Ingénierie de cyanobactéries pour la photoproduction de terpènes (biocarburants)

Célia Chenebault

▶ **To cite this version:**

Célia Chenebault. Ingénierie de cyanobactéries pour la photoproduction de terpènes (biocarburants). Biotechnologie. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT : 2020UPASL066 . tel-03917112

HAL Id: tel-03917112
https://theses.hal.science/tel-03917112

Submitted on 1 Jan 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse de doctorat

NNT : 2020UPASL066

université PARIS-SACLAY

Ingénierie de cyanobactéries pour la photoproduction de terpènes (biocarburants)

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°577 : structure et dynamique des systèmes vivants (SDSV)
Spécialité de doctorat : Biotechnologies
Unité de recherche : Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), 91198, Gif-sur-Yvette, France.
Référent : Faculté des sciences d'Orsay

Thèse présentée et soutenue à Gif-sur-Yvette, le 18/12/2020, par

Célia CHENEBAULT

Composition du Jury

Stéphanie BURY-MONE Professeur des Universités, Université Paris-Saclay (UMR 9198)	Présidente
Amel LATIFI Professeur des Universités, Université Aix-Marseille (UMR 7283)	Rapporteure & Examinatrice
Xénie JOHNSON Chercheur CEA, HDR, Université Aix-Marseille (UMR 7275)	Rapporteure & Examinatrice
Stéphane LEMAIRE Directeur de recherche, Sorbonne (UMR 7238)	Examinateur
Franck CHAUVAT Directeur de recherche, Université Paris-Saclay (UMR 9198)	Directeur de thèse

Remerciements

Aux membres du jury, j'exprime ma gratitude pour avoir accepté d'examiner mes travaux.

Je tiens à remercier chaleureusement mon directeur de thèse Franck Chauvat, pour m'avoir fait confiance pendant ses 3 années et pour avoir toujours été disponible quand j'avais besoin d'un conseil scientifique. Grâce à toi, j'ai beaucoup appris pendant mon doctorat.

A Corinne Cassier-Chauvat, j'adresse ma profonde reconnaissance pour la bienveillance dont elle a fait preuve tout au long de mon doctorat. Merci pour toutes les discussions très intéressantes sur de très nombreux sujets que nous avons eu au détour d'un couloir ou en réunion. Ta capacité de travail n'a pas cessé de m'impressionner.

Aux filles, Victoire et Sigrid, je vous dis un grand merci, vous avez été très précieuses pendant ces années. On a formé une véritable équipe qui s'est toujours entraidée autant au niveau scientifique que psychologique. Vous m'avez permis de relativiser sur de nombreux sujets. Vous allez me manquer !

Merci aux différents stagiaires/nouveaux thésards du LBBC (Nicolas, Arthur, Marine, Fanny, Baptiste, Edern) pour tous les bons moments que nous avons passés ensemble.

Merci Xavier Kammerscheit pour avoir mis en place une grande partie du protocole de GC-MS, ce que tu as fait m'a grandement aidé par la suite.
Merci Encarni pour ton sourire et ta bienveillance. Cela a toujours été très agréable de travailler avec toi.

Merci à l'équipe du SCBM de m'avoir laissé utiliser la GC-MS et d'avoir été présente lorsque j'avais des problèmes sur l'appareil.

Merci à toutes les personnes du Bâtiment 142 et notamment à Adèle pour m'avoir entrainé dans cette folle épreuve qu'était le marathon de Paris. Merci à Valentin aussi, je suis très heureuse d'avoir fait ta connaissance.

Merci Benjamin pour tout l'amour que tu m'as donné pendant ces trois années de thèse. Je n'ai pas toujours été facile à vivre mais tu as toujours été là pour me sortir la tête de l'eau et m'aider à me changer les idées.

Merci à mes amis (Camille, Thibz, Guigz, Aurélie) qui ont toujours été là !

Enfin, tiens à remercier du fond du coeur ma famille qui n'a céssé de m'encourager et me soutenir tout au long de ses trois ans. Merci d'avoir pris le temps de relire avec attention ce manuscrit.

Avant-propos

Mon travail de thèse présenté dans ce manuscrit est le résultat d'expériences menées pendant trois années dans le laboratoire de Biologie et de Biotechnologies des Cyanobactéries au Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives (CEA) de Saclay, sous la direction du Dr Franck Chauvat. Cette thèse a été financée par une bourse Phare Amont-Aval (SL-DRF-17-0106) octroyée par le CEA.

Depuis quelques années, les cyanobactéries sont vues comme des usines cellulaires prometteuses pour produire des molécules carbonées (pour l'énergie, la chimie, l'industrie pharmaceutique) de manière durable et renouvelable/soutenable car leur métabolisme photo-autotrophique utilise uniquement de l'énergie solaire (inépuisable), du CO_2 atmosphérique, des minéraux et de l'eau y compris des eaux salées et/ou polluées.

Très récemment, quelques laboratoires ont initié des projets visant à photo-produire des terpènes. Ces molécules sont très diverses structurellement (on en compte plus de 77000) et sont naturellement produites par les plantes. Elles sont très utilisées par l'industrie agroalimentaire, cosmétique et pharmaceutique (arômes, parfum, propriétés antioxydantes et antibactériennes) et pourraient également, grâce à leur densité énergétique importante et leur faible viscosité, être utilisées comme alternatives au diesel ou être mélangées au kérosène pour l'aviation.

Jusqu'à présent, peu d'articles reportent la production de terpène par des cyanobactéries ingéniérées. Les cyanobactéries possèdent la voie métabolique (voie du méthylérythritol phosphate) permettant la synthèse des précurseurs des terpènes mais elle ne possède pas les gènes codant pour les enzymes « terpènes synthases » qui catalysent la transformation des précurseurs en terpènes d'intérêt. Afin de faire produire des terpènes aux cyanobactéries, les auteurs expriment donc, dans la cyanobactérie, un gène de plante codant pour une terpène synthase. Ils quantifient ensuite la production subséquente de terpènes par GC-MS. Ces études sont limitées à la production d'un ou deux terpènes par un seul châssis cyanobactérien et ne permettent pas de prédire quelle espèce est un bon « châssis » pour la production d'un terpène donné.

Mon travail de thèse s'insère dans l'objectif du laboratoire d'utiliser la vaste diversité biologique des cyanobactéries et de la combiner à la diversité chimique des terpènes à produire, afin d'identifier, dans un premier temps, le(s) châssis le(s) plus adapté(s) à la production d'un terpène donné.
Pour se faire, j'ai réalisé (avec l'aide d'Encarnacion Diaz Santos, post-doctorante au laboratoire) la construction de 25 souches de cyanobactéries. Nous avons mené une étude comparative de la production de deux monoterpènes (limonène, pinène) et trois sesquiterpènes (bisabolène, farnésène, santalène) par 5 souches de cyanobactéries unicellulaires (*Synechocystis* PCC 6803, *Synechococcus* PCC 7942, *Synechococcus* PCC 7002, *Cyanothece*

PCC 7425 et *Cyanothece* PCC 7822) possédant diverses caractéristiques physiologiques (marines ou d'eaux douces, capacité à pousser sur l'urée ou sur le diazote comme source d'azote, dépollution des eaux polluées, temps de génération cours, *etc*).

J'ai poursuivi ce travail en recherchant leus meilleures conditions de culture et en créant des mutants dans le but d'orienter au mieux les flux métaboliques vers la synthèse de terpènes.

***

Dans l'introduction, je vais tout d'abord
- replacer mon projet dans le contexte actuel de la transition écologique et démontrer l'intérêt de la production des terpènes par des organismes photoautotrophes puis
- je parlerai de la diversité des cyanobactéries et les caractéristiques de celles qui ont été retenues pour cette étude. Je détaillerai leur métabolisme photoautotrophe et les voies métaboliques permettant la synthèse des précurseurs des terpènes.
- Enfin, je donnerai un état des lieux des publications portant sur la production de terpènes par les cyanobactéries.

La partie « Résultats et discussion » sera constituée de 3 chapitres.
- La stratégie utilisée pour exprimer les gènes codant pour les terpènes synthases dans les cyanobactéries d'intérêt et les étapes du développement des méthodes de quantification des terpènes par la méthode GC-MS (chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse) constituera le premier chapitre.
- Dans le deuxième chapitre, je présenterai et discuterai les résultats de photo-production de quatre terpènes (limonène, pinène, bisabolène et farnésène) obtenus pour chacune des cyanobactéries utilisées comme châssis. J'ai choisi de présenter ces résultats souche par souche et non terpène par terpène. En effet, il est difficile de comparer la production d'un terpène par différentes cyanobactéries dont la croissance est réalisée dans des conditions de culture très diverses. Les résultats seront discutés au fur et à mesure et des perspectives ciblées seront données à la fin de chaque partie.
- Enfin, une étude comparative de la production de santalène (terpène d'intérêt cosmétique) sera réalisée. Cette étude fera l'objet d'un article distinct.

En conclusion, je comparerai les productions afin de tenter de définir le(s) meilleur(s) châssis pour la production d'un terpène en particulier. J'illustrerai le fait qu'une souche peut être une bonne productrice d'un terpène mais pas d'un autre

Je donnerai les « Perspectives » de mon étude et replacerai mon projet dans le contexte général du laboratoire.

Le « Matériels et Méthodes » se trouve à la fin de ce manuscrit.

Tables des matières

Remerciements 3
Avant-propos 4
Tables des matières 6
Index des figures 13
Index des tableaux 19
Introduction 21
Chapitre 1 : Les terpènes, des hydrocarbures avec de nombreuses propriétés intéressantes 21
I. Le pétrole et la pétrochimie 21
1. Importance du pétrole et de la pétrochimie dans notre vie de tous les jours 21
2. Des ressources qui vont devenir de plus en plus couteuses à exploiter 22
3. Les dangers des ressources fossiles 23
II. Les biocarburants 24
1. Les principes de la chimie verte 24
2. Les différents biocarburants 24
III. Les terpènes, des molécules à haute valeur ajoutée avec des applications dans de nombreux domaines 30
1. Les terpènes, un groupe d'hydrocarbures très divers et abondants 30
2. Les nombreuses applications industrielles des terpènes 33
3. Les procédés existants de production de terpènes 43
Chapitre 2 : Les cyanobactéries, des micro-organismes photosynthétiques 49
I. Importance écologique des cyanobactéries 49
1. Les cyanobactéries sont à l'origine de l'atmosphère oxygénique 49
2. Les cyanobactéries jouent un rôle essentiel dans les cycles géochimiques de la planète 49
II. La grande diversité morphologique, génétique et métabolique des cyanobactéries 50
1. Diversité morphologique, génétique et métabolique 50
2. Structure générale d'une cyanobactérie 52
III. Les souches modèles de cyanobactéries unicellulaires 53
1. *Synechocystis* PCC 6803 53
2. *Synechococcus elongatus* PCC 7942 54
3. *Synechococcus* PCC 7002 54

IV. Les cyanobactéries unicellulaires fixatrices d'azote 55
1. Intérêts biotechnologiques de la fixation de l'azote 55
2. Les *Cyanothece* 56
3. *Cyanothece* PCC 7425 57
4. *Cyanothece* PCC 7822 61
V. Les techniques de modification génétique des cyanobactéries 63
1. La transformation naturelle 63
2. L'électroporation 65
3. La conjugaison 65
4. Modification génétique des cyanobactéries utilisées dans cette étude 67
VI. Le métabolisme énergétique de la cyanobactérie 68
1. La photosynthèse oxygénique 68
2. Devenir du carbone assimilé 72
3. Le cycle de Krebs 75
4. Le métabolisme de l'azote 75
5. La balance C/N 80
VII. La voie MEP chez les cyanobactéries 81
1. Du pyruvate et glycéraldhéyde-3-phosphate aux précurseurs des terpènes (FPP, GPP et GGPP) 81
2. La synthèse des caroténoïdes à partir du GGPP 85
3. Importance de la voie MEP pour les cyanobactéries 87
4. La régulation de la voie MEP chez les cyanobactéries 88
5. Les terpènes synthases chez les plantes 91
Chapitre 3 : La production de terpènes par les cyanobactéries 94
I. Intérêts des cyanobactéries en biotechnologies 94
1. Les cyanobactéries n'ont pas besoin de carbohydrates pour croître 94
2. Les cyanobactéries convertissent de façon efficace l'énergie solaire 95
3. La culture des cyanobactéries ne rentre pas en compétition avec la production agro-alimentaire 95
4. Les cyanobactéries sont génétiquement manipulables 95
5. Les molécules d'intérêt produites naturellement par les cyanobactéries 95
II. La production de terpènes par les cyanobactéries 98
III. Les stratégies utilisées pour augmenter la production de terpènes 105
1. Les outils génétiques 105

2. Choix du châssis 110
3. Choix et optimisation des terpènes synthases 111
4. Ingénierie de la voie MEP 113
5. Amélioration la fixation du CO_2 et la production de pouvoir réducteur 120
6. Rediriger le carbone fixé vers la voie MEP 120
7. Ingénierie de la voie des pentoses phosphates (PPP) 121
8. Inactivation des voies compétitrices 121
9. Optimisation des conditions de culture 122
10. Amélioration de la résistance des cyanobactéries aux stress xénobiotiques 124
Objectifs de mon étude 127
Résultats et discussion 129
Chapitre 1 : Obtention des souches productrices de terpènes et mise au point de la méthode de quantification des terpènes par GC-MS 129
I. Construction des plasmides d'expression des gènes codant pour les terpènes synthases 129
1. Stratégie 129
2. Le vecteur d'expression pFC1 129
3. Construction des plasmides codant pour la bisabolène et la farnésène synthase 131
4. Les vecteurs d'expression des gènes codant pour la limonène, la pinène et la santalène synthase 136
II. Mise au point du protocole de quantification des terpènes par GC-MS 137
1. Principe de la quantification et description de la méthode GC-MS 137
2. Détermination des paramètres à utiliser pour la détection et la quantification par GC-MS 138
3. Réalisation des gammes étalons 149
4. Vérification de la justesse et de la répétabilité et reproductibilité des résultats 153
5. Quantification de la production de terpènes par les cyanobactéries 155
Chapitre 2 : La production de terpènes-carburants par 5 souches de cyanobactéries ingéniérées 158
I. Quantification de la production de mono et sesqui-terpènes par la souche modèle, *Synechocystis* PCC 6803 158
1. Intérêts de l'étude 158
2. Introduction des plasmides codant pour les terpènes synthases et phénotypes des souches productrices 159

3. *Synechocystis* PCC 6803 est capable de produire différents mono et sesquiterpènes lorsque qu'un gène codant pour une terpène synthase spécifique est exprimé à partir du plasmide pC 162

4. *Synechocystis* PCC 6803 produit de façon stable les terpènes d'intérêt 163

5. La production de terpènes par *Synechocystis* PCC 6803 varie en fonction des phases de croissance 165

6. Détermination des conditions de culture permettant une meilleure production de farnésène par *Synechocystis* PCC 6803 168

7. L'utilisation de l'urée comme seule source d'azote dans le milieu de culture permet la production de terpènes chez *Synechocystis* PCC 6803 172

8. Inactivation des voies de production des caroténoïdes chez Synechocystis PCC 6803 175

9. Délétion des voies de stockage du carbone sous forme de glycogène et de PHB chez *Synechocystis* PCC 6803 186

10. Conclusion et perspectives 190

II. Quantification de la production de mono (limonène) et sesquiterpènes (bisabolène et farnésène) par la cyanobactérie modèle *Synechococcus* PCC 7942 193

1. Intérêts de l'étude 193

2. Effet de la présence de dodécane sur la croissance de *Synechococcus* PCC 7942 193

3. Introduction des plasmides codant pour les terpènes synthases et phénotypes des souches productrices 194

4. *Synechococcus* PCC 7942 est capable de produire différents mono et sesquiterpènes lorsqu'un gène codant pour une terpène synthase spécifique est exprimé à partir du plasmide pC 196

5. La production de sesquiterpènes chez *Synechococcus* PCC 7942 est stable 197

6. Impact des conditions de culture : l'ajout de bicarbonate dans le milieu de culture n'améliore pas la production de farnésène 198

7. Conclusion et perspectives 199

III. Quantification de la production de mono et sesqui-terpènes par la souche de cyanobactérie unicellulaire marine, *Synechococcus* PCC 7002 200

1. Intérêts de l'étude 200

2. Introduction des plasmides codant pour les terpènes synthases et phénotypes des souches productrices 201

3. *Synechococcus* PCC 7002 produit différents mono et sesqui-terpènes lorsqu'un gène codant pour une terpène synthase spécifique est exprimé à partir du plasmide pC 204

4. La production de terpènes par *Synechococcus* PCC 7002 ne semble pas être stable. 205

5. Variation de la production de terpènes par *Synechococcus* PCC 7002 en fonction de la phase de croissance 206
6. Détermination des conditions de culture permettant une forte production de limonène par *Synechococcus* PCC 7002 pC-LS 209
7. *Synechococcus* PCC 7002 peut produire du limonène en poussant sur l'urée (un polluant fréquent) comme seule source d'azote 212
8. Conclusions et perspectives 214
IV. Quantification de la production de mono et sesquiterpènes par *Cyanothece* PCC 7425 216
1. Intérêts de l'étude 216
2. Manuscript: A genetic toolbox for the new model cyanobacterium *Cyanothece* PCC 7425: a case study for the photosynthetic production of limonene (Chenebault *et al.*, 2020) 216
3. Production de sesquiterpènes (bisabolène et farnésène) par *Cyanothece* PCC 7425. 242
4. Conclusions et perspectives 245
V. Quantification de la production de limonène par *Cyanothece* PCC 7822 246
1. Intérêts de l'étude 246
2. Prise en main de la souche 246
3. La production de limonène 248
4.Conclusions et perspectives 250
Chapitre 3. Production de santalène par diverses souches de cyanobactéries ingéniérées 252
1. Intérêts de l'étude 252
2. Introduction du plasmide pC-SS codant pour la santalène synthase de *Santalum album* 254
3. Plusieurs souches de cyanobactéries possédant pC-SS produisent du santalène 255
4. Conclusions et perspectives 260
Conclusions 261
Perspectives générales 265
I. Perspectives à court terme 265
II. Perspectives à plus long terme 269
Matériels et méthodes 275
I. Méthodes de biologie moléculaire 275
1. Culture et congélation des souches de *E. coli* utilisées pour le clonage et la conjugaison 275
2. Extraction et purification d'ADN plasmidique 276

3. Méthodes d'amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) 276
4. Dosage de l'ADN 280
5. Méthodes de clonage et de transformation bactérienne 280
6. Séquençage ADN afin de vérifier l'intégrité des constructions 284
II. Culture et caractérisation des cyanobactéries 284
1. Les cyanobactéries utilisées 284
2. Les milieux et conditions de culture 284
3. Les milieux avec des sources d'azote variées 287
4. Caractérisation des souches de cyanobactéries 287
5. Congélation des cyanobactéries et mise en collection 288
III. Les plasmides d'expression de gènes utilisés dans cette étude et le protocole de conjugaison 289
1. Les plasmides utilisés pour étudier la modification génétique de *Cyanothece* PCC 7425 289
2. Les plasmides utilisés pour exprimer les gènes codant pour les terpènes synthases issues de plantes dans nos cyanobactéries d'intérêt (Tableau 34) 291
3. Introduction d'un vecteur réplicatif par conjugaison 292
IV. Les plasmides de délétion utilisés dans l'étude et le protocole de transformation 294
1. Les plasmides utilisés pour la délétion des gènes impliqués dans la biosynthèse des caroténoïdes (cruF et crtR) 294
2. La transformation naturelle et ségrégation 294
V. Etudes des souches productrices de terpènes 297
1. Etude phénotypique des souches productrices de terpènes 297
2. Quantification des terpènes produits par la méthode GC-MS 298
VI. Dosages enzymatiques 299
1. Cassage des cellules à la presse de Eaton 299
2. Dosage des protéines 300
3. Dosage de l'activité chloramphénicol acyl transférase 300
4. Dosage de l'activité beta-galactosidase 302
VII. Microscopie 303
Bibliographie 304
Annexe 329
Annexe 1 : Revue sur le métabolisme photoautotrophique de la cyanobactérie publiée dans Life (Veaudor *et al.*, 2020) 329

Annexe 2 Rôles des caroténoïdes chez les cyanobactéries et phénotype des mutants de délétion 356

Annexe 3 : Différence de biais de codon entre les cyanobactéries utilisées dans cette étude et impact sur l'expression des gènes codant pour les terpènes synthases 360

Annexe 4 : Séquence nucléotidique de l'*E-α-bisabolène synthase* d'*Abies grandis* adaptée au biais de codon de *Synechocystis* PCC 6803 et séquence en acides aminées correspondante 364

Annexe 5 : Séquence nucléotidique de l'*α-farnésène synthase* de *Picea abies* adaptée au biais de codon de Synechocystis PCC 6803 et séquence en acides aminées correspondante 366

Annexe 6 Tableaux contenant les aires obtenues pour les diverses gammes étalons permettant la quantification des terpènes présents dans le dodécane. 368

Annexe 7 : Chromotogrammes montrant la production de limonène, pinène, bisabolène et farnésène par *Synechocystis* PCC 6803 372

Annexe 8 : Chromotogrammes montrant la production de limonène, bisabolène et farnésène par *Synechococcus* PCC 7942 375

Annexe 9 : Chromotogrammes montrant la production de limonène, pinène, bisabolène et farnésène par *Synechococcus* PCC 7002 377

Annexe 10 : Chromotogrammes montrant la production de bisabolène et farnésène par *Cyanothece* PCC 7425 380

Annexe 11 : Chromotogrammes montrant la production de limonène par *Cyanothece* PCC 7822 381

Index des figures

Figure 1 Production des biocarburants de première génération. 2626
Figure 2 Production des biocarburants de seconde génération. 2727
Figure 3 Production des biocarburants de troisième génération. 2828
Figure 4 Représentation de la règle biogénique de l'isoprène 300
Figure 5 Structure des terpènes utilisés dans mon étude. 3333
Figure 6 Courbes de distillation des mélanges de farnésène et du limonène (à 20 et 50%) dans le carburant Jet A-1. 3838
Figure 7 Caractérisitques des dimères de monoterpènes par rapport à celles des carburants et biocarburants d'aviation. 3939
Figure 8 Quelques terpènes retrouvés dans divers produits cosmétiques 411
Figure 9 Procédés de production d'huile essentielle d'orange et d'essence de térébenthine 4545
Figure 10 Procédé de production d'huile de bois de santal à partir de plantes ligneuses. ... 4646
Figure 11 Illustration de la diversité morphologique des cyanobactéries. 511
Figure 12 Structure interne de *Synechocystis* PCC 6803 5353
Figure 13 Comparaison de l'opéron *nif* de *Cyanothece* ATCC 51142 et celui de *Cyanothece* PCC 7425 5858
Figure 14 Photomicrographie de *Cyanothece* PCC 7425..... 5959
Figure 15 Structure des cyanothecamides A, B et C produites par *Cyanothece* PCC 7425 .. 600
Figure 16 Photographie de *Cyanothece* PCC 7822 611
Figure 17 Comparaison de l'opéron *nif* de *Cyanothece* ATCC 51142 et de celui *Cyanothece* PCC 7822.. 6262
Figure 18 Assimilation d'ADN extracellulaire par *Synechocystis* PCC 6803. 6464
Figure 19 Étapes de la conjugaison bactérienne. 6666
Figure 20 Schéma du potentiel redox des électrons issus de la photolyse de l'eau. 700
Figure 21 Cycle de Calvin-Benson-Bassham. 7272
Figure 22 Représentation schématique du métabolisme du carbone chez *Synechocystis* PCC 6803. 7474
Figure 23 Représentation schématique des voies d'assimilation de ressources azotées par les cyanobactéries. 7676
Figure 24 Structure de la nitrogénase.. 7878
Figure 25 Schéma montrant la suite d'évènements qui permet le transfert d'un électron entre la réductase contenant le cluster F et la nitrogénase contenant le cluster P et M. 7878
Figure 26 Représentation schématique de la voie MEP chez les cyanobactéries 8282
Figure 27 Production des caroténoïdes chez *Synechococcus* PCC 7002 8686
Figure 28 Comparaison de la séquence en acides aminés de la protéine DXR. 8989
Figure 29 Comparaison de la séquence en acides aminés de la protéine IspD 8989
Figure 30 Représentation du site de liaison du GPP au niveau de la poche hydrophobe de IspF chez *E. coli.* 900

Figure 31 Alignement des séquences en acides aminés de la protéine IspF chez nos cyanobactéries d'intérets 900
Figure 32 Structure de l'E-α-bisabolene synthase d'*Abies grandis.* 9292
Figure 33 Représentation de l'E-α-bisabolene synthase *d'Abies grandis* lié au farnesyl thiophosphate (FSP) 93
Figure 34 Cyclisation du FPP en bisabolène 93
Figure 35 Voies de production des biocarburants chez les cyanobactéries 9797
Figure 36 Représentation schématique des différentes étapes de mon projet de doctorat. 128128
Figure 37 Cartes des plasmides pFC1 et pC 1300
Figure 38 Construction du plasmide pC-BS 13333
Figure 39 Construction du plasmide pC-FS 13535
Figure 40 Réprésentation schématique d'une chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse 13838
Figure 41 Les spectres d'ion des terpènes d'intérêt 13939
Figure 42 Deux programmes testés pour la séparation des différentes molécules contenues dans le mix d'isomères de farnésène. 14343
Figure 43 Chromatogramme obtenu en injectant le mix d'isomères de farnésène à différents splits et en extrayant les données obtenues pour différents ions 14545
Figure 44 Chromatogramme obtenu en injectant le mix d'isomères de farnésène à différents splits et en extrayant les données obtenues pour l'ion 93.. 14646
Figure 45 Chromatogramme obtenu en injectant le mix d'isomères de farnésène avec un split 5:1, en utilisant le programme 1°C/min et en extrayant les données obtenues pour l'ion 93. 14747
Figure 46 Réalisation de la gamme étalon nécessaire à la quantification des terpènes d'intérêt. 14949
Figure 47 Courbe étalon permettant la quantification du S-limonène. 1500
Figure 48 Courbe étalon permettant la quantification de l'α-pinène. 1511
Figure 49 Courbe étalon permettant la quantification de l'E-α-bisabolène. 15252
Figure 50 Courbe étalon permettant la quantification de l'α-farnésène. 15353
Figure 51 Schéma général du suivi de l'évolution de la quantité de terpènes produits par nos souches de cyanobactéries possédant un plasmide codant pour une terpène synthase. 15555
Figure 52 Protocole d'échantillonnage mis au point afin d'étudier les différentes phases de production 15656
Figure 53 Représentation schématique et photographie d'un gel d'agarose montrant les produits d'amplification par PCR du vecteur pC et de ses dérivés contenant les divers gènes codant pour les terpènes synthases chez *Synechocystis* PCC 6803. 1600
Figure 54 Courbes de croissance de la souche *Synechocystis* PCC 6803 sauvage et des mutants exprimant les gènes codant pour les différentes terpènes synthases en présence ou non de dodécane. 1611
Figure 55 Production de mono et sesquiterpènes par les différentes souches de *Synechocystis* PCC 6803 (pC-LS, pC-BS, pC-FS, pC-PS) 16262

