces ressources, on retrouve la biomasse qui est l'énergie contenue dans du matériel biologique tels que les plantes, le bois, les matières organiques ou les déchets. La combustion de cette biomasse devient source d'énergie (Klass, 1998). Le bois, peut par exemple être utilisé directement pour le chauffage ou pour produire de l'électricité par combustion. Les déchets municipaux que l'être humain produit peuvent aussi être utilisés pour produire du gaz synthétique (Klass, 1998).

Toutefois, l'utilisation de sources d'énergies renouvelables ne reste pas sans inconvénients. En effet, l'utilisation excessive du bois conduit à des déforestations massives et à une surexploitation des forêts ce qui a donc un impact direct sur

l'environnement (Klass, 1998). La combustion directe de la biomasse engendre des problèmes d'émissions de particules. Il est possible de remplacer ceci par la méthanisation ce qui conduit à la production de gaz de synthèse (Mecking, 2004).

Pendant les dernières décennies, la biotechnologie est devenue un bon moyen de remplacer les procédés pétrochimiques jusque-là utilisés. Ceci est le fait d'avoir recours aux microorganismes pour la production du métabolite désiré. L'une des molécules les plus importantes dans l'industrie est l'acide succinique qui peut être produite pétrochimiquement et biotechnologiquement (Zeikus *et al.*, 1999).

1.2. L'acide succinique

L'acide succinique est un acide dicarboxylique de formule $C_4H_6O_4$ retrouvé chez tous les êtres vivants (plantes, animaux et microorganismes) (Zeikus *et al.*, 1999). Biochimiquement, cette molécule est retrouvée dans le métabolisme cellulaire comme intermédiaire dans le cycle de Krebs et intervient donc dans la production de l'énergie ainsi que dans le cycle respiratoire (Rastogi, 1997). Toutefois, cette molécule est aussi intéressante car elle est très utilisée dans l'industrie. En effet, l'acide succinique sert d'intermédiaire dans de nombreuses applications du fait de ses propriétés physico-chimiques.

Tableau : Propriétés physico-chimiques de l'acide succinique

Nom UICPA	Acide butanedioïque
Numéro CAS (Chemical Abstracts Service)	110-15-6
Numéro E (Additif alimentaire)	E363
Aspect	blanc inodore sous sa forme cristalline
Masse molaire	118,09 g/mol
pKa	pKa1= 4.21, pKa2=5,6
Température de fusion	185 °C

Solubilité	100g/100ml à 100°C 7.69g/100 ml à 25°C
Masse volumique	1.56
Température d'ébullition	235 °C

L'utilisation de l'acide succinique est très variée et son marché mondial est segmenté selon les applications. Parmi celles-ci, on retrouve les applications industrielles (57%), les produits pharmaceutiques (16%), les aliments et les boissons (13%) et autres (14%). Toutefois, le marché le plus important de l'acide succinique est son application comme détergent, surfactant et agent moussant (Zeikus *et al.*, 1999). Selon un récent rapport de *Markets Research store,* le marché global de l'acide succinique a été évalué à 400 millions $ en 2014 et pourra atteindre les 1000 millions $ en 2020 (https://www.alliedmarketresearch.com/bio-succinic-acid-market, Novembre 2015).

1.2.1 Applications alimentaires

L'acide succinique (E363) a son importance dans l'industrie alimentaire où il peut notamment jouer un rôle de stabilisateur et servir de régulateur d'acidité dans les boissons et les aliments (A. Tana, 2012). Il est aussi utilisé pour améliorer la saveur des aliments. On le retrouve dans les jus de fruits, les soupes ainsi que dans les confiseries (Ministers, 2002). L'acide succinique est aussi un agent de conservation du fait de ses activités antimicrobiennes, d'où son importance dans les applications pharmaceutiques.

Le sel de l'acide succinique est également ajouté à l'alimentation des ruminants et des animaux monogastriques. Ceci permet d'un côté la synthèse de protéine et d'un autre, l'augmentation de la production du propionate dans le rumen. Ceci accorde l'avantage d'éviter l'utilisation d'antibiotiques dans des aliments pour animaux (Ministers, 2002).

1.2.2 Applications pharmaceutiques

L’activité antimicrobienne de l’acide succinique a été testée sur la croissance de certains microorganismes tels que *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* et *Clostridium perfringens* (E. Skrivanova, 2006). Le pouvoir antimicrobien de l’acide succinique a aussi été testé contre *E. coli* O157:H7 en associant différentes concentrations d’ions d’argent. Toutefois cette activité était davantage due à la présence des ions d’argents (Jo *et al.*, 2007). Certains dérivés de l’acide succinique peuvent avoir un rôle anti-inflammatoire (Jih-Jung Chen *et al.*, 2007) (Kabachnyi *et al.*, 1987) ou être utilisé dans la fabrication de médicaments pour les sédatifs, les contraceptifs (Zeikus *et al.*, 1999).

1.2.3 Applications industrielles

Le marché principal des dérivés de l’acide succinique réside dans son utilisation comme agent tensio-actif dans les détergents et les agents moussants. En dehors de l'alimentation transformée, on le trouve aussi dans les cosmétiques, notamment comme agent inhibiteur d'odeur ou de goût. D’un autre côté, les sels d’acide succinique tels que le calcium ou l’ammonium permettent de favoriser la croissance des plantes. Ces sels sont aussi utilisés lors de températures extrêmement froides pour le dégivrage des routes et des pistes d’avions (sapienza, 1999). Cette molécule est aussi utilisée comme plate-forme pour la production à grande échelle de produis chimiques tels que le 1,4-butanediol, le tétrahydrofurane ou l’acide adipique (Zeikus *et al.*, 1999).

Récemment, son emploi pour la production de plastique biodégradable a fait accroître son importance (A. Tana, 2012). Le but est d’utiliser l’acide succinique comme une plateforme pour la production de plastique durable dit « vert » par fermentation bactérienne et par le 1,4-butanediol (Bechthold *et al.*, 2008). Des exemples de produits chimiques ainsi que des applications de l’acide succinique sont présentées dans la figure 1.

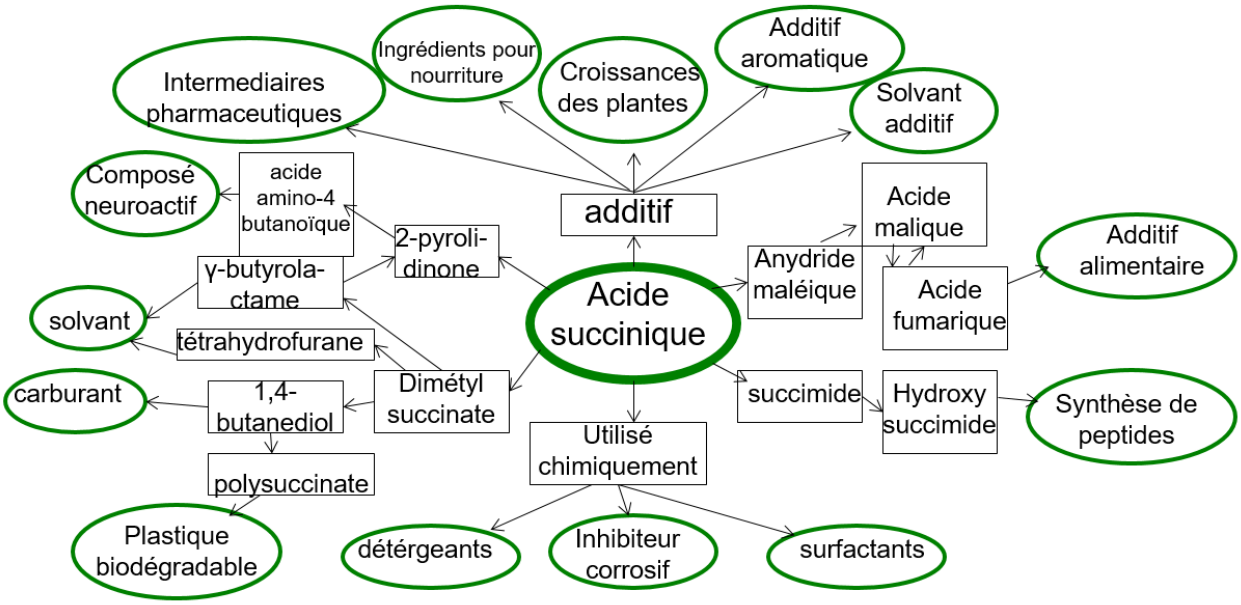


Figure : Polyvalence des applications de l'acide succinique.

Adaptée de la référence (Song *et al.*, 2006).

1.3 Production de l'acide succinique

La première purification de l'acide succinique a été faite à partir de l'ambre jaune, une oléorésine fossile sécrétée par des conifères, par Georgius Agricola en 1546 (Song *et al.*, 2006). De nos jours, il est obtenu par fermentation microbienne en utilisant comme substrat différentes sources de carbone ou par des procédés chimiques à partir de matières premières fossiles tels que le pétrole ou le gaz naturel. L'une comme l'autre, ces deux méthodes ont leurs avantages mais aussi leurs désavantages.

1.3.1 Procédé pétrochimique

Le principal processus de fabrication de l'acide succinique en utilisant des ressources fossiles est dérivé de l'hydrogénation catalytique des acides 1,4-dicarboxylique insaturés C4 ou de l'anhydride maléique (Pinazo *et al.*, 2015). Ce dernier

est lui-même issu de l'oxydation catalytique des hydrocarbures. L'acide succinique peut également être extrait via l'oxydation des 1,4-butanediol (Pinazo *et al.*, 2015). D'un autre côté, mais en plus petite quantité, le procédé de carbonylation (introduction de monoxyde de carbone CO) de l'éthylène glycol, l'éthylène, le dioxane, l'acétylène ou les acides carboxylique C3 insaturés conduisent aussi à la production de l'acide succinique (Pinazo *et al.*, 2015). Toutefois, la méthode la plus rentable et la plus utilisée dans l'industrie pétrochimique reste l'hydrogénation de l'anhydride maléique (obtenu par déshydratation de l'acide maléique) suivi d'une hydratation. Ce processus se fait en phase liquide à des températures entre 120 et 180 °C avec une pression entre 0,5 et 4,0 MPa, ce qui conduit à la production de l'anhydride succinique qui lui-même sera hydraté dans de l'eau chaude. Cette dernière étape conduira à l'obtention de la première forme de l'acide succinique qui doit être séparée des impuretés par cristallisation, filtration et finalement séchage (Pinazo *et al.*, 2015).

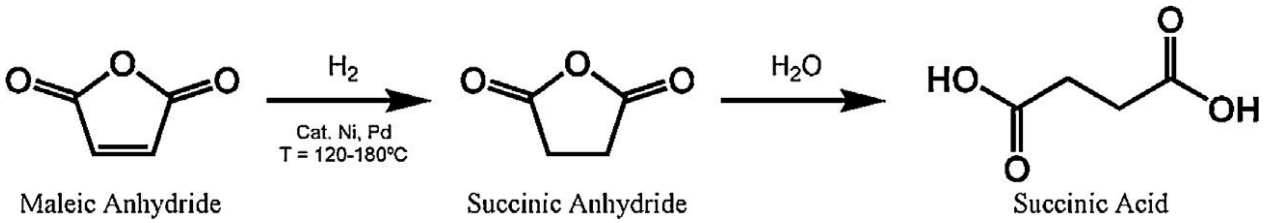


Figure : Production de l'acide succinique à partir de l'anhydride maléique.

Figure tirée de la référence (Pinazo *et al.*, 2015).

Néanmoins, ce procédé reste polluant pour l'environnement dû aux émissions dans l'atmosphère des gaz à effet de serre comme le dioxyde de carbone lors de la production et du raffinage des matières fossiles utilisées, ainsi que lors de la production de l'acide succinique lui-même (Vaidya *et al.*, 2003). D'un autre côté, la demande en acide succinique ne cesse d'augmenter tandis que l'utilisation du pétrole et du gaz à partir de gisements, leurs transports et leurs traitements, nécessitent beaucoup d'énergie et génèrent une grande quantité d'émissions. Il est donc souhaitable d'avoir

recours à une alternative qui soit plus viable à long terme afin de répondre à l'augmentation de la demande en acide succinique sans avoir à polluer davantage l'environnement.

1.3.2 Procédé utilisant la biomasse

L'acide succinique peut également être produit à partir de la biomasse. C'est ce qu'on appelle du bio-succinate. Ce dernier est de plus en plus vu comme le futur remplaçant de l'acide succinique provenant de la pétrochimie. En effet, ceci permet d'éviter l'utilisation de ressources fossiles non renouvelables et de favoriser des matières premières renouvelables. Les avantages économiques et environnementaux que représentent cette bio-industrie ont suscité un vif intérêt pour les projets de recherche et développement du bio-succinate (McKinlay *et al.*, 2007). Toutefois, les prix sont plus élevés et les procédés d'extraction plus longs, ce qui limite la croissance du bio-succinate. Une récente étude a prévu que ce marché peut atteindre 710,0 kilotonnes par an en 2020 (https://www.alliedmarketresearch.com/bio-succinic-acid-market, Novembre 2015).

La biomasse peut être obtenue à partir de secteurs forestiers, agricoles ou alimentaires. Il est plus avantageux et moins problématique d'avoir recours aux deux premières étant donné que les ressources d'ordre alimentaire peuvent présenter des problèmes d'ordre éthique. L'acide succinique est aussi produit en partant de sources de sucres abondantes telles que le glucose, le fructose, l'arabinose et le xylose (McKinlay *et al.*, 2007).

Les microorganismes jouent bien sûr un rôle important. Une grande variété de bactéries, de champignons et de levures est productrice d'acide succinique. Cependant, ces microorganismes sont soit producteurs naturels d'acide succinique, soit des microorganismes modifiés génétiquement de façon à ce qu'ils répondent aux critères de l'industrie (McKinlay *et al.*, 2007). Parmi les compagnies les plus connues qui ont optées pour la biotechnologie pour produire du bio-succinate, on retrouve BioAmber, une compagnie de produits chimiques durables dont le siège sociale se trouve à Montréal,

Québec, Canada. Toutefois la fermentation industrielle présente certaines limitations dont il faut tenir compte.

1.3.3 Microorganismes producteurs d'acide succinique

La production microbienne de l'acide succinique est basée sur l'utilisation de champignons tels que *Byssochlamys nivea, Lentinus degener, Paecilomyces variotii, Aspergillus fumigatus, Aspergillus niger, Penicillium viniferum*, des levures tels que *Saccaromyces cerevisiae* et *Yarrowia lipolytica* (Song *et al.*, 2006). Ces microorganismes ont démontré leur efficacité à produire de l'acide succinique en grande quantité. Cependant, les chercheurs ont pu augmenter leurs rendements en mutant ou en inactivant des gènes indésirables dans le contexte d'une production industrielle (Song *et al.*, 2006).

D'un autre côté, plusieurs bactéries sont capables de produire de l'acide succinique de façon naturelle à partir de différentes sources de carbones, tels que *Anaerobiospirillum succiniciproducens, Actinobacillus succinogenes, Mannheimia succiniproducens*. Cependant, l'utilisation de souches recombinantes telle que *Escherichia coli* n'est pas exclue (Song *et al.*, 2006).

Étant donné la multitude de microorganismes pouvant produire de l'acide succinique, les voies métaboliques sont diverses et différentes selon les conditions aérobie et anaérobie. Dans les deux conditions, le glucose est converti en glucose-6-phosphate par une enzyme appelée hexokinase qui rajoute un groupement phosphate. Une multitude de réaction conduisent à la production du phosphate-énol-pyruvate (PEP). Ce précurseur divergera par la suite en deux directions opposées et finalement en pyruvate par la glycolyse. En condition anaérobie, la réaction de carboxylation du PEP conduit à la formation de l'oxaloacétate par la PEP carboxylase Ppc. Une molécule de CO_2 peut également être incorporée au pyruvate par la pyruvate carboxylase Pyc afin de donner de l'oxaloacétate ou par l'enzyme malique et la malate déshydrogénase Mdh pour former de l'acide malique. Ces deux molécules sont des précurseurs à la formation de l'acide succinique. Ces dernières réactions sont assez communes aux bactéries productrices d'acide succinique. La voie du pyruvate permet aussi de produire

de l'acétate et de l'éthanol (Song *et al.*, 2006) (Figure 3). Cependant, un niveau élevé de CO_2 dans l'environnement entraîne une production accrue d'acide succinique au détriment de l'éthanol et de l'acide formique. En aérobie, l'acide succinique est un intermédiaire du cycle de l'acide tricarboxylique ainsi que du cycle du glyoxylate et ne permet donc pas aux bactéries d'accumuler de l'acide succinique (Song *et al.*, 2006). Ceci a incité certains chercheurs à effectuer des manipulations génétiques sur ces bactéries.

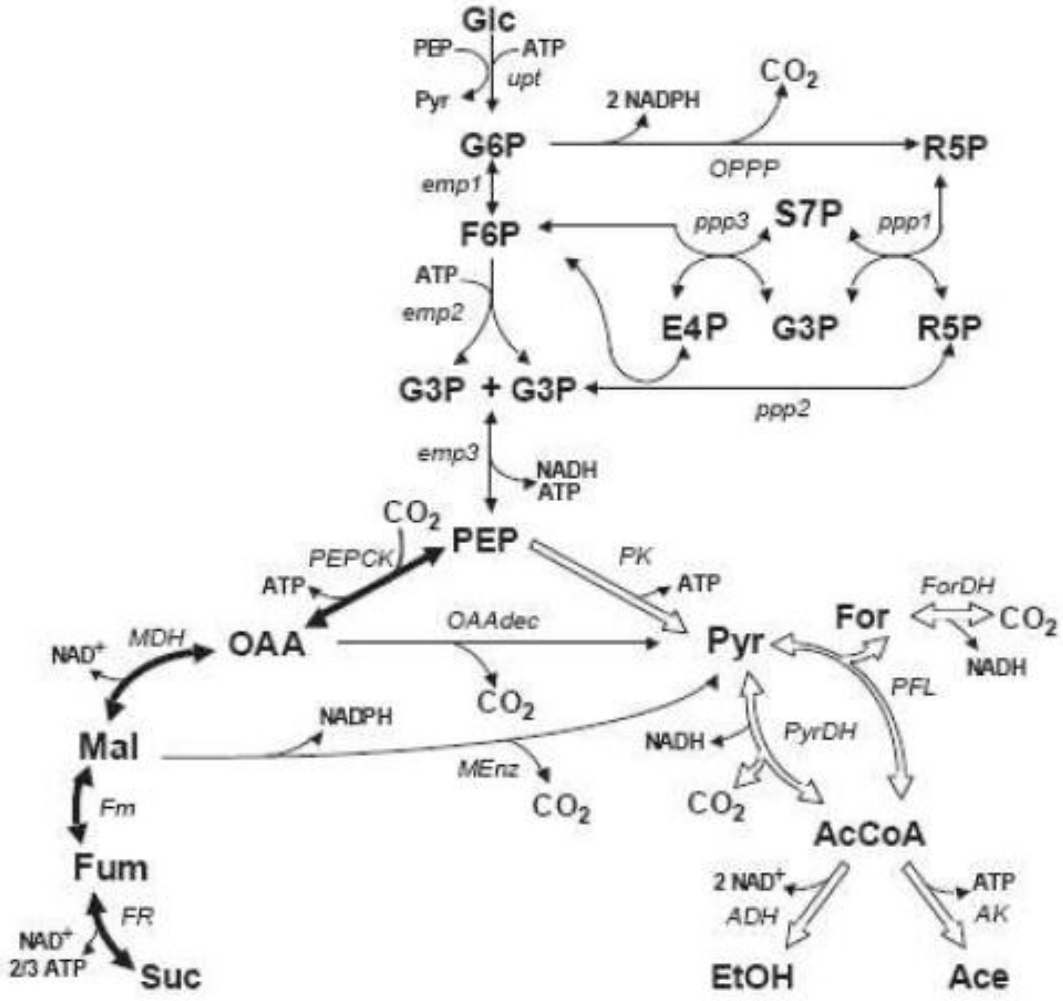


Figure : Voie métabolique de la production d'acide succinique chez *A. succinogenes*.

Métabolites: AcCoA, acétyl-coenzyme A; Ace, acétate; EtOH, éthanol; E4P, érythrose-4-phosphate; For, formate; Fum, fumarate; F6P, fructose-6-phosphate; Glc, glucose; G3P, glycéraldehyde-3-phosphate; G6P, glucose-6-phosphate; Mal, malate; OAA, oxaloacétate; PEP, phosphoénolpyruvate; Pyr, pyruvate; R5P, pentose-phosphates; Suc, succinate; and S7P, sédoheptulose-7-phosphate. Voies métaboliques et réactions : ADH, alcool déshydrogénase; AK, acétate kinase; emp1, 2, et 3, Embden-Meyerhoff-Parnas ou réactions glycolytiques; Fm, fumarase; ForDH, formate dehydrogenase; FR, fumarate reductase; MDH, malate déshydrogénase; MEnz, enzyme malique; OAAdec, oxaloacétate décarboxylase; OPPP, oxidative pentose phosphate pathway; PEPCK, PEP carboxykinase; PFL, pyruvate formate-lyase; PK, pyruvate kinase et PEP:glucose phosphotransférase system; ppp1 and 2, transkétolase; ppp3, transaldolase; PyrDH, pyruvate déshydrogénase; upt, glucose phosphorylation by hexokinase and PEP:glucose phosphotransferase system. Tiré de McKinlay J.B. et Vieille C., 2007 (McKinlay *et al.*, 2008).