Figure 56 Stabilité de la production de bisabolène, de farnésène et de limonène par *Synechocystis* PCC 6803. 16464
Figure 57 Croissance et évolution de la production de bisabolène, farnésène et limonène par *Synechocystis* PCC 6803 (pC-BS, pC-FS ou pC-LS). 16767
Figure 58 Effet de la lumière sur la croissance et la production de farnésène par *Synechocystis* PCC 6803 pC-FS.. 16969
Figure 59 Effet de la température sur la croissance et la production de farnésène par *Synechocystis* PCC 6803 pC-FS 17070
Figure 60 Effet de l'ajout de bicarbonate (0,6 g/L) à 30°C et 34°C sur la croissance et la production de farnésène par *Synechocystis* PCC 6803 pC-FS. 1711
Figure 61 Effet de l'ajout de bicarbonate (0,4 g/L $NaHCO_3$) sur la croissance et la production de bisabolène par *Synechocystis* PCC 6803 pC-BS.. 17272
Figure 62 Croissance et survie après 7 jours de *Synechocystis* PCC 6803 WT cultivée dans un milieu contenant de l'urée ou du nitrate comme seule source d'azote. 17474
Figure 63 Croissance et production de bisabolène par *Synechocystis* PCC 6803 pC-BS cultivée dans un milieu MM contenant du nitrate ou de l'urée 17575
Figure 64 Voie de biosynthèse des caroténoïdes chez les cyanobactéries avec les enzymes CrtR et CruF entourées respectivement en rouge et en vert..... 17676
Figure 65 Représentation schématique de l'environnement génétique de *crtR* et du mutant Δ*crtR* obtenu 17777
Figure 66 Représentation schématique de l'environnement génétique de *cruF* et du mutant Δ*cruF*..... 17878
Figure 67 Construction des plasmides pCrtR_Km sens et pCrtR_Km antisens 1800
Figure 68 Construction des plasmides pCruF_Km sens et pCruF_Km antisens 1811
Figure 69 Représentation schématique et photographie d'un gel d'agarose des produits d'amplification par PCR des *E. coli* transformées avec le plasmide pTwist_crtR..... 18282
Figure 70 Représentation schématique et photographie d'un gel d'agarose des produits d'amplification par PCR des *E. coli* transformées avec le plasmide pTwist_cruF. 18383
Figure 71 Analyse par PCR des transformants Δ*crtR* de *Synechocystis* PCC 6803 WT ou contenant également le plasmide pC-FS. 18484
Figure 72 Analyse par PCR des transformants Δ*cruF* de *Synechocystis* PCC 6803 WT ou contenant également le plasmide pC-FS. 18585
Figure 73 Impact de l'inactivation de *cruF* et *crtR* sur la croissance et la production de farnésène par *Synechocystis* PCC 6803 pC-FS..... 18686
Figure 74 Stratégie de délétion des voies de stockage du carbone 18787
Figure 75 Impact de l'inactivation partielle de *glgC* sur la croissance et la production de limonène par *Synechocystis* PCC 6803 pC-LS.. 18888
Figure 76 Impact de l'inactivation totale de *phaA* et *phaB* sur la croissance et la production de limonène par *Synechocystis* PCC 6803 pC-LS. 18989
Figure 77 Impact de l'inactivation totale de *phaA* et *phaB* sur la croissance et la production de bisabolène et farnésène par *Synechocystis* PCC 6803 pC-BS ou pC-FS. 18989
Figure 78 Courbe de croissance de la souche *Synechococcus* PCC 7942 WT en présence ou absence de dodécane. 194194

Figure 79 Représentation schématique et photographie d'un gel d'agarose des produits d'amplification par PCR des différents vecteurs d'expression contenant les gènes codant pour les terpènes synthases (pC-LS, pC-BS, pC-FS et pC-PS) chez *Synechococcus* PCC 7942.. 195195
Figure 80 Courbes de croissance de la souche *Synechococcus* PCC 7942 WT et du mutant conjugé avec le vecteur pC-BS ou pC-FS en présence ou absence de dodécane..... 196196
Figure 81 Quantification de la production de mono et sesquiterpènes par les différents mutants de *Synechococcus* PCC 7942 197197
Figure 82 Production de farnésène ou de bisabolène par des clones indépendants de *Synechococcus* PCC 7942 pC-FS ou pC-BS. 198198
Figure 83 Effet de l'ajout de bicarbonate (0,6 g/L) sur la croissance et la production de farnésène par *Synechococcus* PCC 7942 pC-FS..... 199199
Figure 84 Représentation schématique et photographie d'un gel d'agarose des produits d'amplification par PCR des différents vecteurs d'expression contenant les gènes codant pour les terpènes synthases (pC-LS, pC-BS, pC-FS et pC-PS) chez *Synechococcus* PCC 7002.. 2022
Figure 85 Courbes de croissance de la souche *Synechococcus* PCC 7002 sauvage et des mutants exprimant les différentes gènes codant pour les terpènes synthases en présence ou absence de dodécane. 20303
Figure 86 Production de mono et sesquiterpènes par les différentes souches de *Synechococcus* PCC 7002 (pC-LS, pC-BS, pC-FS et pC-PS). 20404
Figure 87 Stabilité de la production de limonène par *Synechococcus* PCC 7002 pC-LS.. 20505
Figure 88 Production de bisabolène ou de farnésène par des clones indépendants de *Synechococcus* PCC 7002 pC-BS ou pC-FS. 20606
Figure 89 Croissance et évolution de la production de limonène, bisabolène et farnésène par *Synechococcus* PCC 7002 (pC-BS, pC-FS ou pC-LS) 20808
Figure 90 Effet de la lumière sur la croissance et la production de limonène par *Synechococcus* PCC 7002 pC-LS..... 20909
Figure 91 Effet de la température sur la croissance et la production de limonène par *Synechococcus* PCC 7002 pC-LS.. 2100
Figure 92 Effet de l'ajout de bicarbonate, à 30°C et 34°C sur la croissance et la production de limonène par *Synechococcus* PCC 7002 pC-LS.. 2111
Figure 93 Croissance et survie après 7 joursde *Synechococcus* PCC 7002 WT cultivée dans un milieu contenant de l'urée ou du nitrate comme seule source d'azote. 2133
Figure 94 Croissance et production de limonène par *Synechococcus* PCC 7002 dans un milieu contenant du nitrate ou de l'urée comme seule source d'azote. 21414
Figure 95 Représentation schématique et photographie d'un gel d'agarose des produits d'amplification par PCR des vecteurs pC-BS, pC-FS et pC-PS introduits chez *Cyanothece* PCC 7425. 24242
Figure 96 Courbe de croissance de la souche *Cyantohece* PCC 7425 exprimant les gènes codant pour différentes terpènes synthases en présence ou absence de dodécane..... 24343
Figure 97 Croissance et production de bisabolène par deux clones indépendants de *Cyanothece* PCC 7425 pC-BS 24444

Figure 98 Croissance et production de farnésène par deux clones indépendants de *Cyanothece* PCC 7425 pC-FS. 24545
Figure 99 Courbe de croissance de la souche *Cyanothece* PCC 7822 sauvage à différentes intensités lumineuses). 24747
Figure 100 Représentation schématique et photographie d'un gel d'agarose des produits d'amplification par PCR des vecteurs pC et pC-LS chez *Cyanothece* PCC 7822.. 24848
Figure 101 Courbe de croissance de la souche *Cyanothece* PCC 7822 WT et des mutants pC et pC-LS en présence ou absence de dodécane. 24949
Figure 102 Effet de la quantité d'azote dans le milieu de culture sur la croissance et la production de limonène par *Cyanothece* PCC 7822 pC-LS. 2500
Figure 103 Les différents composés produits par la santalène synthase de *S. album* à partir du farnésyl pyrophosphate.. 25353
Figure 104 Représentation schématique et photographie d'un gel d'agarose des produits d'amplification par PCR du vecteur pC-SS chez *Synechocystis* PCC 6803, *Synechococcus* PCC 7942, *Synechococcus* PCC 7002 et *Cyanothece* PCC 7425. 25454
Figure 105 Chromatogrammes montrant la production des isomères du santalène chez *Synechocystis PCC 6803* pC-SS. 25656
Figure 106 Chromatogrammes montrant la production des isomères du santalène chez *Cyanthoce* PCC 7425 pC-SS. 25757
Figure 107 Chromatogrammes montrant la potentielle production des isomères du santalène chez *Synechococcus* PCC 7942 pC-SS 25858
Figure 108 Chromatogramme montrant que *Synechococcus* PCC 7002 pC-SS ne produit pas de santalène. 25959
Figure 109 Exemple de chromatogramme obtenu pour *E. coli* exprimant le gène codant pour la santalène synthase de *Santalum album.* 2600
Figure 110 Représentation schématique des différentes étapes, des résultats et des perspectives de ma thèse. 26464
Figure 111 Représentation schématique du système HDC. 26565
Figure 112 Alignement des séquences en acides aminés de la protéine IspA de nos diverses souches de cyanobactéries 2700
Figure 113 Représentation schématique du métabolisme central du carbone chez les cyanobactéries et des modifications génétiques à réaliser pour améliorer la production de terpènes. 27373
Figure 114 Représentation schématique du protocole de conjugaison 29293
Figure 115 Représentation schématique des étapes permettant l'obtention des mutants de délétion. 296296
Figure 116 Représentation schématique de la réalisation d'une courbe de croissance … 298298
Figure 117 Photographie annotée d'une presse de Eaton 3000
Figure 118 Réaction chimique permettant le dosage de l'activité beta-galactosidase 3022
Figure 119 Biais de codon de *Synechocysits* PCC 6803 36060
Figure 120 Biais de codon de *Synechococcus* PCC 7942 3600
Figure 121 Biais de codon de *Synechococcus* PCC 7002 3611

Figure 122 Comparaison des biais de codon rares chez *Synechocystis* PCC 6803 et *Synechococcus* PCC 7002 et impact sur l'expression du gène codant pour la bisabolène synthase 3611
Figure 123 Comparaison des biais de codon rares chez *Synechocystis* PCC 6803 et *Synechococcus* PCC 7002 et impact sur l'expression du gène codant pour la farnésène synthase 36262
Figure 124 Biais de codon de *Cyantohece* PCC 7425..... 36262
Figure 125 Comparaison du biais de codon de *Cyanothece* PCC 7425 et de celui de *Synechocystis* PCC 6803. 36363
Figure 127 Chromatogrammes et spectres de masse montrant la production de S-(-)- limonène par *Synechocystis* PCC 6803 pC-LS. 37272
Figure 128 Chromatogrammes et spectres de masse montrant la production d' α-pinène par *Synechocystis* PCC 6803 pC-PS..... 37373
Figure 129 Chromatogrammes et spectres de masse correspondants montrant la production d'E-α-bisabolène ou d'α-farnésène par *Synechocystis* PCC 6803 pC-BS ou pC-FS. 37474
Figure 130 Chromatogrammes et spectres de masse montrant la production de S-(-)- limonène par *Synechococcus* PCC 7942 pC-LS 37575
Figure 131 Chromatogrammes et spectres de masse correspondants montrant la production d'E-α-bisabolène ou d'α-farnésène par *Synechococcus* PCC 7942 pC-BS ou pC-FS. 37676
Figure 132 Chromatogrammes et spectres de masse montrant la production de S-(-)- limonène par *Synechococcus* PCC 7002 pC-LS. 37777
Figure 133 Chromatogrammes et spectres de masse montrant la production d' α-pinène par *Synechococcus* PCC 7002 pC-PS..... 37878
Figure 134 Chromatogrammes et spectres de masse correspondants montrant la production d'E-α-bisabolène ou d'α-farnésène par *Synechococcus* PCC 7002 pC-BS ou pC-FS 37979
Figure 135 Chromatogrammes et spectres de masse correspondants montrant la production d'E-α-bisabolène ou d'α-farnésène par *Cyanothece* PCC 7425 pC-BS ou pC-FS 3800
Figure 136 Chromatogrammes et spectres de masse montrant la production de S-(-)- limonène par *Cyanothece* PCC 7822 pC-LS..... 3811

Index des tableaux

Tableau 1 Classification des terpènes. 32
Tableau 2 Caractéristiques des « terpènes carburants » par rapport à celles du Diesel fossile et du biodiesel 35
Tableau 3 Test du géranial et le farnésène dans un moteur à combustion Diesel 36
Tableau 4 Caractéristiques des « terpènes carburants » par rapport à celle du carburant d'aviation commerciale Jet A-1. 37
Tableau 5 Les caractéristiques des *Cyanothece.* 57
Tableau 6 Présence des gènes du transport et du catabolisme de l'urée dans les cyanobactéries sélectionnées pour l'étude 80
Tableau 7 Gènes codant pour les enzymes de la voie MEP chez nos cyanobactéries d'intérêt 84
Tableau 8. Tableau récapitulatif des différentes études de photoproduction de terpènes par les cyanobactéries. 99
Tableau 9 Avantages et inconvénients des différents systèmes d'expression 106
Tableau 10 Concentration en acétyl-CoA, pyruvate, G3P et IPP/DMAPP pour les souches de cyanobactéries unicellulaires modèles et pour *E.* coli 114
Tableau 11 Rendements en bisabolène, bisabolol et patchoulol par *Synechocystis* PCC 6803 selon le système de culture 122
Tableau 12 – Toxicité des différents terpenoïdes 125
Tableau 13 Caractéristiques des terpènes à quantifier et de leurs standards internes.. 141
Tableau 14 Vérification de la justesse et la répétabilité du protocole de quantification du bisabolène par GC-MS. 154
Tableau 15 Etapes permettant de déterminer la concentration en terpènes produits à partir des aires des pics obtenus en GC-MS 157
Tableau 16 Composition de l'huile de bois de santal extraite de *Santalum album*. 253
Tableau 17 Souches d'*Escherichia coli* utilisées 275
Tableau 18 Liste et caractéristiques des amorces utilisées dans l'étude 276
Tableau 19 Mix à réaliser pour l'amplification d'ADN en utilisant la *Taq* polymérase 278
Tableau 20 Le programme utilisé pour l'amplification d'ADN en utilisant la *Taq* polymérase 278
Tableau 21 Mix à réaliser pour l'amplification d'ADN en utilisant la Phusion polymérase .. 278
Tableau 22 Le programme utilisé pour l'amplification d'ADN en utilisant la Phusion polymérase 279
Tableau 23 Le cycle permettant la lyse cellulaire 279
Tableau 24 Réalisation d'une digestion enzymatique 281
Tableau 25 Composition des milieux de culture utilisés pour les souches de cyanobactéries d'eaux douces.. 285
Tableau 26 Composition en éléments traces des différents milieux dérivant du BG11 286
Tableau 27 Composition des milieux de culture utilisés pour *Synechococcus* PCC 7002 286
Tableau 28 Composition en éléments traces dans les milieux dérivant du milieu A+ 286

Tableau 29 Composition des solutions mères utilisées pour la croissance avec différentes sources d'azote. 287
Tableau 30 Équivalence entre la DO_{750nm} et le nombre de cellules pour chaque souche de cyanobactéries. 288
Tableau 31 Concentrations en antibiotiques utilisées pour les différentes souches de cyanobactéries. 288
Tableau 32 Les plasmides utilisés pour étudier la modification génétique des souches encore peu connues de cyanobactéries 289
Tableau 33 Les plasmides utilisés pour exprimer les gènes codant pour les terpènes synthases dans nos cyanobactéries d'intérêt 291
Tableau 34 Les plasmides utilisés pour inactiver les gènes *cruF* et *crtR* impliquées dans la voie de biosynthèse des caroténoïdes 294
Tableau 35 DO_{750nm} initiale et concentration cellulaire utilisées pour chaque souche de cyanobactérie 297
Tableau 36 Liste des produits utilisés pour le dosage des terpènes 299
Tableau 37 Volume de standard interne à ajouter pour la quantification par GC-MS 299
Tableau 38 Rendements obtenus pour chaque terpène pour chacune des souches de cyanobactéries étudiées. 262
Tableau 39 Rôles des caroténoïdes chez les cyanobactéries 356
Tableau 40 Les mutants de *Synechocystis* PCC 6803 déficients en certains caroténoïdes et leurs phénotypes. 358
Tableau 41 Réalisation de la gamme étalon pour la quantification du limonène. 368
Tableau 42 Réalisation de la gamme étalon pour la quantification du pinène. 369
Tableau 43 Réalisation de la gamme étalon pour la quantification du bisabolène. 370
Tableau 44 Réalisation de la gamme étalon pour la quantification du farnésène. 371

Introduction

Chapitre 1 : Les terpènes, des hydrocarbures avec de nombreuses propriétés intéressantes

I. Le pétrole et la pétrochimie

1. Importance du pétrole et de la pétrochimie dans notre vie de tous les jours

a. Quelques chiffres et définitions

D'après le dictionnaire « American Heritage Dictionary », le pétrole est une huile minérale épaisse composée d'une multitude de composés organiques, essentiellement des hydrocarbures inflammables à la fois sous forme gazeuse, liquide et solide. C'est une mixture complexe qui peut être utilisée pour la production de nombreux produits de notre vie quotidienne grâce à la pétrochimie.
En 2016, la consommation mondiale de pétrole était de 96,6 millions de barils (1 baril = 159 litres) par jour ("connaissances des energies.org,"; "planetoscope,"). L'agence internationale de l'énergie (AIE) prévoit une forte augmentation de la consommation pétrochimique mondiale. Cette dernière devrait augmenter de 30 % d'ici à 2030 et de 60 % d'ici à 2050. Cela est notamment dû à l'accroissement de la démographie (9 milliards d'individus d'ici 2030-2050) et le développement des pays émergents.

b. Notre monde est dépendant du pétrole pour se déplacer

Du fait de sa facilité de stockage et de transport, le pétrole s'est rapidement imposé, lors des deux guerres mondiales, comme le carburant majeur. Pourtant, si aujourd'hui, le pétrole fournit la quasi-totalité des carburants liquides (fioul, gazole, kérosène, essence, GPL), ce n'était pas le cas au début de l'automobile. Le moteur à explosion inventé par Nikolaus Otto avait été conçu pour fonctionner avec de l'éthanol et la Ford T (produite de 1903 à 1926) roulait avec cet alcool. Par ailleurs, la première voiture à dépasser les 100 km/h roulait à l'électricité et la première à dépasser les 200 km/h roulait à la vapeur.

c. Notre monde dépend de la pétrochimie pour se loger, se divertir, s'habiller, se nourrir et se soigner

Aujourd'hui, l'utilisation du pétrole ne s'arrête pas à une combustion dans les moteurs de nos voitures. Plastiques (polyéthylène, polypropylène et polystyrène), matériaux de construction, électroménagers, équipements informatiques, fibres textiles, meubles, peintures, cosmétiques, médicaments (pénicilline et aspirine), emballages alimentaires, *etc*… Tous ces produits du quotidien sont issus de la pétrochimie, c'est-à-dire la chimie des dérivés du pétrole ("La pétrochimie : une industrie incontournable").

2. Des ressources qui vont devenir de plus en plus couteuses à exploiter

Les réserves de pétrole sont les volumes de pétrole récupérables dans les gisements exploités ou pouvant l'être au vu des critères techniques et économiques actuels. Lorsqu'on parle de réserves de pétrole, les chiffres sont bien souvent ceux des réserves « prouvées », c'est à dire celles que l'on est « sûr » (à 90%) de pouvoir extraire. En 2015, ces réserves étaient estimées dans le monde à 1 698 milliards de barils, soit l'équivalent d'environ 51 ans de production mondiale au rythme actuel. Les cinq pays disposant des plus importantes réserves prouvées de pétrole sont :

- Le Venezuela avec 300,9 milliards de barils de pétrole (17,7%) ;
- L'Arabie saoudite avec 266,6 milliards de barils (15,7%) ;
- Le Canada avec 172,2 milliards de barils (10,1%) ;
- L'Iran avec 157,8 milliards de barils (9,3%) ;
- L'Irak avec 143,1 milliards de barils (8,4%).

Cependant, le pétrole existe sous de nombreuses formes dont le coût d'extraction varie fortement : la grande majorité des réserves vénézuéliennes et canadiennes sont ainsi constituées d'hydrocarbures « non conventionnels » (huiles extra-lourdes au Venezuela, sables bitumineux au Canada) dont l'extraction est bien plus coûteuse que celle du pétrole brut « conventionnel » extrait en Arabie saoudite.

L'exploitation et les investissements dans la recherche de nouveaux gisements de pétrole sont directement liés au cours du pétrole (40 dollars / baril en septembre 2020). Plus le prix du pétrole est élevé et plus l'investissement dans la recherche de nouveaux gisements et l'exploitation des gisements moins accessibles (offshore, pétrole lourd, réserve en Arctique) vont être importants. Par conséquent, au fur et à mesure que les réserves pétrolières « conventionnelles » vont diminuer, le prix du pétrole va augmenter et par conséquent des nouveaux gisements seront découverts et mis en exploitation ("connaissances des energies.org,")
L'idée selon laquelle nous allons rapidement être à court de ressources fossiles semble donc infondée. En revanche, la bataille pour cette ressource précieuse est un enjeu géopolitique majeur et sa raréfaction va entrainer une forte augmentation de son prix bouleversant

l'économie mondiale. De plus, les dangers de l'industrie pétrochimique sur l'environnement et la santé humaine sont quant à eux, bien fondés.

3. Les dangers des ressources fossiles

a. Impacts de la pollution atmosphérique

L'agence internationale de l'énergie évalue les émissions mondiales de CO_2 dues au pétrole à 11 232 millions de tonnes en 2016 ce qui n'est pas sans conséquence sur la santé humaine. D'après l'organisation mondiale de la santé, 7 millions de morts prématurées sont dues à la pollution atmosphérique, cela équivaut à un huitième des morts mondiales et aurait un coût mondial de 1.4 trillions de dollars par an.

De plus, l'augmentation de la quantité de CO_2 dans l'atmosphère a un effet néfaste sur l'environnement. Cela entraine l'acidification des eaux et des sols et impacte la croissance des végétaux. On observe alors une diminution des rendements agricoles (et donc une augmentation de l'utilisation des pesticides pétrosourcés créant un cercle vicieux) et une altération des écosystèmes aquatiques.

b. La pollution plastique

Selon un rapport de l'ONU, en seulement 65 ans, l'homme a produit 9 milliards de tonnes de plastique dont une très faible proportion est recyclée. De ce fait, chaque année, c'est plus de 8 millions de tonnes de déchets plastiques qui sont déversées dans les océans. Cela a des conséquences dramatiques sur la biodiversité (Brandon *et al.*, 2019; "statista.com," ; "WWF,").

c. Les autres pollutions

Par ailleurs, chaque année plus de 6 millions de tonnes d'hydrocarbures sont déversées sur notre planète. Ces rejets proviennent de rejets terrestres (industriels, urbains), de la navigation (peinture des coques des bateaux, marées noires) ou des travaux de recherche et d'exploitation en mer.

Il faut par conséquent trouver de nouvelles alternatives au pétrole/objets issus de la pétrochimie afin de préserver le monde et notre santé de leurs effets néfastes.

II. Les biocarburants

1. Les principes de la chimie verte

La notion de chimie verte est apparue dans les années 1990 aux USA avec pour objectif de concevoir des produits et procédés permettant de réduire l'utilisation et la synthèse de substances dangereuses. Elle doit permettre de produire de la nourriture et de l'eau potable, des médicaments et de l'énergie tout en protégeant l'environnement. C'est en 2000 que Paul Anastas et John Warner ont publié les bases théoriques de cette nouvelle discipline (Anastas and Warner, 2000). Parmi les grands principes de la chimie verte, on trouve la nécessité de limiter la pollution à la source plutôt que de mettre en place des procédés de traitement des déchets ; d'utiliser des procédés de production directs afin de ne pas générer de co-produits ; de préférer des procédés catalytiques qui accélèrent la vitesse de réaction en abaissant l'énergie nécessaire ; d'utiliser des ressources et énergies plus durables et de concevoir un produit en vue de sa dégradation finale (Anastas and Warner, 2000; Sarrade, 2011).

La chimie du végétal joue actuellement un rôle important dans la chimie verte pour la production d'agromatériaux (panneaux d'isolation, papiers, colles végétales…) et de biocarburants. Cependant, comme il sera développé par la suite, la production de biomasse végétale pour la chimie verte entre en compétition avec l'alimentation humaine et animale ce qui freine son développement.
C'est là qu'intervient le génie biologique et la microbiologie. La bio-ingénierie est une technique prometteuse pour mener à bien les défis de développement durable. En effet, de nombreuses réactions chimiques peuvent être réalisées au sein d'un (micro-)organisme en utilisant ses enzymes comme catalyseurs et par conséquent de nombreuses molécules carbonées d'intérêt peuvent être produites par ces (micro-)organismes à partir de sucres (organismes hétérotrophes) ou de CO_2 (organismes photosynthétiques).
Le bioéthanol est la principale molécule biosourcée commercialisée avec 22 860 et 53 064 millions de litres de bioéthanol produits en 2013 par le Brésil et les États-Unis.