1.3.3.1 Bactéries du rumen des bovins : *Actinobacillus succinogenes*

Le rumen est constitué d'une multitude de microorganismes responsables de la fermentation anaérobie. C'est un endroit où protozoaires, bactéries et champignons vivent en symbiose afin d'assurer la digestion des aliments (Joshi *et al.*, 2014). Parmi les bactéries qui peuvent produire naturellement de l'acide succinique et qui ont été isolée du rumen de bovins, on retrouve *Actinobacillus succinogenes* souche 130Z (Guettler *et al.*, 1999) et *Mannheimia succiniciproducens* (Hong *et al.*, 2004). *A. succinogenes* est la plus étudiée, c'est une bactérie sous forme de bacille ou coccobacille, anaérobie facultative, à Gram négatif et capnophile. Elle est capable de réduire différentes sources de sucres tels que le glucose, le fructose, le mannose, le lactose, et l'arabinose en succinate dans des conditions anaérobies. Ces voies sont aussi capables de produire des produits intermédiaires tels que l'éthanol et l'acétate (Joshi *et al.*, 2014).

Cette bactérie a l'avantage de tolérer une forte concentration d'acide succinique contrairement à d'autres bactéries comme *E. coli* ou *A. succiniciproducens* (Joshi *et al.*, 2014), ce qui fait d'elle une bonne candidate pour la fermentation industrielle. Dans des conditions optimales, la souche 130Z non modifiée peut produire jusqu'à 80 g/L d'acide succinique. Ce potentiel important a conduit certains chercheurs à développer des méthodes d'ingénierie métabolique afin d'augmenter sa productivité. Les voies

métaboliques d'*A. succinogenes* sont montrées à la figure 3. Ces voies sont similaires à celles d'autres bactéries telles qu'*A. succinoproducens.*

L'étape de la production de l'acide succinique reste néanmoins identique (Song *et al.*, 2006). Les recherches ont identifiés cinq enzymes clés dans la production de l'acide succinique. Le PEP carboxykinase Pck, la malate déshydrogénase Mdh, l'enzyme malique Sfc, la fumarase Fum et la fumarate réductase Frd. D'autres enzymes sont impliquées dans le flux de l'acide succinique comme la pyruvate kinase Pyk, la pyruvate ferredoxine oxidoréductase Pfo, l'acétate kinase Ack, l'alcool déshydrogénase Adh ainsi que la lactate déshydrogénase Ldh (Song *et al.*, 2006).Toutefois, les bactéries comme *A. succinoproducens* et *A. succinogenes* nécessitent des milieux complexes et coûteux, ce qui poussent les compagnies à utiliser d'autres bactéries économiquement plus fiables et mieux domestiquées telle que *E. coli.* Cette dernière sera manipulée génétiquement de façon à ce qu'elle réponde aux critères de l'industrie (Song *et al.*, 2006).

1.3.3.2 L'ingénierie métabolique

Le séquençage d'ADN a permis de décoder les voies métaboliques et ainsi révéler les enzymes clés d'une multitudes d'organismes intéressants (Keasling, 2010).Les bactéries peuvent être utilisées comme mini-usine de façon à surproduire une substance donnée. Pour ce faire, elles peuvent subir des modifications génétiques. C'est ce qu'on appelle de la biologie synthétique et plus exactement du génie métabolique. Celle-ci consiste à reconstruire des systèmes biologiques naturels déjà existants et à manipuler le génome d'un organisme donné à des fins utilitaires (Yu *et al.*, 2011). Le génie métabolique est utilisé dans les applications industrielles du fait des ressources renouvelables que représentent les bactéries. En effet, l'ingénierie métabolique permet de produire un grand nombre de produits chimiques, tel que le butane-1,4-diol, qui normalement sont issues de ressources non renouvelables ou ressources naturelles limitées, à partir de matériaux moins coûteux et plus disponibles (Yu *et al.*, 2011).

Cependant, le génie métabolique nécessite certaines conditions. Le choix de l'hôte est bien sûr important, dans la mesure où il faut choisir une bactérie facilement

manipulable chez qui la voie métabolique désirée existe ou peut être reconstituée de façon à ne pas affecter la viabilité de la bactérie. *E. coli, S. cerevisiae, Bacillus subtilis*, et *Streptomyces coelicolor* sont entre autres des microorganismes largement utilisés pour des applications de génie métabolique (Yu *et al.*, 2011) (Keasling, 2010).

Ceci a poussé un grand nombre de compagnies à investir dans la recherche et développement notamment pour la fabrication de produits chimiques importants tel que l'acide succinique (Yu *et al.*, 2011) (S. J. Lee *et al.*, 2005).

1.3.3.3 Utilisation d'*Escherichia coli* pour la production de l'acide succinique

Les souches sauvages d'*E. coli* ont tendance à fermenter le glucose en éthanol, en acide formique, en acide acétique et en acide lactique. Ceci laisse peu de place à la production de l'acide succinique qui n'est détecté qu'en très faible concentration en conditions anaérobies (Song *et al.*, 2006, Thakker *et al.*, 2012). Normalement, l'acide succinique est produit comme un intermédiaire du cycle de l'acide tricarboxylique et son rendement n'excède pas 0.2 mol par mol de glucose consommée par *E. coli* (Song *et al.*, 2006). Néanmoins, cette bactérie est très domestiquée, son génome a été très bien étudié et décortiqué et une multitude d'outils génétiques existent pour créer des souches modifiées, ce qui facilite sa modification génétique de façon à ce qu'elle produise un rendement d'acide succinique plus élevé (Song *et al.*, 2006, Thakker *et al.*, 2012). Il est connu qu'*E.coli* utilise six voies pour former de l'acide succinique mais contrairement aux bactéries citées plus haut, l'enzyme PEP carboxykinase Pck n'est importante dans aucune de ces six voies (Clark, 1989, Song *et al.*, 2006).

Plusieurs approches ont été testées pour créer des souches d'*E. coli* productrices d'acide succinique. Il est possible d'inactiver les enzymes des réactions qui compétitionnent avec les voies menant à l'acide succinique. D'autres ont privilégié l'amplification des enzymes impliquées dans la production de l'acide succinique ou l'introduction d'enzymes hétérologues mimant ainsi les voies métaboliques de *A. succinogenes* et *A. succinoproducens* (Song *et al.*, 2006, Thakker *et al.*, 2012, Yim *et al.*, 2011). L'une des premières approches a été de surexprimer l'enzyme PEP carboxykinase Pck et PEP carboxylase Ppc (Millard *et al.*, 1996). Ceci a permis

d'obtenir 3,5 fois plus d'acide succinique par l'enzyme Ppc. La modification de Pck n'a pas eu d'effet (Millard *et al.*, 1996).

La souche NZN111 de *E. coli* contient l'enzyme pyruvate formate lyase PflB et l'enzyme lactate déshydrogénase LdhA et est très utilisé comme souche de départ pour de futurs modifications génétiques afin d'augmenter la production d'acide succinique (Bechthold *et al.*, 2008, Song *et al.*, 2006). La souche en elle-même n'est pas fiable dans la mesure où elle a démontré une incapacité de croissance en fermentation. Un mutant spontané du gène *ptsG* qui code pour une glucose phosphotransférase a été sélectionné afin de restaurer la croissance en fermentation (Chatterjee *et al.*, 2001).

Pour la production de l'acide succinique en condition aérobie, le cycle de TCA peut être bloqué à des points stratégiques de manière à accumuler l'acide succinique. Le gène de la succinate déshydrogénase *sdh* est un très bon candidat. De nombreuses études ont démontré que son blocage est essentiel à une accumulation de l'acide succinique (Cao *et al.*, 2013).

1.4 La fermentation

La fermentation en bioréacteur reste une alternative intéressante à l'utilisation de ressources non renouvelables pour l'industrie. Un bioréacteur est une enceinte dans laquelle les microorganismes croient dans des conditions contrôlés. Ce dernier peut comporter un bouchon qui sépare l'air extérieur de l'air intérieur, ainsi qu'une seringue afin d'injecter les solutions désirés, un système d'agitation, et des capteurs pour la mesure des paramètres qui ont besoin d'être contrôler tels que la température, le pH, la concentration en oxygène, le niveau de méthanol dans le cas de *M. extorquens.* Tout ceci est contrôlé par ordinateur qui est relié au bioréacteur (Cinar *et al.*, 2003, Eibl *et al.*, 2009).

On retrouve deux types de bioréacteurs : les bioréacteurs à biomasse en suspension et à biomasse immobilisée. Ces derniers différent dans la façon dont la manière dont les bactéries vont croître. Dans la première, les microorganismes sont

continuellement agités tandis que la deuxième favorise plutôt la formation de biofilm (Cinar *et al.*, 2003).

La mode de conduite de bioréacteur diffère selon la façon avec laquelle le substrat est injecté. Il existe les bioréacteurs non alimentés en continu en substrat. Cette technique repose sur le fait que le substrat est injecté une seule fois, ceci est aussi appelé d'une façon plus répondu de fonctionnement batch. Parallèlement, il existe donc les bioréacteurs alimentés en continu en substrat ou le substrat est introduit tout au long de la réaction avec des soutirage au milieu afin que le volume reste constant (Cinar *et al.*, 2003).

Finalement, on retrouve aussi les bioréacteurs partiellement alimentés en substrat ou le substrat est introduit tout au long de la réaction mais cette fois-ci sans soutirage au milieu de façon à ce que le volume augmente. Cette technique est plus communément appelé semi-continu ou fed-batch (Cinar *et al.*, 2003) (Lim *et al.*, 2013).

Toutefois, la fermentation a ses désavantages. Tout d'abord il faut considérer le fait qu'une mini-fermentation en laboratoire n'égale pas une fermentation industrielle avec des bioréacteurs pouvant aller jusqu'à des millions de litre. Plusieurs paramètres doivent être rigoureusement contrôlés comme le pH. Si on prend l'exemple d'*A. succinogenes,* elle a un pH de croissance optimal entre 6.0 et 7.2. Toutefois en fermentation, cette bactérie a un pH optimal de 7 pour optimiser la production d'acide succinique (Wan *et al.*, 2008, Yun-jian Zhang *et al.*, 2012). Une valeur plus élevée de pH entraînera une plus forte augmentation de bactéries qui conduira à une augmentation de production de sous-produits non désirés. Tandis qu'une valeurs moins élevé de pH causera une diminution de la croissance bactérienne (P. Lee *et al.*, 2002).

Si on prend l'exemple de l'acide succinique, sa production est toujours accompagnée de sous-produits comme l'acide formique et l'acide acétique. Afin de contrer l'acidité qui peut devenir toxique pour les bactéries, le pH doit donc rester stable en ajoutant constamment une base telle que l'hydroxyde de sodium. D'un autre côté, si une grande concentration de sodium est rajoutée, ceci aura pour effet de déstabiliser l'osmolarité des cellules. La température, la concentration en CO_2, ainsi que l'oxygène dissout ont aussi un effet sur la viabilité de la bactérie. Tout ceci doit être pris en considération selon les conditions optimales des souches utilisées (Cao *et al.*, 2013).

La plupart des souches productrices d'acide succinique sont anaérobies. Ceci présente un grand désavantage en fermentation car le temps de culture est plus long et la formation de produit plus faible (Cao *et al.*, 2013). Une alternative à cela a été de créer un procédé de fermentation en deux phases. En premier lieu, les bactéries se multiplient librement et sans aucune contrainte afin d'augmenter la biomasse dans des conditions aérobies. Par la suite, le passage en condition anaérobe favorisera la production de l'acide succinique (Cao *et al.*, 2013).

Il existe différentes sources de carbone pour la production d'acide succinique en biotechnologie, la principale étant le glucose (Sanchez *et al.*, 2005). Cependant, le fait d'utiliser le glucose à des fins industrielles est éthiquement problématique étant donné qu'il s'agit aussi d'une source alimentaire. D'un autre point de vue, le glucose a un coût élevé. Il serait donc très utile de trouver des alternatives comme source de carbone afin de remplacer le glucose. L'utilisation des méthylotrophes capables de croître en présence de méthanol semble être une bonne alternative. En effet, le méthanol a un coût plus faible que le glucose étant qu'il provient essentiellement de la gazéification des déchets industrielles tandis que le glucose provient plutôt de l'alimentation. (Zhong, 2004).

1.5 Méthode d'extraction de l'acide succinique

L'extraction de l'acide succinique est une étape importante dans la mesure où celle-ci doit être le plus économique possible dans le but d'augmenter la rentabilité du produit final. En moyenne, la séparation et la purification de l'acide succinique coûtent plus de 50% des coûts totaux de la production en fermentation (Cao *et al.*, 2013).

L'étape cruciale est la séparation du produit désiré de la souche qui le produit. Ceci se fait généralement par centrifugation. Le culot contient les bactéries tandis que le surnageant contient l'acide succinique encore mélangé avec d'autres impuretés. Ceci conduit à l'étape de filtration afin d'éliminer toute les impuretés tels que les protéines ou les polysaccharides. Il existe plusieurs stratégies afin d'augmenter la pureté du produit final. Ceci inclut des électrodialyses, des nanofiltrations, une cristallisation, des

précipitations, des extractions et des séparations par chromatographie. (Cao *et al.*, 2013, Song *et al.*, 2006).

1.6 La méthylotrophie

La méthylotrophie est la capacité de certains microorganismes de "croître en utilisant des composés de carbone réduits contenant un ou plusieurs atomes de carbone mais ne contenant pas de liaisons carbone-carbone" (Bélanger *et al.*, 2004). Le méthane et le méthanol ainsi que les méthylamines, les dérivés halogénés du méthane et les groupements de soufres méthylés peuvent représenter des sources d'énergies et de carbone pour les méthylotrophes. Par le fait même, les cycles du carbone, de l'azote et du soufre sont d'une importance vitale chez les méthylotrophes (Bélanger *et al.*, 2004).

Malgré la découverte de ce phénomène il y a à peu près 100 ans, il a fallu attendre jusqu'aux années 60 pour comprendre la nature biochimique de ces microorganismes. L'étude des voies métaboliques a permis de mieux les comprendre et de séparer les méthylotrophes procaryotes en des groupes distincts. Les méthylotrophes strictes ne pouvant utiliser que les composés à un seul carbone et les méthylotrophes facultatifs pouvant réduire les composés carbonés à un ou plusieurs carbone(s) (Anthony, 1982, Bélanger *et al.*, 2004, Chistoserdova, 2011); les méthanotrophes de type I et de type II selon le mode de fixation du formaldéhydes et la structure de leurs membranes, et finalement les autotrophes versus les hétérotrophes (Chistoserdova, 2011).

Les procaryotes méthylotrophes peuvent être séparés en deux groupes différents selon la source de carbone : les méthanotrophes pouvant croître en présence de méthane et les méthylotrophes qui utilisent des composés méthylés autre que le méthane tel que le méthanol (De Marco, 2004). L'étude des différents méthylotrophes a permis de distinguer diverses types pouvant être aérobies ou anaérobies facultatives, appartenant à trois des classes de protéobactéries (α, β et γ). L'étude des voies métaboliques a permis de conclure que tous les méthylotrophes possédants le cycle des sérines pour l'assimilation du formaldéhyde sont des α-Protéobactéries, les

méthylotrophes n'utilisant pas le méthane appartiennent aux β-Protéobactéries sauf pour le genre *Methylophaga*. Quant aux méthanotrophes, ceux qui utilisent le cycle du ribulose monophosphate pour l'assimilation du formaldéhyde, ce sont des γ-Protéobactéries.

1.6.1 Les méthanotrophes

Les méthanotrophes sont les méthylotrophes capables d'utiliser le méthane comme source de carbone. Les méthanotrophes de type I assimilent le carbone en utilisant le cycle du ribulose monophosphate tandis que ceux du type II favorisent le cycle des sérines (Hanson *et al.*, 1996).

Les méthanotrophes possèdent un gène codant pour une enzyme responsable de l'oxydation du méthane : la méthane monooxygénase MMO. Selon les espèces de bactéries, on retrouve deux types de cette enzyme. Une version soluble de MMO sMMO a été retrouvée chez des genres tels que *Methylococcus* et *Methylosinus*et quelques souches de *Methylomonas, Methylomicrobium et Methylocystis* (Fuse *et al.*, 1998, Hanson *et al.*, 1996, Shigematsu *et al.*, 1999). On la retrouve chez les types I et II des méthanotrophes.

L'autre type de MMO est une version associée à la membrane, nommée pMMO (E. *et al.*, 2006, Hanson *et al.*, 1996). Elles diffèrent de la présence de systèmes membranaires internes (E. *et al.*, 2006, Hanson *et al.*, 1996)). Les gènes qui codent pour la pMMO ont été retrouvés chez la plupart des méthanotrophes. Ceci mène à la déduction qu'il existe des méthanotrophes possédant les deux versions de l'enzyme. Dans ce cas, leurs expressions dépendent du niveau de cuivre disponible dans le milieu de culture (A. K. Nielsen *et al.*, 1997). Une concentration de cuivre suffisante conduit à l'expression de pMMo tandis qu'une insuffisance mène à l'expression de la sMMO (A. K. Nielsen *et al.*, 1997).

1.6.2 Les méthylotrophes

Les bactéries décrites comme méthylotrophes sont catégorisées en celles qui sont capable de réduire les composés monocarbonés (ex. méthanol), mais pas le méthane,

et celles qui ont aussi la capacité de réduire les composés multicarbonés (ex. acide succinique) (E. *et al.*, 2006).

En ce qui concerne le méthanol, son oxydation en formaldéhyde s'effectue par trois classes d'enzymes. L'étude des méthylotrophes Gram-négatif a révélé la présence d'une méthanol déshydrogénase MDH (Goodwin *et al.*, 1998). Les deux autres enzymes sont une *NAD-linked enzyme* retrouvés chez les *Bacillus*, et la N,N'-dimethyl-4-nitrosoaniline oxydoréductase MNO également retrouvées chez des espèces à Gram positif (E. *et al.*, 2006). Une des bactéries les plus étudiées qui a la capacité d'assimiler le méthanol est *Methylobacterium extorquens* AM1.

1.6.3 *Methylobacterium extorquens*

Methylobacterium extorquens est la bactérie méthylotrophe anaérobie la plus étudiée. Elle appartient aux α-protéobactéries. C'est une méthylotrophe facultative donc pouvant réduire les composés mono et multicarbonés (Bélanger *et al.*, 2004). Elle a la capacité d'utiliser le méthanol comme seul source d'énergie et de carbone. En général, les bactéries utilisant le méthanol sont retrouvées de façon ubiquitaire dans l'environnement. Le sol, les sédiments des lacs, les océans, les eaux douces et les nodules de plantes sont entre autres des endroits favorables à l'épanouissement de ces bactéries. La souche *M. extorquens* ATCC 5536, aussi nommée AM1, qui est l'objet de cette étude a été isolée à partir d'un sol sablonneux, contaminé fréquemment par de l'huile durant une période de 40 ans (Bourque *et al.*, 1992).

L'étude de la souche *M. extorquens* AM1 a permis de comprendre l'organisation des voies métaboliques chez les méthylotrophes pour l'assimilation du méthanol.

1.6.3.1 Voies métaboliques chez *M. extorquens*

Sachant que *M. extorquens* est une méthylotrophe facultative, elle utilise des voies différentes selon la source de carbone. Une croissance en milieu contenant une source de carbone multicarbonée conduit à l'utilisation des mêmes voies que la plupart des hétérotrophes incluant le cycle de Krebs, le cycle des pentoses phosphates, une partie de la gluconéogenèse et du cycle anaplérotique et la chaîne de transport d'électrons qui

implique la NADH déshydrogénase (Skovran *et al.*, 2010). En parallèle, le recours à une source monocarbonée tel que le méthanol favorise des voies métaboliques plus spécifiques afin de maximiser l'apport d'énergie, le métabolisme et l'assimilation du carbone. Le fait de passer d'une source de carbone tel que l'acide succinique à une source de carbone tel que le méthanol conduit à ce que la bactérie puise l'énergie de son métabolisme à partir d'un système de transport d'électrons basé sur un cytochrome qui coopère avec une enzyme, la méthanol déshydrogénase Mox. Cette enzyme est responsable de l'oxydation du méthanol (Skovran *et al.*, 2010). L'utilisation de l'acide succinique va plutôt favoriser l'oxydation du NADH par la NADH déshydrogénase (mejkalová *et al.*, 2010).

Le méthanol est d'abord oxydé dans le périplasme afin de former le formaldéhyde grâce à la méthanol déshydrogénase. Le formaldéhyde est ensuite oxydé en ayant recours au co-facteur, la tétrahydrométhanoptérine (H_4MPT) qui fait office de support des unités de carbone (Anthony, 2004). Par la suite, une multitude de réactions enzymatiques conduisent à la formation du formate utilisant des enzymes tel que la Fae (*formaldehyde activating enzyme*)(Anthony, 2004).

Le formate obtenue est alors soit oxydé en grande quantité en CO_2 par l'enzyme formate déshydrogénase (Fdh*),* soit il continue son chemin pour la production du méthylène-H_4F par trois réactions qui nécessitent trois enzymes : la formyl-H4F ligase (FtfL), la méthenyl-H4F cyclohydrolase (Fch) et la méthylène-H4F déshydrogénase (MtdA) (mejkalová *et al.*, 2010, Skovran *et al.*, 2010)

Le méthylène-H_4F est la clé pour l'entrée de la source de carbone dans le cycle des sérines. Ce dernier est en fait condensé avec la glycine et de l'eau et entre ainsi dans le cycle des sérines. Ce dernier est important dans la mesure où il chevauche deux autres cycles, le cycle de TCA et le cycle de l'éthylmalonyl-CoA (EMC) (mejkalová *et al.*, 2010, Skovran *et al.*, 2010).