Je vais détailler ci-dessous les différents processus permettant la production de biocarburants et les différentes biomasses utilisées pour leurs productions.

2. Les différents biocarburants

a. Bioessence et biodiesel

Le bioéthanol peut être utilisé dans les moteurs à essence sous différentes formes :

- Mélangé de façon systématique à l'essence dans une proportion de 5% (SP95) ou 10% (SP95-E10) sans modification du véhicule,
- Transformé en ETBE (Ethyl tertio butyle éther fabriqué à partir d'éthanol et d'isobutène) qui peut être mélangé à hauteur de 15% dans l'essence,

- En tant que carburant à part entière : l'E85, qui contient entre 65 et 85% de bioéthanol, est destiné à des véhicules Flex Fuel qui disposent des adaptations nécessaires à son utilisation.

La bioessence de synthèse peut être produite à partir d'huile de palme hydrotraitée. Le produit ainsi obtenu est totalement miscible à l'essence et peut être incorporé à hauteur de quelques pourcents. Ainsi, en France, en 2017, 7,5% de l'énergie contenue dans l'essence était d'origine renouvelable (3,4% sous forme d'éthanol, 2,3% sous forme d'ETBE, et 1,2% sous forme de bioessence (ecologique-solidaire.gouv, 2020)).

Le biodiesel utilisé dans les voitures Diesel peut-être produit à partir d'huiles (végétales, alimentaires usagées ou graisses animales) estérifiées. Ainsi, les esters d'acide gras obtenus peuvent être :

- Mélangés au diesel à hauteur maximale de 7% ou 10% en volume (diesel B7 ou B10).
- Mélangés au diesel à hauteur de 30% pour produire le diesel B30 qui n'est pas commercialisé en station-service car il n'est pas compatible avec les moteurs Diesel déjà mis en circulation.

Le biodiesel peut également être produit par hydrotraitement d'huiles végétales et de graisses animales ou par conversion thermochimique. La conversion thermochimique comprend un procédé de gazéification (biomasse → monoxyde de carbone (CO) + dihydrogène (H_2)) puis une réaction de Fischer-Tropsch (CO et H_2 → hydrocarbures). Les biodiesels ainsi obtenus ont des propriétés comparables voire supérieures à celles du diesel. En 2017, 7,7% de l'énergie contenue dans le diesel provenait de biocarburants (6,85% sous forme d'esters méthyliques d'acides gras et 0,85% provenant d'huiles hydrogénées (ecologique-solidaire.gouv, 2020)).

Différentes biomasses peuvent être utilisées pour la production de la bioessence et du biodiesel, elles sont réparties en 3 générations que je vais décrire dans les paragraphes suivants. Je donnerai à chaque fois les avantages et inconvénients des différentes générations de biomasses.

b. Biocarburants de première génération

Le bioéthanol, dit de première génération, est fabriqué à partir de la fermentation des sucres extraits des plantes sucrières (betterave, canne à sucre) ou des plantes amylacées (blé ou maïs). L'extraction de ces sucres ne nécessite pas de traitement de la biomasse. Cette première génération de biocarburant inclut également l'essence fabriquée à partir d'huile de palme hydrotraitée (Figure 1).
Le biodiesel, dit de première génération est fabriqué à partir d'huiles végétales estérifiées (esters méthyliques d'acides gras) extraites de plantes oléagineuses (principalement le colza mais aussi tournesol, soja et palme (Figure 1)).

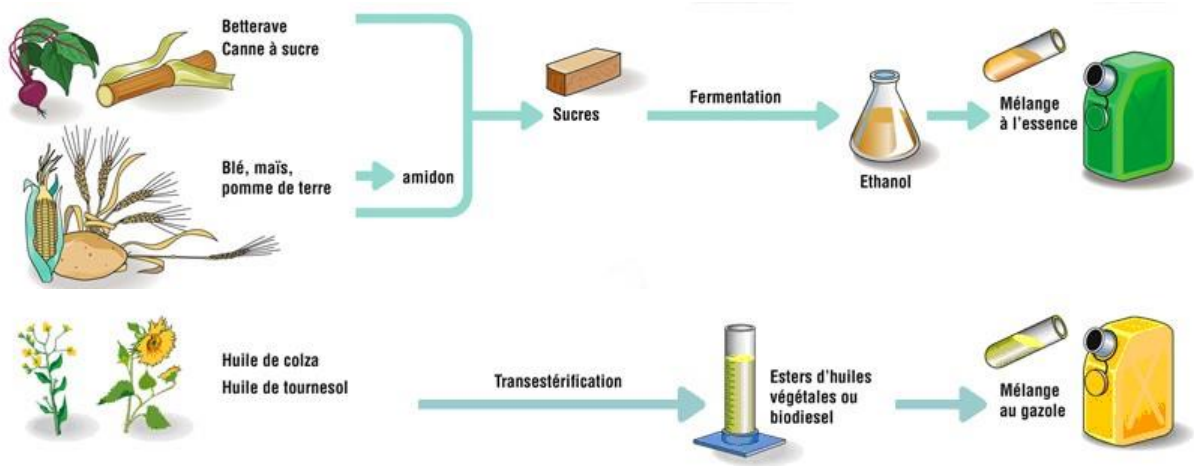


Figure 1 Production des biocarburants de première génération. Schéma tiré de (ecologique-solidaire.gouv, 2020).

Ces biocarburants permettent la réduction de l'émission de gaz à effet de serre et l'indépendance énergétique des pays par rapport aux pays producteurs de pétrole. De plus, certains co-produits générés (pulpe de betterave, drêches) peuvent être utilisés en alimentation animale ou en épandage agricole. Cependant, l'utilisation de ces ressources vivrières menace l'alimentation humaine et animale, provoque une déforestation accélérée et engendre des émissions importantes de gaz à effet de serre à travers la fertilisation des champs. En France, les cultures utilisées pour la production de bioéthanol représentent environ 3% de la surface agricole française globale de céréales et de plantes sucrières (ecologique-solidaire.gouv, 2020).
Ces obstacles ont entrainé le développement des biocarburants dits de seconde génération.

c. Biocarburants de seconde génération

Le bioéthanol, dit de seconde génération, est produit à partir de sucres extraits de biomasses lignocellulosiques telles que les tiges de blé et de maïs, la bagasse, les résidus de bois, les cultures dédiées de *Miscanthus* et *Panicum virgatum*. L'extraction des sucres nécessite de séparer les entremêlas de lignine, cellulose et hémicellulose qui constituent cette biomasse. Pour cela, un prétraitement (à base d'acide concentré ou thermique) suivi d'une hydrolyse enzymatique doit être mis en place (Figure 2). Cela est généralement très couteux et nécessite beaucoup d'énergie.

Les biomasses lignocellulosiques ainsi que la fraction organique des déchets municipaux peuvent également être converties en hydrocarbures par conversion thermochimique produisant ainsi du biodiesel de seconde génération (Figure 2). Cette technique a l'avantage de ne pas nécessiter la séparation des différents composants de la biomasse lignocellulosique.

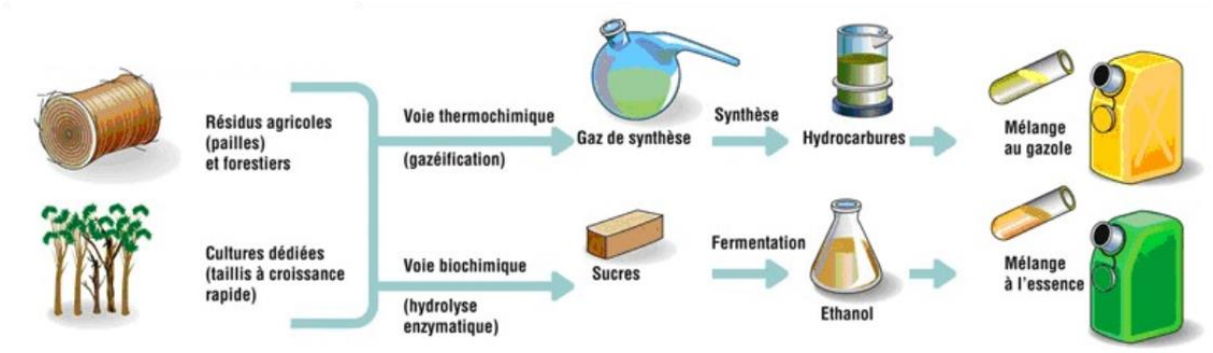


Figure 2 Production des biocarburants de seconde génération. Schéma tiré de (ecologique-solidaire.gouv, 2020).

L'utilisation de cette biomasse de seconde génération a plusieurs avantages. Elle est moins couteuse et plus diversifiée (moins d'impact saisonnier, utilisation des déchets présents près de l'usine). Son bilan énergétique est également plus favorable que celui des biomasses de première génération (rapport WTW, 2007).
Cependant, l'utilisation de cette biomasse entre en compétition direct avec l'alimentation animale (fourrage) mais aussi indirectement avec l'alimentation humaine pour l'espace cultivable (notamment pour les cultures dédiées (Babcock and Fabiosa, 2011). Les préoccupations environnementales liées à la production de biocarburants de seconde génération sont aussi dues à la peur d'une déforestation non contrôlée (notamment pour les cultures dédiées) ainsi qu'à l'utilisation massive d'énergie et de produits chimiques nécessaires pour séparer les différents composants de la biomasse lignocellulosique. De plus, le coût d'investissement initial pour la construction des usines de production de bioéthanol ou biodiesel 2G est trop important pour garantir la viabilité de ces industries (voir analyse NREL (Aden *et al.*, 2002; Kabir Kazi *et al.*, 2010), exemple de l'entreprise BetaRenewables).

d. Biocarburants de troisième génération

Les biocarburants, dits de troisième génération, sont produits par les microalgues ou les cyanobactéries. Ces microorganismes peuvent accumuler des acides gras qui, une fois extraits et transestérifiés, peuvent servir de biodiesel (Figure 3).
Certaines espèces de microalgues et de cyanobactéries accumulent également des sucres qui après fermentation en bioéthanol ou en hydrocarbures pourraient être mélangés à l'essence, au kérosène ou au gazole (Figure 3).

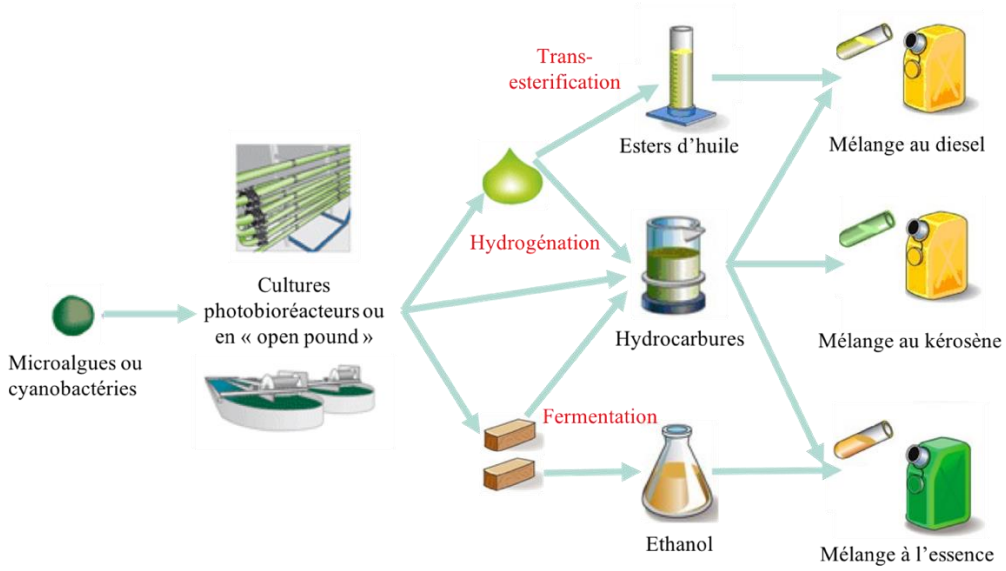


Figure 3 Production des biocarburants de troisième génération.

Les avantages de cette biomasse sont nombreux. Tout d'abord, contrairement aux biomasses de 1ère et 2nde générations, la culture des microalgues et des cyanobactéries ne mobilise pas de surfaces agricoles ou forestières et n'est pas soumise aux contraintes environnementales (sécheresse, maladies). Leur culture peut être réalisée dans des endroits non propices à l'agriculture.
De plus, ces microorganismes ne requièrent que de la lumière, du CO_2, de l'azote et quelques autres minéraux pour croître. La production d'algocarburants permet d'absorber une partie des rejets industriels carbonés (provenant par exemple d'une centrale électrique thermique, d'une cimenterie ou d'une papeterie) et peut être couplée au recyclage des eaux usées (Beal *et al.*, 2012). Ainsi, il est possible de fermer le cycle du carbone (Demirbas, 2011) : le CO_2 rejeté dans l'atmosphère au moment de la combustion des algocarburants ne serait finalement que celui qui a été absorbé par le microorganisme. Enfin, les microalgues et cyanobactéries présentent une productivité élevée par rapport aux plantes : elles contiennent jusqu'à 70% d'huile et pourraient produire jusqu'à 10 fois plus de litres d'huile par hectare que le colza, et 20 fois plus que le tournesol ("http://www-heliobiotec.cea.fr,").

Cependant, la culture de ces microorganismes requière de grandes quantités d'eaux (999 kg d'eau pour 1 kg de biomasse), de nitrate (azote) et de phosphate. Les coûts de culture représentent entre 30% et 50% du coût de production et les conditions de culture sont souvent peu respectueuses de l'environnement. L'étape de centrifugation nécessaire pour séparer les microalgues et cyanobactéries de leurs milieux de culture puis l'étape d'extraction des lipides sont très couteuses et énergivores. De plus, les huiles obtenues doivent être transformées en biocarburants par les processus matures utilisés pour les biocarburants de 1ère et 2nde génération.

Afin d'augmenter les rendements, il faut créer des souches génétiquement modifiées capables de croître plus rapidement, d'accumuler de grandes quantités de lipides ou d'hydrocarbures et de sécréter directement ces molécules dans leurs milieux de culture (Gressel, 2008; Amaro *et*

al., 2011). Cela pose cependant des problèmes car ce sont des OGM et qu'il est nécessaire d'appliquer des règles pour leur confinement (Henley *et al.*, 2013).
Cette technologie est récente (Ruthsatz *et al.*, 2014) et ses bénéfices environnementaux sont assez mitigés (Lardon *et al.*, 2009; Clarens *et al.*, 2011). Cependant elle reste très prometteuse (Zhu *et al.*, 2012). C'est pour cela que de nombreux investissements sont réalisés dans cette filiale (projet européens All-GAS, BIOFAT et INTESUSAL, projets français GreenStars et Probio3, HélioBiotec).

Afin de permettre aux algocarburants d'être compétitifs sur le marché de l'énergie, il faudrait réduire au maximum les coûts de production, d'extraction et de transformation. Afin de réduire les couts de production, il est possible d'utiliser de l'eau polluée et/ou salée ainsi que de l'urée (polluant fréquent) comme seule source d'azote. Il serait également intéressant de produire des hydrocarbures n'ayant pas besoin d'être extraits des microorganismes et pouvant être utilisés directement dans les moteurs existants. On parle ici de « Drop-in biofuels » qui selon l'agence internationale de l'énergie sont des « hydrocarbures liquides qui sont fonctionnellement équivalent aux ressources fossiles et complètement compatibles avec les infrastructures pétrolières existantes ». De plus, afin de garantir la rentabilité économique du procédé, il faudrait que les molécules produites aient des applications dans d'autres domaines que celui de l'énergie.
Les terpènes, des hydrocarbures volatils, répondent à ces critères : ils diffusent au travers de la paroi des microorganismes facilitant leurs extractions, ils peuvent être utilisés directement dans les moteurs existants et ils ont des applications diverses dans d'autres secteurs industriels.

La production de terpènes dans les cyanobactéries à partir de lumière et de CO_2 est non seulement faisable mais pourrait devenir rentable en augmentant les rendements. Cependant, les nombreuses études réalisées jusqu'à présent pour améliorer les rendements de production sont restées infructueuses. Il faudra donc plusieurs années avant d'atteindre des niveaux de production suffisants.

Dans la partie suivante, je vais vous présenter les caractéristiques des terpènes, leurs nombreuses utilisations ainsi que les terpènes à faire produire par les cyanobactéries durant mon travail de thèse. Puis, je parlerai des cyanobactéries, de leur métabolisme et de leurs utilisations en biotechnologies. Enfin, je réaliserai un état des lieux de la production de terpènes chez les cyanobactéries et des stratégies mises en place afin d'augmenter les rendements de production.

III. Les terpènes, des molécules à haute valeur ajoutée avec des applications dans de nombreux domaines

1. Les terpènes, un groupe d'hydrocarbures très divers et abondants

Les terpènes sont une vaste famille d'hydrocarbures (plus de 77 000 d'après la base de données « Dictionary of Natural Products ») linéaires ou cycliques. Le nombre d'atomes de carbone et d'hydrogène dont ils sont constitués sont des multiples de l'isoprène (C_5H_8).
Chez les organismes vivants, l'isoprène est synthétisé à partir du dimethylallyl diphosphate (DMAPP) par élimination du groupement pyrophosphate. Les autres terpènes sont synthétisés par additions successives d'isopentenyl diphosphate (IPP) au précurseur DMAPP suivant la règle biogénique de l'isoprène (Figure 4 ; (Ruzicka, 1953; Davies *et al.*, 2015)).
L'assemblage successif des unités d'isoprène produit des molécules linéaires mais peut également conduire à la formation de composés cycliques (Tableau 1, (Davies *et al.*, 2015)). La gomme (cis 1,4 polyisoprene) est le terpène avec la plus grande chaine carbonée, elle comprend plus de 100 000 unités d'isoprène.

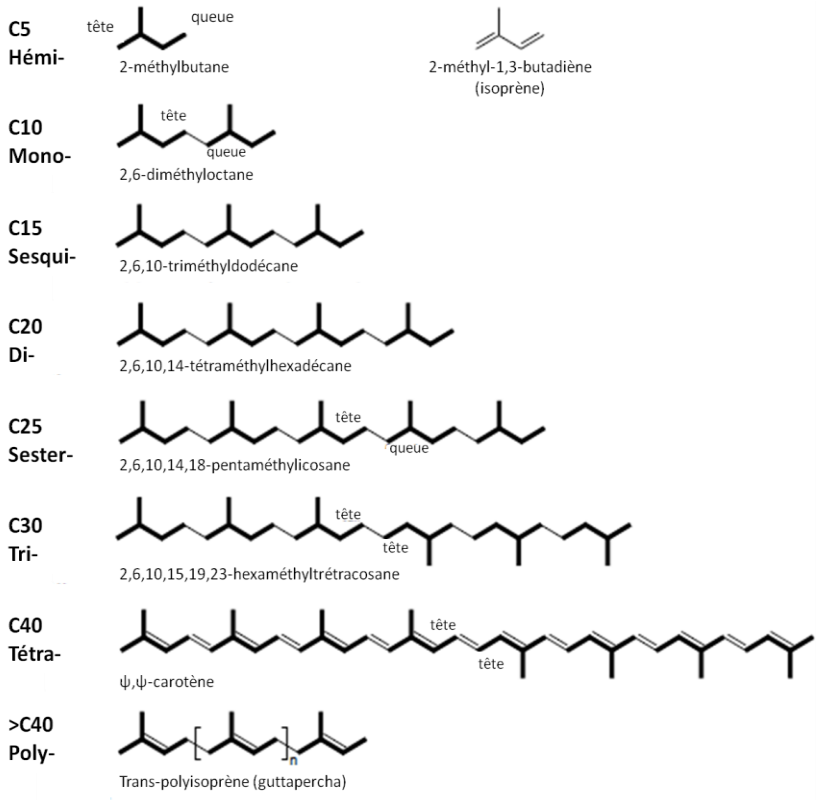
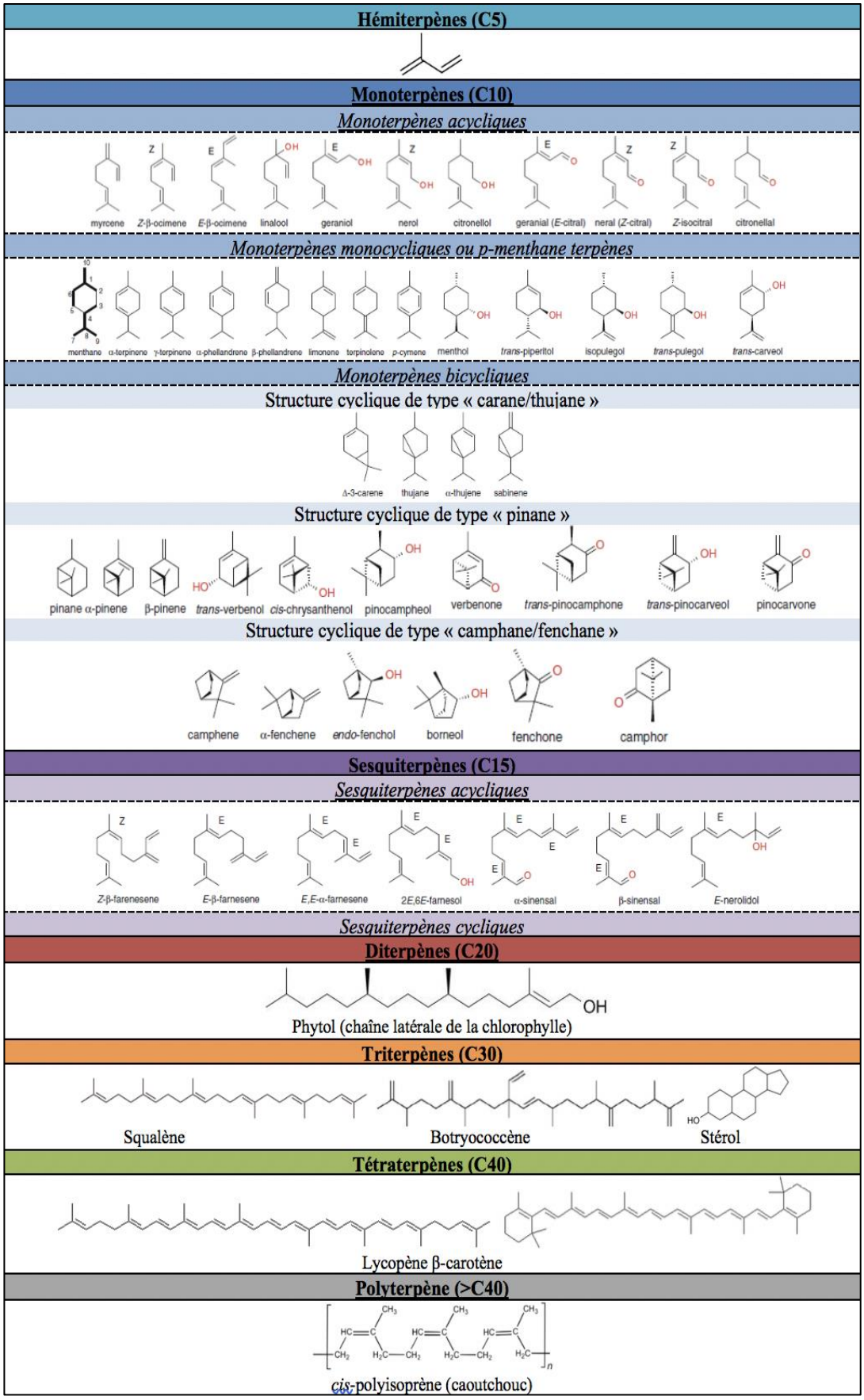


Figure 4 Représentation de la règle biogénique de l'isoprène (Ruzicka, 1953)

Cependant, la longueur de leur chaine carbonée, à elle seule, n'explique pas leur diversité fonctionnelle. Cette diversité est également créée par les réarrangements structuraux qui

incluent le degré de saturation (α-farnésène et α-farnèsane par exemple), l'isomérisation (L-limonène et D-limonène), la cyclisation, la linéarisation et l'addition de groupements fonctionnels (groupements hydroxyle pour le (-)-menthol, farnesol, phytol, et stérol; groupements cétone pour le S-carvone). Lorsque des groupements fonctionnels sont présents dans la chaine carbonée des terpènes, on parle alors de « terpenoïdes ». La classification des terpènes, présentée ci-dessous (Tableau 1), s'appuie sur le nombre de carbone mais également sur la structure du squelette carboné (acyclique ou avec un ou plusieurs cycles).

Tableau 1 Classification des terpènes. Tableau extrait de (Kammerscheit, 2019)



Le comité américain de nomenclature en chimie organique a posé les règles de nomenclature des monoterpènes acycliques, monocycliques et bicycliques (pour revue (Crane, 1955; Chizzola, 2013)). Cependant, devant la complexité et la diversité des terpènes, leur nom d'usage est généralement basé sur la plante dont ils ont été extraits. Par exemple, le pinène est très largement produit par le pin (*Pinus*) et le menthol par la menthe (*Mentha*).

La diversité structurelle et fonctionnelle des terpènes explique en partie leurs nombreux rôles et leurs importances dans la nature. Les terpènes sont synthétisés par la majorité des êtres vivants et notamment par les plantes qui en produisent de nombreux (Chizzola, 2007; Figueiredo *et al.*, 2008; Miyazawa *et al.*, 2010; Teuscher and Lindequist, 2010; Kumari, 2018). La voie de biosynthèse des terpènes chez les cyanobactéries sera détaillée dans le chapitre 2 de ce manuscrit.

2. Les nombreuses applications industrielles des terpènes

Dans les paragraphes suivants, je vais présenter les diverses applications des terpènes en détaillant plus particulièrement celles des terpènes utilisés dans mon étude. Quatre de ces terpènes (E-α-bisabolène, α-farnésène, α-pinène et S-(-)-limonène) ont démontré des propriétés très intéressantes comme carburants dans l'industries du transport automobile ou aérien (Hellier *et al.*, 2013; George *et al.*, 2015). Je me suis également intéressée aux terpènes présents dans l'huile de bois de santal, une huile fortement valorisée en parfumerie (Figure 5).

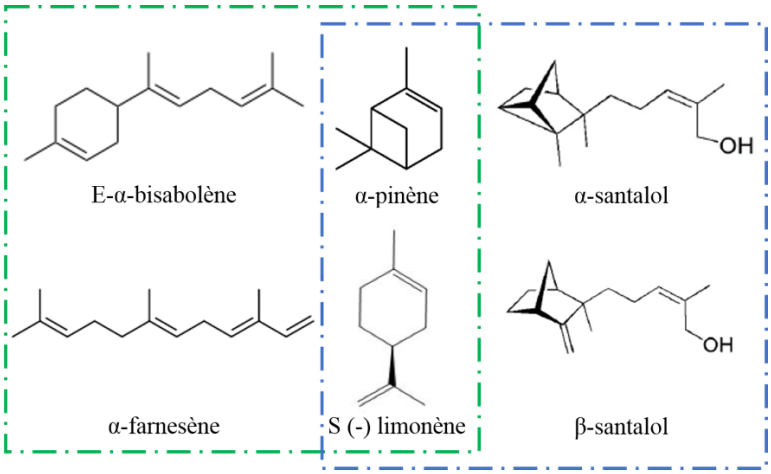


Figure 5 Structure des terpènes utilisés dans mon étude. Les « terpènes carburants » sont entourés en vert alors que ceux utilisés en cosmétique et parfumerie sont entourés en bleu.

a. Le monoterpène limonène et les sesquiterpènes (farnésène et bisabolène) représentent une alternative au diesel

L'objectif des biocarburants est d'être directement utilisés dans les infrastructures de transport existantes sans avoir à concevoir de nouveaux lieux de stockage et d'utilisation. On parle de biocarburant « drop-in ». De ce point de vue, les terpènes sont très intéressants car ce sont des molécules hydrophobes, donc pouvant facilement être mélangés aux carburants dérivés du pétrole (essence, diesel, carburants d'aviation) ou biocarburants (alcools, esters d'acide gras).

Comme les terpènes ont une forte densité énergétique, un indice cétane élevé (la capacité d'un carburant à s'auto-enflammer), une faible hygroscopicité (capacité à retenir l'humidité) et une faible viscosité même à basse température, ils peuvent soit être utilisés directement comme carburant soit être mélangés aux carburants fossiles ou biocarburants actuels pour en améliorer les propriétés (Tracy *et al.*, 2009; Peralta-Yahya *et al.*, 2011; Hellier *et al.*, 2013; Sarria *et al.*, 2014). De plus, leur point d'inflammabilité est proche de celui du Diesel. Le point d'inflammabilité d'un carburant est la température la plus basse à laquelle un corps combustible émet suffisamment de vapeur pour former, avec l'air ambiant, un mélange gazeux qui s'enflamme sous l'effet d'une source d'énergie calorifique. C'est une donnée importante : si ce point est trop haut, le carburant ne s'enflammera pas totalement et des résidus resteront dans le moteur au contraire, s'il est trop bas, il y aura beaucoup d'évaporation et cela entrainera des pertes de carburants.

Plusieurs sesquiterpènes (molécules à 15 carbones ; farnésène, bisabolène et bisabolane) et monoterpènes (molécules à 10 carbones ; limonène et son dérivé hydrogéné) ont des caractéristiques (densité, indice cétane, viscosité, point de congélation et d'inflammabilité, pouvoir calorifique) similaires au Diesel D2 (Tableau 2). Ainsi, ils pourraient être directement utilisés dans les moteurs Diesel existants (voir Tableau 3 et (Hellier *et al.*, 2013)).

Les expériences menées par Hellier *et al* ont démontré que le farnésène et le géranial étaient de très bon carburants Diesel, en composant unique, en termes de combustion et d'émission. Le mélange de farnésène (jusqu'à 20%) dans le diesel fossile n'avait pas d'effet significatif sur les propriétés de combustion et améliorait même son indice cétane (voir Tableau 2 et 3 et (Hellier *et al.*, 2013)). Le dérivé hydrogéné du farnésène, le farnesane a également été incorporé à hauteur de 30% dans un diesel ULSD (Diesel à très faible taux en soufre) sans en changer les propriétés. De plus, la structure linéaire et l'absence de résidus soufrés dans la molécule de farnesane réduit les émissions d'oxyde de carbone (CO) et de particules fines (Millo *et al.*, 2014).
De même, des études menées sur le dérivé hydrogéné du limonène (le 1-isopropyl-4-methylcyclohexane) ont conclu que cette molécule pouvait être mélangée au carburant Diesel conventionnel à hauteur de 10% pour en améliorer les propriétés tout en réduisant son impact écologique (Tracy *et al.*, 2009).

En revanche dans les moteurs à essence, Hellier *et al*, ont démontré qu'il était préférable d'utiliser les terpènes citronnelle et linalool. Ces molécules sont parfaitement solubles dans l'essence et peuvent être utilisées en mélange jusqu'à 45% et 65% (wt/wt) respectivement (Hellier *et al.*, 2013).

Tableau 2 Caractéristiques des « terpènes carburants » par rapport à celles du Diesel fossile et du biodiesel (esters d'acide gras). Les données en vert montrent la conformité du « terpène-carburant » avec les caractéristiques du Diesel. Les données encadrées en bleu sont issues de (Peralta-Yahya *et al.*, 2011) ; celles encadrées en vert de (Tracy *et al.*, 2009) ; celles encadrées en orange de (Hellier *et al.*, 2013) et celles encadrées en rouge de (Millo *et al.*, 2014). ULSD = Diesel à très faible taux en soufre.

	Densité à 20°C ($kg.m^{-3}$)	Viscosité à 40°C ($mm^2\ s^{-1}$)	Point de congélation (°C)	Point d'inflammabilité (°C)	Pouvoir calorifique ($MJ.kg^{-1}$)	Indice cétane
Diesel D2	865	1,3 - 4,1	-35 à 5°C	60-80°C	42	41,6
Biodiesel	880	4 - 6	-3 à 15°C	100-170°C	37	48-65
Bisabolène	900					30
Bisabolane commercial hydrogéné	820	2,91	-78°C	111°C		41,9
Limonène hydrogéné 10% dans diesel		2,311	-11°C	58,9°C		42,8
5% farnésène dans diesel	860			75°C		41,7
20% farnésène dans diesel	845			78°C	43	45,2
50% farnésène dans diesel	820			86°C	43	50,7
100% farnésène	774 - 844	2,325	-50°C	109°C	44	58,6
Diesel ULSD	838	2,68			42,8	51,2
30% Farnesane dans Diesel ULSD	819	2,76			43,3	53,1
100% Farnesane	774	3,10			44,1	56,7

Tableau 3 Données obtenues en testant le géranial et le farnésène dans un moteur à combustion Diesel (Hellier *et al.*, 2013). Les tests ont été réalisés à moment d'injection constant, c'est-à-dire que le carburant est injecté toujours au même moment : lorsque le degré de l'angle de Crank (CAD) est de 7,5 avant le point mort haut (PMH), c'est-à-dire avant que le volume de la chambre soit minimal et donc la compression maximale. Ils ont aussi été réalisé à moment d'ignition constant : l'injection a lieu à différents moments afin que la combustion commence toujours au PHM lorsque le volume de la chambre est minimal. L'encadré rouge indique les données obtenues dans un moteur à 1200 rpm et avec une pression d'injection à 700 bar. Le test, dont les données sont encadrées en bleu, a été réalisé à 1200 rpm et avec une pression d'injection à 450 bar. Les données indiquées en vert représentent les conditions dans lesquelles le « terpène-carburant » s'est comporté de la même façon que le Diesel de référence. NSF = Ne s'enflamme pas ; CAD = degré de l'angle de Crank ; PMH = point mort haut ((*Ignition Timing Animation*, 2018) pour animation).

	Densité à 20°C (kg/m^3)	Viscosité à 20°C (mPa s)	Moment d'injection constant (Début de l'injection à 7.5 CAD avant PHM)		Moment d'ignition constant (Début de la combustion à PMH)	
			Délai avant l'ignition (CAD)	Durée de l'injection (µs)	Délai avant l'ignition (CAD)	Durée de l'injection (µs)
Diesel	834	3,42	5	589	4,8	590
100% Géranial	887	2,65	5,5	598	5,1	601
100% Farnésène	841	3,29	6,5	566	6,4	571
Diesel			7,5	685	7,5	686
5% Farnésène			8,1	736	8	736
10,1% Farnésène			8,5	735	8,3	737
20,3% Farnésène			8,9	736	8,7	741
40% Farnésène			10,1	737	9,9	735
51,2% Farnésène			11,1	778	10,7	742
59,9% Farnésène			NSF	//	10,9	751

b. Les monoterpènes cycliques (limonène et pinène) et les sesquiterpènes (farnésène et bisabolène) représentent une alternative au carburant d'aviation commerciale

Plusieurs études ont démontré la possibilité d'utiliser les terpènes (pinène, limonène, farnésène et bisabolène) comme alternative aux carburants d'aviation commerciale car leurs caractéristiques sont très similaires au carburant Jet A (Tableau 4).

Tableau 4 Caractéristiques des « terpènes carburants » par rapport à celle du carburant d'aviation commerciale Jet A-1. Les données en vert montrent la conformité du « terpène-carburant » avec le standard ATSM. Données extraites de (Chuck and Donnelly, 2014) pour le farnésène et le limonène ; de (Harvey *et al.*, 2010; Meylemans *et al.*, 2012; Sarria *et al.*, 2014) pour le pinène et du brevet (Harvey, 2018) pour l'α-bisabolène et bisabolane

	Point de congélation (°C)	Viscosité à -20°C ($mm^2\ s^{-1}$)	Point d'inflammabilité (°C)	Densité à 15°C ($kg\ m^{-3}$)	Pouvoir calorifique (MJ/Kg)
Standard ATSM	Minimum - 47°C	Maximum 8	Minimum 39°C	Entre 775 et 840	Minimum 42,8
Jet A-1 utilisé dans l'étude	-52°C	4,634	42°C	780	43,52
20% limonène	- 52,7°C	3,626	42°C	790	
50% limonène	- 56°C	2,715	44°C	820	
100% limonène	- 74°C	2,348	50°C	840	45
20% farnésène	- 52°C	5,656	46°C	785	
50% farnésène	- 53°C	7,859	50°C	780	
100% farnésène	-90°C	14,283	Plus de 95°C	790	43
α-pinène	-64°C		33°C	860	43
β-pinène	-61°C		31°C	860	43
α-bisabolène		10		870	134 150 btu/gal = 43
Bisabolane		17,2		814	127 500 btu/gal = 43,7

Le limonène est particulièrement intéressant : en mélange (à 20 et 50%), il améliore les caractéristiques du carburant Jet A-1 en réduisant sa viscosité. De plus, les courbes de distillation (courbe qui représente la quantité de matière en ébullition et donc sous forme gazeuse à une certaine température) obtenues pour ces mélanges sont très similaires à celle du Jet A-1 (Figure 6). Cela signifie que le limonène a une volatilité similaire à celle du carburant Jet A-1 et peut donc être mixé à ce carburant sans altérer l'efficacité et la qualité de la combustion.

Le farnésène a également été testé comme alternative au Jet A-1. Ce terpène a une très bonne densité mais sa viscosité est très élevée (Tableau 4 et (Chuck and Donnelly, 2014)). De plus, le point d'ébullition de cette molécule est bien plus élevé que celui du Jet A-1. Par conséquent, les mélanges (20% et 50% farnésène dans du Jet A-1) ne satisfont pas les exigences du standard ATSM : 5% (en fraction volumique) du mélange rentre en ébullition avant 200°C et la totalité du mélange est en ébullition avant 300°C (Figure 6 et (Chuck and Donnelly, 2014)).

Le farnesane, un dérivé hydrogéné du farnésène, a été approuvé par l'ASTM comme biokérosène en 2014 puis par l'Agence National du Pétrole brésilien (ANP) en mélange jusqu'à 10% dans du kérosène fossile. Des vols Air France entre Toulouse et Orly ont déjà été effectués en utilisant un mélange de kérosène contenant 10% de farnesane biosourcée.

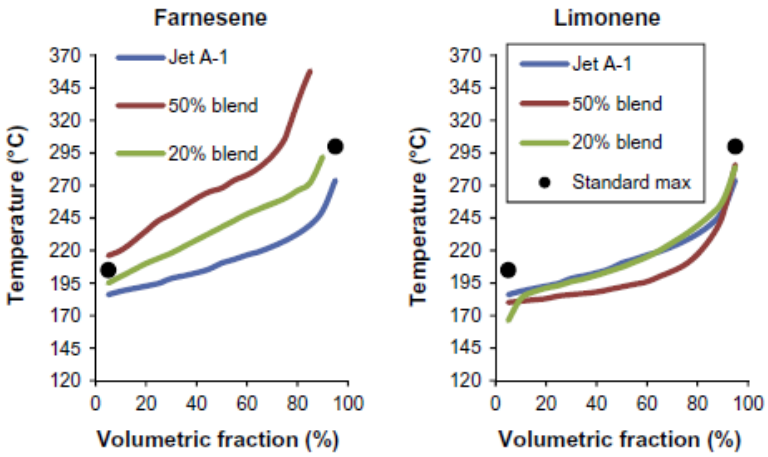


Figure 6 Courbes de distillation des mélanges de farnésène et du limonène (à 20 et 50%) dans le carburant Jet A-1. Les points noirs définissent la température maximale à laquelle une certaine fraction du mélange doit être en ébullition. Extrait de (Chuck and Donnelly, 2014).

c. Les dimères des monoterpènes cycliques (limonène et pinène) ont des caractéristiques similaires aux carburants d'aviation militaire (JP-10 et RJ-5)

Les biocarburants actuels (alcools et esters d'acides gras), n'ont pas une puissance énergétique suffisante pour être utilisés comme carburants d'aviation militaire. Pour atteindre une puissance énergétique volumétrique similaire, il faut des molécules ayant une structure aromatique similaire au JP-10 (tetrahydrodicyclopentadiene) et au RJ-5 (dimères de norbornadiene). Or parmi la diversité de structures des terpènes, certains aromatiques sont d'excellents candidats (Figure 7 et (Harvey *et al.*, 2010; Meylemans *et al.*, 2012; Sarria *et al.*, 2014)).

Si l'α-pinène, le β-pinène et le limonène n'ont pas une densité et un pouvoir calorifique suffisant pour être utilisés comme carburant d'aviation militaire, ils peuvent cependant être modifiés par catalyse chimique pour former des dimères qui présentent des caractéristiques similaires au carburant tactique JP-10 (Figure 7, (Harvey *et al.*, 2010; Meylemans *et al.*, 2012; Sarria *et al.*, 2014)).

La viscosité importante des dimères de pinènes (35 cst à 40°C) et leur point de congélation élevé (-52°C pour les dimères d'α-pinène et -30°C pour les dimères de β-pinène comparés à -79°C pour le JP-10) risquent de limiter leur utilisation en tant que carburants autonomes. Ils peuvent alors être mélangés avec des composants de plus basse viscosité pour atteindre les standards fixés. Cette méthode a été utilisée pour certains carburants tel que le carburant RJ-5 dont le point de congélation est de -18°C (Meylemans *et al.*, 2012).

Du fait de leur structure plus linéaire, les dimères de limonène ont une viscosité moins importante (25 cst à 40°C) et également un point de congélation similaire à celui du carburant JP-10 (-78°C). Ces dimères pourraient donc être utilisés directement dans les moteurs existants et peuvent être stockés dans les infrastructures existantes sans en oxyder l'alliage métallique (Liang *et al.*, 2015)

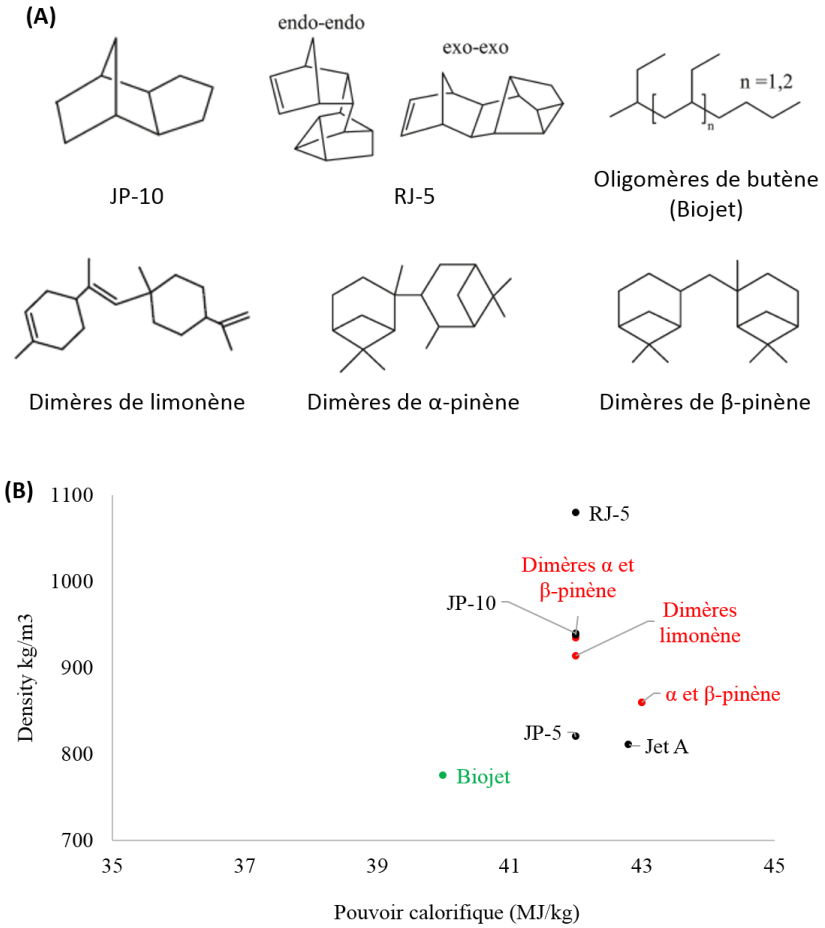


Figure 7 (A) Structures des dimères de monoterpènes comparées à celle des carburants et biocarburants d'aviation. (B) Densité des carburants issus de ressources fossiles (en noir) et des biocarburants (en vert et rouge) en fonction de leur pouvoir calorifique. Les biocarburants produits actuellement, à l'exception des monoterpènes et de leurs dimères, ont une densité et un pouvoir calorifique moins importants que ceux des carburants d'aviation traditionnels. Données obtenues à partir de (Harvey *et al.*, 2010; Meylemans *et al.*, 2012; Sarria *et al.*, 2014).

Il est d'ailleurs intéressant de noter qu'un brevet déposé il y a 2 siècles fait état de l'utilisation d'essence de térébenthine (composée majoritairement du monoterpène α-pinène mais aussi de β-pinène, 3-carene, limonène et camphène) en combinaison avec l'éthanol, comme carburant dans les moteurs à combustion interne (Morey, 1826). Ce mélange a, par exemple, été utilisé comme carburant pour le premier étage du lanceur Diamant A, vecteur du premier satellite français, Astérix (Meylemans *et al.*, 2012).

d. Les terpènes, des principes actifs utilisés dans l'industrie pharmaceutique

Les terpènes sont très présents dans les huiles essentielles et participent à l'action thérapeutique de ces dernières. Ils sont utilisés pour soigner les douleurs chroniques, les troubles respiratoires, la dépression, les troubles cognitifs, l'anxiété, l'insomnie et les troubles liés au stress mais également pour repousser des nuisibles (moustiques) (Trongtokit *et al.*, 2005; Chizzola, 2013; Baser and Buchbauer, 2015)

Les terpènes ont une activité anti-inflammatoire et sont capables de soulager les symptômes de maladies chroniques (arthrose (Rufino *et al.*, 2014), rhinites allergiques (Nam *et al.*, 2014). Ils ont également des propriétés antibactériennes (contre *Staphylococcus aureus* (Nascimento *et al.*, 2007) et *Helicobacter pylori* (Ochi *et al.*, 2005)) ; antiparasitaires (artémisinine contre les parasites du genre *Plasmodium* (Nosten and White, 2007)) et antivirales (contre la grippe (Paulpandi *et al.*, 2012) et le VIH (Gustafson *et al.*, 1992)).

De plus, de nombreuses études ont été menées sur les propriétés anti-cancéreuses des terpènes et certains ont déjà reçu l'autorisation de la FDA pour être utilisés comme traitement contre les cancers. C'est, par exemple, le cas du taxol, un diterpène, autorisé dans le traitement du cancer de l'ovaire depuis 1992, du sein depuis 1994 et du sarcome de Kaposi depuis 1997. Cependant, son utilisation est limitée par la disponibilité de cette molécule et le fort impact environnemental lié à son extraction. En effet, on estime qu'il faut 2000 à 3000 tonnes du conifère *Taxus brevifolia* (l'if de l'ouest) pour produire 1 kg de taxol. Cela équivaut à l'abattage d'un arbre de 100 ans pour la production d'une dose de médicament (Horwitz, 1994; Jennewein and Croteau, 2001; Li *et al.*, 2015).

Enfin, certains terpènes ont des propriétés antioxydantes (Misra and Dey, 2013), neuroleptiques et anxiolytiques (Hongratanaworakit *et al.*, 2004; Satou *et al.*, 2014; Satou *et al.*, 2015).

e. Applications en parfumerie et dans l'industrie cosmétique

i. Les propriétés organoleptiques des terpènes

Les terpènes représentent la quasi-totalité des molécules volatiles émises par les plantes. Ils sont responsables de la senteur (parfois très agréable) des plantes et sont par conséquent utilisés dans l'industrie cosmétique et en parfumerie. Parmi les terpènes les plus utilisés dans nos produits cosmétiques (Figure 8), on retrouve le L-limonène qui a une odeur fraiche et citronnée.

Ces divers cosmétiques contiennent du limonène, linalool, citronellol, géraniol, ionone et des extraits de citron et de fleurs (*Camellia Sinensis, Backhousia citriodora, nelumbium speciosum*)

Figure 8 Quelques exemples de terpènes retrouvés dans divers produits cosmétiques

ii. L'huile de bois de santal : une fragrance très recherchée

L'essence de bois de santal est très recherchée pour sa fragrance boisée. Elle est produite par les plantes ligneuses de l'espèce *Santalum (S. album, S. austrocaledonicum,* et *S. spicatum*) et est composée de nombreux sesquiterpènes avec une fonction alcool (majoritairement l'α-, β- et epi-β-santalol ainsi que de l'α-exo-bergamotol) mais aussi de sesquiterpènes (α-, β- et epi-β-santalène ainsi que de (Z)-α-bergamotène (Daramwar *et al.*, 2012; Diaz-Chavez *et al.*, 2013)).

Utilisée comme note de fond, cette fragrance est un excellent fixateur qui permet de capturer les arômes de tête des autres huiles essentielles. Elle est considérée comme une des huiles les plus précieuses et les plus chères et est très utilisée comme encens, en aromathérapie, et en parfumerie. En Inde, des temples construits avec du bois de santal conservent leur senteur depuis des siècles.

iii. Les propriétés biologiques des terpènes

En cosmétique, les terpènes sont également utilisés pour leur effet assouplissant, hydratant, émollient (substance qui amollit et relâche les tissus tendus) et protecteur contre les espèces

réactives de l'oxygène (ROS). Certaines huiles essentielles, provenant de *Camellia oleifera*, *Fructus evodia*, ou de pericarpium *Citri reticulatae*, facilitent la pénétration dans la peau des crèmes et traitements cutanés (Adorjan and Buchbauer, 2010).

f. Applications dans l'industrie agroalimentaire

i. Aromes et additifs alimentaires

Les terpènes/terpenoïdes étant naturellement synthétisés par les plantes, on les retrouve dans de nombreux produits alimentaires. La flaveur (ensemble des sensations olfactives, gustatives et tactiles ressenties lors de la dégustation d'un produit alimentaire) du citron, de l'orange ou de la menthe est due aux terpènes présents dans ces fruits et aromates (Chizzola, 2013). Les terpènes sont d'ailleurs ajoutés dans de nombreux produits alimentaires manufacturés afin de leur donner un goût et une odeur « naturels ».
Par exemple, le L-limonène est un agent odorant essentiel du jus d'orange (Behr and Johnen, 2009; Schempp *et al.*, 2018). La carvone ou le menthol sont utilisés comme additif alimentaire dans l'industrie du chewing-gum (Witkewitz *et al.*,1992). L'α–pinène, qui a un gout citronné, épicé et boisé, est également très utilisé dans la confection de chewing-gums et bonbons (Wu and Maravelias, 2018).
Le β-bisabolène a, quant à lui, été approuvé comme additif alimentaire (odeur balsamique) en Europe. Il entre également dans la synthèse de l'hernandulcine, une molécule aux propriétés édulcorantes. Les chlorophylles, les carotènes/caroténoïdes/lycopènes et les xanthophylles sont utilisés comme additifs sous l'appellation E140, E160 et E161 respectivement.

ii. Alimentation animale

L'utilisation d'huiles essentielles dans l'alimentation animale pourrait avoir des effets positifs sur la santé et la productivité des animaux ainsi que sur la qualité des produits obtenus (Franz *et al.*, 2010).

iii. Pesticides et gestion durable de l'agriculture

Les terpènes sont des molécules allélochimiques, c'est-à-dire qu'ils interviennent dans la communication biochimique intra ou interspécifique (entre une plante et une plante ou entre une plante et un micro-organisme par exemple) directe ou indirecte. L'utilisation des terpènes pourrait permettre une meilleure gestion de l'agriculture et une réduction de l'utilisation d'herbicides, de fongicides et d'insecticides. Le L-limonène entre, par exemple, dans la composition de l'herbicide "Avenger".

g. Les terpènes comme molécules plateformes pour la synthèse de nombreux polymères

Les terpènes sont utilisés depuis de nombreuses années dans la synthèse du caoutchouc synthétique, d'élastomères, de copolymères, d'adhésifs et autres composés chimiques (Vickers

and Sabri, 2015). L'α-pinène, le β-pinène et le limonène entrent, par exemple, dans la composition des polyamides (nylons (Winnacker and Sag, 2018) ; des polyuréthanes (colles, peintures, caoutchoucs, mousses) ou de polyesters (colles, joints (Firdaus *et al.*, 2011; Ciriminna *et al.*, 2014). Le polylimonène (Piccolyte C115) est utilisé dans les adhésifs, dans les emballages alimentaires, dans les résines conductrices d'électricité et comme agent mastiquant dans les chewing-gums.
Une entreprise (Kuraray) a récemment mis au point un liquide à base de β-farnésène qui réagit avec le caoutchouc du pneumatique et permet d'en améliorer la forme, la stabilité et les performances (Schofer *et al.*, 2014).