D'un autre côté, le cycle de serine fournit un élément clé qui est l'acétyl-CoA. Cette molécule se condense avec une autre molécule d'acétyl-CoA pour former l'AcAc-CoA. Cette dernière molécule est le point d'embranchement du cycle poly-β-hydroxybutyrate

(PHB) et de l'EMC (Skovran *et al.*, 2010). L'EMC permet de fournir un précurseur à la production de l'acide succinique, le succinyl-CoA (Skovran *et al.*, 2010). La figure 4 montre les voies métaboliques de l'assimilation du méthanol.

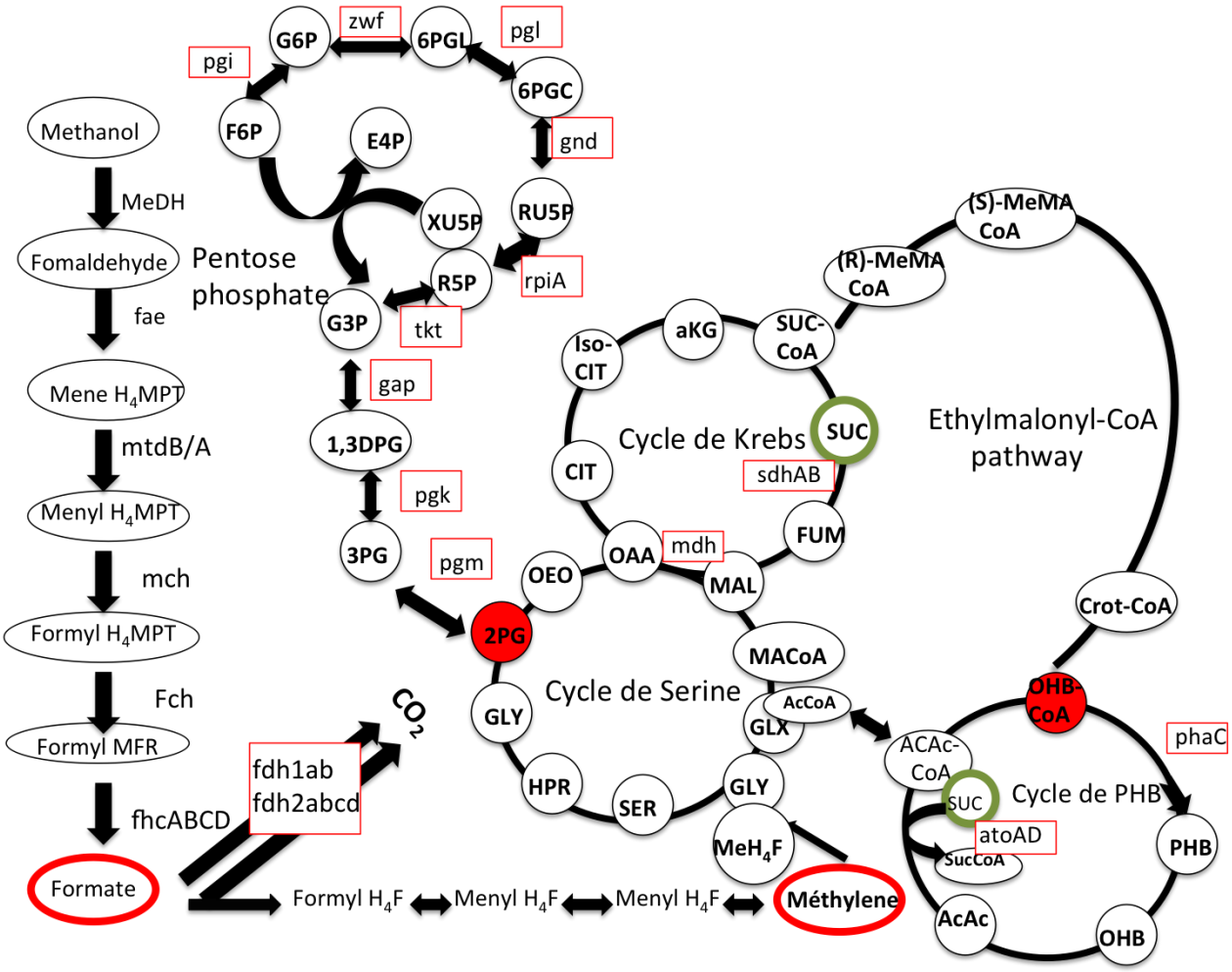


Figure : Voies d'assimilation du méthanol chez *M. extorquens*.

Le méthanol donne suite au formate qui est soit utilisé pour la formation de CO2, soit entrainé pour l'obtention du méthylène. La molécule d'acide succinique est entouré en verte. Les molécules en rouge sont les points de divergences des routes qui mènent vers l'acide succinique. Les noms de gènes encadrés en rouge sont ceux qui peuvent potentiellement être inhibés afin d'augmenter la production de l'acide succinique. MeDH, methanol déshydrogénase ; *Fae*, formaldéhyde-activating enzyme ; MtdB, NAD(P)-dependent méthylène-H4MPT déshydrogénase ; MtdA, NADP-dependent methylène-H4F/methylene-H4MPT dehydrogenase; *mch*, methenyl-H4MPT cyclohydrolase; *fhc*, formyltransférase/hydrolase complex ; *fch*, methenyl-H4F cyclohydrolase; FDHs, formate déshydrogénases; Oaa, oxaloacétate ; Mal, malate ; 2PG, 2 phosphoglycérate ; Gly, glycine ; Hpr, hydroxypiruvate ; Ser, serine ; Glx,

glycoxylate ; AcCoA, acétyl-coenzyme A; Fum, fumarate ; Suc, succinate ; Suc-coa, succinyl-Coa ; aKG, α-cétoglutarate ; Iso-Cit, isocitrate ; Cit, citrate ; Crot-Coa, Crotonyl-Coa ; MeMa-Coa , methylmalonyl-CoA ; PHB, poly-β-hydroxybutyrate ; OHB, hydoxybutyryl-CoA; 3PG, glycéraldehyde-3-phosphate ; 2PG, 2 phosphoglycérate ; 3PG, 3 phosphoglycérate ; R5P, ribose-5-phosphate ; RU5P, Ribulose-5-phosphate ; 6PGC, 6-Phosphogluconate ; 6PGL, 6 phosphogluconolactone ; G6P, Glucose-6-phosphate ; F6P, Fructose-6-phsphate ; E4P, Erythrose-4-phosphate ; Xu5P, Xylulose-5-phosphate ; RSP, Ribulose-5-phosphate ; *Ato,* acetyl-coenzyme *; phaC,* Polyhydroxyalkanoic acid synthase ; *mdh,* malate déshydrogénase ; *sdh*, succinate déshydrogénase ; *pgm*, phosphoglycérate mutase ; *pgk*, Phosphoglycérate kinase ; *gap*, glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase ; *tkt*, Transkétolase ; *rpiA*, ribose 5-phosphate isomerase A ; *gnd*, 6-phosphogluconate déshydrogénase ; *pgl*, 6-phosphogluconolactonase ; *zwf*, glucose-6-phosphate 1-déshydrogénase ; *pgi*, glucosephosphate isomérase.

Adapté de (Skovran *et al.*, 2010).

1.6.4 Provenance du méthanol

L'industrie d'aujourd'hui a recours aux microorganismes comme usines cellulaires microbiennes à des fins de production. Les retombées économiques diffèrent selon plusieurs facteurs, tels que le microorganisme utilisé et donc le substrat nécessaire à la croissance du microorganisme en question. Le recours au méthanol au lieu d'autre substrat tel que le glucose ou l'amidon présente plusieurs avantages tels que le fait d'éviter l'utilisation des produits provenant de l'agriculture à des fins industrielles. (http://www.methanol.org/Methanol-Basics/Methanol-Applications.aspx, 2011). Bien sûr le côté économique est aussi très important. Toute compagnie préfère avoir recours à un substrat moins onéreux pour la croissance de la souche. Le méthanol répond parfaitement à ces critères. Il ne provient pas de l'agriculture et son coût est très faible vu qu'il peut provenir de la dégazéfication des déchets industrielles En ce qui concerne l'environnement, le méthanol représente une alternative prometteuse dans de la cadre du développement durable et est une matière première intéressante pour les bioprocédés microbiens (http://www.methanol.org/Methanol-Basics/Methanol-Applications.aspx, 2011).

Les sources de méthanol sont très diverses. Les matières premières nécessaires à sa production sont très disponibles ce qui lui procure l'avantage d'être un produit

chimique flexible (http://www.methanol.org/Methanol-Basics/Methanol-Applications.aspx, 2011).

En premier lieu, la production du méthanol nécessite un gaz de synthèse dont les principaux composants sont le monoxyde de carbone et l'hydrogène gazeux. Le gaz naturel peut aussi être utilisé. Toutefois il est préférable d'avoir recours à des matières premières renouvelables (http://www.methanol.org/Methanol-Basics/Methanol-Applications.aspx, 2011). En effet, le méthanol peut être obtenu à partir de n'importe quelle ressource pouvant être transformé en gaz de synthèse. Les plantes, la biomasse, les déchets agricoles, les déchets solides municipaux sont entre autres des matières dont la gazéification peut conduire à la production de méthanol (http://www.methanol.org/Methanol-Basics/Methanol-Applications.aspx, 2011).

Il est donc très avantageux pour une industrie de choisir *M*. *extorquens* pour la production d'acide succinique étant donné que celle-ci peut se nourrir de méthanol. Cependant, cette bactérie n'étant pas productrice naturelle d'acide succinique, elle doit être modifiée génétiquement en utilisant des outils génétiques spécifiques, tels que les sARN.

1.7 Les acides ribonucléiques

Une cellule est constituée de trois types de macromolécules : les acides désoxyribonucléiques (ADN), les acides ribonucléiques (ARN) et les protéines. L'ADN peut être subdivisé en segments qu'on appelle des gènes qui contiennent l'information génétique. Les ARN sont des polymères de ribonucléotides reliés entre eux par des liaisons nucléotidiques. Leurs fonctions dans la cellule sont très diversifiées selon le type d'ARN. En effet, contrairement à l'ADN qui a une conformation relativement simple en double hélice, les ARN ont diverses fonctions qui dépendent de leurs structures(Cooper, 1999).

L'expression des gènes consiste à transcrire un gène en un ARN qui lui-même sera traduit en protéine. Ces étapes sont appelées respectivement transcription et traduction. C'est ce qui est défini comme le dogme central, proposé par Crick dans les

années 50 (J. D. Watson *et al.*, 1953). Il représente la transcription de l'ADN en ARN messager (ARNm). Cet ARNm sera par la suite traduit en protéine aidé par les ARN ribosomiques (ARNr) et les ARN de transfert (ARNt). Les ARNm sont donc des ARN codants car ils sont traduits en protéine (Cooper, 1999).

Toutefois, les ARN tel que les ARNt et les ARNr sont des molécules fonctionnelles non traduites et appartiennent aux ARN non codants.

1.7.1 Les ARN codants

Un ARNm mature est constitué d'un cadre de lecture flanqué de deux régions non traduites mais qui sont essentiels à la machinerie traductionnelle. La région en 5' est essentielle pour le site de fixation du ribosome dont la séquence chez les procaryotes est une forme canonique AGGAGGU. Ce site est nommé la séquence *Shine-Dalgarno* ou RBS pour *ribosome binding site* (Carey, 1996). La région en 3' de l'ARNm est impliquée en partie dans la maturation car elle contient le signal de poly-adénylation qui joue un rôle de stabilisateur (Carey, 1996).

1.7.2 Les ARN non codants

Les ARN non codants (ncRNA) sont ceux qui généralement ne codent pas pour des protéines. Leurs fonctions sont très diverses et dépendent de leurs structures. En effet, la molécule d'ARN peut adopter diverses fonctions selon la structure qu'elle adopte (Barciszewski, 2003, Mattick *et al.*, 2006). La structure que peut former l'ARN est souvent sous la forme de bases appariées formant une tige avec des régions non appariées qui sont des boucles. Les ARN non codants ont la plupart du temps un rôle de régulateur de l'expression génique (Barciszewski, 2003, Mattick *et al.*, 2006).

D'autres études tout au long des années ont permis de découvrir d'autres types d'ARN de petite taille : les petits ARN (sARN pour *small RNA*) (Eddy, 2001, Mattick *et al.*, 2006). On retrouve les sARN nucléaires snARN localisés dans le noyau des cellules chez les eucaryotes. D'autres sont localisés dans le nucléole qui est un compartiment du noyau cellulaire, ce sont des petits ARNs nucléolaires snoARN, les ARNs

cytoplasmiques de petites tailles scARN et les petits ARN interférents siARN chez les eucaryotes (Eddy, 2001).

La découverte des sARN chez les procaryotes dans les années 1980 qui ont une capacité de régulation, a permis de mettre en évidence le rôle important des régions intergéniques (Mizuno *et al.*, 1984).

1.7.2.1 Régulation des gènes par les ARN non codants chez les bactéries

Plusieurs petits ARN régulateurs ont été découverts chez différentes bactéries. Le premier ARN régulateur chromosomique a été découvert en 1984 (Mizuno *et al.*, 1984). Cette étude portait sur un ARN MicF complémentaire à la fin de la région 5' de l'ARNm *ompF* capable de se fixer sur le RBS afin d'inhiber sa traduction (Mizuno *et al.*, 1984). MicF agit donc en *trans*. En effet, la régulation qui se fait par la complémentarité peut agir soit en *cis* ou en *trans* (*cis-acting* et *trans-acting*). La régulation en *trans* signifie que la séquence du petit ARN est distincte du gène régulé dans la mesure où les facteurs *trans*-régulateurs qui se fixent sur la séquence à réguler proviennent de l'expression de gène dont la position se trouve ailleurs sur le génome par apport au gène régulé (Fig. 5) (J.D. Watson, 2007).

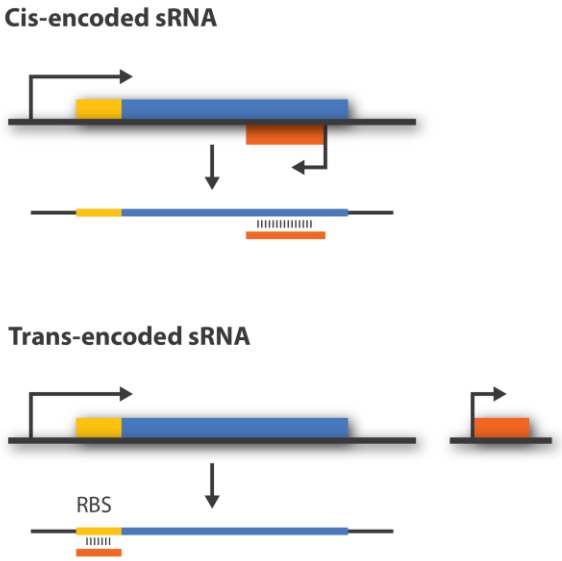


Figure : Régulation en cis versus régulation en trans des sRNA

Différence entre la régulation en cis et la régulation en trans. Les boites orange font référence au sARN tandis que les boites bleues illustrent la cible soit l'ARNm. Les boites jaunes correspondent aux RBS, soit le site de fixation du sARN. Tiré de la référence (http://2011.igem.org/Team:DTU-Denmark/Background_sRNA#References, 2011).

En parallèle, les ARN régulateurs qui agissent en *cis* régulent les gènes qui leurs sont adjacents sur le même chromosome. Elle été mise en évidence pour la première fois sur des plasmides, sur des phages et des transposons (Brantl, 2007, Wagner *et al.*, 2002).

Ces ARN régulateurs qui agissent en *cis* et en *trans* fonctionnent normalement par un mécanisme d'hybridation à anti-sens afin de réguler la traduction ou la stabilité de la cible qui se trouve être l'ARNm. Ceci va altérer leur structure afin de libérer ou de séquestrer des sites spécifiques. Cette dernière situation intervient plus fréquemment. (Brantl, 2007).

Parmi les ARN qui agissent en cis, les *riboswitch* agissent de façon allostérique par la liaison avec des métabolites afin de réguler l'expression des gènes. Plus précisément, ce sont des séquences non codantes situées dans les UTR des ARNm et contrôlent l'expression de plusieurs gènes en réponse aux changements des conditions cellulaires (Mandal *et al.*, 2004).

L'étude sur laquelle porte ce mémoire s'intéresse principalement à l'action des petits ARN qui agissent en *trans* sur leurs ARNm-cibles.

1.7.2.2 Les petits sARN et leurs mécanismes d'actions

Les petits ARNs régulent l'expression de gènes chez les bactéries. Ils sont relativement courts (entre 50 et 300 nucléotides) et régulent les ARNm par des appariements de bases pouvant être imparfaits. La région d'appariement de bases se situe le plus fréquemment au niveau du RBS afin de bloquer la traduction en compétitionnant avec le ribosome (Storz *et al.*, 2011). Toutefois, des études ont permis de déterminer des appariements de bases en aval de la région du RBS qui interférerait

tout de même avec le ribosome en passant par d'autres mécanismes (Storz *et al.*, 2011).

Habituellement, chez les bactéries à Gram négatif, l'action du sARN est aidée par l'intervention d'une protéine Hfq qui interagit avec des régions riches en AU sur le sARN et sur la cible. Cette protéine aide à compétitionner avec le ribosome, stabilise le sARN et stimule l'appariement entre le sARN et la cible (Storz *et al.*, 2011).

L'étude des sARN chez les bactéries a permis d'apprendre davantage sur la régulation de l'expression des gènes et d'utiliser les sARN comme des outils dans différents domaines. D'un autre côté, les sARN peuvent également présenter un excellent outil dans le domaine de la biotechnologie (Storz *et al.*, 2011).

1.7.3 Les sARN : outil pour l'ingénierie métabolique

L'ingénierie métabolique est une technologie résultant de la modification du métabolisme de souches microbiennes par le génie génétique. Ceci permet d'obtenir des nouvelles souches ayant la capacité de produire une plus grande quantité de métabolites. L'étude minutieuse des voies métaboliques de l'organisme concerné permet l'identification de potentiels cibles génétiques (ARNm) afin d'optimiser ou de réduire leur expression (Na *et al.*, 2013). Il est possible de pratiquer le génie métabolique en ayant recours à des outils autres que les sARN tels que le *multiplex automated genome engineering*. Néanmoins, cette méthode permet le ciblage de 24 gènes au maximum (Na *et al.*, 2013). D'un autre coté et contrairement aux *knock out*, les sARN réduisent l'expression génétique. Le gène est toujours présent et n'est pas totalement inactivé. Ceci est appelé un *knockdown.* Un *knockout* est avantageux à un knockdown car ce dernier peut être fatal pour la bactérie si celle-ci a besoin d'être alimenté par un métabolite pour sa survie. L'exemple l'acide succinique est que si on fait un *knockout* sur le gène *sdh* de *M. extorquens,* cette dernière aura besoin d'être alimenté en acide malique (voir figure 4). Ceci est bien sur désavantageux d'un point de vue économique pour l'industrie. (Na *et al.*, 2013).

L’utilisation des sARN comme outil permet de cibler plusieurs gènes car Il est très facile de synthétiser les sARN par des assemblages de séquences ou de commander les séquences entières des sARN grâce à leur petite taille (Na *et al.*, 2013).

Dokyun Na et al (Na *et al.*, 2013) ont bien étudié l’utilisation des sARN comme outils d’ingénierie métabolique chez *E. coli*. Leurs travaux portaient sur la conception de sARN pour l’augmentation de la production de la tyrosine et de la cadaverine. Ils ont préalablement criblé une centaine de sARN présents chez *E. coli* afin de déterminer lesquels ont la plus grande capacité d’inhibition. Leur ARN modèle reposait sur le sARN MicC qui inhibe le gène d’OmpC, gène qui permet la formation de porines membranaires (Na *et al.*, 2013).

Ce petit sARN MicC a donc été utilisé comme base pour la synthèse de sARN spécifiques aux gènes cibles. Les sARN étaient composés de deux portions. Une portion pour le recrutement de la protéine Hfq qui provient de MicC (Na *et al.*, 2013, Yoo *et al.*, 2013). L’autre portion est responsable de la complémentarité avec la cible (voir figure 6) (Na *et al.*, 2013, Yoo *et al.*, 2013). Il faut savoir que la transcription du sARN nécessite le choix d’un bon promoteur. Cependant, la taille du petit ARN complet est très importante à la fonctionnalité de ce dernier et doit idéalement rester courte. Au niveau du promoteur, il y a un minimum de séquence inutile transcrite. Plusieurs applications ont démontré que des bases supplémentaires en 5' ont peu d'impact sur la fonction ou l’expression du gène d'intérêt, mais dans le cas d’un gène ciblé par un sARN, la séquence en superflue risque de causer des interactions non-spécifiques et de diminuer l'expression de gènes qu'on ne veut pas affecter. Cela risque aussi de réduire l'efficacité de liaison de la séquence voulue avec la cible choisie. Le tableau 2 résume quelques exemples de sARN synthétiques durant les dernières années.