Depuis quelques années, les terpènes retiennent également l'attention pour la conception de matériaux aux propriétés antimicrobiennes et de résines d'encapsulation des médicaments (Barros *et al.*, 2007).

h. Les terpènes, des produits ménagers naturels et biodégradables

De nombreux produits ménagers représentent un danger pour la santé et l'environnement car ils contiennent des composés organiques volatils.
Les terpènes peuvent être utilisés comme une alternative « plus verte » et moins néfaste. Le limonène est particulièrement intéressant du fait de son odeur citronnée et rafraichissante. Ainsi, il est utilisé dans l'industrie pour le dégraissage des machines mais aussi comme produit d'entretien, comme détachant ou solvant à peinture.
Le farnésène est également commercialisé comme solvant renouvelable sous le nom de Myralène. Ce solvant est biodégradable et a un bon profil de viscosité, un pouvoir dégraissant élevé, une excellente stabilité thermique et à l'hydrolyse et une faible odeur. C'est aussi un bon tensioactif (McPhee, 2013).

i. Lubrifiants pour moteurs

Les huiles obtenues en mélangeant 50% de β-farnésène avec 50% d'alcènes représentent une alternative biodégradable aux lubrifiants issus de la pétrochimie. Ces huiles se comportent de la même façon que les alphapolyoléfines (polymère aliphatique saturé) et peuvent donc être directement utilisées dans les infrastructures existantes (huile pour transformateur, pour compresseur, pour moteurs). Ces huiles ont les caractéristiques requises pour obtenir l'Ecolabel et ne sont pas toxiques (classifiés comme « huiles blanches » par la National Sanitation Foundation) (Benjamin *et al.*, 2016; Sharma and Biresaw, 2016).

3. Les procédés existants de production de terpènes

Si pour certains terpènes (farnésène et bisabolène) des procédés de synthèse chimique ont été mis au point, les autres (santalène, limonène et pinène) sont extraits à partir des plantes qui les produisent.

a. Le limonène et le pinène sont respectivement des coproduits de l'industrie du jus de fruits et de l'industrie papetière

Le D-limonène est extrait en grandes quantités (23 000 tonnes annuelles (Wu and Maravelias, 2018) à partir d'écorces d'agrumes pressées à froid puis distillées. Il est par conséquent un coproduit de la production de jus de fruits à base d'agrumes (Figure 9, (Lohrasbi *et al.*, 2010; Pourbafrani *et al.*, 2010)) et cela en fait un des terpènes les moins chers à 7 $.kg^{-1}$ (Wu and Maravelias, 2018).
L'α–pinène et le β-pinène sont extraits à partir de l'huile de térébenthine contaminée au souffre provenant de l'industrie papetière (procédé de Kraft). Ils peuvent aussi être directement extraits des pins, pour cela une incision est réalisée dans le tronc de l'arbre et la résine est collectée en utilisant des acides concentrés pour augmenter le rendement. La résine est ensuite distillée sous vide pour produire entre 14 à 20% d'huile de térébenthine et 70 à 75% de colophane (Figure 9 (Behr and Johnen, 2009)). L'essence de térébenthine contient entre 45–97% d'α-pinène et entre 0,5–28% de β-pinène (Dvorakova *et al.*, 2007) et le marché de l'α–pinène et du β-pinène sont similaires (22 000 tonnes/an pour l'α-pinène et 20 000 tonnes/an pour le β-pinène). Par conséquent, le β-pinène a une valeur supérieure à l'α–pinène (5 $ kg^{-1} contre 2,5 $ kg^{-1} (Wu and Maravelias, 2018) mais reste tout de même parmi les terpènes les moins chers.

Ces procédés d'extraction ne permettent d'extraire que de faibles quantités de terpènes et sont énergivores. Ils sont par conséquent adaptés à une utilisation en cosmétique, en pharmaceutique et en alimentaire mais si le limonène et le pinène étaient un jour appelés à remplacer le kérosène fossile, de nouveaux procédés de production devraient être mis en place.

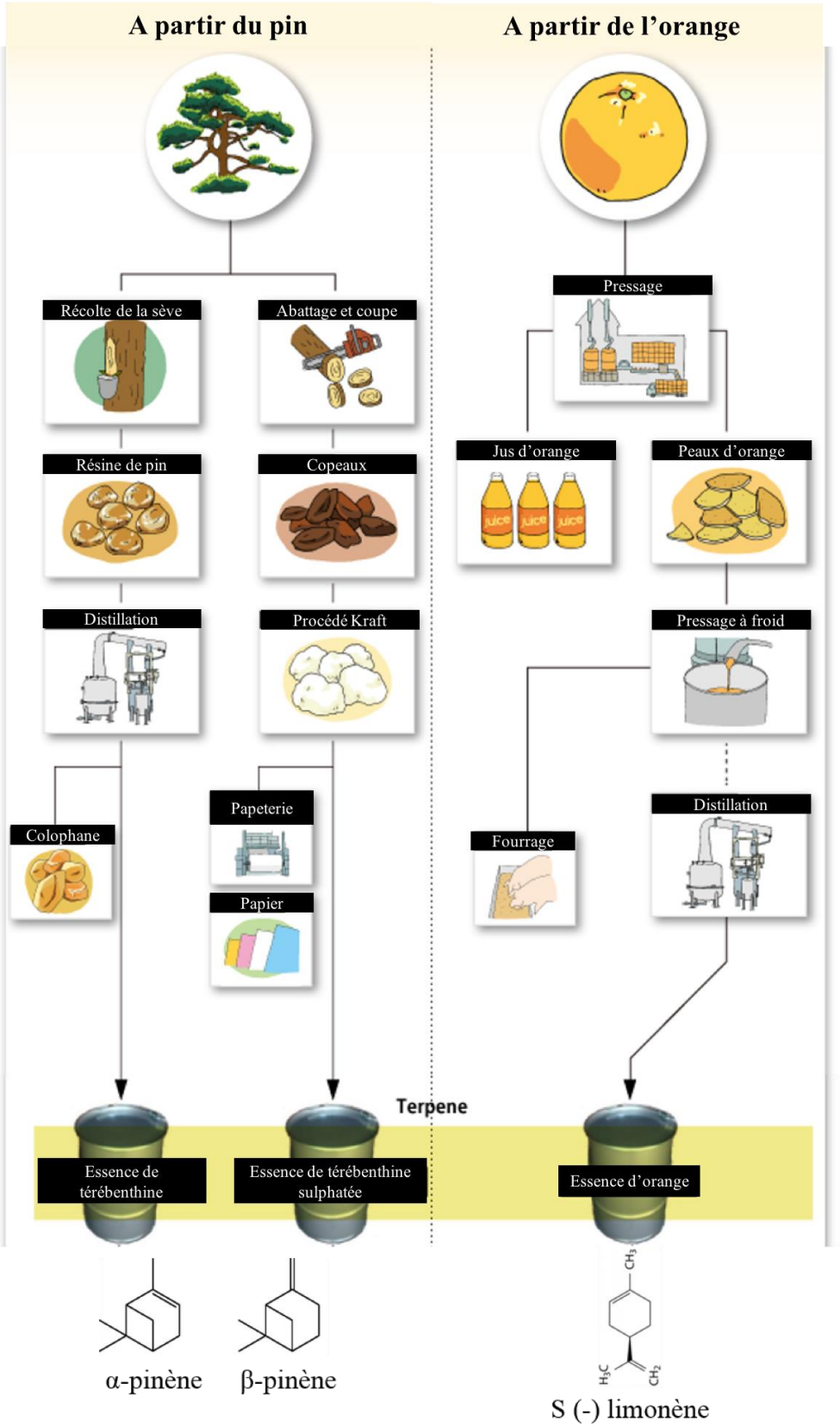


Figure 9 Procédés de production d'huile essentielle d'orange (contient majoritairement du D-limonène) comme co-produit de l'industrie du jus de fruits et de production d'essence de térébenthine (contient entre 45–97% d'α-pinène et entre 0,5–28% β-pinène) à partir de pins. Image adaptée de ("http://www.yschem.co.jp/english/terpene/process.html,")

b. L'huile de bois de santal est extraite à partir de cultures dédiées

L'huile de bois de santal, produite par les plantes ligneuses de l'espèce Santalum (*S. album, S. austrocaledonicum, et S. spicatum*), est obtenue par un procédé similaire à celui décrit pour le limonène et le pinène. Bien que certains procédés de synthèse chimique aient été mis au point (Pianowski *et al.*, 2005; Fehr *et al.*, 2009), l'extraction à partir du bois de santal reste la seule méthode réalisable. Cette extraction se fait après pulvérisation et hydrodistillation du bois (Figure 10) et a un rendement de l'ordre de 5 à 7% (Birkbeck, 2010).

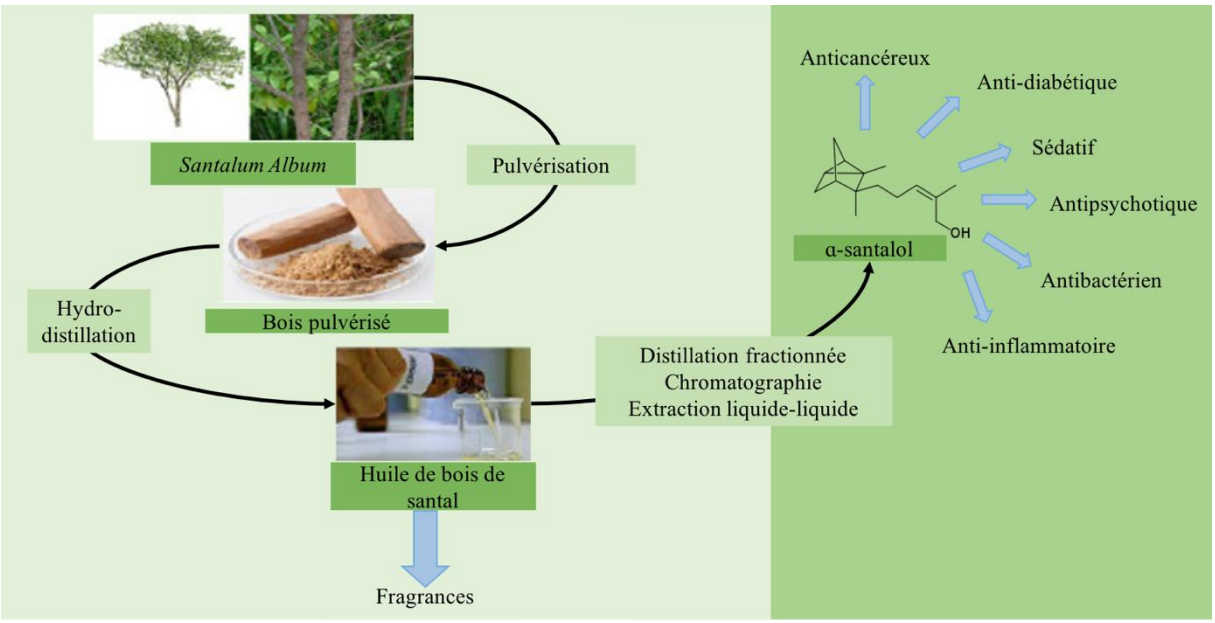


Figure 10 Procédé de production d'huile de bois de santal à partir de plantes ligneuses. Adaptée de (Bommareddy *et al.*, 2019)

Cependant, seules certaines espèces de Santalum (majoritairement *S. album*) produisent une huile contenant les molécules odorantes recherchées dans les bonnes proportions (Jones *et al.*, 2011). De ce fait, ces espèces (majoritairement *S. album*) sont en danger et leur exploitation est très régulée. Cela en fait une essence très chère (2 000 à 2500 $. kg-1 (Birkbeck, 2017)) et, en dépit des peines encourues, des centaines d'arbres sont abattus illégalement chaque année.

Le prix important de cette huile conduit également à de nombreuses fraudes. Une étude menée par Howes *et al.* a démontré que de nombreuses huiles labélisées « bois de santal » ne contenaient que peu, voire pas, les molécules composant normalement cette huile. Très peu d'huiles testées satisfaisaient les standards actuels définis par la norme ISO 3518 : 2002 qui impose une proportion de 41 à 55% d'α-santalol et 16 à 24% de β-santalol (Howes *et al.*, 2004).

Par conséquent, de nouvelles alternatives doivent être trouvées afin de produire, de manière plus durable (sans déforestation) et rentable, cette fragrance. De plus, un procédé permettant de produire spécifiquement de l'α-santalol permettrait le développement de cette molécule comme principe actif de l'industrie pharmaceutique.

c. Le procédé de synthèse chimique du farnésène et du bisabolène

Le farnésène est un terpène très présent dans la nature : le (E,E)-α-farnésène est produit par les pommes, le (Z,E)-α-farnésène est produit par de nombreuses plantes aromatiques et le (E)-β-farnésène est très présent dans les huiles essentielles de camomille et de pomme de terre. Cependant, aucun procédé industriel n'a été développé afin d'extraire le farnésène de ces plantes. Il peut, en revanche, être synthétisé chimiquement à partir de l'isoprène (Akutagawa *et al.*, 1978) ou par dégradation des sesquiterpènes alcools (Tanaka *et al.*, 1975). Mais ces procédés couteux ne sont pas viables à une échelle industrielle et produisent une mixture composée de β-farnésène et α-farnésène et d'autres coproduits.

Le bisabolène (α-, β- ou γ-bisabolène) est également naturellement présent dans les huiles essentielles de nombreux végétaux (citron, cubèbe ou origan) mais aucun procédé n'a été développé à ce jour pour l'extraire de ces plantes. Plusieurs procédés de synthèse chimique ont été développés soit en utilisant le palladium ($PdCl_2$ ou $Pd(PPh_3)_4$) comme catalyseur (Vyvyan *et al.*, 2004), soit en 6 étapes en partant du 2-methyl-2 butenylmagnesium bromide et du 2-(4-methyl-3-ene-1-cyclohexyl) propionaldehyde (Hu *et al.*, 2019).

d. Les micro-organismes, des usines cellulaires pour une production plus rentable et durable des terpènes

Plusieurs terpènes sont maintenant produits par des micro-organismes génétiquement modifiées (*E. coli* et *Saccharomyces cerevisiae*). C'est le cas, par exemple, de l'artémisinine (traitement contre le paludisme) dont la production « biologique » a permis d'augmenter la production et de stabiliser le coût du traitement (variation entre 120$ et 1200$. kg^{-1} entre 2005 à 2008 due aux mauvaises conditions de culture de cette plante (Keasling *et al.*, 2007)).

Suivant cet exemple, plusieurs entreprises ont développé des procédés de production biologique de terpènes. C'est le cas d'Amyris, une entreprise américaine qui commercialise du β-farnésène produit par fermentation de sucre de canne par des levures génétiquement modifiées (Newman *et al.*, 2018). Cette entreprise a même conclu un partenariat avec Total pour promouvoir le développement du β-farnésène biosourcé comme biocarburant. Cependant, depuis 2013, l'entreprise semble se concentrer sur le marché de la cosmétique et de la nutraceutique. Cela peut être dû au fait que le β-farnésène biosourcé n'a pas un prix assez compétitif pour être utilisé en tant que biocarburant.
L'entreprise Firmenich a également déposé un brevet décrivant la production biologique d'α-santalène par des organismes non humains génétiquement modifiées (préférentiellement *E .coli* ou *Saccharomyces cerevisiae* (Schalk, 2009)).

Cependant, les rendements assez faibles et le coût important de la matière première (glucose, plantes sucrières) empêchent les molécules ainsi produites d'être compétitive par rapport aux ressources pétrochimiques. Cela est encore plus vrai pour les biocarburants, qui nécessitent des rendements importants et à très bas coûts.

Dans ce contexte, les cyanobactéries sont particulièrement intéressantes pour la production de molécules biosourcées car elles ont seulement besoin de CO_2, d'eau (même polluée ou salée), de lumière et de minéraux pour leur croissance. Cela diminue grandement les coûts de production. De plus, la culture des cyanobactéries ne rentre pas en compétition avec la production agro-alimentaire et de nombreuses espèces de cyanobactéries sont génétiquement manipulables. Je vais donc, dans le prochain chapitre de ce manuscrit décrire la diversité des cyanobactéries, leur importance écologique et leur métabolisme photoautotrophique.

Chapitre 2 : Les cyanobactéries, des micro-organismes photosynthétiques

I. Importance écologique des cyanobactéries

1. Les cyanobactéries sont à l'origine de l'atmosphère oxygénique

Les cyanobactéries seraient apparues sur Terre il y a 2,3 à 3,5 milliards d'années (Awramik, 1992). A cette époque, l'atmosphère terrestre était composée en majorité d'hydrogène, de dioxyde de carbone, d'ammoniac, d'hydrogène sulfuré et de méthane. La présence de dioxygène était infime, les atomes d'oxygène étant pour la plupart liés au carbone pour former du CO_2 ou emprisonnés dans les roches de la croûte et du manteau terrestre.
Les cyanobactéries, en développant la photosynthèse, ont été capables d'absorber l'énergie lumineuse sous forme de photons (énergie physique) puis de l'utiliser afin réaliser la photolyse des molécules d'eau ($2\ H_20 \rightarrow 4\ H^+ + 4\ e^- + O_2$; le système d'oxydation de l'eau ou "oxygen evolving complexe"), qui permet par une cascade de réactions la production d'énergie chimique (ATP) et de pouvoir réducteur (NADPH) nécessaires aux réactions métaboliques. Cela a notamment permis aux cyanobactéries d'assimiler et de transformer le CO_2 atmosphérique en matières organiques (CH_2O).
De plus, la photolyse de l'eau permet la libération du dioxygène qui est à l'origine de l'atmosphère terrestre riche en oxygène que nous connaissons (Des Marais, 1991). La chute des températures, l'augmentation de la quantité de dioxygène et de matières organiques disponibles a également eu un effet drastique sur la biosphère de l'ère du précambrien.

Enfin, il est généralement admis que les cyanobactéries sont les ancêtres des chloroplastes des algues et des plantes par endosymbiose avec un hôte eucaryote (Gray, 1993; Schopf, 2011; Ponce-Toledo *et al.*, 2017).

2. Les cyanobactéries jouent un rôle essentiel dans les cycles géochimiques de la planète

Actuellement, les cyanobactéries assurent environ 30 % de la production de dioxygène et de l'assimilation du CO_2 et N_2 par les océans (Partensky *et al.*, 1999; Grizeau *et al.*, 2016; Cassier-Chauvat and Chauvat, 2018).

Concernant les cycles du carbone et de l'oxygène, leurs quantités dans l'atmosphère dépend de la photosynthèse ($CO_2 + H_2O \leftrightarrow CH_2O + O_2$). En créant de la matière organique (CH_2O) à partir de matière inorganique, les cyanobactéries représentent un maillon important de la chaine alimentaire.

Enfin, certaines cyanobactéries dites « diazotrophiques » sont capables de fixer l'azote atmosphérique (N_2) et de le convertir en ammonium (NH_4^+) ou en nitrate (NO_3). Ces cyanobactéries fournissent par conséquent une source d'azote assimilable aux océans et aux micro-organismes du sol. Enfin, la forte production de dioxygène par les cyanobactéries a également un impact sur la disponibilité des métaux (notamment le fer qui s'oxyde en hydroxyde de fer II et III [$Fe(OH)_2$ et $Fe(OH)_3$] puis forme de l' oxyde de fer III (rouille)).

II. La grande diversité morphologique, génétique et métabolique des cyanobactéries

1. Diversité morphologique, génétique et métabolique

Les cyanobactéries colonisent la quasi-totalité des eaux douces, marines et saumâtres et la plupart des sols (même désertiques) où règnent des températures allant de 0°C (glaciers) à 70°C (sources chaudes). Elles supportent également des milieux alcalins comme certains lacs dont le pH est proche de 11 (Garcia-Pichel and Pringault, 2001; Badger *et al.*, 2006; Summerfield and Sherman, 2008; Couradeau *et al.*, 2012). Les cyanobactéries participent d'ailleurs à l'alcalinisation de ces milieux.

Si les cyanobactéries ont réussi à coloniser des milieux aussi divers, c'est grâce à leur grande capacité d'adaptation et leur diversité génétique, métabolique et morphologique. Cette diversité en fait le groupe le plus vaste et le plus diversifié des bactéries (Shi and Falkowski, 2008). Il existe plus de 6000 espèces de cyanobactéries qui, selon une étude de 2017, pourraient être réparties en 3 classes : les cyanobactéries oxygéniques (oxyphotobacteria) ; les non photosynthétiques (melainabacteria) et une lignée particulière de cyanobactéries anaerobiques ML635J-21 (Soo *et al.*, 2017). Afin de ne pas ajouter une complexité superflue et parce que mon étude ne porte que sur les oxyphotobacteria, le terme cyanobactérie utilisée dans ce manuscrit fait uniquement référence à la classe des oxyphotobacteria.

Il est possible d'observer cette diversité sur le plan morphologique (Figure 11) : la taille des cellules cyanobactériennes varie d'environ 0,5 µm jusqu'à 40 µm de longueur (*Oscillatoria princeps*). Elles peuvent exister sous différentes formes : unicellulaires sphériques (*Synechocystis* PCC 6803), coccoïdes (*Cyanothece* PCC 7425) ou en forme de bâtonnets (*Synechococcus* PCC 7942) se divisant par scission binaire (*Synechocystis* PCC 6803) ou par scission multiple (*Dermocarpa*, *Xenococcus*, de l'ordre des *Pleurocapsales ;* (Cassier-Chauvat and Chauvat, 2014)). D'autres cyanobactéries sont pluricellulaires, elles sont organisées en filaments linéaires pouvant présenter des cellules différenciées et spécialisées telles les hormogonies (dédiées à la dissémination) ou les akinètes (possédant une membrane plus épaisse et des granules de stockage pour résister aux stress) ou les hétérocystes (fixation de l'azote atmosphérique, notamment chez les *Nostocales* (Grizeau *et al.*, 2016)). On observe également des formes pluricellulaires organisées en filaments linéaires dépourvues de cellules spécialisées

(*Spirulina* sp.) et des formes organisées en filaments ramifiés (*Fischerella* sp.) (Rippka *et al.*, 1979).

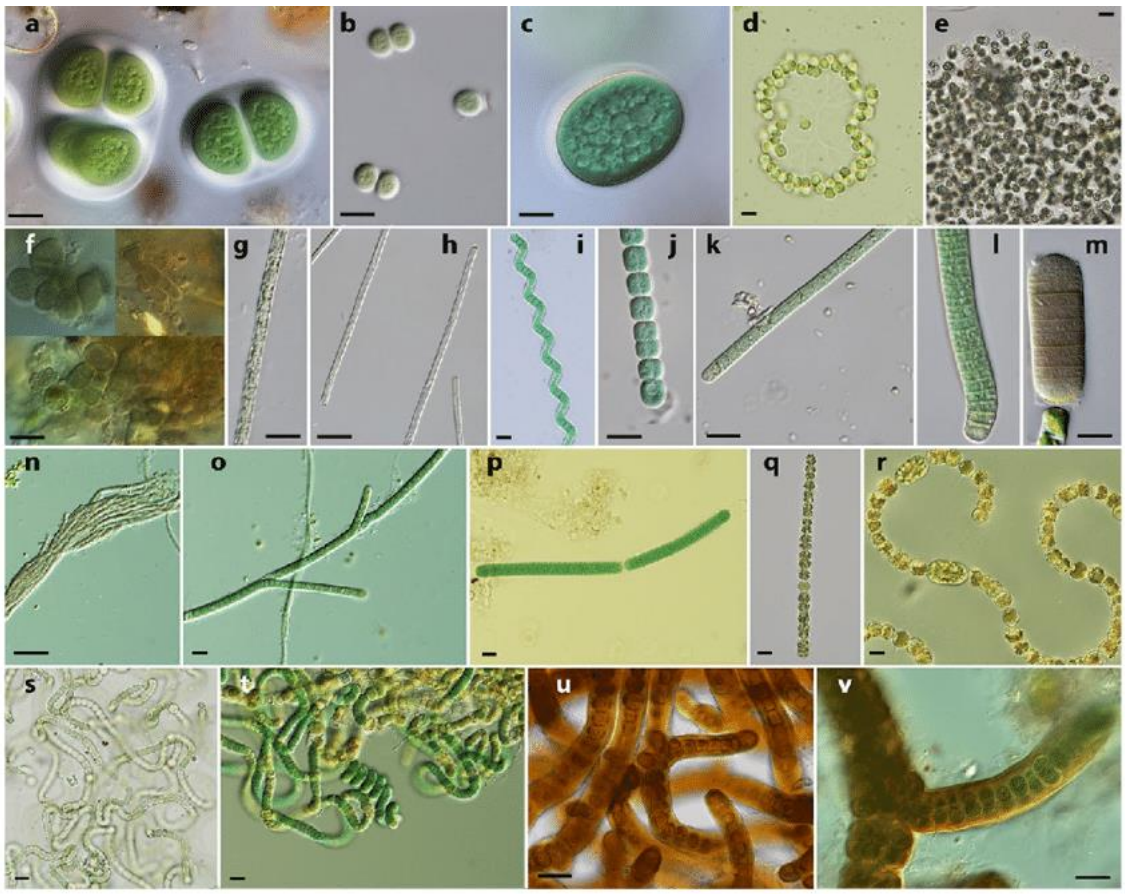


Figure 11 Illustration de la diversité morphologique des cyanobactéries tirée de (Dvořák *et al.*, 2015). Ces cyanobactéries sont classifiées selon les ordres décrits par (Rippka *et al.*, 1979).
I. Ordres des chroococcales : **a** *Chroococcus subnudus*, **b** *Ch. limneticus*, **c** *Cyanothece aeruginosa*, **d** *Snowella litoralis*, **e** *Microcystis aeruginosa*.
II. Ordres des Pleurocapsales : **f** *Pleurocapsa minor*.
III. Ordres des Oscillatoriales : **g** *Planktothrix agardhii*, **h** *Limnothrix redekei*, **i** Arthrospira jenneri, **j** *Johanseninema constricum*, **k** *Phormidium sp.*, **l, m** *Oscillatoria sp.*, **n** *Schizothrix sp.*, **o** *Tolypothrix sp.*, **p** *Katagnymene accurata.*
IV. Ordres des Nostocales : **q, r** *Dolichospermum sp.*, **s** *Nostoc sp.*, **t** *Nodularia moravica.*
V. Ordres des Stigonematales : **u, v** *Stigonema sp.*
Echelle **a–u** = 10 µm, v = 20 µm.