Tableau : Exemple d’utilisation de sARN synthétiques dans la littérature

Caractéristiques	Références
Premiers à utiliser des ARN complémentaires pour l’inhibition des gènes	(Coleman et al., 1984)
Utilisation des ARN pour la biologie	(Z. Chen et al., 2010)

synthétiques	
Conception des sARN synthétiques	(Rodrigo et al., 2013)
Utilisation du sARN MicC (production de cadaverine et tyrosine)	(Na et al., 2013)
sARN Ribo-0	(Jin et al., 2013)
sARN SibC	(Park et al., 2013)
sARN DsrA, GcvB, MicF et Spot42	(Sharma et al., 2012)
Stratégie de screening in vivo	(Sharma et al., 2013)
sARN-RHR2, sARN-PDC6 (production du fumarate)	(X. Chen *et al.*, 2016)
sARN pour ZFP	(Hsia *et al.*, 2016)

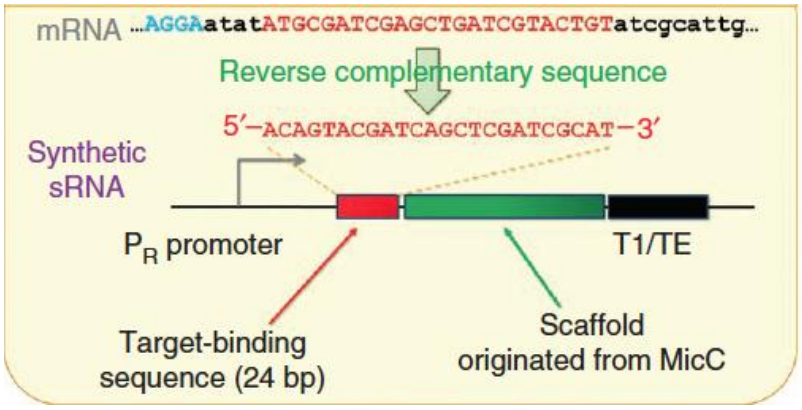


Figure : Structure de la conception d'un petit ARN.

Conception du petit sARN synthétique pour emploi en génie métabolique par régulation de gènes-cibles. Il est constitué d'une partie de MicC (en vert), de la séquence complémentaire à la cible (en rouge) qui doit faire dans les 24 paires de bases, ainsi que du promoteur. Tiré de Dokyun Na et al, 2013 (Na *et al.*, 2013).

2. OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES

Ce projet repose sur une méthode qui a déjà été prouvée sur *E. coli*. Il existe donc des sARN connus qui ont la capacité d'inhiber des gènes. Il est donc théoriquement possible de cibler des gènes-clés dans les voies métaboliques de *M. extorquens* et de les inhiber par le biais d'sARN régulateurs de façon à favoriser la production d'acide succinique.

La problématique réside dans le fait de savoir comment améliorer la production d'acide succinique. Comment cibler les gènes et les inhiber et surtout quels sont les gènes les plus intéressants à cibler ?

L'objectif principal de ce projet est d'optimiser la production d'acide succinique chez *M.extorquens* en utilisant comme outil pour l'ingénierie métabolique les sARN. Pour ce faire, trois sous-objectifs sont nécessaires à la réalisation du projet.

Le premier objectif était donc de préparer une construction avec un promoteur idéal pour l'expression de sARN dans *M*. *extorquens*. Le deuxième objectif était de prouver qu'il est possible d'utiliser les sARN synthétiques chez *M. extorquens* afin d'inhiber l'expression de gènes spécifiques. Finalement, le troisième objectif était d'inhiber par les sARN des gènes cibles dans des voies métaboliques diverses pour optimiser la production d'acide succinique chez *M. extorquens*.

3. MATÉRIELS ET MÉTHODES

Tableau : Souches et plasmides

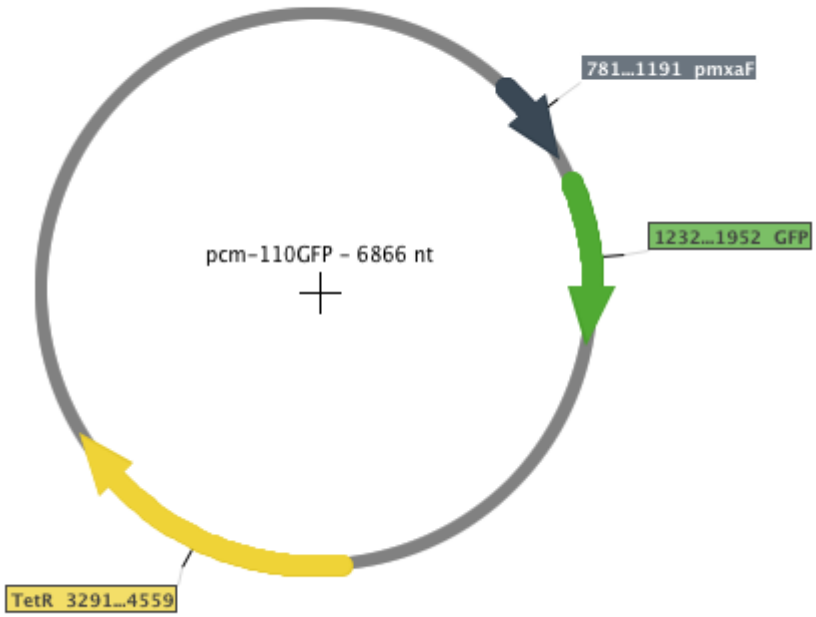
Souches bactériennes et plasmides	Caractéristiques	Référence ou source
Souches *Escherichia coli*		
χ7213	SM10λ*pir* Δ*asd*	(Roland *et al.*, 1999)
DH5 α	Utilsée pour les transformations	NEB

Souches *Methylobacterium extorquens*		
ATCC55366	Souche sauvage	(Bourque *et al.*, 1992)
GFP5	Cinq copies de *gfp* intégré	(Y. J. Choi *et al.*, 2006b)
PCM-GFP	Contient le plasmide pCM-110-GFP	(Bélanger *et al.*, 2004)
sARN-*gfp*1	Contient le sARN contre le gène *gfp*	Cette étude
sARN-*gfp*2		Cette étude
sARN-*gfp*3		Cette étude
sARN-*sdhA*	Contient le sARN contre le gène *sdh*	Cette étude
sARN-*sdhB*		Cette étude
Plasmides		
pCM-110-GFP	GFP, P_{mxaF}, tet^R	(Bélanger *et al.*, 2004)
pBK-miniTn7-KmΩSm2	Basé sur pUC19-based et contient les casettes pour miniTn*7*-KmΩSm1. Ap^R, Sm^R, Km^R, *mob*+	(Birgit Koch *et al.*, 2001a)
pRI01	Dérivé de pCM-110-GFP et contient le promoteur P_{mxaF} tronqué	Cette étude
pRI02	Dérivé de pBK-miniTn7-KmΩSm2 et contient le sARN-*gfp2*	Cette étude
pRI03	Dérivé de pBK-miniTn7-KmΩSm2 et contient le sARN-*gfp3*	Cette étude
pRI04	Dérivé de pBK-miniTn7-KmΩSm2 et contient le sARN-témoin	Cette étude
pRI05	Dérivé de pBK-miniTn7-KmΩSm2 et contient le sARN-*sdh*	Cette étude
pRI06	Dérivé de pBK-miniTn7-KmΩSm2 et contient le sARN-	Cette étude

sdh

3.1 Premier objectif : Tester un bon promoteur pour induire l'expression du sARN.

Le promoteur choisi est P_{mxaF} qu'on retrouve sur le plasmide pCM110-GFP, obtenu de nos collègues du CNRC (figure 7). Ce promoteur est fort, inductible par la présence du méthanol, et induit l'expression du gène codant pour la GFP (Y. J. Choi *et al.*, 2006c). Toutefois au niveau de ce promoteur, il y a des nucléotides supplémentaires en



5' en aval du +1 (site d'initiation de la transcription) qui ont peu d'impact sur la fonction ou l'expression du gène d'intérêt. Toutefois, étant donné que la taille de l'ensemble de l'ARN est importante pour les sARN, cette séquence superflue risque d'une part de causer des interactions non-spécifiques et de ce fait diminuer l'expression de gènes qu'on ne veut pas affecter et d'autre part cela risque aussi de réduire l'efficacité de liaison de la séquence voulue avec la cible choisie. Il a donc été décidé de tronquer la partie du promoteur en aval du +1.

Figure : **Plasmide pCM110-GFP avec le promoteur P_{mxaF} qui exprime le gène GFP.** L'antibiotique de sélection est la tétracycline.

3.1.1 Souche bactérienne, plasmide et conditions de croissance

Les bactéries *E. coli* ont été cultivées sur un milieu LB liquide ou solide selon les conditions. Les bactéries *M. extorquens* ont été cultivées en aérobiose dans le milieu minimal CHOI en forme liquide ou en gélose. Ce milieu contient 11 mM $(NH_4)_2SO_4$, 9,59 mM KH2PO4, 15 mM Na_2HPO_4, 5,48 mM $MgS0_4$, 0,41 mM $CaCl_2$, 22 µM FeSO4, 87 µM MnSO4, 27 µM $ZnSO_4$, 10 µM $CuSO_4$ et xxx Na_2MoO_4, zzz $CoCl_2$, et 29 µM H_3BO_3 (Bourque *et al.*, 1995). Nous ajoutons 0,5 % (v/v) de méthanol à 99.8% de J.T.Baker dans ce milieu comme source de carbone. Les bactéries sont conservées à -80 °C avec 15 % de glycérol. Tout matériel utilisé doit être stérile et lavé trois fois à l'eau distillé. Les expériences sont réalisées dans des flacons de type Erlenmeyers *baffled* de 250 ml contenant 50 ml de milieu. Les cultures de *M. extorquens* sont cultivées pendant 72 heures dans un incubateur-agitateur à une vitesse d'agitation de 250 rpm. La croissance est évaluée en mesurant l'absorbance à 600 nm (Bourque *et al.*, 1995, Lamarche M.G., 2015).

3.1.2 Extraction de plasmide pCM110-GFP

E. coli DH5α contenant le plasmide pCM110-GFP a été mis en culture O/N (*overnight*) dans du milieu LB à 37°C avec une agitation continue afin de faire une extraction de plasmide par le kit Wizard plus mini-preps de Promega**.** Ce plasmide contient le gène codant pour GFP inductible par le promoteur P_{mxaF} ainsi qu'un gène de résistance à la tétracycline comme moyen de sélection.

3.1.3 Tronquage du promoteur P_{mxaF}

Le plasmide a dû être tronqué en supprimant la région en aval du +1 par une méthode par PCR (voir figure 8). Les données concernant le +1 de P_{mxaF} proviennent d'une étude concernant les sites d'initiation (M. Zhang *et al.*, 2005) et ont permis concevoir les amorces. Deux amorces ont été utilisées : une amorce sens 5'ACCGAATTAGCTTGCATGC et une amorce antisens 5'ATCGTAAGCTTCTATATTTTCTAGGCTTTGATTGGAC. L'une des amorces et plus longues que l'autre car elle a nécessité l'ajout de l'enzyme de rétraction EcoRI ainsi que 5 nucléotides. La phusion High-Fidelity DNA polymérase a été employée dans un une thermocycler pour PCR T100 pour BIO-RAD. Le programme de PCR était: 98 °C pour

2 min (activation de l'enzyme), puis 25 cycles de 98 °C pour 10 s, 59 °C pour 30 s, puis une élongation de 72 °C pour 20 s, et finalement une élongation finale de 72 °C pour 5 min. Après vérification sur gel d'agarose 1,5 % du produit de PCR correspondant au promoteur tronqué, une digestion a été faite avec les enzymes de restriction AflII et EcoRI (New England Biolabs (NEB) à 37°C pendant 2 heures. Le produit de PCR digéré du promoteur P_{mxaF} tronqué a été obtenu après avoir découpé le gel et fait une purification avec la trousse de purification sur gel. Les kits pour les deux étapes sont issus de la compagnie BIOBASIC.

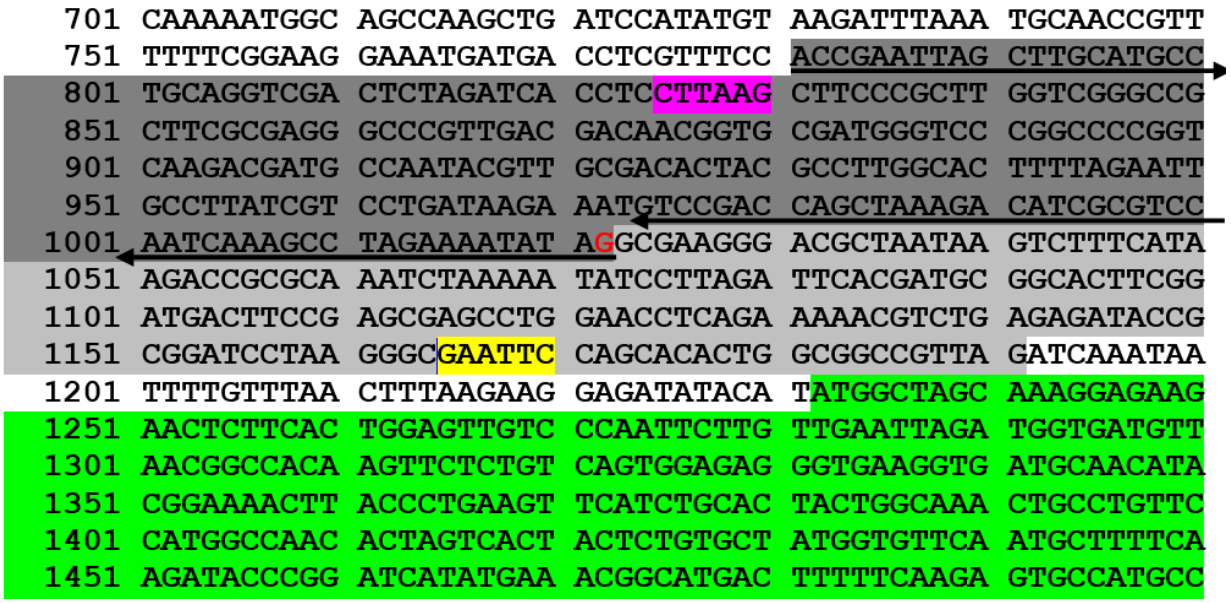


Figure : Partie de la séquence du plasmide pCM110-GFP avec le promoteur P_{mxaF} qui exprime le gène GFP.

Le promoteur P_{mxaF} est représenté en gris. La partie gris foncé est la partie du promoteur qui a été gardé et la partie en gris pâle est la partie qui a été tronquée, soit la partie juste après le +1 qui est représenté en rouge. L'enzyme AflII est représentée en rose et l'enzyme EcoRI en jaune. La séquence du gène GFP est représentée en vert. Les sites d'hybridation des amorces sont représentés avec des fléchés.

3.1.4 Clonage de la version tronquée du promoteur P_{mxaF}

La version longue du promoteur présent sur le plasmide initial PCM110-GFP a été supprimée par digestion enzymatique avec AflII et EcoRI comme ci-dessous (voir figure

9). Une vérification sur gel d'agarose 1% a été nécessaire ainsi qu'une purification sur gel pour obtenir l'échantillon du nouveau plasmide digéré.

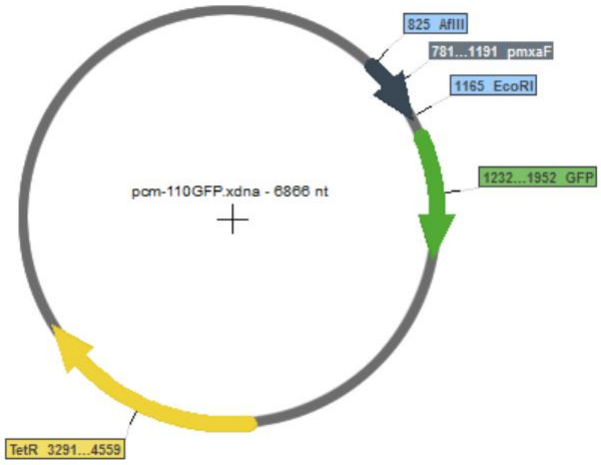


Figure : Plasmide pCM110-GFP avec le promoteur P_{mxaF} qui exprime le gène GFP.

Le graphique montre les sites de coupure des enzymes AflII et EcorI afin de supprimer le promoteur présent.

Afin de relier le nouveau plasmide et le promoteur tronqué, une ligation a été nécessaire. La réaction de ligation contient 1 µl tampon T4 ligase 10x, 1 µl T4 ligase, et 8 ul mélange promoteur tronqué et plasmide pour un ratio 3 pour 1 pour un volume finale de 10 µl. La ligation s'est faite à 16°CO/N.

3.1.5 Transformation de *Escherichia coli* DH5α

La transformation a été effectuée en mélangeant 10 µl du tube de ligation avec 50 µl de cellules compétentes *E. coli* DH5 α compétente C2987 de chez NEB, le tube a été mis sur glace pendant 30 min, puis 45 secondes à 42°C. Après avoir ajouté 800 µl de milieu SOC, il a fallu laisser agiter pendant 1 heure. Puis en étaler 20 à 200 µl sur gélose LB avec l'antibiotique de sélection tétracycline à 10 µg/ml et laisser incuber toute la nuit à 37°C. Le lendemain, quelques colonies ont été repiquées, puis vérifiées par PCR sur colonies. Deux amorces ont été utilisées : une amorce sens

5’CAGCCAAGCTGATCCATATGT et une amorce antisens 5’CCAGTAGTGCAGATGAACTT. La Taq DNA polymérase a été employée dans un une thermocycler pour PCR T100 pour BIO-RAD. Le programme de PCR était : 94 °C pour 10 min (activation de l’enzyme), puis 30 cycles de 94 °C pour 30 s, 57 °C pour 30 s, puis une élongation de 72 °C pour 30 s, et finalement une élongation finale de 72 °C pour 5 min. Le produit de PCR est ensuite analysé sur gel d’agarose 1,5% pour voir si l’insert est présent dans les colonies. Le plasmide a ensuite été extrait d’une colonie positive et comparé sur gel d’agarose avec le plasmide non tronqué puis envoyé au séquençage au Centre d'innovation Génome Québec et Université McGill pour vérification.

3.1.6 Préparation de cellules compétentes de *M. extorquens* et transformation par électroporation

Des cellules compétentes de *M. extorquens* ont été préparées selon la méthode de Tayoma *et al* (Toyama *et al.*, 1998). Les cellules ont été cultivées dans le milieu CHOI contenant 0,5% (v/v) de méthanol jusqu’à ce que la culture atteigne une D.O 600 nm entre 0,6 et 0,8. Les cellules ont été récoltées par centrifugation (10000 g, 10 min, 4°C) et lavées trois fois avec une solution stérile glacée de glycérol 10% (v/v). La suspension cellulaire a été concentrée 10 fois dans 10% de glycérol, et distribuée dans des aliquotes conservées à -80°C. Exactement 40 µl de cellules électro-compétentes ont été mélangées avec une suspension d'ADN plasmidique (500 ng) dans une cuvette à electroporation puis gardées sur glace pendant trois minutes. L’électroporation a été réalisée en utilisant un Gene Pulser (Bio-Rad) avec les paramètres suivants : 3000 V, 200Ω et 25 uF pour une force finale 12,5 kV cm^{-1}. Après que les cellules aient été pulsées, 20 ml de milieu CHOI et 0,5% de méthanol ont été ajoutés à la cuvette immédiatement. La suspension cellulaire est ensuite transférée dans un flacon Erlenmeyer et incubée à 30°C pendant 6 heures. Les clones transformés ont été sélectionnés sur des géloses CHOI + méthanol contenant de la tétracycline à 10 µg/ml à 30 ºC pendant 5 jours.

3.1.7 Tester l’expression de GFP

Quatre clones ont été sélectionnés et mis en culture dans du milieu CHOI + méthanol à 30 °C et en agitation continue pendant 24 heures. Leur fluorescence a été déterminée d'abord en mettant les flacons sous une longueur d'onde de 254 nm pour détecter la fluorescence, ensuite un clone positif a été retenu puis retourné en culture pendant 72 heures. L'expression de la fluorescence a été détectée par le fluoromètre Cytofluor 2300 System (Millipore) sous excitation et émission de longueur d'onde à 485 nm et 530 nm tout en prenant les D.O 600 nm après chaque mesure de fluorescence.

3.2 Deuxième objectif : Tester le sARN sur le gène rapporteur GFP

Une souche de *M*. *extorquens* contenant le gène GFP a été utilisée (Y. J. Choi *et al.*, 2006b) et des sARN contre GFP ont été construits. il a donc fallu tester si les sARN ont la capacité d'inhiber les gènes dans *M. extorquens*. Pour ce faire, des souches de cette dernière ont été utilisées. Une souche *M. extorqens* GFP5 issue de l'étude de Choi Y.J. et al (Y. J. Choi *et al.*, 2006b) et une souche contenant le plasmide pCM110-GFP (voir figure 7). Dans les deux cas les promoteurs permettent d'exprimer GFP. Les sARN contre la GFP ont été réalisé selon la figure 10.

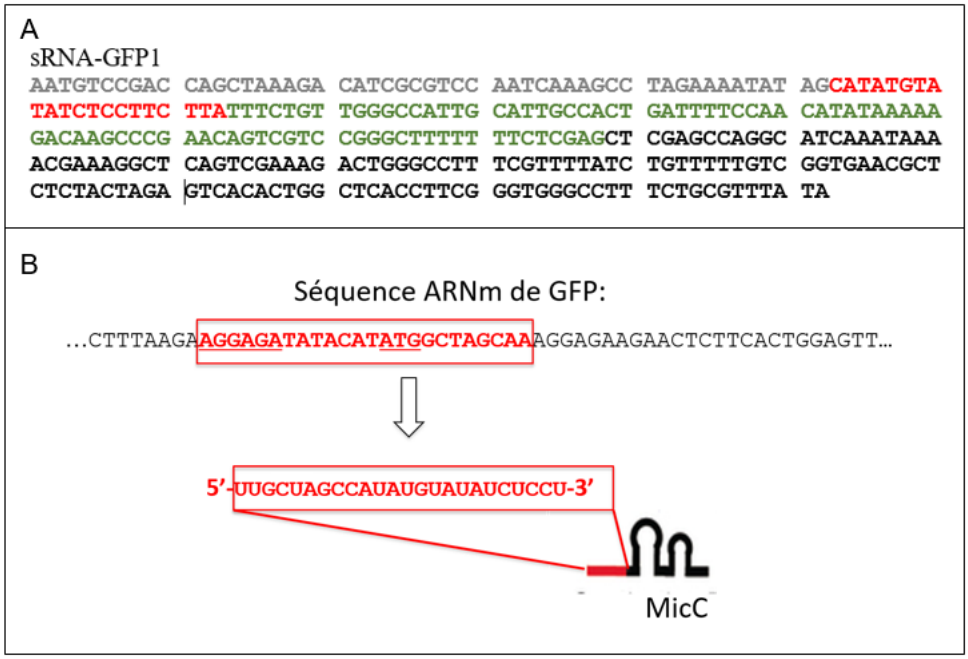


Figure : Construction du sARN

(A) La partie en rouge correspond donc à la région qui va se lier à la cille. En gris le promoteur tronqué P_{mxaF}, en vert la partie qui est originaire de *micC* pour le recrutement de la protéine Hfq et la partie en noir correspond au terminateur transcriptionel T1/TE. (B) La figure démontre la manière que les sARN contre la GFP sont formé. La partie en rouge correspond à la liaison avec la cible. Cette région comprend le plus souvent le Shine-Dalgarno et l'ATG

3.2.2 Assemblage des sARN par PCR d'assemblage

Quatre types de sARN ont été construits. Trois d'entre eux sont spécifiques au gène rapporteur GFP et le dernier est un sARN témoin qui n'est pas supposé s'hybrider à la cible (ni à aucun autre ARN de *M. extorquens*) (voir figure 12). Le gène ici choisi à inhiber est pour prouver la preuve de concept qu'il est possible d'utiliser la stratégie des sARN sur *M. extorquens*. La partie de *micC* qui contient le terminateur contient 219 pb. La séquence complémentaire à la cible contient 21 pb. Le promoteur fait 242 pb. Ceci donne un amplicon PCR complet de 482 pb pour chaque sARN (voir figure 11 pour un exemple).

ACCGAATTAG CTTGCATGCC TGCAGGTCGA CTCTAGATCA CCTCCTTAAG CTTCCCGCTT
GGTCGGGCCG CTTCGCGAGG GCCCGTTGAC GACAACGGTG CGATGGGTCC CGGCCCCGGT
CAAGACGATG CCAATACGTT GCGACACTAC GCCTTGGCAC TTTTAGAATT GCCTTATCGT
CCTGATAAGA AATGTCCGAC CAGCTAAAGA CATCGCGTCC AATCAAAGCC TAGAAAATAT
AGCATA TGTATATCTC CTTCTTATTTCTGT TGGGCCATTG CATTGCCACT GATTTTCCAA
CATATAAAAA GACAAGCCCG AACAGTCGTC CGGGCTTTTT TTCTCGAGCT CGAGCCAGGC
ATCAAATAAA ACGAAAGGCT CAGTCGAAAG ACTGGGCCTT TCGTTTTATC TGTTTTTGTC
GGTGAACGCT CTCTACTAGA GTCACACTGG CTCACCTTCG GGTGGGCCTT TCTGCGTTTA
TA

Figure : Exemple d'une séquence complète du sARN ainsi que le promoteur

La séquence en gris représente le promoteur P_{mxaF}. Le bleu est le +1, la partie en rouge est la partie complémentaire à la cible et la partie non surlignée correspond au *micC*. La partie de *micC* qui contient le terminateur T1/TE contient 219 pb. La séquence complémentaire à la cible contient 21 pb. Le promoteur fait 242 pb. Ceci donne un amplicon PCR complet de 482 pb pour chaque sARN.

Figure : Représentation des séquences

La séquence de GFP contient le Shine-Dalgarno SD et le codon d'initiation de la traduction. La séquence surlignée en jaune correspond à la région codante et la séquence ciblée est en gras. La construction de GFP1 cible le codon d'initiation ainsi que le SD. La construction de GFP2 cible le SD et une région de la partie codante. La construction de GFP3 cible uniquement la région codante. La construction de sARN témoin ne cible aucun gène en particulier. Ceci a été prouvé par RAST et blast.

Les conditions pour toutes les PCR sont les même excepté pour la température d'hybridation qui diffère selon les amorces. Cette dernière a été déterminée pour chaque étape en faisant un gradient de température. Nous avons utilisé 2,5 µl de chacune des amorces d'une concentration de 10 mM, auxquelles est ajouté 5 µl de tampon de Pfu 10X, 1 µl de dNTP à 10mM, 1µl de MgSO4 à 100 mM, 1 µl de Pfu à 1U/µl et on complète avec de l'eau stérile et les matrices d'ADN (1 µl du produit de PCR d'avant) pour obtenir un volume final de 50 µl. Le produit de chaque réaction PCR est vérifié sur un gel d'électrophorèse avec 1% d'agarose et du bromure d'éthidium, et la migration effectuée à 400 mA et 100 V. Un marqueur de taille 1 kb DNA ladder de NEB est ajouté à chaque électrophorèse afin d'analyser la taille des bandes obtenues. Le programme de PCR était : 95 °C pour 3 min (activation de l'enzyme), puis 30 cycles de

95 °C pour 30 s, température pour chaque étape à 30 s, puis une élongation de 72 °C pour 30 s, et finalement une élongation finale de 72 °C pour 5 min.

Toute la construction par assemplage de PCR a nécessité des oligonuclétides qui se chevauchent (voir figure 13).

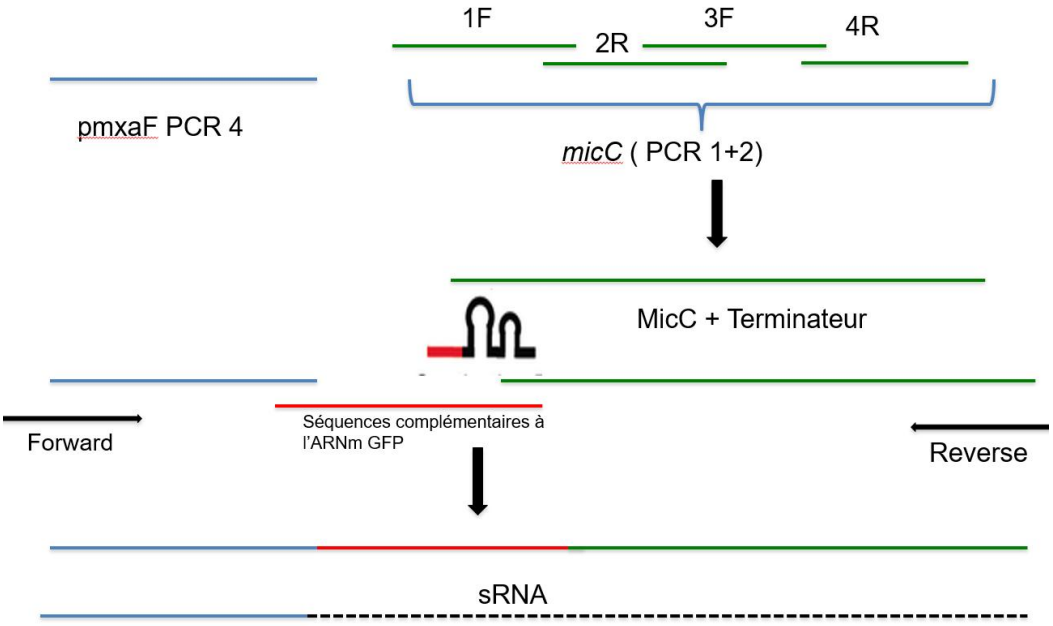


Figure : PCR d'assemblage pour la constrution du sARN.

Les trois premières PCR consistent en la construction de *micC* (en vert). Les oligonucléotides se chevauchent par les bouts. Une autre PCR a été de rajouter la partie complémentaire à la cible de GFP (en rouge). Les bouts des oligonucléotides se chevauchent. L'étape d'après a été de rajouter le promoteur tronqué P_{mxaF}, puis de faire une PCR finale pour amplifier le tout.

3.2.2.1 Construction de *micC*

Pour construire le sARN au complet (voir figure 11 et 13), la première PCR a été de construire la partie correspondante à *micC*. Ceci a nécessité l'assemblage de 5 différents oligonucléotides synthétiques dont les extrémités sont complémentaires les unes aux autres pour qu'elles puissent se chevaucher.

Selon le gradient de température, le Tm approprié est de : 55℃.

MicC1-F	TTTCTGTTGGGCCATTGCATTGCCACTGATTTTCCAACATATAAAAAAACAAACA
MicC2-R	GGCTCGAGCTCGAGAAATACAAACAGACCAGATTGTCTGTTTGTTTTTTTATATGTTGGAAAATC

MicC3-F	TTGTATTTCTCGAGCTCGAGCCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGG
MicC4-R	AGCGTTCACCGACAAAAACAGATAAAACGAAAGGCCCAGTCTTTCGACTGAGC
MicC5-R	AGCGTTCACCGACAAAAACAGATAAAACGAAAGGCCCAGTCTTTCGACTGAGC

La deuxième PCR a été faite afin de rajouter l'enzyme de restriction SacII et d'amplifier la partie *micC*. Le Tm approprié est de 55℃.

Les amorces qui ont été utilisés pour cette deuxième PCR sont :

MicC1-F	TTTCTGTTGGGCCATTGCATTGCCACTGATTTTCCAACATATAAAAAAACAAACA
MicC-SacII-R	AAAGGATCGATTATAAACGCAGAAAGGCCCACCCGAAGGTGAGCCAGTG

3.2.2.2 Rajout de la séquence complémentaire à la cible GFP

La suite a été d'effectuer une troisième réaction PCR afin de rajouter la partie qui est spécifique au gène de GFP. Les oligonucléotides contiennent donc les séquences complémentaires à la cible entourées des paires de bases pour la superposition avec *micC* et le promoteur (voir figure 13). Trois réactions PCR différentes ont été faites afin d'avoir trois sortes d'ARN. Le Tm approprié est de 58,4℃. Les amorces « sens » (forward) sont :

GFP1-F	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGCATATGTATATCTCCTTCTTATTTCTGTTGGGCCATTGCA
GFP2-F	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGGCTAGCCATATGTATATCTCTTTCTGTTGGGCCATTGCA
GFP3-F	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGCTTCTCCTTTGCTAGCCATTTTCTGTTGGGCCATTGCA
sARN-contrôle	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGTAGCTAGCTAGCTAGCTAGCTAGCTTTCTGTTGGGCCATTGCA

L'amorce « antisens » (reverse) est

MicC-SacII-R	AAAGGATCGATTATAAACGCAGAAAGGCCCACCCGAAGGTGAGCCAGTG

3.2.2.3 Rajout du promoteur P_{mxaF}

La quatrième étape a été de rajouter le promoteur tronqué issu du premier objectif, il a donc fallu faire une autre réaction où est rajouté le promoteur plus le produit de PCR déjà obtenu précédemment (voir 3.1.3). Cette étape finale de l'assemblage a nécessité

d'essayer plusieurs conditions différentes, tant dans le nombre de cycle que la température.

Les conditions finales de PCR sont :

Tm : 58,4℃

Les amorces qui ont été utilisées dans ce cas-là sont :

P_{mxaF} -F	ACCGAATTAGCTTGCATGC
MicC-SacII-R	AAAGGATCGATTATAAACGCAGAAAGGCCCACCCGAAGGTGAGCCAGTG

3.2.3 Précipitation des inserts

La construction des ARNs est suivie par une précipitation à l'éthanol afin de concentrer et de purifier le produit de PCR final. Ceci nécessite le rajout de 0,1 volume d'acétate de sodium et de 2,5 fois volume d'éthanol froid à 100 % (120 µl pour 48 µl de solution) et garder le tout à -80℃ pendant la nuit. La séparation du culot et du surnageant par une centrifugation à 13000 g de 20 min permet d'obtenir l'ADN concentré qui est lavé avec 500 µl d'éthanol 70 % par une deuxième centrifugation à 13000 RPM pendant 2 min. Le culot ainsi obtenu est séché toute la nuit afin d'éliminer les résidus d'éthanol. Le culot sec est finalement resuspendu dans 20 µl d'eau. Ceci permet d'obtenir des échantillons avec une concentration élevée d'ADN.

3.2.4 Insertion chromosomique du vecteur d'expression des sARN dans le chromosome.

L'insertion des sARN a été faite dans un plasmide à transposon mini-Tn*7* qui permet d'intégrer l'insert chez les bactéries à Gram négatif dans le chromosome dans une région intergénique *att*Tn7 en aval du gène *glmS* (REF) (B. Koch *et al.*, 2001b). Ce plasmide contient les cassettes Tn7L et Tn7R ainsi que les gènes de résistance correspondant à la kanamycine (Km) et à la streptomycine (Sm) (B. Koch *et al.*, 2001b). Ce plasmide sera appelé dans ce projet pBKS2. L'utilisation de ce plasmide lors de la conjugaison nécessite l'aide d'un autre plasmide pUX-BF13, plasmide *help*er qui fournit les fonctions de transposition Tn*7* en *trans* (B. Koch *et al.*, 2001b). Ces plasmides nous

ont été fournis par l'équipe de Carlos Miguez au CNRC. L'intérêt d'utiliser des transposon Tn7 est de permettre à l'industrie d'éviter l'utilisation des antibiotiques à l'échelle industrielle.

3.2.4 Digestion des sARN et du plasmide

Des souches *E. coli* DH5α contenant le plasmide pBKS2 ont été mises en culture O/N dans du milieu LB à 37°C avec une agitation continue afin de faire une extraction de plasmide par le kit de bio basic « EZ-10 spin column ».

Pour digérer le plasmide pBKS2, les enzymes de restriction utilisées étaient : AflII et SacII (NEB). Pour la digestion du plasmide et de l'insert, le mélange de réaction était constitué de 1 ug d'ADN, 1 µl de chaque enzyme de restriction, 2.5 µl de tampon Cutsmart, ainsi que l'eau pour un volume final de 25 µl. La réaction dure 2 heures à 37°C. Une ligation a ensuite été effectuée selon la méthode décrite précédemment (Section 3.1.5).

3.2.4.1 Transformation du plasmide pBKS2 modifié avec les inserts de sARN dans *Escherichia coli*

Se référer à la section 3.1.5. L'antibiotique de sélection utilisé est la kanamycine à 40 µg/ul.

3.2.4.2 Transformation du plamide pBKS2 modifié dans *Escherichia coli* χ7213

Le plasmide en main qui sera nommé pRI02, il fallait le transférer dans une autre souche permettant d'effectuer une conjugaison avec *M*. *extorquens*. Cette souche est *E. coli* χ7213 (SM10λ pir Δasd) (Gao *et al.*, 2014) qui nécessite l'acide diaminopimelique (DAP) pour sa survie du fait d'une mutation du gène *asd*. Ce gène code pour l'aspartate-β-semialdehyde déshydrogénase, une enzyme clé dans la biosynthèse du DAP, intermédiaire essentiel des voies métaboliques de la lysine, de la méthionine et de la thréonine (Hoang *et al.*, 1997). Cette souche a été choisie car étant donné qu'elle nécessite le DAP, il sera plus facile de s'en débarrasser lors de la conjugaison pour ne garder que les bactéries *M*. *extorquens* (section 3.2.4.3) en enlevant le DAP du milieu.

Le protocole pour la transformation est le même que celui décrit dans le premier objectif, section 3.1.5.

3.2.4.3 Conjugaison avec *M. extorquens*

La conjugaison a été effectuée avec un système à trois composantes incluant la souche donneuse χ7213 qui contient le plasmide pRI03 et la souche χ7213 qui contient le plasmide *helper* pUX-BF13, de même que la souche *M*. *extorquens* AM1 GFP5 ou une souche AM1 contenant le plasmide pCM110-GFP. La méthode a été inspiré selon Choi et Schweizer qui l'ont appliqué sur *Pseudomonas aeruginosa* (K. H. Choi *et al.*, 2006a), tout en rajoutant quelque modifications. Tout d'abord, il faut lancer les cultures χ7213 O/N dans du milieu LB contenant 50 µg/ml de DAP. La souche contenant le plasmide nécessite 40 µg/ml Km et la souche contenant le plasmide *helper* pUX-BF13 100 µg/ml ampiciline. Les concentrations d'antibiotiques pour ce plasmide ont été obtenues après avoir tester plusieurs concentrations différentes. Les souches *M*. *extorquens* sont mises en culture dans le milieu CHOI avec 0,5% de méthanol et la tétracycline à 10 µg/ml pour la souche contenant le plasmide pCM-110 GFP. Le lendemain, il faut préchauffer tout le matériel utilisé à 37℃. Par la suite, nous avons prélevé 0,1 ml de chaque culture dans un microtube contenant 300 µl de LB et 300 µl CHOI et centrifuger pendant 2 min à 7000 x *g* à température ambiante. Nous avons récupéré par la suite le culot et l'avons resuspendu dans 500 µl CHOI et 500 µl LB pour centrifuger pendant 2 min à 7000 x g. Le culot ainsi obtenu est resuspendu dans 15 µl de CHOI et 15 µl de LB. Les 30 µl sont ensuite déposés sur une gélose LB ne contenant que 0,5 g/l de NaCl. La gélose est placée pendant 24h à 37℃ puis pendant 48h à 30℃. la deuxième phase est de récupérer le tapis bactérien et de le mélanger avec 1 ml de solution de PBS et 0,1% de gélatine. Il faut bien vortexer le mélange et l'étaler sur une gélose de CHOI avec 0,5% de méthanol et 40 µg/ml Km et l'antibiotique approprié selon la souche de *M*. *extorquens*. Nous avons placé la gélose de 3 à 5 jours à 30℃. Les colonies sont finalement testées afin de tester l'intégration chromosomique de l'insert (promoteur P_{mxaF} +sARN contre GFP).

Les clones de *M. extorquens* sont par la suite testés par PCR avec des amorces appropriées PdhaTF [5'-CATCGCGATTGTCGATTCGG-3'] et PglmSR [5'CTGAAGGAAATCAGCTACATC-3'].

3.2.5 Tester l'inhibition de la fluorescence

La fluorescence a été testée avec l'appareil Typhoon FLA 9500 de GE Healthcare Life Sciences dans des microplaques de 48 puits à des DO600 différentes.

3.3 Troisième objectif : Inhiber les gènes cibles dans les voies métaboliques par les sARN pour optimiser la production d'acide succinique

3.3.1 Construction des sARN spécifiques aux gènes cibles

Le dernier objectif a été de trouver les gènes les plus pertinents et de construire des sARN à l'aide de leurs séquences trouvées sur le site RAST. Le choix des gènes a été fait selon les voies métaboliques expliquées dans la section 1.6.3.1, figure 4. L'idée est donc de favoriser la production d'acide succinique en forçant une seule voie et en essayant le plus possible d'éliminer toutes les autres voies qui divergent de celles qui mènent à la production de l'acide succinique.

Premièrement, afin d'éviter la grande perte de carbone dans la production de CO_2, les sous-unités du gène *fdh* ont été ciblées. Une étude a en effet démontré que le fait de cibler ce gène n'est pas létal pour *M. extorquens* (Chistoserdova *et al.*, 2007).

Dans le cycle du TCA, l'un des gènes les plus évidents à cibler est le gène *sdh* responsable de la conversion de l'acide succinique en fumarate. Les gènes *fumC* et *mdh*, qui sont respectivement responsable de la conversion du fumarate en malate et puis du malate en oxaloalacétate ont aussi été ciblé. Bien qu'en principe, il suffise de supprimer *sdh* pour permettre l'accumulation d'acide succinique, comme les sARN

répriment, sans toutefois être des *knockout*, des sARN additionnels pourraient aider à avoir une accumulation plus efficace.

Dans le cycle de sérine, une voie divergente mène au cycle de pentose phosphate par le 2-phosphoglycérate 2PG. Tous les gènes impliqués tel que la phosphoglycérate mutase *pgm* sont de bons candidats à cibler.

En ce qui concerne le cycle de PHB et l'EMC, l'AcAc-CoA est convertit en hydoxybutyryl-CoA (OHB-CoA), qui est le point d'embranchement de ces deux cycles. Il apparaît plus avantageux de réduire au maximum la production de PHB en ciblant la PHB synthase PhaC qui convertit l'OHB-CoA en PHB.

La façon de construire les sARN à tester est la même que celle décrite dans le deuxième objectif. Voir en annexe 1 les oligonucléotides correspondant à chaque gène. Au total 70 sARN différents ont été conçus et construits.

3.3.2 Mesure de la concentration d'acide succinique par HPLC

L'acide succinique et d'autres acides tricarboxyliques ont été quantifiés et détectés par HPLC-UV selon la méthode décrite par Zheng *et al*. 2012 (Zheng *et al.*, 2012) . La colonne utilisée est une échangeuse d'ions ICSep ICE-ION-300 de Transgenomic à une température de 60°C en utilisant de l'H_2SO_4 à 0.005N comme phase mobile à un débit de 0.5 ml/min. Tous les échantillons ont été centrifugé à 13000 g pendant 10 minutes et filtrés avec des filtres de 0,2 µm avant les analyses. Les concentrations ont été calculé en utilisant une courbe standard.

3.3.3 Buvardage Northern

Le buvardage Northern a été fait afin de mesurer l'expression des sARN dans les bactéries. L'ARN total a été extrait en utilisant le kit Bacterial RNA Kit de Omega bio-tek selon les instructions du manufacturier. L'ARN total est par la suite séparé dans un gel acrylamide dénaturant 8M urée, TBE (Tris, Borate, EDTA), 6% (19:1 acrylamide:bisacrylamide) puis transféré sur une membrane de Nylon (N+). La

membrane est ensuite mise dans une bouteille avec le tampon d'hybridation (5X SSC, 5X Denhardt's reagent, 1% SDS, 100 µg/ml d'ADN de saumon) et la sonde marqué préalablement au ^{32}P O/N à 65℃. Par la suite la membrane a été lavée avec un tampon de lavage à 65℃. les sondes utilisés sont un oligonucléotide complémentaire à une région du sARN ainsi que deux contrôles soit l'ARN 5S et le tmARN.