La diversité des cyanobactéries s'exprime également sur le plan génomique. Si la plupart des cyanobactéries possèdent seulement un chromosome circulaire dont la taille varie de 1.44 Mb pour la souche symbiotique UCYN-A à 12.07 Mb pour *Scytonema hofmanni* PCC 7110 (Dagan *et al.*, 2013); certaines souches telles que *Cyanothece* ATCC 51142 et *Cyanothece* PCC 7822 possèdent, en plus de leur chromosome circulaire, un à trois chromosomes linéaires (Welsh *et al.*, 2008; Bandyopadhyay *et al.*, 2011). Les cyanobactéries peuvent également posséder un ou plusieurs plasmides autoréplicatifs de tailles diverses (de 2 kb à 291 kb) (Cyanobase ; (Domain *et al.*, 2004; Narainsamy *et al.*, 2013; Cassier-Chauvat and Chauvat, 2018)).

Ces différences dans la taille du génome et le nombre de plasmides peuvent être expliquées comme le résultat de gain ou de perte de gènes transférés au cours de l'évolution par le biais de cyanophages, de séquences d'insertion ou encore de plasmides (Cassier-Chauvat *et al.*, 2016). Quelques cyanobactéries sont monoploïdes (*Prochlorococcus*, *Synechococcus* sp. WH 7805) mais la plupart sont polyploïdes (Labarre *et al.*, 1989; Griese *et al.*, 2011; Watanabe, 2020). Un exemple des plus marqué est *Synechocystis* PCC 6803 qui possède environ 20 copies de son chromosome durant la phase exponentielle de sa croissance (Labarre *et al.*, 1989; Griese *et al.*, 2011).

Enfin, la diversité des cyanobactéries est importante sur le plan métabolique. En effet, les cyanobactéries ont dû s'adapter aux contraintes de leur environnement (lumière, salinité, température, disponibilité en nutriments (Rippka *et al.*, 1979). Elles peuvent donc assimiler le carbone et/ou l'azote à partir de diverses sources (dioxyde de carbone, glucose, acétate, glycérol pour le carbone ; diazote, ammonium, nitrate, urée, arginine, asparagine et glutamine pour l'azote (Luque *et al.*, 1994; Quintero *et al.*, 2000; Bryant, 2006)) et produire de nombreux métabolites qui leur permettent de mieux tolérer les stress environnementaux et d'interagir avec leurs compétiteurs, prédateurs ou hôtes symbiotiques (champignons, bryophytes, gymnospermes, angiospermes) (Pade and Hagemann, 2014; Cassier-Chauvat and Chauvat, 2018).

2. Structure générale d'une cyanobactérie

Bien que cela varie d'une espèce à une autre, la structure et l'organisation interne des cyanobactéries ont de nombreuses caractéristiques en commun. Mon travail portant sur les cyanobactéries unicellulaires, j'ai choisi de montrer la structure de *Synechocystis* PCC 6803 (Figure 12).

Les cyanobactéries sont des bactéries à GRAM négatif dont l'enveloppe est souvent plus épaisse que chez les autres bactéries (1 à 10 nm). Cela s'explique par la présence d'une couche de peptidoglycane très importante et parfois par la présence d'une gaine mucilagineuse. Certaines cyanobactéries, comme *Synechocystis* PCC 6803, possèdent également des pili (Chen *et al.*, 2020) leur permettant de se déplacer par phototropisme (Bhaya, 2004) ou tactisme hydrique (Garcia-Pichel and Pringault, 2001).

Leur cytoplasme contient le nucléoïde (lieu où se trouve le matériel génétique), les membranes photosynthétiques appelées thylakoïdes, des carboxysomes (microcompartiment lieu de fixation du CO_2 (Turmo *et al.*, 2017)) et diverses granules de stockage.

Les nombreuses granules de stockage servent de réserves d'énergie ou de nutriments et leur permettent de faire face aux variations de leur environnement. On trouve, par exemple, des grains de polyglucosides situés près des thylakoïdes (réserve de carbone), des polypeptides composés de L-arginine et L-aspartate appelés cyanophycine (réserve d'azote), de la volutine (composé cristallin servant de réserve de phosphate) et des globules lipidiques.

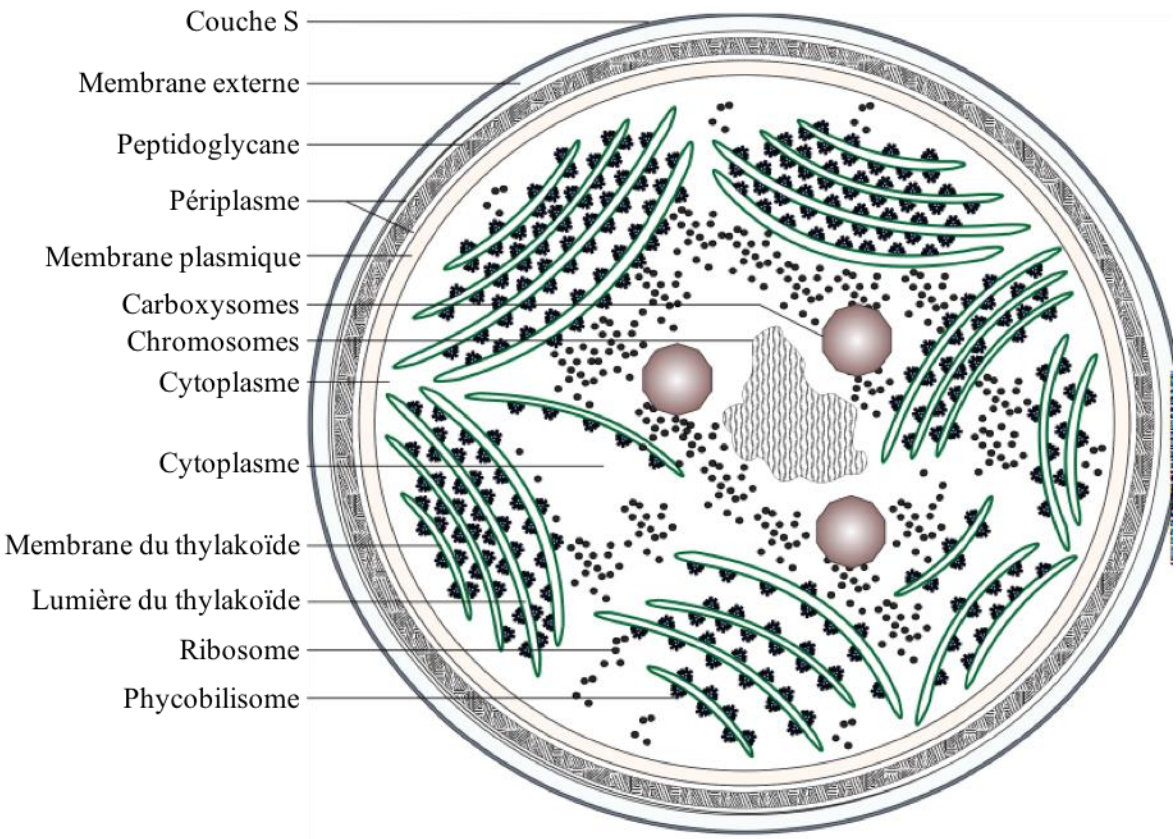


Figure 12 Structure interne de *Synechocystis* PCC 6803 montrant les différents micro-compartiments présents à l'intérieur de la souche. Adaptée de (Mills *et al.*, 2020).

III. Les souches modèles de cyanobactéries unicellulaires

Ces souches sont utilisées de façon courante dans les laboratoires travaillant sur les cyanobactéries. Le choix de ces souches est « historique » : ce sont les premières souches qui ont été manipulées génétiquement et dont les génomes ont été séquencés.

1. Synechocystis PCC 6803

Synechocystis PCC 6803 (aussi appelée *Synechocystis* ATCC 27184) est une cyanobactérie appartenant à l'ordre des Chroococcales et à la famille des Nitrospiraceae. Elle a été isolée à Berkeley par Kunisawa (Stanier *et al.*, 1971). Elle est sphérique et mesure 1 µm de diamètre. C'est une cyanobactérie euryhaline vivant aussi bien dans les eaux douces que les eaux saumâtres (Richardson *et al.*, 1983).
Historiquement, cette souche a été très utilisée pour étudier la photosynthèse car elle est hétérotrophe facultative (Rippka *et al.*, 1979), c'est-à-dire qu'elle est capable de croître, en absence d'activité photosynthétique, au dépend du glucose. Il était donc possible d'obtenir des mutants viables de délétion des gènes de la photosynthèse.

Son génome est le troisième génome procaryote et le premier génome cyanobactérien à avoir été séquencé (Kaneko *et al.*, 1996)**.** Il est disponible dans différentes bases de données (http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase/, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/BA000022, https://jgi.doe.gov/). *Synechocystis* possède 7 plasmides de 2,3 kb à 119 kb et un chromosome circulaire polyploïde de 3,57 Mb (Kaneko *et al.*, 1996, 2003; Chauvat *et al.*, 1986; Xu and McFadden, 1997; Yang and McFadden, 1993, 1994).

Cette cyanobactérie est un bon système modèle pour étudier les mécanismes de la photosynthèse, la physiologie, la morphologie, la division cellulaire et la tolérance aux stress des cyanobactéries. Cette cyanobactérie est également un bon châssis pour la bio-ingénierie et la production de molécules d'intérêt (Veaudor *et al.*, 2018).

2. Synechococcus elongatus PCC 7942

Synechococcus PCC 7942 (appelée aussi *Anacystis nidulans*, *Synechococcus* ATCC 33912 ou *Synechococcus leopoliensis*) isolée en 1973 appartient à l'ordre des Chroococcales et à la famille des Synechococcaceae.Cette cyanobactérie a une forme de bâtonnet (1 µm de diamètre pour 3 à 4 µm de long) vivant dans les eaux douces à température modérée. Elle est photoautotrophe stricte.
Le génome de *Synechococcus elongatus* PCC 7942 est constitué d'un chromosome circulaire (2,7 Mb, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CP000100) et de deux plasmides endogènes : pANL (46 kb, (Chen *et al.*, 2008) https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/47059642/) et pANS (8 kb (Van der Plas *et al.*, 1992)).

Cette souche a été très étudiée par la communauté scientifique sur des sujets tels que l'assimilation du CO_2, l'adaptation aux stress environnementaux, la division cellulaire, le rythme circadien et en biotechnologies pour la production d'alcool (Deng and Coleman, 1999; Shen and Liao, 2012; Li *et al.*, 2014; Anfelt *et al.*, 2015).

3. Synechococcus PCC 7002

Synechococcus PCC 7002 (anciennement connu sous le nom d'*Agmenellum quadruplicatum* souche PR-6 ou *Synechococcus* ATCC® 27264) a été isolé dans un échantillon de boue provenant d'un enclos à poissons à Porto Rico (Van Baalen, 1962). C'est une cyanobactérie modèle appartenant à l'ordre des Synechoccoccales et à la famille des Synechococcaceae.
Elle est unicellulaire, de forme coccoide et mesure 0,5 à 1,5 µm. Elle croit naturellement dans des eaux marines et est cultivée au laboratoire dans un milieu salin (NaCl et KCl). Cependant, elle est capable de s'adapter à des changements importants de salinité (de 0 à 100 g/L) (Batterton and Van Baalen, 1971; Ludwig and Bryant, 2012).

Son habitat naturel (zone intertidale) étant très changeant (salinité, lumière, température, disponibilité en nutriments), elle s'adapte à ces diverses variations. Elle est hétérotrophe

facultative pouvant pousser au dépend du glycérol comme seule source de carbone (Lambert and Stevens, 1986).

Son génome entièrement séquencé est composé d'un chromosome circulaire de 3 Mbp et de plusieurs plasmides circulaires pAQ1, pAQ3, pAQ4, pAQ5, pAQ6 et pAQ7 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CP000952.1) de tailles variables (4 kb à 186 kb).

La forte tolérance de cette souche à de nombreuses conditions de culture (forte lumière (Nomura *et al.*, 2006), forte température) alliée à sa croissance rapide (temps de génération de 3,5 h dans certaines conditions (Ludwig and Bryant, 2012)) font de cette cyanobactérie un châssis très intéressant en biotechnologie.

IV. Les cyanobactéries unicellulaires fixatrices d'azote

Plusieurs espèces de cyanobactéries, dites « diazotrophiques », sont capables de réaliser la fixation de l'azote atmosphérique (N_2) grâce à une enzyme appelée nitrogénase. Ces cyanobactéries sont unicellulaires (*Cyanothece sp.*, *Gloeothece sp.*) ou pluricellulaires (*Nostoc sp.*, *Anabaena sp.*). Lors de mon étude, j'ai porté mon attention sur les *Cyanothece sp*, je vais donc décrire leurs caractéristiques dans cette partie. Mais avant cela, je vais donner certains intérêts biotechnologiques de la fixation de l'azote afin de justifier pourquoi nous avons choisi de travailler sur des cyanobactéries diazotrophiques.

1. Intérêts biotechnologiques de la fixation de l'azote

La fixation de l'azote est intéressante en biotechnologies pour deux aspects.

Tout d'abord, l'industrialisation des procédés de production est susceptible de décupler la demande en azote (Pate *et al.*, 2011). Or, la production de cette ressource (sous forme de nitrate ou d'ammoniaque) se fait généralement par des processus couteux et ayant un impact très négatif sur l'environnement (hydrogénation du diazote N_2 en ammoniaque à très haute température). Pour être parfaitement durable, la culture des cyanobactéries à grande échelle doit donc reposer sur des matières premières peu couteuses et respectueuses de l'environnement (Huo *et al.*, 2012). Ainsi, la fixation de l'azote atmosphérique par les cyanobactéries diazotrophiques permet de répondre à cette problématique majeure.

Le deuxième intérêt biotechnologique de la fixation d'azote est la production concomitante de dihydrogène. Cette molécule possède une liaison covalente très énergétique entre ses deux atomes. La combustion du dihydrogène ne produit que de l'eau et libère beaucoup d'énergie (286 $kJ.mol^{-1}$). A titre de comparaison, un baril de pétrole brut (159 litres) contient autant d'énergie que 47,3 kg de H_2 (Hydrogen Analysis Resource Center). L'hydrogène peut donc servir de vecteur d'énergie, c'est-à-dire comme molécule « navette » permettant de stocker l'énergie sous forme chimique (liaison covalente H-H) et de l'utiliser par la suite comme carburant. Il est surtout utilisé dans l'aéronautique où il sert de combustible de propulsion pour

le lancement des navettes spatiales. Depuis peu, différents constructeurs automobiles développent des prototypes de voitures équipées de moteurs électriques alimentés par une pile à hydrogène. D'autres technologies sont en train d'être développées et reposent sur l'alimentation directe en H_2 d'un moteur à explosion classique.

2. Les Cyanothece

Le groupe des *Cyanothece*, défini par Komàrek (Komàrek, 1976), se compose de cyanobactéries unicellulaires avec des caractéristiques morphologiques, génétiques et structurales particulières (Komàrek, 1976; Reddy *et al.*, 1993; Schneegurt *et al.*, 1997; Porta *et al.*, 2000; Bandyopadhyay *et al.*, 2011, 2013).

Les *Cyanothece* sont capables de fixer l'azote atmosphérique (N_2) en conditions aérobiques (à l'exception de *Cyanothece* PCC 7425). Cette capacité est permise grâce à la présence, dans leur génome, de l'opéron *nif* (35 gènes chez *Cyanothece* ATCC 51142) codant pour la nitrogénase et les protéines associées (Ms *et al.*, 1999; Thiel, 2019). La nitrogénase catalyse la conversion du N_2 en ammonium assimilable (Raymond *et al.*, 2004).
Ce procédé, qui sera décrit en détail dans la partie VI de ce chapitre, est très couteux en énergie et très régulé afin de séparer temporellement la photosynthèse (productrice d'oxygène) de la fixation d'azote (sensible à l'oxygène (Gallon, 1981; Stöckel *et al.*, 2008, 2011; Toepel *et al.*, 2008; Welsh *et al.*, 2008). Les *Cyanothece* sont par conséquent des souches très intéressantes pour l'étude du rythme circadien (Schneegurt *et al.*, 1994; Stöckel *et al.*, 2008, 2011) et de la compartimentation et l'alternance métabolique (Sherman *et al.*, 2010). La production concomitante d'H_2 avec la fixation de N_2 a également suscité l'intérêt pour ces souches (Min and Sherman, 2010; Melnicki *et al.*, 2012; Sadler *et al.*, 2016).
De ce fait, les génomes de plusieurs souches du groupe *Cyanothece* (*Cyanothece* PCC 51142, *Cyanothece* PCC 8801, *Cyanothece* PCC 8802, *Cyanothece* PCC 7822, *Cyanothece* PCC 7424 et *Cyanothece* PCC 7425) ont été séquencés.

La comparaison des génomes des différentes souches de *Cyanothece* et les études réalisées ont permis d'appréhender les différences morphologiques, génétiques et métaboliques entre ces souches (Tableau 5, avec en vert les critères importants pour la sélection) et de sélectionner deux souches pour cette étude : *Cyanothece* PCC 7425 et *Cyanothece* PCC 7822. Les caractéristiques intéressantes de ces souches seront décrites dans les paragraphes suivants.

Tableau 5 Résumé des caractéristiques des *Cyanothece*. Les données sont issues de (Bandyopadhyay *et al.*, 2011, 2013). Les critères importants pour la sélection des souches sont indiqués en vert.

	ATCC 51142	PCC 7424	PCC 7425	PCC 7822	PCC 8801	PCC 8002
Taille (µm)	4-5	7-8	3-4	8-10	4-5	4-5
Taille génome (Mbp)	5,46	6,55	5,79	7,84	4,79	4,80
Nombre de plasmides	4	6	3	3	3	4
Nombre d'éléments chromosomique linéaires	1	0	0	3	0	0
Nombre de pseudogènes	6	177	131	341	200	206
Production de PHAs	-	+	+	+	-	-
Synthèse de phycoérythrine	-	+	-	+	+	-
Nombres de gènes constituants l'opéron *nif*	35	31	29	29	32	32
Activité nitrogénase en aérobie (µmol ethylene produit/mg de chlorophylle/h)	148	55	0	48	89	98
Activité nitrogénase en anaérobie (µmol ethylene produit/mg de chlorophylle/h)	238	141	36	130	163	173
Production d'hydrogène en aérobie (µmol hydrogène produit/mg de chlorophylle/h)	133	51	0	50	53	61
Production d'hydrogène en anaérobie (µmol hydrogène produit/mg de chlorophylle/h)	358	162	41	156	181	191
Transport et catabolisme de l'urée	-	+	+	+	-	-
Biominéralisation intracellulaire	-	-	+	-	-	-

3. Cyanothece PCC 7425

a. Généralités

Cyanothece PCC 7425 a été isolée dans un champ de riz au Sénégal et appartient au groupe des *Cyanothece* (Komàrek, 1976) bien qu'elle ne partage que peu de caractéristiques communes avec les autres espèces de ce groupe. Avec seulement 40% de ses gènes en commun avec les

autres *Cyanothece* cette souche semble avoir évoluée séparément (Bandyopadhyay *et al.*, 2011, 2013) est phylogénétiquement, plus proche de *Thermosynechococcus elongatus*, *Nostoc punctiforme* et *Synechococcus* PCC 7335 et d'*Acaryochloris marina* MBIC 11017 (une souche produisant la chlorophylle d). Son génome séquencé est composé d'un chromosome circulaire de 5,79 Mbp et de 3 plasmides circulaires (pP742501 : 196 kb ; pP742502 : 179 kb ; pP742503 : 34 kb, (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000022045.1/).

Au contraire des autres *Cyanothece*, cette souche n'est pas capable de fixer le diazote atmosphérique en conditions aérobiques. Cette incapacité pourrait être liée à l'absence du gène *hupL* codant pour une hydrogénase qui semble jouer un rôle dans la protection de la nitrogénase contre l'oxygène (Zhang *et al.*, 2014b). Il pourrait être intéressant d'exprimer de façon hétérologue le gène *hupL* chez *Cyanothece* PCC 7425 afin de regarder si cela restaure sa capacité à fixer le diazote en aérobie.

Par ailleurs, l'opéron *nif* de *Cyanothece* PCC 7425 a subi de nombreux réarrangements qui pourrait affecter l'activité de la nitrogénase. Tout d'abord, une insertion de 2,5 Mbp a eu lieu, séparant les gènes *nifDK* des gènes *nifEN* (gènes consécutifs chez les autres *Cyanothece*). De plus, les gènes de régulation *nifT*, *nifZ*, *nifV*, *cysE* et d'autres gènes de fonctions inconnues ne sont pas situés en antisens au début de l'opéron mais en sens après *nifK* et avant *nifE*. Enfin, certains gènes codant pour un transporteur à fer (*feoB*), un transporteur à molybdène (*modb*) ou des protéines de fonctions inconnues ont été perdus (Figure 13).

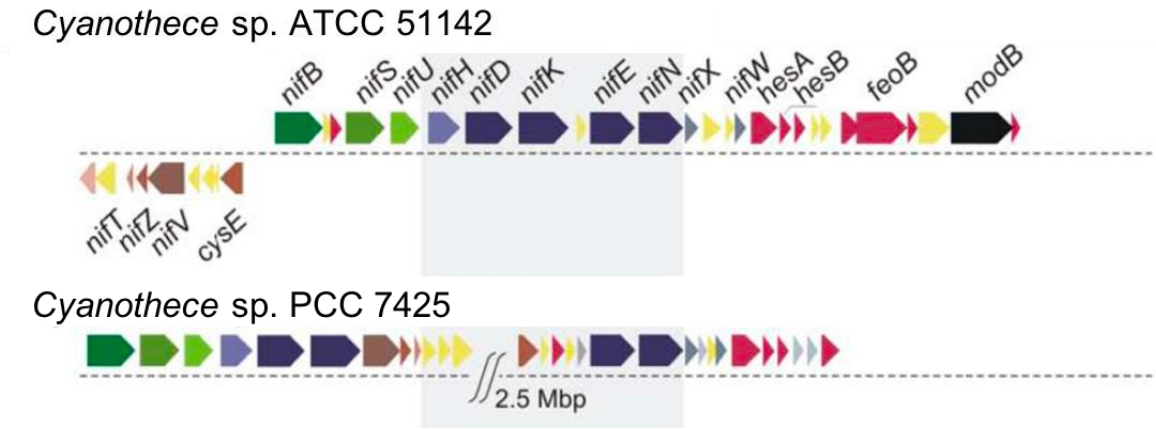


Figure 13. Structure de l'opéron *nif* de *Cyanothece* ATCC 51142 (le plus comlet) comparée à la structure de l'opéron de *Cyanothece* PCC 7425. Adapté ede (Bandyopadhyay *et al.*, 2011).

c. Intérêts de *Cyanothece* PCC 7425

Tout d'abord, le large diamètre de cette souche (3 à 4 µm, Figure 14) facilite l'observation de la localisation des protéines à l'intérieur de la cellule. Cela permettrait, par exemple, de mieux comprendre le rôle de FtsE (Cyan7425_2913), une protéine capable de lier l'ATP et qui serait impliquée dans la division cellulaire. La protéine FtsE est absente des génomes des cyanobactéries unicellulaires modèles et des autres *Cyanothece* (Miyagishima *et al.*, 2005). Le

gène codant pour FtsE est présent dans le génome des cyanobactéries pluricellulaires (*Anabaena sp., Nostoc sp.)* mais sa fonction n'a jamais été étudié jusqu'à présent.

De plus, il a été démontré que cette souche possédait 5 gènes codant pour des synthases du peptidoglycane de type ampH alors que les cyanobactéries modèles en possèdent moins (2 pour *Synechocystis* PCC 6803, 1 pour *Synechococcus* PCC 7002) voir aucun (pour *Synechococcus* PCC 7942 par exemple).

Concernant la tolérance au stress oxydant, son génome code pour deux superoxide dismutases (SodA et SodB) alors que les souches modèles de cyanobactéries unicellulaires ne possèdent que SodB (Veaudor et al., 2019). Elle possède également une glutathion réductase ce qui n'est pas le cas de *Synechocystis* PCC 6803 (Marteyn *et al.*, 2009) et de *Synechococcus* PCC 7002 (Narainsamy *et al.*, 2013). De plus, cette souche possède un set de Glutathion-S-transférase (GST) différent de ceux de *Synechocystis* PCC 6803 et *Synechococcus* PCC 7942. Les GST sont impliqués dans la gestion de nombreux stress (Kammerscheit *et al.*, 2019a, 2019b).
Il serait par conséquent intéressant d'étudier le rôle de ces enzymes et des nombreuses autres codées par le large génome de cette souche (5, 79 Mbp).