4. RÉSULTATS

4.1 Premier objectif : Tester un bon promoteur pour induire l'expression du sARN

Cet objectif avait pour but de raccourcir le promoteur P_{mxaF} de façon à ce que le sARN soit juste après le +1 (site d'initiation de la transcription) (Voir figure 14-A). Pour cela, j'ai tronqué le promoteur en utilisant un gène rapporteur GFP pour vérifier si le promoteur tronqué est reste fonctionnel. La figure 11 montre le fragment qui été amplifié par PCR qui corresponds au promoteur tronqué P_{mxaF} * qui a une longueur de 242 pb. Ceci confirme que le promoteur a été tronqué car la version longue du promoteur fait 411 pb.

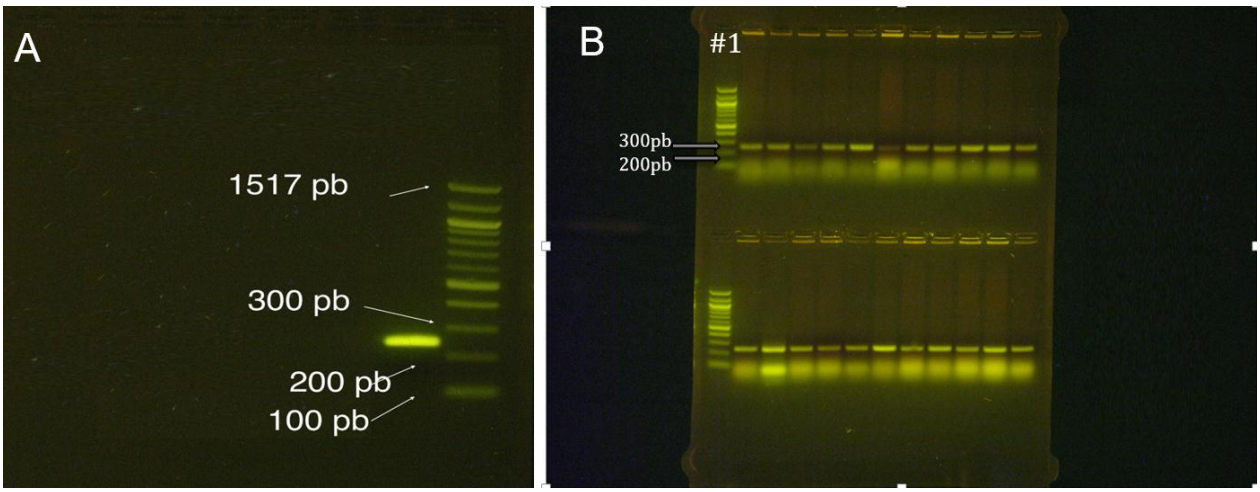


Figure : Tronquage du promoteur P_{mxaF}.

(A) Électrophorèse de la région promotrice tronquée. Le gel contient 1,5% d'agarose. Le puits à droite contient le standard moléculaire all blue 100 pb DNA. Poids moléculaires correspondants : 1517, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 pb. Le

puits à gauche contient le produit de PCR du promoteur tronqué P_{mxaF} * 242 pb et 2 ul de tampon de migration. (B) Électrophorèse de la région promotrice tronquée des clones après transformation.

Après avoir tronqué le plasmide pCM110-GFP, pour supprimer le promoteur P_{mxaF} déjà présent (340 pb ont été coupé) (voir figure 10 et 15), une ligation a été effectuée avec *PmaxF** qui correspond donc au nouveau promoteur tronqué. Une fois le nouveau plasmide ligué obtenu, donc pCM-110-gfp avec le promoteur P_{mxaF}* tronqué qu'on a appelé pRI01, une transformation a été faite chez *E. coli* et les clones ont été vérifiés (figure 14-B).

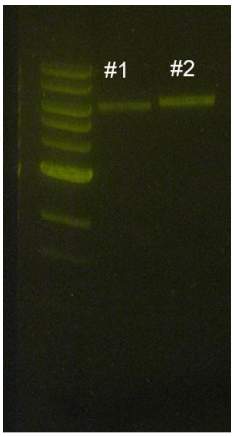


Figure : Digestion du plasmide pCM110-GFP.

Électrophorèse du plasmide pCM110-GFP. Le puits #1 contient le plasmide digéré avec les enzymes AflII et EcorI et qui fait 6526 nt. Le puits #2 contient le plasmide avec le promoteur P_{mxaF} qui fait 6866 nt.

Après l'extraction du plasmide d'un clone choisi et après validation du séquençage, l'électroporation chez *M. extorquens* a été effectué, il a fallu tester l'expression de la GFP en comparant la fluorescence avec *M. extorquens* ayant le plasmide avec la version longue du promoteur (figure 16). La fluorescence est nettement moins forte chez les bactéries ayant le promoteur tronqué et a tendance à baisser le deuxième jour, tandis qu'elle a tendance à augmenter chez *M. extorquens* avec la version longue du promoteur. Toutefois cela montre que malgré le fait que le promoteur soit tronqué, il est toujours capable d'induire l'expression de GFP.

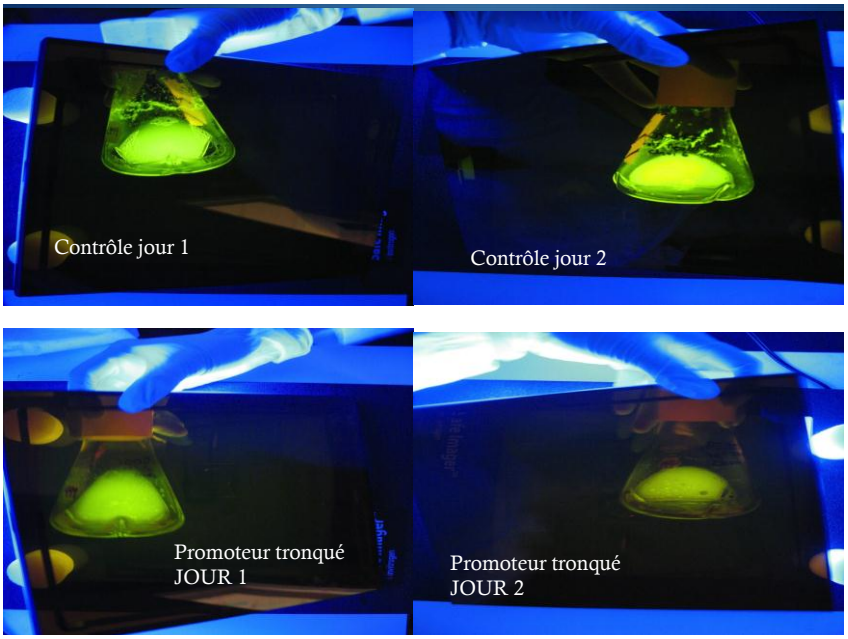


Figure : Efficacité du promoteur tronqué.

Un volume de 50 ml de cultures dans un flacon Erlenmeyer de 250 ml avec le milieu CHOI et 0,5% de méthanol en agitation continue à 30 ºC. Les figures montrent l'intensité de la fluorescence chez *M. extorquens* avec le plasmide contenant le promoteur tronqué et le promoteur non tronqué. Les photos sont prises le premier et le deuxième jour de l'incubation.

.

4.2 Deuxième objectif : Vérifier l'effet inhibiteur de sARN synthétiques sur l'expression du gène rapporteur GFP

Le deuxième objectif a été de tester 4 sortes de sARN induit par le promoteur P_{mxaF}* tronqué sur le gène GFP afin de vérifier leurs effets inhibiteurs. La première partie de cet objectif est la construction des sARN servant à réprimer GFP. Nous avons fait des gradients de température sur des étapes du PCR d'assemblage pour définir la bonne température d'hybridation. La figure 17 montre la séquence finale du sARN-GFP1 que nous avons conçu.

.

ACCGAATTAG CTTGCATGCC TGCAGGTCGA CTCTAGATCA CCTCCTTAAG CTTCCCGCTT
GGTCGGGCCG CTTCGCGAGG GCCCGTTGAC GACAACGGTG CGATGGGTCC CGGCCCCGGT
CAAGACGATG CCAATACGTT GCGACACTAC GCCTTGGCAC TTTTAGAATT GCCTTATCGT
CCTGATAAGA AATGTCCGAC CAGCTAAAGA CATCGCGTCC AATCAAAGCC TAGAAAATAT
AGCATA TGTATATCTC CTTCTTATTTCTGT TGGGCCATTG CATTGCCACT GATTTTCCAA
CATATAAAAA GACAAGCCCG AACAGTCGTC CGGGCTTTTT TTCTCGAGCT CGAGCCAGGC
ATCAAATAAA ACGAAAGGCT CAGTCGAAAG ACTGGGCCTT TCGTTTTATC TGTTTTTGTC
GGTGAACGCT CTCTACTAGA GTCACACTGG CTCACCTTCG GGTGGGCCTT TCTGCGTTTA TA

Figure : Séquence finale de la construction sARN GFP1

La partie en gris représente le promoteur, la partie en bleu est le +1, la partie en rouge est la région complémentaire à la cible et la région vert représente la partie *micC* suivi du terminateur T1/TE.

La figure 18 montre le résultat de *micC* final qui fait 219 paires de base ainsi que 11 bases en extra qui comprennent l'enzyme de restriction SacII. Une température d'hybridation idéale de la PCR de 58,4 ºC a été trouvée grâce à une PCR faite au préalable avec un gradient de température.

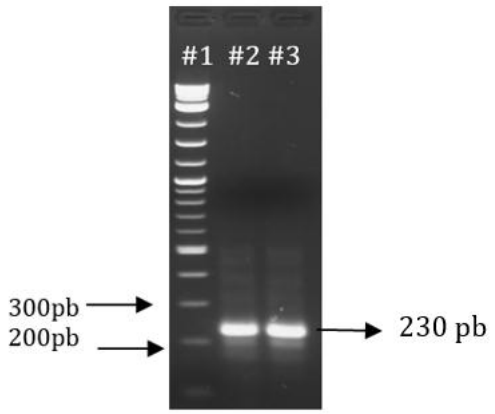


Figure : Électrophorèse de l'amplicon *micC* avec le terminateur.

Le puits #1 contient le standard moléculaire 10 Kb DNA Les autres puits correspondent à la migration de *micC* qui fait 230 pb.

Par la suite, nous avons ajouté la partie complémentaire à la cible (voir aussi matériel et méthode section 3.2.2.2). La figure 19 montre le résultat de la PCR sur gel qui fait 277

pb qui correspond à 240 pb GFP+*micC*, 26 pb de la région qui se chevauchent avec le partie du P_{mxaF} *, et 11 bases en extra qui comprennent l'enzyme de restriction SacII.

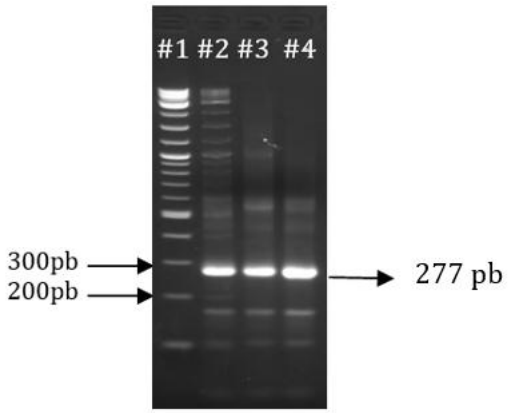


Figure : Électrophorèse de l'amplicon GFP+*micC.*

Le puits #1 contient le standard moléculaire 10 Kb DNA Les autres puits correspondent à la migration du GFP+*micC* qui fait 277 pb en totale.

Nous avons ensuite ajouté le promoteur P_{mxaF} * amplifié au préalable. La température idéale de 55,3 ºC a été trouvée grâce à une PCR à gradient de température pour faire les PCR subséquents. La dernière étape a été de rassembler le tout, soit le promoteur et la partie complémentaire à la cible et la partie *micC* ainsi que le terminateur. Cette partie a été la plus difficile à obtenir par PCR. Nous avons effectué plusieurs gradients de température et changé plusieurs paramètres, dont le nombre de cycle. Finalement il a été possible d'obtenir le produit de PCR final voulu avec une température de 55,8 ºC et 25 cycles (Fig. 20). La taille est de 494 qui comprennent 11 pb de plus pour l'enzyme SacII.

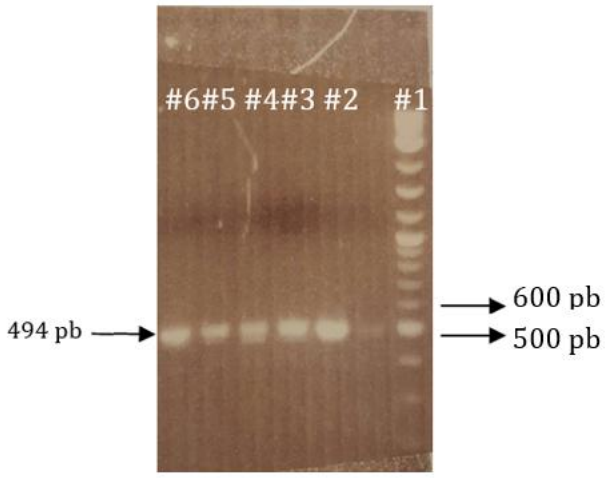


Figure : Électrophorèse du sARN-GFP1, sARN-GF2, sARN-GFP3

Le puits #1 contient le standard moléculaire 10 Kb DNA Les autres puits correspondent à la migration des produits de PCR de l'assemblage de sARN finale de 494 pb.

Les amplicons des sARN finaux ainsi obtenus pour les trois versions ciblant GFP, ils ont été ligués dans le plasmide pBKS2. La figure 21 est une électrophorèse après une PCR sur colonies résultant de la transformation sur E. coli (voir matériels et méthodes section 3.4.2.1). La plupart des colonies ont intégrés le plasmide. Toutefois, après avoir envoyé au séquençage les plasmides purifiés au Centre d'innovation Génome Québec et Université McGill, il a été impossible d'obtenir la version GFP1 (voir 3.2.2).

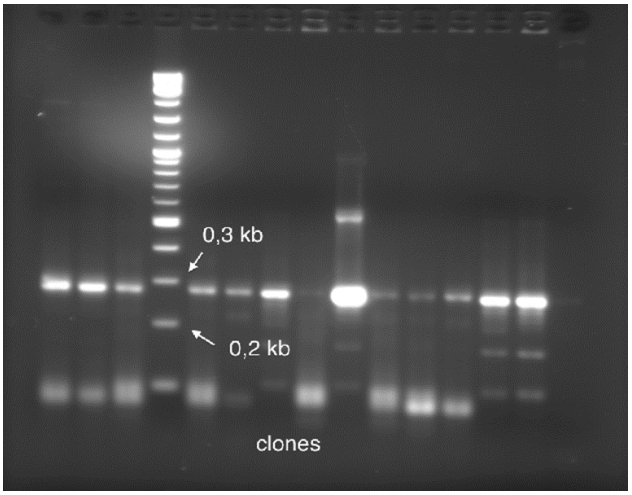


Figure : Électrophorèse de l'insert du sARN chez les clones *E. coli*.

Le gel montre que la plupart des clones ont intégré le plasmide. La région amplifié fait 260 pb et correspond à une partie de l'insert.

Les plasmides pBKS2 contenant les autres versions de sARN GFP2 et GFP3 et contrôle ont été appelés respectivement pRI02, pRI03, pRI04 et ont été transformés dans la souche χ7213 pour être conjugué à *M*. *extorquens*. La fluorescence des souches de *M*. *extorquens* ainsi obtenue a été testée et comparée à celle des souches sauvages qui ne contiennent pas le sARN. On s'attend donc à ce que le sARN affecte l'expression de la fluorescence négativement. La figure 22 montre la fluorescence en fonction de la croissance chez la souche de *M. extorquens* qui contient le gène GFP dans le chromosome de la bactérie GFP5, on voit bien qu'il y a une diminution de la fluorescence. Toutefois le contrôle qui correspond à une souche avec un sARN ne ciblant aucun gène, se retrouve avec la fluorescence affectée également. Des résultats similaires ont été obtenus avec la souche de *M. extorquens* qui contient le plasmide pCM110-GFP plutôt que la version chromosomique de GFP (Figure 23).

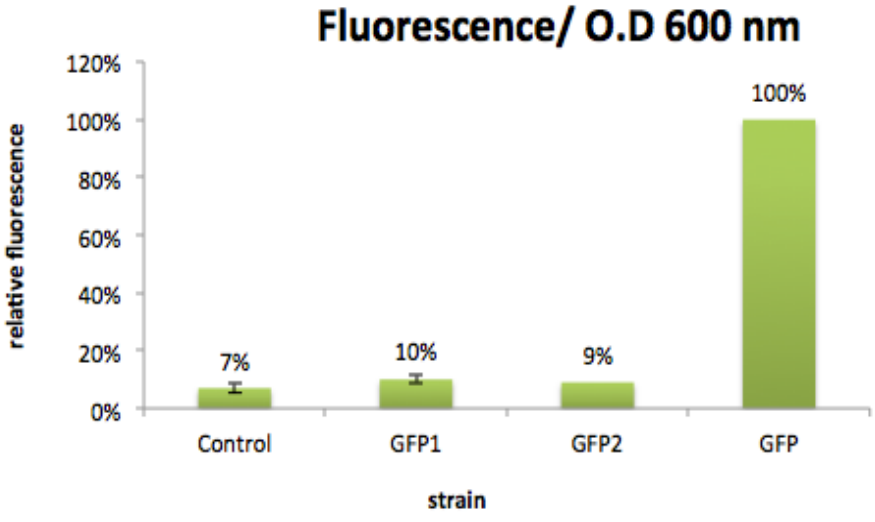


Figure : Fluorescence en fonction de la D.O chez *M. extorquens*

Les unités de fluorescence sont prises avec l'appareil Typhoon FLA 9500 de GE Healthcare Life Sciences avec un filtre de type LPB (510LP) et un laser ≥ 510, dans des microplaques de 48 puits. La souche de base utilisée ici est la souche qui contient le gène de GFP dans le chromosome de la bactérie et qui a été transformée avec les constructions indiquées. Le contrôle correspond à la souche possédant un sARN qui ne cible aucun gène, GFP1 et GFP2 correspondent à la souche contenant un sARN contre le gène GFP.

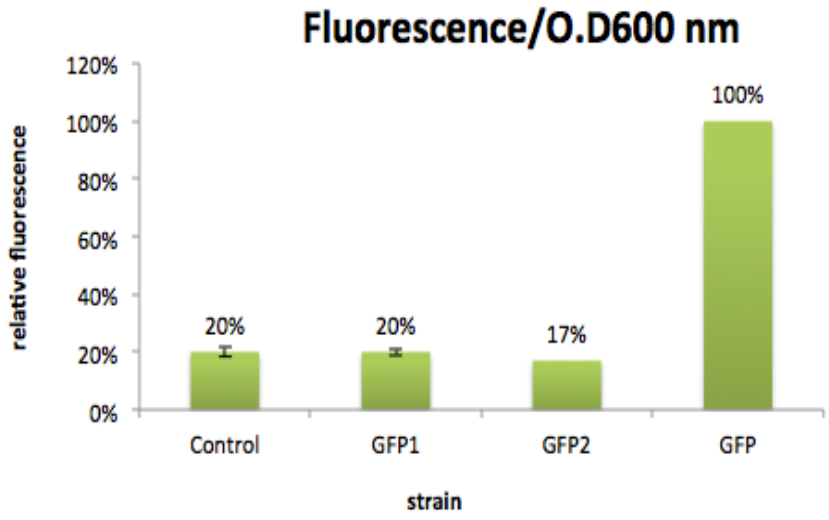


Figure : Fluorescence en fonction de la D.O chez *M. extorquens* :

Les unités de fluorescence sont prises avec l'appareil Typhoon FLA 9500 de GE Healthcare Life Sciences, avec un filtre de type LPB (510LP) et un laser ≥ 510 dans des microplaques de 48 puits. La souche de base utilisée ici est la souche qui contient le gène GFP dans le plasmide pCM-110 GFP. . Le contrôle correspond à la souche possédant un sARN qui ne cible aucun gène, GFP1 et GFP2 correspondent à la souche contenant un sARN contre le gène GFP.

4.3 Troisième objectif : Inhiber les gènes cibles dans les voies métaboliques par les sARN pour optimiser la production d'acide succinique

Le troisième objectif consistait à choisir les gènes cibles et construire leurs sARN correspondants en respectant la méthode citée plus haut. Étant donné les résultats

négatifs du deuxième objectif (il y'avait aussi une inhibition dans les sARN témoin), un seul sARN a été testé, celui qui cible le gène *sdhA* et *sdhB*, responsable de la conversion de l'acide succinique en fumarate. Après avoir mesuré la concentration de l'acide succinique dans le surnageant filtré, les souches obtenues ont été soumises à une extraction d'ARN pour un buvardage Northern. L'efficacité n'a pas pu être vérifiée car aucun acide succinique n'a été mesuré. La figure 24 montre l'expérience sur 4 souches de la souche sauvage modifiée par le sARN qui cible *sdhA* et *sdhB* (*sdhA1, sdhA2, sdhB1, sdhB2*) ainsi que la souche sauvage. Deux contrôles positifs ont été utilisés, le tm ARN et l'ARN 5S. Il a été impossible de détecter les sARN sdh par la sonde correspondante (Fig 24 A). Les contrôles positifs ont fonctionné car des bandes sont bien visibles (Fig. 24 B, et Fig. 24 C)

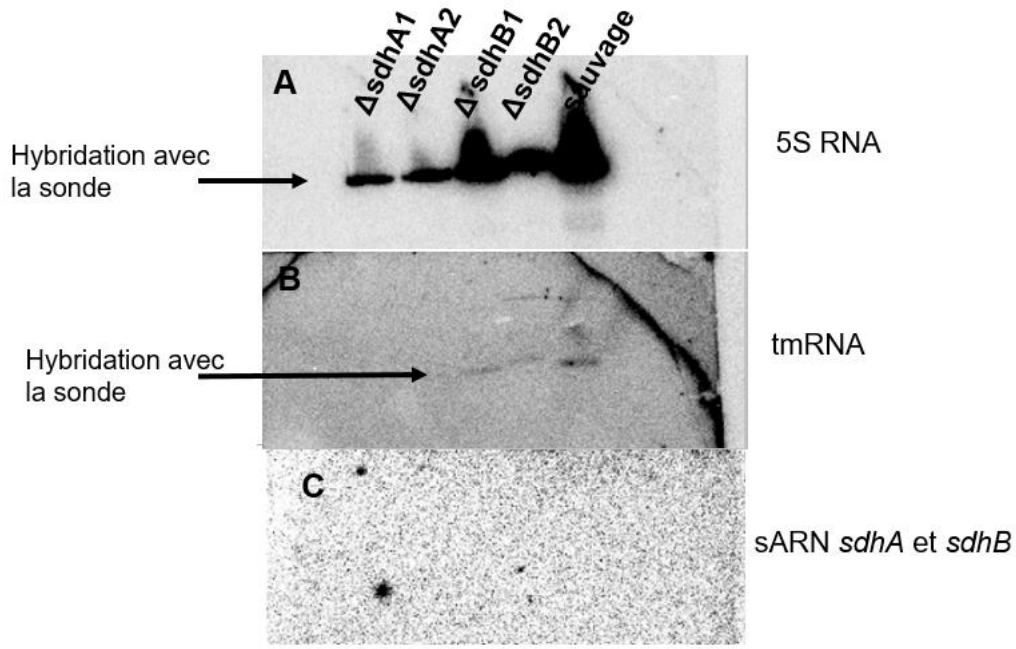


Figure : Northern Blot de l'expression des sARN dans les souches des sARN *sdhA* et *sdhB*

L'ARN total de cinq souches a été extrait en utilisant le kit Bacterial RNA Kit de Omega bio-tek selon les instructions du manufacturier. Les souches sont : la souche sauvage, ΔsdhA1 et ΔsdhA2 possèdent le sARN qui cible le gène sdhA, ΔsdhB1 et ΔsdhB2 possèdent le sARN qui cible le gène sdhB. 10 µARN total a par la suite été séparé dans un gel acrylamide dénaturant 6% puis transféré sur une membrane de Nylon (N+). La

membrane a ensuite été mise dans une bouteille avec le tampon d'hybridation et l'ADN marqué au ^{32}P O/N à 65℃. (A) Hybridation de la membrane avec la sonde de l'ARN 5S. (B) Hybridation de la membrane avec la sonde du tmRNA. (C) Hybridation de la membrane avec la sonde complémentaire aux sARN sdhA et sdhB

5. DISCUSSION

L'ingénierie métabolique et la biologie synthétique sont de plus en plus étudiées et exploitées. Depuis que Cohen & Boyer ont inséré le premier gène à l'intérieur d'une bactérie (Cohen *et al.*, 1973), il est devenu évident que ces microorganismes présentent un grand potentiel et peuvent dorénavant être utilisés pour la production de nombreux produits chimique ou pharmaceutiques. Néanmoins, des études poussées ont permis de réaliser que l'ingénierie métabolique ne se résume pas à l'insertion d'un gène surexprimé pour augmenter la production d'un métabolite donné. Une étude approfondie des voies métaboliques afin de trouver une combinaison idéale peut grandement améliorer la production du métabolite désiré (J. Nielsen, 2003).

Ce projet consistait donc à optimiser la production de l'acide succinique chez *M. extorquens* qui offre l'avantage économique de croître sur du méthanol. L'utilisation des sARN pour inhiber les gènes intéressants est une alternative pour améliorer la productivité sans *knock-outs* qui peuvent être désavantageuses pour l'industrie étant donné qu'il faudra alimenter la bactérie avec un autre métabolite pour maintenir la croissance. La méthode choisie s'est donc inspirée de l'étude de Dokyun Na et al (Na *et al.*, 2013). Leurs résultats ont indiqué que leur stratégie, basée sur les sARN, peut être utilisée pour l'ingénierie métabolique sur des souches non modifiées mais aussi sur des souches déjà modifiées (avec des knock-out par exemple) de façon à surproduire le métabolite désiré. L'équipe de Sang Yup Lee a montré une efficacité optimale avec 24 paires de bases dans la séquence responsable de la liaison avec la cible. Ceci étant suffisant pour assurer une haute affinité avec la cible choisie (Na *et al.*, 2013).

Toutefois, nous avons dû rajouter un promoteur fort qui puisse induire l'expression du sARN sans pour autant diminuer l'efficacité de liaison de la séquence voulue avec la cible choisie. En effet, la taille du sARN est très liée à son efficacité. Il a donc été décidé

d'y aller par étape en choisissant d'abord le bon promoteur et d'en éliminer les séquences en extra en 5' qui ont peu d'impact sur la fonction du promoteur ou l'expression du gène d'intérêt. Toutefois, on ne pouvait prédire si cela allait fonctionner ni quel impact cela aurait sur l'expression du gène modèle choisi, le gène rapporteur GFP pour développer la technologie ; l'important pour notre étude étant d'avoir un niveau transcriptionnel de base. Il était primordial pour notre étude aussi de connaître l'emplacement du site d'initiation de transcription +1 afin de décider de la séquence à éliminer. Le promoteur choisi s'est porté sur P_{mxaF} qui est un fort promoteur inductible par le méthanol, et dont le +1 est connu (M. Zhang *et al.*, 2005) afin de pouvoir éliminer par PCR et par digestion la région entre le site d'initiation de la transcription et le site d'initiation de la traduction (ATG) du gène GFP. Il se trouve que les promoteurs issus de gènes *mox (mxaF,mxaD*...) sont les plus forts chez *M. extorquens*. Si le promoteur P_{mxaF}* tronqué restait toujours fonctionnel et s'il gardait sa capacité à exprimer le gène relié. Les résultats de la figure 16 montrent qu'il est toujours capable d'exprimer GFP. En effet le fait d'avoir tronqué le promoteur n'affecte pas sa capacité à exprimer les gènes. Toutefois, comme ceci est visible sur la figure 16 la puissance du promoteur est affectée. Ceci est dû au fait que le promoteur a besoin de toute sa séquence pour sa puissance, mais étant donné qu'à la base c'est un fort promoteur il reste fonctionnel bien qu'il soit tronqué et donc qu'il est perdu de sa puissance. L'expression du sARN peut alors également être affectée. Ceci peut donc avoir une incidence directe sur la quantité de sARN présents pour l'inhibition du gène en question et peut en partie expliquer l'absence de de production des sARN visés (Fig. 24).

La construction des sARN contre GFP n'a pas donné de résultats concluants. En effet, un sARN témoin a été construit de façon à ce qu'il n'ait aucun effet sur le gène GFP. Pourtant, les résultats indiquent qu'il a aussi une inhibition de la fluorescence similaire aux sARN conçus pour cibler GFP. Ceci porte à croire que ce n'est pas le sARN qui cause cette inhibition, mais peut-être la manipulation de la bactérie qui pourrait affecter la fluorescence. D'un autre côté, cette construction concerne une intégration chromosomique de sARN, ceci a dû affecter le gène GFP déjà présent qui lui aussi a été intégré de façon chromosomique dans la bactérie. Donc, on serait porté à

croire que ce n'est pas le sARN qui fait son effet, mais que l'expression du gène GFP est affectée.

Néanmoins, ceci reste une supposition non-supportée par l'expérience suivante : Étant donné que dans cette souche, le gène GFP se trouve dans le chromosome, nous avons décidé de refaire la même expérience mais avec une souche qui contient le gène GFP dans un plasmide pCM-110. Ceci n'affectera donc en rien l'expression du gène GFP qui sera exprimé grâce au plasmide. Toutefois, les résultats ont été similaires. En effet, la figure 23 montre une diminution de plus de 80% de la fluorescence pour les souches contenant le sARN contre GFP et pour le sARN contrôle.

En parallèle à ces expériences, des sARN contre les gènes *sdhA* et *sdhB* ont été construits et testés sur *M. extoquens*. En effet, plusieurs études ont démontré que l'inhibition de ces gènes mène à une augmentation de la production de l'acide succinique (Lamarche M.G., 2015, Song *et al.*, 2006). Étant donné que le sARN agit comme un knock-down (le gène n'est pas complètement inactivé), on supposait au départ qu'il n'y aurait pas eu besoin d'alimenter la bactérie avec du malate (Lamarche M.G., 2015) (Voir les voies métaboliques figure 4). Le fait d'effectuer un *knock out* normal sur le gène *sdh* affectera la viabilité de la bactérie, qui nécessitera alors du malate pour sa survie. Un *knock down* par les sARN ne procure pas une inactivation du gène à 100% et permet de contourner ce problème. Il sera encore plus judicieux de construire un système inductible. La bactérie pourra alors croître à son aise sans aucune contrainte en l'attente d'une biomasse importante. L'activation alors de l'expression des sARN fera en sorte d'obtenir plus d'acide succinique.

Néanmoins, ces souches n'ont pas montré d'augmentation significative de la production d'acide succinique par rapport à la souche sauvage. Néanmoins, les buvardages Northern ne montrent pas une expression suffisante du sARN. Ceci peut être dû au fait que le promoteur qui exprime les sARN est tronqué, et donc que les sARN ne sont pas suffisamment exprimés.

Ceci nous amène à penser que l'expression du sARN n'était pas suffisante dans les différentes expériences effectuées. Le fait de mettre plusieurs copies du sARN

pourraient peut-être en augmenter l'expression. Il est aussi possible d'utiliser un plasmide multicopie plutôt qu'un transposon pour l'expression des sARN en combinaison avec des promoteurs plus forts qu'on peut trouver dans la littérature.

6. CONCLUSION

Nos résultats indiquent que pour le premier objectif, il a été possible d'obtenir une expression du gène GFP par le promoteur P_{mxaF}* malgré le fait qu'il soit raccourci... cependant sa plus faible activité suggère une perte d'efficacité. Toutefois, il n'a pas été possible d'obtenir une inhibition de la fluorescence avec les sARN contre GFP. Les sARN qui ciblent les gènes *sdhA* et *sdhB* ne donnent pas les résultats escomptés conformément à la littérature. Cependant, étant donné les résultats du deuxième objectif, il y a une optimisation à effectuer quant à la fonctionnalité du sARN, en effet nos résultats ne permettent pas d'indiquer que le sARN dérivé de *micC* est bel est bien fonctionnel chez *M. extorquens*. Une alternative que l'on pourra essayer et de ne pas utiliser un plasmide à tn7 tel que pBKS2, mais un plasmide tel que pCM-110 pour y intégrer les sARN, et cloner alors le plasmide sur la souche GFP5, qui contient le gène GFP dans le chromosome.

Une autre alternative aux sRNA est l'utilisation de CRISPR-Cas9 (*Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*). Ce système est un outil de génie génétique qui permet de modifier le génome à l'aide de nucléases (Qi *et al.*, 2012). Cela permet en génie génétique d'induire des brèches dans l'ADN des gènes concerné ce qui peut conduire à l'inactivation du gène (Qi *et al.*, 2012). Il sera possible alors d'utiliser un moyen de controler ceci dans l'attente d'une biomasse suffisante de la bactérie avant de pouvoir utiliser CRISPR-Cas9.

Malgré certain défis à relever, l'utilisation de *M. extorquens* est très prometteuse pour l'industrie du fait de sa croissance en présence de méthanol.

7. RÉFÉRENCES

A. Tana LT, Q. Turmeau (2012) Production d'acide succinique biosourcé par l'entreprise Roquette

Anthony C (1982) The biochemistry of methylotrophs. *Academic Press,* London, United Kingdom.

Anthony C (2004) The quinoprotein dehydrogenases for methanol and glucose. *Arch Biochem Biophys* 428(1):2-9.

Barciszewski J (2003) *Non-Coding RNAs: Molecular Biology and Molecular Medicine.* Springer US. https://books.google.ca/books?id=4HFro6mzdH0C

Bechthold I, Bretz K, Kabasci S, Kopitzky R & Springer A (2008) Succinic acid: A new platform chemical for biobased polymers from renewable resources. *Chemical Engineering and Technology* 31(5):647-654.

Bélanger L, Figueira MM, Bourque D, Morel L, Béland M, Laramée L, Groleau D & Míguez CB (2004) Production of heterologous protein by Methylobacterium extorquens in high cell density fermentation. *FEMS Microbiology Letters* 231(2):197-204.

Bourque D, Ouellette B, André G & Groleau D (1992) Production of poly-β-hydroxybutyrate from methanol: characterization of a new isolate of Methylobacterium extorquens. *Appl Microbiol Biotechnol* 37(1):7-12.

Bourque D, Pomerleau Y & Groleau D (1995) High-cell-density production of poly-β-hydroxybutyrate (PHB) from methanol by Methylobacterium extorquens: production of high-molecular-mass PHB. *Appl Microbiol Biotechnol* 44(3-4):367-376.

Brantl S (2007) Regulatory mechanisms employed by cis-encoded antisense RNAs. *Curr Opin Microbiol* 10(2):102-109.

Cao Y, Zhang R, Sun C, Cheng T, Liu Y & Xian M (2013) Fermentative succinate production: An emerging technology to replace the traditional petrochemical processes. *BioMed Research International* 2013.

Carey PR (1996) *Protein Engineering and Design.* Elsevier Science. https://books.google.ca/books?id=PIaqRAB7QM4C

Chatterjee R, Millard CS, Champion K, Clark DP & Donnelly MI (2001) Mutation of the ptsG gene results in increased production of succinate in fermentation of glucose by Escherichia coli. *Appl Environ Microbiol* 67(1):148-154.

Chen J-J, Lin W-J, Liao C-H & Shieh P-C (2007) Anti-inflammatory Benzenoids from Antrodia camphorata. *Journal of Natural Products* 70(6):989-992.

Chen X, Zhu P & Liu L (2016) Modular optimization of multi-gene pathways for fumarate production. *Metabolic Engineering* 33:76-85.

Chen Z, Wilmanns M & Zeng AP (2010) Structural synthetic biotechnology: from molecular structure to predictable design for industrial strain development. *Trends in biotechnology* 28(10):534-542.

Chistoserdova L (2011) Modularity of methylotrophy, revisited. *Environmental Microbiology* 13(10):2603-2622.

Chistoserdova L, Crowther GJ, Vorholt JA, Skovran E, Portais JC & Lidstrom ME (2007) Identification of a fourth formate dehydrogenase in Methylobacterium extorquens AM1 and confirmation of the essential role of formate oxidation in methylotrophy. *J Bacteriol* 189(24):9076-9081.

Choi KH & Schweizer HP (2006a) mini-Tn7 insertion in bacteria with single attTn7 sites: example Pseudomonas aeruginosa. *Nat Protoc* 1(1):153-161.

Choi YJ, Bourque D, Morel L, Groleau D & Miguez CB (2006b) Multicopy integration and expression of heterologous genes in Methylobacterium extorquens ATCC 55366. *Appl Environ Microbiol* 72(1):753-759.

Choi YJ, Morel L, Bourque D, Mullick A, Massie B & Miguez CB (2006c) Bestowing inducibility on the cloned methanol dehydrogenase promoter (PmxaF) of Methylobacterium extorquens by applying regulatory elements of Pseudomonas putida F1. *Appl Environ Microbiol* 72(12):7723-7729.

Cinar A, Parulekar SJ, Undey C & Birol G (2003) *Batch Fermentation: Modeling: Monitoring, and Control.* CRC Press. https://books.google.ca/books?id=KyoQWVBAG9MC

Clark DP (1989) The fermentation pathways of Escherichia coli. *FEMS Microbiology Letters* 63(3):223-234.

Cohen SN, Chang ACY, Boyer HW & Helling RB (1973) Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids In Vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 70(11):3240-3244.

Coleman J, Green PJ & Inouye M (1984) The use of RNAs complementary to specific mRNAs to regulate the expression of individual bacterial genes. *Cell* 37(2):429-436.

Conti JJ DL (2010) International Energy Outlook.

Cooper GM (1999) La cellule: Une approche moléculaire. Deboeck (Édit.)Paris. p 216.

De Marco P (2004) Methylotrophy versus heterotrophy: A misconception. *Microbiology* 150(6):1606-1607.

E. LM, Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH & Stackebrandt E (2006) *The Prokaryotes: Vol. 2: Ecophysiology and Biochemistry.* Springer New York. https://books.google.ca/books?id=kyAZ47ZrazkC

E. Skrivanova MM, V. Benda (2006) Susceptibility of Escherichia coli, Salmonella sp. and Clostridium perfringens to organic acids and monolaurin. *agriculturejournal* 51:81-88.

Eddy SR (2001) Non-coding RNA genes and the modern RNA world. *Nat Rev Genet* 2(12):919-929.

Eibl R & Eibl D (2009) *Disposable Bioreactors.* Springer Berlin Heidelberg. https://books.google.ca/books?id=Gfz95vY-rf0C

Fuse H, Ohta M, Takimura O, Murakami K, Inoue H, Yamaoka Y, Oclarit JM & Omori T (1998) Oxidation of trichloroethylene and dimethyl sulfide by a marine Methylomicrobium strain containing soluble methane monooxygenase. *Biosci Biotechnol Biochem* 62(10):1925-1931.

Gao Y, Liu C, Ding Y, Sun C, Zhang R, Xian M & Zhao G (2014) Development of Genetically Stable Escherichia coli Strains for Poly(3-Hydroxypropionate) Production. *PLoS ONE* 9(5):e97845.

Goodwin PM & Anthony C (1998) The biochemistry, physiology and genetics of PQQ and PQQ-containing enzymes. *Adv Microb Physiol* 40:1-80.

Guettler MV, Rumler D & Jain MK (1999) Actinobacillus succinogenes sp. nov., a novel succinic-acid-producing strain from the bovine rumen. *Int J Syst Bacteriol* 49 Pt 1:207-216.

Hanson RS & Hanson TE (1996) Methanotrophic bacteria. *Microbiol Rev* 60(2):439-471.

Hoang TT, Williams S, Schweizer HP & Lam JS (1997) Molecular genetic analysis of the region containing the essential Pseudomonas aeruginosa asd gene encoding aspartate-beta-semialdehyde dehydrogenase. *Microbiology* 143 (Pt 3):899-907.

Hong SH, Kim JS, Lee SY, In YH, Choi SS, Rih J-K, Kim CH, Jeong H, Hur CG & Kim JJ (2004) The genome sequence of the capnophilic rumen bacterium Mannheimia succiniciproducens. *Nat Biotech* 22(10):1275-1281.

Hsia J, Holtz WJ, Maharbiz MM, Arcak M & Keasling JD (2016) Modular synthetic inverters from zinc finger proteins and small RNAs. *PLoS ONE* 11(2).

http://2011.igem.org/Team:DTU-Denmark/Background_sRNA#References (2011)), (Consulté le 11/04)

http://www.methanol.org/Methanol-Basics/Methanol-Applications.aspx (2011)),

http://www.planete-energies.com/fr/medias/decryptages/la-petrochimie-une-industrie-incontournable (*29 Juil. 2015.*),

https://www.alliedmarketresearch.com/bio-succinic-acid-market (Novembre 2015)),

Jin Y, Wu J, Li Y, Cai Z & Huang JD (2013) Modification of the RpoS network with a synthetic small RNA. *Nucleic Acids Research* 41(17):8332-8340.

Jo SC, Rim AR, Park HJ, Yuk HG & Lee SC (2007) Combined treatment with silver ions and organic acid enhances growth-inhibition of Escherichia coli O157:H7. *Food Control* 18(10):1235-1240.

Joshi RV, Schindler BD, McPherson NR, Tiwari K & Vieille C (2014) Development of a markerless knockout method for actinobacillus succinogenes. *Applied and Environmental Microbiology* 80(10):3053-3061.

Kabachnyi VI, Chernykh VP, Drogovoz SM, Golubenko Iu A & Bogutskaia EE (1987) [Search for anti-inflammatory preparations among the derivatives of succinic acid heteryl amides]. *Farmakol Toksikol* 50(1):94-97.

Keasling JD (2010) Manufacturing molecules through metabolic engineering. *Science* 330(6009):1355-1358.

Klass DL (1998) *Biomass for Renewable Energy, Fuels, and Chemicals.* Elsevier Science. https://books.google.ca/books?id=udDHC3Ss7DAC

Koch B, Jensen LE & Nybroe O (2001a) A panel of Tn7-based vectors for insertion of the gfp marker gene or for delivery of cloned DNA into Gram-negative bacteria at a neutral chromosomal site. *Journal of Microbiological Methods* 45(3):187-195.

Koch B, Jensen LE & Nybroe O (2001b) A panel of Tn7-based vectors for insertion of the gfp marker gene or for delivery of cloned DNA into Gram-negative bacteria at a neutral chromosomal site. *J Microbiol Methods* 45(3):187-195.

Lamarche M.G. PJ, Arbour M., Imane R., Gauriat M., Miguez C. (2015) Toward bio-succinic acid production from methanol: reducing the need of a PHB producing succinate dehydrogenase mutant for malate supplementation. Montreal, Canada).