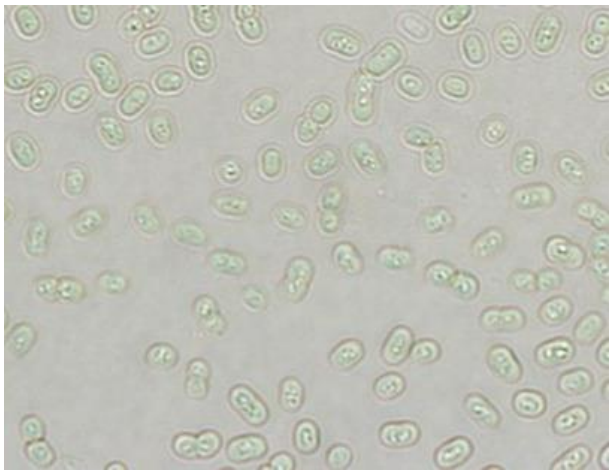


Figure 14 Photomicrographie de Cyanothece PCC 7425. Extrait de (Bandyopadhyay et al., 2013)

Récemment, l'équipe de Karim Benzerara avec laquelle le laboratoire collabore s'est intéressée à la capacité de cette souche à réaliser la biominéralisation intracellulaire du carbonate de calcium (Benzerara *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2016; Blondeau *et al.*, 2018). Les auteurs ont montré la présence de 2 à 20 inclusions de carbonate de calcium amorphe dans le cytoplasme de la cellule entourées par une monocouche lipidique ou des protéines. Le rôle physiologique de la formation de carbonate de calcium amorphe intracellulaire reste inconnu. Cependant, si des outils génétiques permettaient la compréhension de ce phénomène, cela aurait un grand intérêt pour la dépollution de l'eau (eau calcaire notamment (Cam *et al.*, 2015)).
Cette souche est également intéressante car elle est l'une des rares cyanobactéries à posséder la panoplie complète des gènes impliqués dans le transport (*urtABCDE*) et le catabolisme de l'urée (*ureABCDEFG*, *urea carboxylase* et *allophanate hydrolase* (Veaudor *et al.*, 2019)). Il est possible que la croissance de cette souche dans son milieu naturel repose, en partie, sur le catabolisme de l'urée (source d'azote). Cette caractéristique est à la fois intéressante en

recherche fondamentale afin de mieux comprendre les mécanismes et l'importance de l'urée pour les cyanobactéries mais également en biotechnologies pour la production de molécules d'intérêt couplée à la dépollution des eaux polluées. L'urée est le principal produit du catabolisme des acides aminés et est également très utilisé comme engrais azoté. De ce fait, il est présent en grandes quantités dans les écosystèmes côtiers et aquatiques où il crée une abondance en azote qui permet à certains microorganismes (cyanobactéries, algues et diatomées unicellulaires) de se développer de façon importante en « blooms ». Le traitement des eaux polluées par l'urée est donc une problématique majeure car les infrastructures à mettre en place sont couteuses. Pourtant, l'urée pourrait constituer une filière d'approvisionnement considérable pour satisfaire les besoins en azote des biotechnologies. Cela éviterait l'ajout de nitrate (couteux, produit de la pétrochimie) dans les milieux de culture et donc une réduction des prix de production et une diminution de l'impact environnemental des procédés.

Enfin, *Cyanothece* PCC 7425 synthétise naturellement et de façon abondante plusieurs molécules d'intérêt telles que :

- Les bioplastiques de type PHB (Cyan7425_4054 à Cyan_4057) (Porta *et al.*, 2000),
- La cyanophycine, un polymère d'arginine/aspartate qui est le précurseur de l'acide polyaspartique (Klemke *et al.*, 2016) ,
- Des molécules avec un fort potentiel thérapeutique : les cyanobactines (Figure 15 et (Donia *et al.*, 2008; Sivonen *et al.*, 2010; Arnison *et al.*, 2013; Leikoski *et al.*, 2013)). Ces molécules sont des peptides cycliques ribosomaux produits à partir de petits peptides ayant subis différentes modifications post-traductionnelles (heterocyclisation, oxydation, méthylation, prénylation). Houssen *et al* ont identifié chez *Cyanothece* PCC 7425 un opéron de 16,5 kb qui permettrait la production de patellamides particuliers appelés cyanothecamides A, B et C (Houssen *et al.*, 2012).

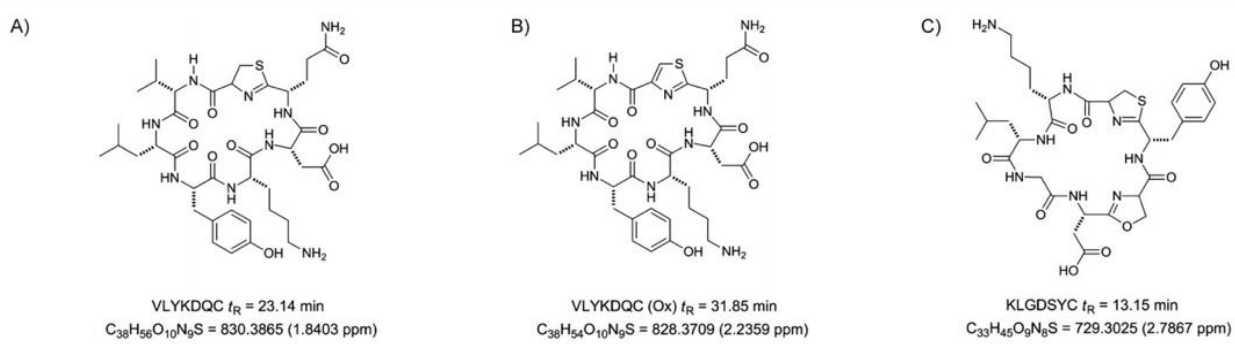


Figure 15 Structure des cyanothecamides A, B et C produites par *Cyanothece* PCC 7425 (Houssen *et al.*, 2012).

4. Cyanothece PCC 7822

a. Généralités

Cyanothece PCC 7822 isolée dans un champ de riz à Cuttack (Inde) appartient au groupe des *Cyanothece* (Komàrek, 1976) et est phylogénétiquement proche des autres *Cyanothece*, notamment de *Cyanothece* PCC 7424. Ces cellules de forme ovoïde ont une taille très importante (8 à 10 µm, Figure 16). Elle est hétérotrophe facultative et peut pousser sur le glycérol comme seule source de carbone (Aryal *et al.*, 2013).

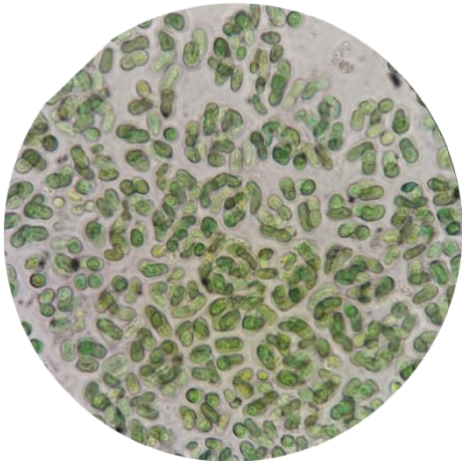


Figure 16 Photographie de *Cyanothece* PCC 7822 prise au microscope à l'objectif x100.

Son génome entièrement séquencé est composé d'un chromosome circulaire de 5,7 Mbp, de 3 plasmides circulaires (Cy782203 : 291 kb ; Cy782204 : 47 kb et Cy782205 : 43 kb) et de 3 éléments chromosomiques linéaires (Cy782201 : 879 kb ; Cy782202 : 473 kb et Cy782206 : 13 kb).

b. L'opéron *nif* confère à la souche la capacité de fixer l'azote atmosphérique en aérobie

Chez *Cyanothece* PCC 7822, l'opéron *nif* est très similaire à celui de *Cyanothece* ATCC 51142 (Figure 17) lui conférant la capacité de fixer l'azote atmosphérique en conditions aérobiques. Cependant, chez cette souche, l'opéron a perdu certains gènes codant pour des transporteurs de métaux (*feoB*, *feoC* et *modB*) ou de fonctions inconnues (Bandyopadhyay *et al.*, 2011).

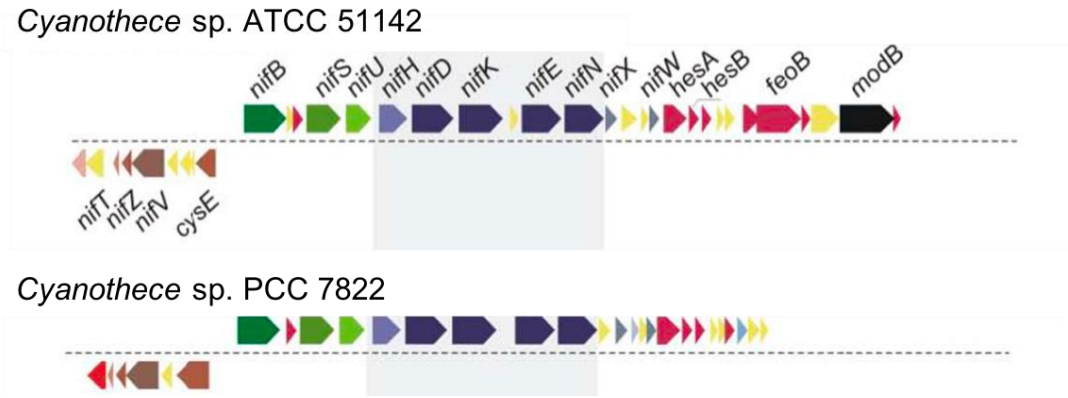


Figure 17 Structure de l'opéron *nif* de *Cyanothece* ATCC 51142 comparée à celui de *Cyanothece* PCC 7822. Adaptée de (Bandyopadhyay *et al.*, 2011).

c. Intérêts de *Cyanothece* PCC 7822

Tout d'abord, la taille importante des cellules de *Cyanothece* PCC 7822 lui confère un intérêt dans les études de localisation intracellulaire de protéines.
Cette souche a particulièrement retenu l'attention du fait de la présence de trois éléments chromosomiques linéaires dans son génome. Le plus grand contient 595 séquences codantes, le deuxième 422 séquences codantes et le dernier 13 séquences codantes et plus de 50% de ces gènes sont uniques à *Cyanothece* 7822 (ces gènes n'ont pas d'homologues chez les autres *Cyanothece)* et n'ont pas de paralogues dans le génome de cette cyanobactérie. Ils codent pour des transporteurs ABC (deux opérons impliqués dans le transport du molybdène et du phosphate), pour des gènes impliqués dans le métabolisme des carbohydrates, pour des protéines régulatrices, pour des transposons ou encore pour des protéines associées à CRISP-R (Bandyopadhyay *et al.*, 2011).

Cyanothece PCC 7822 est capable de constituer de nombreuses réserves de carbone sous forme de glycogène mais également d'amidon (rare chez les cyanobactéries) grâce à la présence d'une pyrophosphorylase ADP-glucose (AGPase), d'une synthase de glycogène et d'amidon (GS/SS, cyan7822_4734 et cyan7822_2570) et d'une enzyme de ramification (Preiss, 1984; Welkie *et al.*, 2013). *Cyanothece* PCC 7822 peut également stocker le carbone sous forme de PHB.
Cette souche synthétise également de nombreuses molécules d'intérêt telles que :

- La phycoérythrine (Aryal *et al.*, 2013), un pigment rouge utilisé comme marqueur fluorescent en cytométrie de flux ou en microscopie confocale par exemple.
- La cyanophycine, un polymère d'arginine/aspartate précurseur de l'acide polyaspartique.
- Des PHB par l'expression constitutive de deux gènes (Cyan7822_1329 et Cyan7822_1329) (Aryal *et al.*, 2013). Ces polymères sont très recherchés pour la production de bioplastiques biodégradables.
- Des acides organiques : les capacités fermentaires de cette souche laissent imaginer sa capacité à produire naturellement ou par expression de gènes hétérologues de nombreux acides organiques (acétate, lactate et formate) (Oost *et al.*, 1989).
- De l'hydrogène (production concomitante à la fixation du diazote par la nitrogénase).

V. Les techniques de modification génétique des cyanobactéries

1. La transformation naturelle

La transformation naturelle est le procédé par lequel une bactérie peut récupérer de l'ADN dans son milieu extracellulaire et l'intégrer à son génome.

Des auteurs ont démontré que l'incorporation naturelle d'ADN chez les cyanobactéries est permise grâce à la présence de pili de type IV (Chen *et al.*, 2020). Ce pilus est un bras rétractable constitué de monomères de PilA (obtenus après clivage de pre-pilin A par PilD) qui sont polymérisés et dépolymérisés grâce à l'action de PilB et PilT. Le pore est constitué d'unités de PilQ dans la membrane externe et d'unités de PilC, PilM, PilN et PilO dans la membrane interne (Figure 18 et (Wendt and Pakrasi, 2019)).
Les sous-unités de PilQ peuvent se lier à l'ADN et permettre son transport au travers de la membrane externe vers le périplasme. Par la suite, un des brins de l'ADN est dégradé par une endonucléase et l'autre brin est transporté au travers de la membrane interne vers le cytoplasme grâce à l'action de plusieurs protéines ComA, ComE et ComF (Yoshihara *et al.*, 2001; Cassier-Chauvat *et al.*, 2016).
Après son internalisation, l'ADN simple brin peut être inséré au génome de la cyanobactérie grâce aux mécanismes endogènes de recombinaison et de réparation de l'ADN ((Domain *et al.*, 2004) et voir (Cassier-Chauvat *et al.*, 2016) pour revue sur les gènes impliqués dans la recombinaison et la réparation de l'ADN).

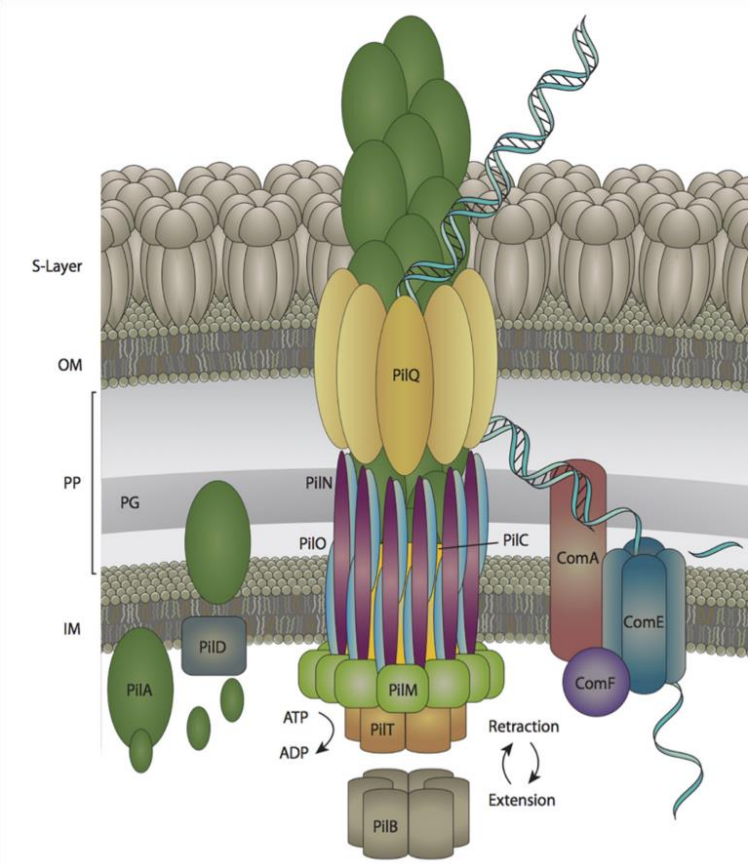


Figure 18 Assimilation d'ADN extracellulaire par *Synechocystis* PCC 6803. Schéma extrait de (Wendt and Pakrasi, 2019).

Cette capacité naturelle peut être utilisée afin d'inactiver ou d'introduire des gènes d'intérêt dans le génome des cyanobactéries. Des recombinaisons homologues entre des régions d'homologie situées dans l'ADN introduit (ADN donneur, ADN mutant contenant souvent une cassette de résistance à un antibiotique) et le génome de la cellule (chromosome ou plasmide) permettent l'intégration dirigée de l'ADN donneur en lieu et place du site correspondant du génome. Ceci conduit, selon le cas à l'élimination d'un ou plusieurs gènes (ou promoteur(s) contigu(s)) ou à leur remplacement par une version modifiée (Pakrasi *et al.*, 1988; Ferino and Chauvat, 1989). Plusieurs sites d'intégrations neutres ont été identifiés chez les souches les plus connues (*Synechocystis* PCC 6803, *Synechococcus* PCC 7942 et *Synechococcus* PCC 7002 (Davies *et al.*, 2014; Ng *et al.*, 2015; Cao *et al.*, 2017; Vasudevan *et al.*, 2019)).

Par ailleurs, si l'ADN donneur est majoritairement introduit sous forme d'un plasmide amplifié dans *E. coli*, il peut également l'être sous forme d'ADN linéaire (produit PCR par exemple). Cela donne une alternative efficace dans le cas où les gènes à intégrer seraient toxiques pour *E. coli* comme cela est le cas pour certains composants de l'appareil photosynthétique. L'amplification d'un plasmide codant pour ces composants n'est pas possible chez *E. coli* (Nagarajan *et al.*, 2011).

Les cyanobactéries étant majoritairement polyploïdes, il est nécessaire de favoriser la propagation de l'ADN mutant dans toutes les copies du génome. On parle alors de ségrégation.

Pour cela, il est possible d'augmenter la dose d'antibiotique utilisée jusqu'à disparition totale des copies sauvages. Si le mutant obtenu est totalement ségrégé alors le gène cible est considéré comme non essentiel à la croissance dans les conditions du laboratoire. Parfois, si le gène cible est essentiel dans les conditions standard de croissance, une proportion plus ou moins grande de copies sauvages subsistera dans le mutant (hétéroploïdie).

2. L'électroporation

L'électroporation a exactement le même objectif que la transformation naturelle : faire entrer l'ADN dans les cellules. Cette technique a été utilisée pour la première fois chez *Anabaena sp*. M-131 (Thiel and Poo, 1989) et est utilisée depuis pour d'autres espèces (Iwai *et al.*, 2004; Onai *et al.*, 2004; Zang *et al.*, 2007). Elle consiste à mettre en contact l'ADN donneur avec les cellules cyanobactériennes puis à soumettre ces cellules à un courant électrique pour désorganiser leur membrane et faciliter ainsi l'entrée de l'ADN. La délétion ou la surexpression de gènes d'intérêt se fait ensuite de la même façon que pour la transformation naturelle (par recombinaison homologue).

En revanche cette technique présente un certain nombre d'inconvénients :

- Elle n'est efficace que pour un petit nombre de cyanobactéries car bien souvent la paroi externe, composée de nombreux polysaccharides, est trop épaisse pour être déstabilisée par un courant électrique.
- Elle requière de grandes quantités d'ADN (Thiel and Poo, 1989)
- En générant des radicaux libres, le choc électrique peut introduire des mutations dans l'ADN et entrainer le mouvement d'éléments transposables vers d'autres locus (Bruns *et al.*, 1989).

3. La conjugaison

La conjugaison permet d'introduire un plasmide pouvant se répliquer de façon autonome dans l'organisme cible (Elhai and Wolk, 1988). Ce plasmide, appelé plasmide cargo, sert de vecteur de clonage et se propage chez *E. coli*. Il est par la suite mobilisé grâce à un autre plasmide, le plasmide conjugatif, contenant une origine de transfert et un gène codant pour une nickase.
La conjugaison se fait par l'interaction entre une cellule donneuse (*E. coli* dans notre cas qui a été transformée avec le plasmide cargo et le plasmide conjugatif) et une cellule réceptrice (une cyanobactérie dans notre cas).
Une fois le contact établi, l'ADN est préparé pour son transfert. Comme montré dans le schéma ci-dessous, le passage d'un double brin d'ADN circulaire à un simple brin d'ADN linéaire nécessite la coupure « nicking » du lien covalent retenant le plasmide sous forme circulaire (Figure 19, étape 1 et description du procédé dans l'encadré de gauche). Cette coupure est effectuée par la nickase à un site spécifique situé dans l'origine de transfert. La nickase reste liée de façon covalente au phosphate 5' de l'origine de transfert pour former un complexe appelé **« relaxosome »**. La réplication de l'ADN peut alors commencer à l'extrémité OH 3' en se servant de l'ADN non clivé comme modèle (étape 2).

Le relaxosome est recruté au niveau du **pili (T4CP)** et interagi avec la **machinerie protéique (T4SS)** permettant le passage de l'ADN simple brin synthétisé vers la cellule réceptrice (étape 3). L'activité « pompe » de T4CP facilite le passage de l'ADN.

Dans la cellule réceptrice, l'ADN simple brin est par la suite recircularisé grâce à l'action de la nickase (étape 4) et converti en ADN double brin afin de se répliquer (étape 5).

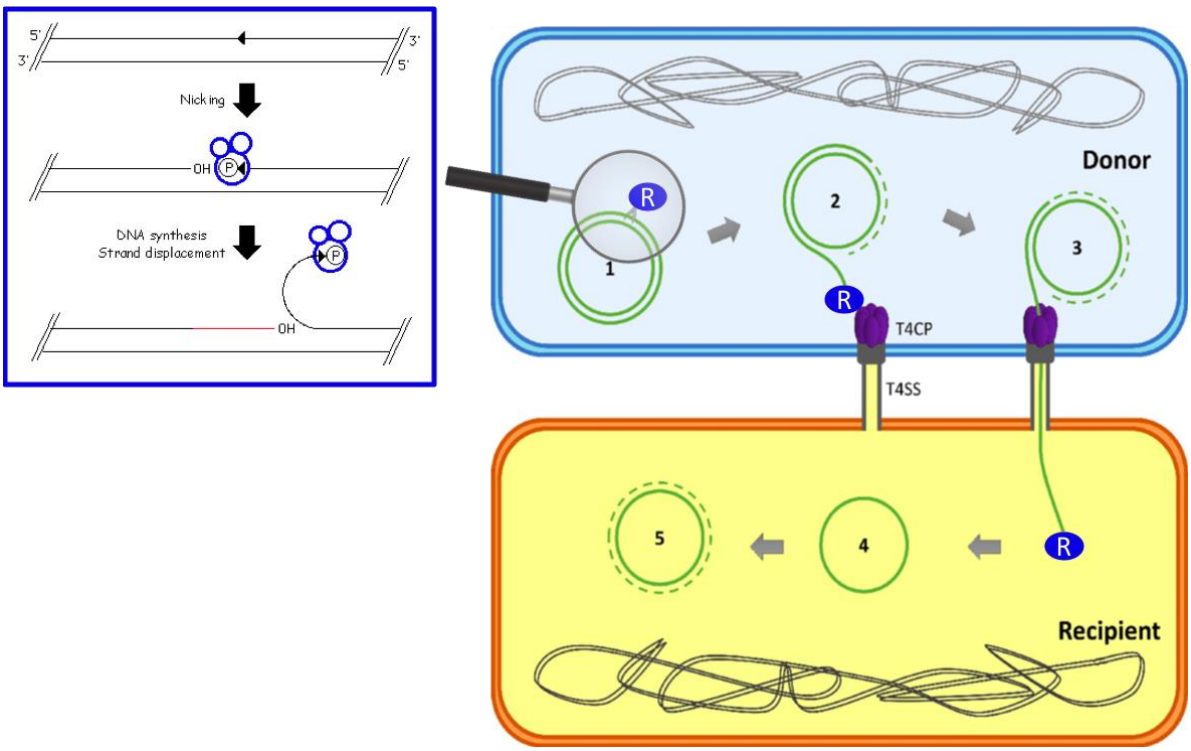


Figure 19 Étapes de la conjugaison bactérienne. Adaptée de (Getino and Cruz, 2018)

La conjugaison peut aussi se faire exactement de la même façon que décrite ci-dessus par l'interaction des cyanobactéries avec une *E. coli* possédant le plasmide conjugatif et une autre *E. coli* possédant le plasmide cargo. Dans ce cas, l'*E. coli* possédant le plasmide conjugatif va le transmettre à celle possédant le plasmide cargo et cette dernière va ensuite transmettre le plasmide cargo à la cyanobactérie.

Au laboratoire, la conjugaison s'effectue en mettant en contact, sur une boite de pétri non sélective, une/des souches d'*E. coli* transformées avec le plasmide conjugatif et le plasmide cargo avec des cellules cyanobactériennes réceptrices. Les micro-organismes sont ensuite transférés sur une boite de pétri contenant les antibiotiques adéquats pour la sélection des souches mutantes (protocole adapté de (Mermet-Bouvier *et al.*, 1993) et décrit dans le matériel et méthodes et dans (Chenebault *et al.*, 2020)).

4. Modification génétique des cyanobactéries utilisées dans cette étude

a. Modification génétique des cyanobactéries modèles

Deux techniques sont couramment utilisées pour modifier génétiquement les cyanobactéries modèles (*Synechocystis* PCC 6803, *Synechococcus elongatus* PCC 7942 et *Synechococcus* PCC 7002) : la transformation naturelle (Stevens and Porter, 1980; Grigorieva and Shestakov, 1982; Chauvat *et al.*, 1983; Labarre *et al.*, 1989) et la conjugaison ((Marraccini *et al.*, 1993 ; Chauvat *et al.*,1988) et nos résultats non publiés présentés dans les résultats chapitre 2 I, II et III.)

b. Modification génétique des souches de *Cyanothece*

Deux études mentionnent la modification génétique des *Cyanothece* retenues dans cette étude. Dans la première étude, les auteurs ont tenté d'inactiver différents gènes (*nifK, nifD, ntcA,* et *kaiA*). Pour cela, ils ont prétraité les cellules avec du $CaCl_2$ puis les ont soumis à un choc électrique (électroporation) afin de faire entrer de l'ADN exogène. Ensuite, afin de vérifier si la recombinaison chez les *Cyanothece* se faisait de manière ciblée, les auteurs ont transformé par électroporation *Cyanothece* PCC 7425 et *Cyanothece* PCC 7822 avec un vecteur suicide contenant seulement la cassette de résistance à un antibiotique (sans région d'homologie) ou un vecteur réplicatif contenant la même cassette de résistance.