Lee P, Lee S, Hong S & Chang H (2002) Isolation and characterization of a new succinic acid-producing bacterium, Mannheimia succiniciproducens MBEL55E, from bovine rumen. *Appl Microbiol Biotechnol* 58(5):663-668.

Lee SJ, Lee DY, Kim TY, Kim BH, Lee J & Lee SY (2005) Metabolic engineering of Escherichia coli for enhanced production of succinic acid, based on genome comparison and in silico gene knockout simulation. *Applied and Environmental Microbiology* 71(12):7880-7887.

Lim HC & Shin HS (2013) *Fed-Batch Cultures: Principles and Applications of Semi-Batch Bioreactors.* Cambridge University Press. https://books.google.ca/books?id=zHMhAwAAQBAJ

Mandal M & Breaker RR (2004) Gene regulation by riboswitches. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(6):451-463.

Mattick JS & Makunin IV (2006) Non-coding RNA. *Hum Mol Genet* 15 Spec No 1:R17-29.

McKinlay JB & Vieille C (2008) 13C-metabolic flux analysis of Actinobacillus succinogenes fermentative metabolism at different NaHCO3 and H2 concentrations. *Metabolic Engineering* 10(1):55-68.

McKinlay JB, Vieille C & Zeikus JG (2007) Prospects for a bio-based succinate industry. *Appl Microbiol Biotechnol* 76(4):727-740.

Mecking S (2004) Nature or petrochemistry? - Biologically degradable materials. *Angewandte Chemie - International Edition* 43(9):1078-1085.

mejkalová H, Erb TJ & Fuchs G (2010) Methanol Assimilation in <italic>Methylobacterium extorquens</italic> AM1: Demonstration of All Enzymes and Their Regulation. *PLoS ONE* 5(10):e13001.

Millard CS, Chao YP, Liao JC & Donnelly MI (1996) Enhanced production of succinic acid by overexpression of phosphoenolpyruvate carboxylase in Escherichia coli. *Applied and Environmental Microbiology* 62(5):1808-1810.

Ministers NCo (2002) *Food Additives in Europe 2000.* Nordic Council of Ministers. https://books.google.ca/books?id=Fvm-sqd90-oC

Mizuno T, Chou MY & Inouye M (1984) A unique mechanism regulating gene expression: translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA). *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(7):1966-1970.

Na D, Yoo SM, Chung H, Park H, Park JH & Lee SY (2013) Metabolic engineering of Escherichia coli using synthetic small regulatory RNAs. *Nat Biotechnol* 31(2):170-174.

Nielsen AK, Gerdes K & Murrell JC (1997) Copper-dependent reciprocal transcriptional regulation of methane monooxygenase genes in Methylococcus capsulatus and Methylosinus trichosporium. *Mol Microbiol* 25(2):399-409.

Nielsen J (2003) *Metabolic Engineering.* Springer Berlin Heidelberg. https://books.google.ca/books?id=FQBrCQAAQBAJ

Park H, Bak G, Kim SC & Lee Y (2013) Exploring sRNA-mediated gene silencing mechanisms using artificial small RNAs derived from a natural RNA scaffold in Escherichia coli. *Nucleic Acids Research* 41(6):3787-3804.

Pinazo JM, Domine ME, Parvulescu V & Petru F (2015) Sustainability metrics for succinic acid production: A comparison between biomass-based and petrochemical routes. *Catal. Today* 239:17-24.

Qi L, Haurwitz RE, Shao W, Doudna JA & Arkin AP (2012) RNA processing enables predictable programming of gene expression. *Nat Biotech* 30(10):1002-1006.

Rastogi VB (1997) *Modern Biology.* Pitambar Publishing. https://books.google.ca/books?id=D-85x6Jhji0C

Rodrigo G, Landrain TE, Shen S & Jaramillo A (2013) A new frontier in synthetic biology: automated design of small RNA devices in bacteria. *Trends in genetics : TIG* 29(9):529-536.

Roland K, Curtiss R, 3rd & Sizemore D (1999) Construction and evaluation of a delta cya delta crp Salmonella typhimurium strain expressing avian pathogenic Escherichia coli O78 LPS as a vaccine to prevent airsacculitis in chickens. *Avian diseases* 43(3):429-441.

Sanchez AM, Bennett GN & San KY (2005) Efficient succinic acid production from glucose through overexpression of pyruvate carboxylase in an Escherichia coli alcohol dehydrogenase and lactate dehydrogenase mutant. *Biotechnol Prog* 21(2):358-365.

sapienza r (1999) Environmentally benign anti-icing or deicing fluids.

Sharma V, Yamamura A & Yokobayashi Y (2012) Engineering artificial small RNAs for Conditional gene silencing in escherichia coli. *ACS Synthetic Biology* 1(1):6-13.

Sharma V & Yokobayashi Y (2013) In vivo screening of artificial small RNAs for silencing endogenous genes in Escherichia coli. in *Methods in Molecular Biology*), p 75-84.

Shigematsu T, Hanada S, Eguchi M, Kamagata Y, Kanagawa T & Kurane R (1999) Soluble methane monooxygenase gene clusters from trichloroethylene-degrading Methylomonas sp. strains and detection of methanotrophs during in situ bioremediation. *Appl Environ Microbiol* 65(12):5198-5206.

Skovran E, Crowther GJ, Guo X, Yang S & Lidstrom ME (2010) A systems biology approach uncovers cellular strategies used by Methylobacterium extorquens AM1 during the switch from multi- to single-carbon growth. *PLoS One* 5(11):e14091.

Song H & Lee SY (2006) Production of succinic acid by bacterial fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* 39(3):352-361.

Storz G, Vogel J & Wassarman KM (2011) Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers. *Mol Cell* 43(6):880-891.

Thakker C, Martínez I, San K-Y & Bennett GN (2012) Succinate production in Escherichia coli. *Biotechnology journal* 7(2):213-224.

Toyama H, Anthony C & Lidstrom ME (1998) Construction of insertion and deletion mxa mutants of Methylobacterium extorquens AM1 by electroporation. *FEMS Microbiol Lett* 166(1):1-7.

Vaidya PD & Mahajani VV (2003) Kinetics of aqueous phase hydrogenation of maleic acid to succinic acid over an Ru/Al2O3 catalyst. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 78(5):504-511.

Wagner EG, Altuvia S & Romby P (2002) Antisense RNAs in bacteria and their genetic elements. *Adv Genet* 46:361-398.

Wan C, Li Y, Shahbazi A & Xiu S (2008) Succinic acid production from cheese whey using Actinobacillus succinogenes 130 Z. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 145(1-3):111-119.

Watson JD (2007) *Recombinant DNA: Genes and Genomes: A Short Course.* W. H. Freeman. https://books.google.ca/books?id=iWfMUtyXidIC

Watson JD & Crick FHC (1953) Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* 171(4356):737-738.

Yim H, Haselbeck R, Niu W, Pujol-Baxley C, Burgard A, Boldt J, Khandurina J, Trawick JD, Osterhout RE, Stephen R, Estadilla J, Teisan S, Schreyer HB, Andrae S, Yang TH, Lee SY, Burk MJ & Van Dien S (2011) Metabolic engineering of Escherichia coli for direct production of 1,4-butanediol. *Nat Chem Biol* 7(7):445-452.

Yoo SM, Na D & Lee SY (2013) Design and use of synthetic regulatory small RNAs to control gene expression in Escherichia coli. *Nat. Protocols* 8(9):1694-1707.

Yu C, Cao Y, Zou H & Xian M (2011) Metabolic engineering of Escherichia coli for biotechnological production of high-value organic acids and alcohols. *Appl Microbiol Biotechnol* 89(3):573-583.

Zeikus JG, Jain MK & Elankovan P (1999) Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. *Appl Microbiol Biotechnol* 51(5):545-552.

Zhang M, FitzGerald KA & Lidstrom ME (2005) Identification of an upstream regulatory sequence that mediates the transcription of mox genes in Methylobacterium extorquens AM1. *Microbiology* 151(Pt 11):3723-3728.

Zhang Y-j, Li Q, Zhang Y-x, Wang D & Xing J-m (2012) Optimization of succinic acid fermentation with Actinobacillus succinogenes by response surface methodology (RSM). *Journal of Zhejiang University. Science. B* 13(2):103-110.

Zheng Z, Chen T, Zhao M, Wang Z & Zhao X (2012) Engineering Escherichia coli for succinate production from hemicellulose via consolidated bioprocessing. *Microbial Cell Factories* 11.

Zhong JJ (2004) *Biomanufacturing.* Springer. https://books.google.ca/books?id=XnR9iUboUj4C

8. ANNEXE

Une partie de la séquence du gène d'intérêt. La partie en jaune représente la partie codante. Les oligonucléotides sont représentés dans les tableaux avec en rouge la partie complémentaire inversé qui correspond à la partie ciblé. Le RBS est représenté en rouge sur la séquence du gène.

atoD

Séquence :

gcccgccctggcggaagactaaggaagggacgctgtcgatgaagaaggtctatccggatccgaaggc

ggcgctcg

Pmxaf/satoD2	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGccttcttcatcgacagcgtcccttccTTTCTGTTGGGCCATTGCA
Pmxaf/satoD3	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGcggatccggatagaccttcttcatTTTCTGTTGGGCCATTGCA

atoA

Séquence :

Gatgcgccaaacgagggaacgtcaagaccatggcctggacccgtgagcagatggcggagcgcgccgcccgg

gagc

Pmxaf/satoA2	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGtccaggccatggtcttgacgttccTTTCTGTTGGGCCATTGCA
Pmxaf/satoA3	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGcatctgctcacgggtccaggccatTTTCTGTTGGGCCATTGCA

phaC

Séquence :

gatgcgggcggacctttgggaggacgtgtcgcgtgggcaccgagcggacgaacccggcagcgccggatttc

Pmxaf/sphaC2	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGcggtgcccacgcgacacgtcctccTTTCTGTTGGGCCATTGCA
Pmxaf/sphaC3	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGcgggttcgtccgctcggtgcccacTTTCTGTTGGGCCATTGCA

pgm

Séquence :

aaccgcgctacgacgtgcgcagtgtgtcttccacgagaatcgagcgaaccatggcgtcgaagcgggttccc

accagcccctatccggaccagaagcccggcacctcggg

Pmxaf/spgm2	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGtcgacgccatggttcgctcgattcTTTCTGTTGGGCCATTGCA
Pmxaf/spgm3	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGggtgggaacccgcttcgacgccatTTTCTGTTGGGCCATTGCA

mdh

Séquence :

tcgcgaattccgaccggaggctagatcatccatggcacgcagcaagatcgcgctcatcggcgccggacaga

tcggcggcacgctggccc

Pmxaf/smdh2	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGtgcgtgccatggatgatctagcctTTTCTGTTGGGCCATTGCA
Pmxaf/smdh3	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGgagcgcgatcttgctgcgtgccatTTTCTGTTGGGCCATTGCA

pgk

Séquence :

ttctgcctccaacccgtagaaatcagacgccgccatgacggatttccgcaccctcgacgatgccggcccgc

tccagggcaagcgcgt

Pmxaf/spgk2	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGaatccgtcatggcggcgtctgattTTTCTGTTGGGCCATTGCA
Pmxaf/spgk3	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGgtcgagggtgcggaaatccgtcatTTTCTGTTGGGCCATTGCA

Gap NADPH-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

Séquence :

gggtgcgccccatttcgaaggagtcacgccgtgaccgtcaaggttgccatcaacgggttcgggcgcatcgg

Pmxaf/sgap2	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGtgacggtcacggcgtgactccttcTTTCTGTTGGGCCATTGCA
Pmxaf/sgap3	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGgttgatggcaaccttgacggtcacTTTCTGTTGGGCCATTGCA

ecm

Séquence :

cgattgcatcggacagggagtcgagtgggatgagcgcgcaagcgagcgtcgccgaggtcaagcgcgacaa

Pmxaf/secm2	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGgcgcgctcatcccactcgactccgTTTCTGTTGGGCCATTGCA
Pmxaf/secm3	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGggcgacgctcgcttgcgcgctcatTTTCTGTTGGGCCATTGCA

epm

Séquence :

acgttcaagacaacaa**aggagg**gaggcagcaatgatcggacggctcaatcacgtcgccatcgcg

Pmxaf/sepm2	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGtccgatcattgctgcctccctcctTTTCTGTTGGGCCATTGCA
Pmxaf/sepm3	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGgacgtgattgagccgtccgatcatTTTCTGTTGGGCCATTGCA

tkt

Séquence :

ggcgatggaagcgagaaagacggtaactccatgagcggtgcagacacgagcccgaaggcggccctgagc

Pmxaf/sepm2	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGtccgatcattgctgcctccctcctTTTCTGTTGGGCCATTGCA
Pmxaf/sepm3	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGgacgtgattgagccgtccgatcatTTTCTGTTGGGCCATTGCA

rpi

Séquence :

gagtgcccccgatgaattcgcttcccgaggtcgtttcgtgagcgcgccggatctgaagcgggcggcggccg
agcgcgcgctccccctggtcg

Pmxaf/srpiA2	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGggcgcgctcacgaaacgacctcggTTTCTGTTGGGCCATTGCA
Pmxaf/srpiA3	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGccgcttcagatccggcgcgctcacTTTCTGTTGGGCCATTGCA

pgl

Séquence :

cggcggccacaaggagccgccgcgccgggggcccgcgccatgatttcgcttcccccgaacgccgagctgat
ggcggatgccgaggcga

Pmxaf/spgl2	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGagcgaaatcatggcgcgggccccTTTCTGTTGGGCCATTGCA
Pmxaf/spgl3	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGggcgttcgggggaagcgaaatcatTTTCTGTTGGGCCATTGCA

Pgi

Séquence :

gggcacggggacgcacaagaattacgcgaggacgctagagatgaacgcgctgaacgccctcttcgccgagc
acgagcaggcggtctgg

Pmxaf/spgi2	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGagcgcgttcatctctagcgtcctcTTTCTGTTGGGCCATTGCA
Pmxaf/spgi3	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGgaagagggcgttcagcgcgttcatTTTCTGTTGGGCCATTGCA

rpe

Séquence :

cccagggccgcccgcggttttcgcagggcggcaccgtgttcgcttcgagccgttccatgacccttatcgca
ccctcgatccttgcggccgacttctccaggctcggtgaggaga

Pmxaf/srpe2	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGaagggtcatggaacggctcgaagcTTTCTGTTGGGCCATTGCA
Pmxaf/srpe3	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGgatcgagggtgcgataagggtcatTTTCTGTTGGGCCATTGCA

gnd

Séquence :

gaaaggtggttgccggctttcggaaaaagatgatgcaaaagcaaaagcctcgatgggagtgcgagcctatg

Pmxaf/sgnd2	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGcttgcttttgcatcatctttttccTTTCTGTTGGGCCATTGCA
Pmxaf/sgnd3	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGccatcgaggcttttgcttttgcatTTTCTGTTGGGCCATTGCA

Gap20 Granule-associated 20 kDa protein

Séquence :

gcccgatgccaacatcaggagagagacgtgacaaacactccgaattacgaagtcccgaccgag

Pmxaf/sgap202	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGgagtgtttgtcacgtctctctcctTTTCTGTTGGGCCATTGCA
Pmxaf/sgap203	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGttcgtaattcggagtgtttgtcacTTTCTGTTGGGCCATTGCA

Sous-unités de fdh :

fdh1A

Séquence :

cagagcctggagcggacgcatgagcaacggccccgaaccgcacggcaacaagatcgaacagcccgagatcc
gcgccgacgaacgtcagga

Pmxaf/sfdh1A2	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGgccgttgctcatgcgtccgctccaTTTCTGTTGGGCCATTGCA
Pmxaf/sfdh1A3	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGgtgcggttcggggccgttgctcatTTTCTGTTGGGCCATTGCA

fdh2A

Séquence :

gcggccgagtg**aggaggccgtcgcatgaccctcat**caaggaaatcgactacggcacgccgatccggctca

gcggccgagtgaggaggccgtcgc**atgaccctcatcaaggaaatcgac**tacggcacgccgatccggctca

Pmxaf/sfdh2A2	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGatgagggtcatgcgacggcctcctTTTCTGTTGGGCCATTGCA
Pmxaf/sfdh2A3	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGgtcgatttccttgatgagggtcatTTTCTGTTGGGCCATTGCA

fdh3A

Séquence :

ggcttccaccggtcc**gaagtgaggctgccatgctgatca**agcgcaagagcggcgacgctgctcgc

ggcttccaccggtccgaagtgaggctgcc**atgctgatcaagcgcaagagcggc**gacgctgctcgc

Pmxaf/sfdh3A2	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGtgatcagcatggcagcctcacttcTTTCTGTTGGGCCATTGCA
Pmxaf/sfdh3A3	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGgccgctcttgcgcttgatcagcatTTTCTGTTGGGCCATTGCA

fdh4A

Séquence :

cgc**gaagaccgggctctcggatggatc**gttcgcaaggcctacccaagcgttcttccgccgcgggcggctgg

cgcgaagaccgggctctcgg**atggatcgttcgcaaggcctaccc**aagcgttcttccgccgcgggcggctgg

Pmxaf/sfdh4A2	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGgatccatccgagagcccggtcttcTTTCTGTTGGGCCATTGCA
Pmxaf/sfdh4A3	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGgggtaggccttgcgaacgatccatTTTCTGTTGGGCCATTGCA

fdh1B

Séquence :

agtt**ggaacacaggtcgcgtcatgagtg**aggcaagtgggactgtccggagcttcgcgcatccgggccgtgg

agttggaacacaggtcgcgtc**atgagtgaggcaagtgggactgtc**cggagcttcgcgcatccgggccgtgg

Pmxaf/sfdh1B2	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGcactcatgacgcgacctgtgttccTTTCTGTTGGGCCATTGCA
Pmxaf/sfdh1B3	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGgacagtcccacttgcctcactcatTTTCTGTTGGGCCATTGCA

fdh2B

Séquence :

ccgaatccctcgacgccgccctc**aaggaggcccgcgcgtgagcatca**ccgtctacgtcccgcaggacgccg

ccgaatccctcgacgccgccctcaaggaggcccgcgc**gtgagcatcaccgtctacgtcccg**caggacgccg

Pmxaf/sfdh2B2	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGtgatgctcacgcgcgggcctcctttTTTCTGTTGGGCCATTGCA
Pmxaf/sfdh2B3	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGcgggacgtagacggtgatgctcacTTTCTGTTGGGCCATTGCA

fdh3B

Séquence :

aa**gaggagcaccccgaacc****atggccc**ggatgaagttcctctgcgacgcggatcgctgcatcgagt

aagaggagcaccccgaacc**atggcccggatgaagttcctctgc**gacgcggatcgctgcatcgagt

Pmxaf/sfdh3B2	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGgggccatggttcggggtgctcctcTTTCTGTTGGGCCATTGCA
Pmxaf/sfdh3B3	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGgcagaggaacttcatccgggccatTTTCTGTTGGGCCATTGCA

fdh4B

Séquence :

gatct**gggcaaggctgcgtgagcgaggaa**aaaggccgcgtgagcgagcccgccgccgacgccgagacctttt

gatctgggcaaggctgc**gtgagcgaggaaaaaggccgcgtg**agcgagcccgccgccgacgccgagacctttt

Pmxaf/sfdh4B2	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGttcctcgctcacgcagccttgcccTTTCTGTTGGGCCATTGCA
Pmxaf/sfdh4B3	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGcacgcggccttttttcctcgctcacTTTCTGTTGGGCCATTGCA

fdh2D

Séquence :

ccaatcagac**acagccgagtgcgggc****atgagcgc**aacgaccatcaacgaccgactggtgcggatggccaac

ccaatcagacacagccgagtgcgggc**atgagcgcaacgaccatcaacgac**cgactggtgcggatggccaac

Pmxaf/sfdh2D2	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGgcgctcatgcccgcactcggctgtTTTCTGTTGGGCCATTGCA
Pmxaf/sfdh2D3	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGgtcgttgatggtcgttgcgctcatTTTCTGTTGGGCCATTGCA

fdh2C

Séquence :

ccaagtt**gggcaggaaacg****atggtcagtccc**gagccttggaacgcgacccgcgcggctgcaatcgtcgccggg

ccaagttgggcaggaaacg**atggtcagtcccgagccttggaac**gcgacccgcgcggctgcaatcgtcgccg

Pmxaf/sfdh2C2	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGgggactgaccatcgtttcctgcccTTTCTGTTGGGCCATTGCA
Pmxaf/sfdh2C3	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGgttccaaggctcgggactgaccatTTTCTGTTGGGCCATTGCA

fdh3C

Séquence :

gacgagacttc**gaaaggaacgccg****atgcggcgggc**aacgaccttcctcagcaccctcctcctggcggtgat

gacgagacttcgaaaggaacgccg**atgcggcgggcaacgaccttcctc**agcaccctcctcctggcggtgat

Pmxaf/sfdh3C2	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGgcccgccgcatcggcgttcctttcTTTCTGTTGGGCCATTGCA
Pmxaf/sfdh3C3	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGgaggaaggtcgttgcccgccgcatTTTCTGTTGGGCCATTGCA

Formate dehydrogenase chain *D*

ggctgcctct**ggggatacgg****atgcaggacgtcgg**cgcaaaacctgagcaggaagccggagatgacttcg

ggctgcctctggggatacgg**atgcaggacgtcggcgcaaaacct**gagcaggaagccggagatgacttcg

Pmxaf/sfdhD2	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGccgacgtcctgcatccgtatcccTTTCTGTTGGGCCATTGCA
Pmxaf/sfdhD3	GTCCAATCAAAGCCTAGAAAATATAGaggttttgcgccgacgtcctgcatTTTCTGTTGGGCCATTGCA