Pour *Cyanothece* PCC 7425, le nombre de transformants obtenus avec les deux vecteurs étaient similaires. Cela peut indiquer (i) l'apparition spontanée de clones résistants aux antibiotiques. Cependant, il n'y a pas de témoin négatif dans cette étude pour invalider cette hypothèse) ou (ii) que la recombinaison chez *Cyanothece* PCC 7425 se fait de manière aléatoire dans tout le génome (Min and Sherman, 2010).
Dans le cas de *Cyanothece* PCC 7822, les auteurs ont obtenu un nombre de transformants plus important avec le vecteur réplicatif qu'avec le vecteur suicide sans région d'homologie. Ces résultats semblent indiquer que les recombinaisons homologues chez cette souche se font de manière ciblée et non aléatoire et qu'il est possible de faire rentrer de l'ADN par électroporation. Les auteurs ont finalement réussi à inactiver le gène *nifK* dans *Cyanothece* PCC 7822 par l'électroporation d'un ADN simple brin contenant des régions d'homologie du gène *nifK* et une cassette de résistance à la spectinomycine. Ainsi, le mutant obtenu était incapable de pousser sans source d'azote dissous dans le milieu (Min and Sherman, 2010).

Une deuxième étude, réalisée sur *Cyanothece* PCC 7822, a démontré la possibilité d'inactiver le gène *hupL* codant pour une des sous-unités de « l'uptake hydrogenase ». Ce mutant a été obtenu par électroporation d'un ADN simple brin contenant les régions d'homologie du gène *hupL* et une cassette de résistance à la kanamycine (Zhang *et al.*, 2014b).
Aucun système d'expression de gènes (contrôlée ou constitutive) n'est décrit dans la littérature pour *Cyanothece* PCC 7425 et *Cyanothece* PCC 7822.

VI. Le métabolisme énergétique de la cyanobactérie

Le métabolisme énergétique est un ensemble complexe et incessant de réactions chimiques par lesquelles les êtres vivants acquièrent et utilisent de l'énergie libre et synthétisent et dégradent les biomolécules qui les constituent. Le métabolisme énergétique a deux facettes :

- Le catabolisme qui libère de l'énergie (sous forme d'ATP ou autres composés à haut potentiel énergétique) et du pouvoir réducteur (NAD(P)H)) en décomposant des biomolécules complexes en molécules de plus en plus simples. On passe ainsi d'une molécule complexe telle qu'une protéine qui est décomposée en acides aminés puis en CO_2, H_2O et NH_3. Les voies de catabolisme convergent généralement vers un petit nombre de molécules plateformes qui pourront par la suite être à nouveau utilisées.

- L'anabolisme qui utilise l'énergie, le pouvoir réducteur et les molécules plateformes issues du catabolisme et de l'environnement extérieur à la cellule pour recréer des molécules complexes. Ici, le CO_2, H_2O et NH_3 sont utilisés pour la production d'acides aminés qui seront par la suite assemblés pour former des protéines. L'anabolisme est dit « divergent » car il peut synthétiser de nombreuses molécules complexes à partir de quelques molécules plateformes.

1. La photosynthèse oxygénique

a. Définition et équation générale de la photosynthèse

Les cyanobactéries sont les seuls organismes procaryotes capables d'effectuer la photosynthèse oxygénique. Elles utilisent l'énergie solaire pour hydrolyser des molécules d'eau, produisant ainsi une force proton motrice qui conduit à la synthèse d'énergie chimique (ATP) et de pouvoir réducteur sous forme de NAD(P)H. Les cyanobactéries fixent ensuite le CO_2 atmosphérique et, pour certaines, l'azote atmosphérique qu'elles convertissent en molécules organiques (carbohydrates et acides aminés) grâce à l'énergie créée par la photosynthèse.

En termes de métabolisme les cyanobactéries sont par conséquent dites « **Photolithoautotrophes** » car leur source d'énergie est la lumière captée lors de la phase photochimique de la photosynthèse, elles utilisent des électrons provenant d'une source minérale (H_2O oxydée lors de la photosynthèse) et leur source de carbone est également minérale (le CO_2 absorbé pendant la phase non photochimique de la photosynthèse). Elles n'assimilent que peu de composés organiques (carbohydrates, les acides aminés ou encore l'urée) et s'appuient donc essentiellement sur la photosynthèse (n **CO_2** + 2n H_2O + → n **CH_2O** + n O_2 + n H_2O) pour produire la **matière organique** nécessaire à leur croissance et bien être.

La photosynthèse oxygénique se fait en deux phases :

- La phase lumineuse de la photosynthèse permet l'absorption de l'énergie lumineuse et sa transformation en énergie (sous forme d'**ATP**) et en pouvoir réducteur (sous forme de **NADPH**) *via* des réactions dépendantes de la lumière.
- La phase dite obscure (Cycle de Calvin-Benson-Bassham) permet l'assimilation du CO_2 atmosphérique et de l'eau et leurs transformations en divers composés organiques grâce à l'énergie produite par la phase lumineuse.

Les équations permettant la synthèse d'un triose à partir de la photosynthèse oxygénique sont :

[2× phase lumineuse] $\xrightarrow{\text{8 photons}}$ $6\ H_2O + 6\ NADP^+ + 9\ ADP + 9\ Pi \rightarrow 3\ O_2 + \mathbf{9\ ATP} + \mathbf{6\ NADPH,\ H^+}$

[3 × phase obscure] $\mathbf{3\ CO_2} + \mathbf{9\ ATP} + \mathbf{6\ NADPH,\ H^+} \rightarrow \mathbf{3\ CH_2O} + 9\ ADP + 9\ Pi + 6\ NADP^+ + 3\ H_2O$

On a donc : $3\ CO_2 + 6\ H_2O \xrightarrow{\text{8 photons}} \mathbf{3\ CH_2O} + 3O_2 + 3\ H_2O$

Pour la synthèse d'un triose (3 CH_2O), il faut donc l'hydrolyse de 6 molécules d'eau, l'assimilation de 3 molécules de CO_2 et la production puis consommation de 9 ATP et de 6 NADPH, H^+. L'énergie chimique générée par la photosynthèse sert également à l'assimilation de nutriments azotés et de minéraux.

b. La phase lumineuse ou photochimique

Chez les cyanobactéries, les réactions de la phase photochimique de la photosynthèse ont lieu au niveau de replis de la membrane des vésicules lipidiques intracellulaires spécialisées : les thylakoïdes. Le processus de photosynthèse photochimique repose sur le fonctionnement en séries de quatre complexes (Figure 20) :

- Le processus commence par l'absorption de l'énergie lumineuse au niveau du photosystème II (PSII) grâce aux phycobiliproteines. L'énergie ainsi absorbée permet la photolyse de l'eau et donc la production de dioxygène, de protons et d'électrons selon l'équation : $H_2O \rightarrow ½\ O_2 + 2\ H^+ + 2\ e^-$

- Les électrons sont ensuite transportés du PS II au cytochrome b6/f par la chaine de transport d'électrons suivant le potentiel redox. Le cytochrome permet non seulement la transmission du flux d'électrons mais également le transfert de protons au travers de la membrane photosynthétique.

- Le flux d'électrons est ensuite transmis au photosystème I. Au niveau du PS I, de l'énergie lumineuse est à nouveau absorbée par les pigments photosynthétiques afin de

redescendre le potentiel redox. Les électrons excités sont ainsi transmis à la ferrédoxine permettant la synthèse de NADPH, H+.

- Enfin le gradient électrochimique et donc la force proton motrice créée par le flux de protons au travers de la membrane photosynthétique va permettre la synthèse d'ATP au niveau de l'ATP synthase.

La phase lumineuse de la photosynthèse s'effectue donc selon la réaction globale :
4 photons + $NADP^+$ + H_2O + 4 H^+ (cytoplasme) → NADPH + ½ O_2 + 6 H^+ + ATP (thylakoïde) (Zhu *et al.*, 2010a).

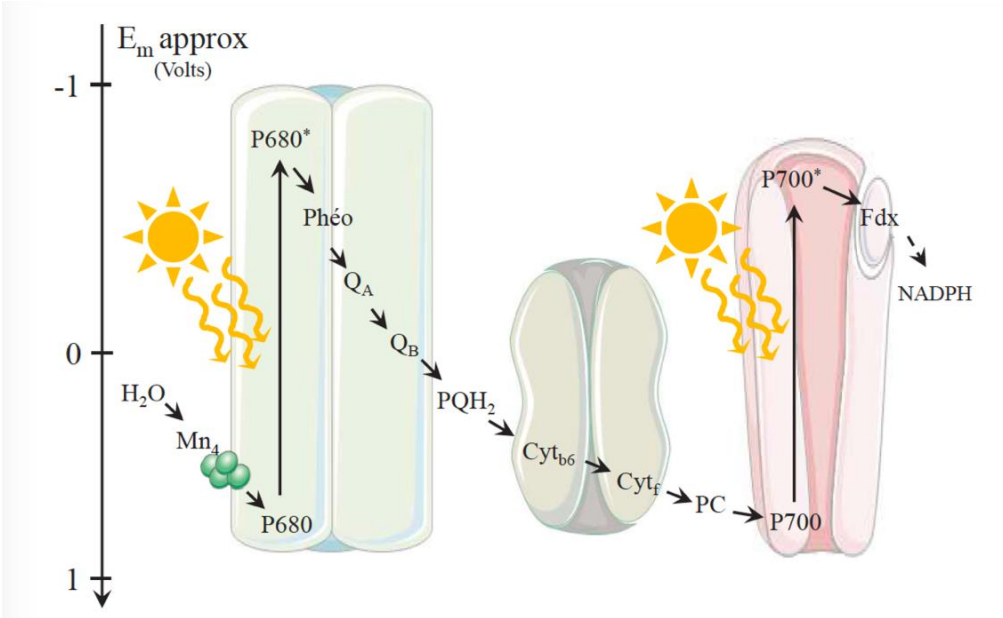


Figure 20 Schéma en Z du potentiel redox des électrons issus de la photolyse de l'eau. Mn_4 = Cluster manganèse, Phéo = Pheophytine, Q_A/Q_B = Site de fixation des quinones, PQH_2 = Plastoquinone réduite, Cyt_{b6} = Cytochrome b_6, Cyt_f = cytochrome f, PC = Plastocyanine, Fdx = Ferrédoxine. Extrait de la thèse de Théo Veaudor (Veaudor, 2017)

c. La phase obscure ou non photochimique de la photosynthèse

La cyanobactérie peut utiliser le carbone inorganique sous plusieurs formes. Il peut être assimilé sous forme de CO_2 présent dans l'atmosphère ou sous forme de bicarbonate (HCO_3) dissous dans le milieu. Les cyanobactéries ont développé plusieurs systèmes d'import et de transport du carbone tels que des transporteurs de bicarbonates ou des transporteurs de CO_2 spécifiquement associés à des NADPH-déshydrogénases du complexe I (NDH-I) de la chaîne respiratoire. Une fois dans la cellule, le CO_2 est concentré et stocké sous forme d'ions hydrogénocarbonates HCO_3^- au niveau des carboxysomes (pour plus d'informations sur les mécanismes du transport et de la concentration du CO_2 se référer à la revue (Veaudor *et al.*, 2020) située en annexe 1 et dont je suis co-auteure).

Par la suite, le CO_2 est assimilé par le cycle de Calvin qui se décompose en trois phases (Figure 21) :

- Tout d'abord, l'assimilation du CO_2 par la RUBISCO dans les carboxysomes (voir notre récente revue (Veaudor *et al.*, 2020) située en annexe 1). Trois molécules de CO_2 sont condensées à trois molécules de ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP, 5 carbones) pour donner six molécules de 3-phosphoglycérate (3-PGA, 3 carbones) → **3 CO_2** + **3 C_5** donnent **6 C_3.**

- Les six molécules de 3-phosphoglycérate sont phosphorylées en six molécules de biphosphoglycérate (BPGA, 3 carbones) grâce à la consommation de **six molécules d'ATP**. Les six molécules de biphosphoglycérate sont ensuite réduites en six molécules de glycéraldéhyde-3-phosphate (3 carbones) par l'enzyme glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH, Gap2) en utilisant **six molécules de NADPH**→ on a **6 C_3 au début et 6 C_3 à la fin.**

- Puis une des six molécules de glycéraldéhyde-3-phosphate est utilisée dans le métabolisme central et les cinq restantes sont utilisées pour régénérer les trois molécules de ribulose-1,5-bisphosphate → on a **1 C_3 qui est utilisé dans le métabolisme central** et **5 C_3** qui sont utilisés pour régénérer **3 C_5.**

La régénération se fait de la manière suivante :

- **2 G3P (C_3)** → 2 DHAP (C_3)
- **2 G3P (C_3)** + 2 DHAP (C_3) → 2 Fructose 1,6biP (C_6) → 2 F6P (C_6)
- **G3P (C_3)** + F6P (C_6) → E4P (C_4) + X5P (C_5)
- F6P (C_6) + E4P (C_4) → S7P (C_7) + G3P (C_3)
- S7P (C_7) + G3P (C_3) → R5P (C_5) + X5P (C_5)
- R5P (C_5) + 2 X5P (C_5) → **3 Ru5P (C_5)**

Où Ru5P = Ribulose-5-phosphate ; RuBP = Ribulose-1,5-bisphosphate ; 3-PGA = 3-phosphoglycérate ; BPGA = Bisphosphoglycérate ; G3P = Glycéraldéhyde-3-phosphate ; DHAP = Dihydroxyacétone phosphate ; FBP = Fructose-1,6-bisphosphate ; F6P = Fructose-6-phosphate ; X5P = Xylulose-5-phosphate ; E4P = Erythrose-4- phosphate ; S7P = Sedoheptulose-7-phosphate ; R5P = Ribose-5-phosphate.

On a donc **3 CO_2 + 9 ATP + 6 NADPH, H^+ → G3P + 9 ADP + 9 P_i + 6 $NADP^+$**

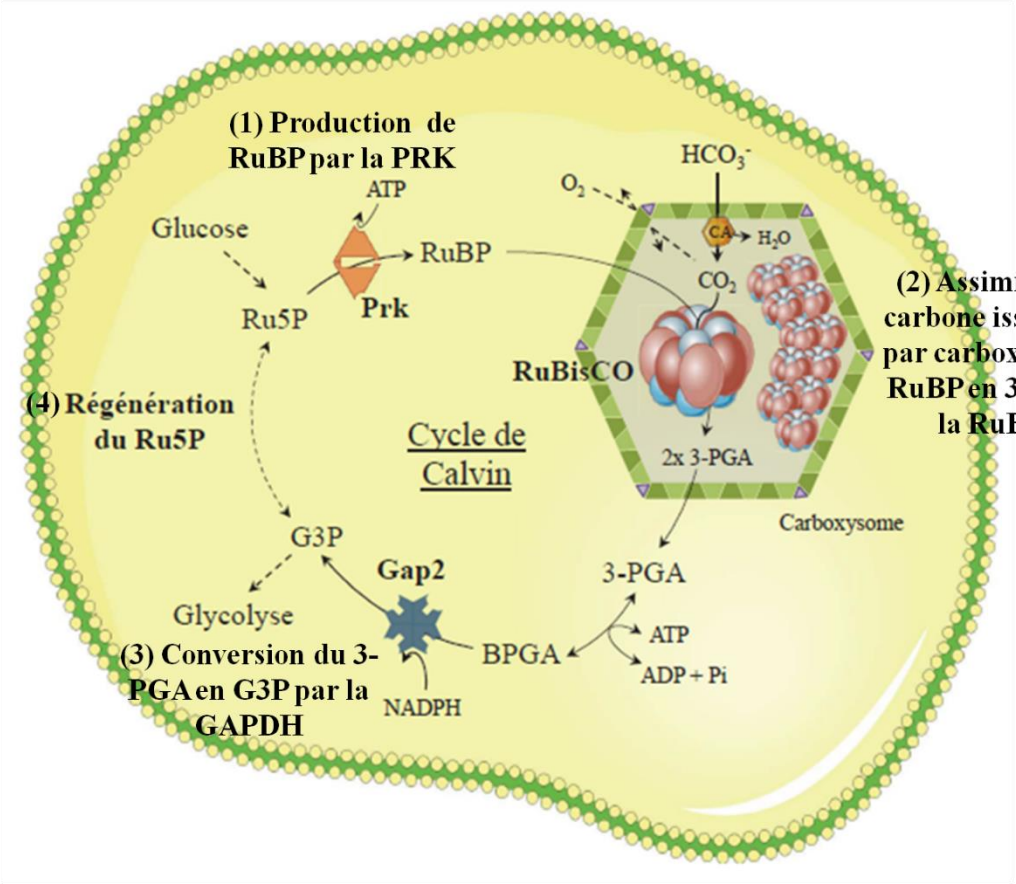


Figure 21 Cycle de Calvin-Benson-Bassham.
Les trapèzes verts représentent la coque protéique du carboxysome et dont les sommets (représentés par des triangles violets) correspondent à une protéine spécifique. Ce compartiment contient des anhydrases carboniques (CA, hexagone en orange) et de très nombreuses RuBisCO (structure en L_8S_8, grandes sous-unités L en rouge et petites sous-unités S en bleu). Adaptée de la thèse de Théo Veaudor (Veaudor, 2017).

d. La phosphoénolpyruvate carboxylase : une autre enzyme permettant la fixation de CO_2

La phosphoénolpyruvate carboxylase catalyse la carboxylation irréversible du phosphoénolpyruvate (PEP) en utilisant du bicarbonate (HCO_3^-) pour générer une molécule d'oxaloacétate, un intermédiaire du cycle de Krebs. Ainsi, cette enzyme est responsable de la fixation de 25% du CO_2 chez *Synechocystis* PCC 6803 (Takeya *et al.*, 2017) et est essentielle pour la croissance en photoautotrophie chez *Synechococcus* PCC 7942 (Luinenburg and Coleman, 1990).

2. Devenir du carbone assimilé

a. Du G3P à la synthèse de molécules complexes

Le G3P produit par le CBB peut être directement redirigé vers la synthèse de divers acides aminés, sucres et acides-gras ou bien être redirigé vers la synthèse de pyruvate (précurseur de la synthèse de certains pigments photosynthétiques et d'acides aminés) et d'acétyl-CoA

(précurseur de la synthèse des lipides) par la glycolyse ou enfin être redirigé vers le cycle de Krebs et le cycle de l'urée pour la synthèse des bases nucléiques et des acides aminés.

b. Création et utilisation des réserve carbonées

En photoautotrophie, une partie du carbone est également stockée sous forme de polymères de carbohydrates agglomérés en granules intracellulaires insolubles (poly-β-hydroxybutyrates (PHB) ou glycogène).

La synthèse du glycogène se fait en plusieurs étapes (Preiss, 1984). Tout d'abord le glucose-1-phosphate est converti en ADP-glucose par GlgC, puis les deux isoformes GlgA1 et GlgA2 polymérisent l'ADP-glucose en un polymère (Yoo *et al.*, 2014). Enfin, GlgB catalyse la ramification du glycogène en branches 1,6 alpha.
Le catabolisme du glycogène quant à lui est permis grâce à deux isoformes de GlgX (GlgX1 et GlgX2) et deux isoformes de GlgP (GlgP1 et GlgP2). La fonction exacte de GlgX n'a pas encore été déterminée alors que celle de GlgP l'est. GlgP clive le glycogène en sous-unités individuelles de glucose-1-phosphate (Fu and Xu, 2006). Des études menées chez *Synechocystis* PCC 6803 ont montré l'importance du glycogène dans le maintien de l'homéostasie interne de la cellule (ratio C : N, stockage des électrons (Cano *et al.*, 2018)) et dans la reprise de croissance après une chlorose due à un manque d'azote (Doello *et al.*, 2018).

Chez certaines cyanobactéries, l'acetyl-coA peut être transformé en polymères de PHB. Les PHB ou poly-β-hydroxybutyrates sont synthétisés en 3 étapes à partir de 2 molécules d'acétyl-CoA (Hein *et al.*, 1998; Taroncher-Oldenburg *et al.*, 2000). Ces 2 molécules sont condensées pour former de l'acétoactétyl-CoA par la β-cétothiolase (PhaA), qui est par la suite réduit en hydroxybutyryl-CoA par l'acétoacétyl-CoA réductase (PhaB). La polymérisation de l'hydroxybutyryl-CoA est assurée par la PHB synthase (complexe PhaC/PhaE). Le catabolisme des PHB est réalisé par les mêmes enzymes réalisant les réactions inverses.

c. Les différentes voies du catabolisme du carbone

Les cyanobactéries possèdent plusieurs voies de dégradation des carbohydrates : la glycolyse (voie EMP pour Embden-Mereyhof-Parnas), la voie des pentoses phosphates, la voie de la phosphoketolase mais également la voie Entner-Doudoroff (ED) et la phosphoketolase (PK) (Figure 22). La voie Entner Doudoroff n'a été découverte que très récemment chez les cyanobactéries mais plusieurs études démontrent sa présence dans la cyanobactérie modèle *Synechocystis* PCC 6803 (Chen *et al.*, 2016).

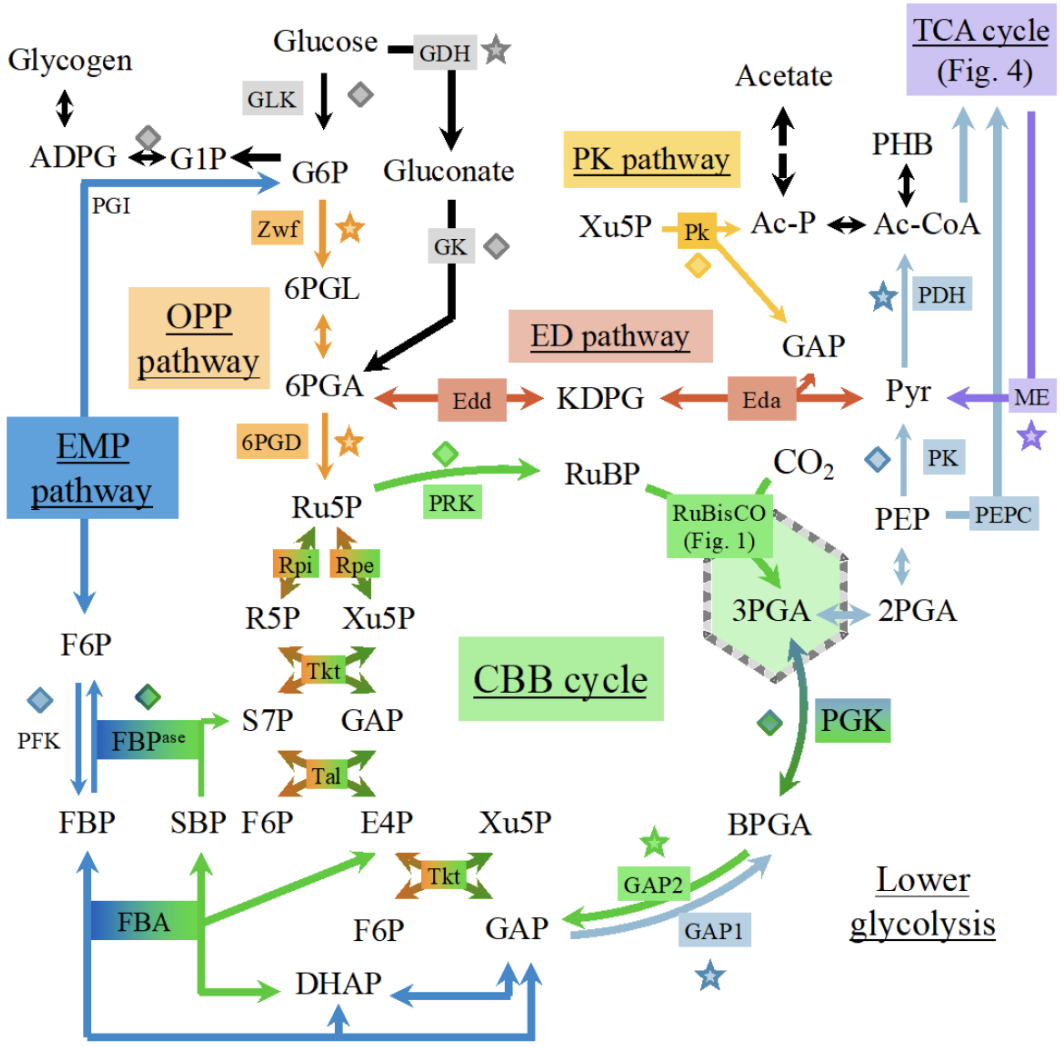


Figure 22 Représentation schématique du métabolisme du carbone chez *Synechocystis* PCC 6803. Le métabolisme du carbone comprend la glycolyse/néoglucogénèse (bleu), les voies d'Entner-Doudoroff (rouge) et des pentoses phosphates (orange), le cycle de Calvin (vert) et la voie de la phosphokétolase (jaune). Les losanges et les étoiles indiquent les réactions enzymatiques utilisant respectivement l'ATP ou les cofacteurs réduits (NADPH et NADH). Les réserves de carbone sont stockées sous forme de glycogène ou de PHB. Figure extraite de (Veaudor *et al.*, 2020)

ADPG = ADP-glucose; BPGA = bisphosphoglycérate; Ac-CoA = acétyl-CoA; Ac-P = acétyl phosphate; DHAP = dihydroxyacetone phosphate; E4P = erythrose-4-phosphate; Edda = KDPG aldolase; Edd = 6PGA déshydratase; FBP = fructose-1,6-bisphosphate; F6P = fructose-6-phosphate; G1P = glucose-1-phosphate; G6P = glucose-6-phosphate; GAP = glyceraldehyde-3-phosphate; GAP1-2 = glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase 1 or 2; GDH = glucose déshydrogénase; GK = gluconate kinase; GLK = glucokinase; KDPG = keto-3-deoxy-6-phospho-gluconate; ME = malic enzyme; PDH = pyruvate déshydrogénase; PEP = phosphoénolpyruvate; PEPC = PEP carboxylase; PFK = phosphofructokinase; PGK = phosphoglycérate kinase; PHB = poly-β-hydroxybutyrate; Pk = phosphokétolase; PK = pyruvate kinase; PRK = phosphoribulokinase; Pyr = pyruvate; R5P = ribose-5-phosphate; Rpe = Ru5P épimerase; Rpi = R5P isomérase; RuBisCO = ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase; Ru5P = ribulose-5-phosphate; RuBP = ribulose-1,5-bisphosphate; S7P = sedoheptulose-7-phosphate; SBP = sedoheptulose-1,7-bisphosphate; Tal = transaldolase; Tkt = transkétolase; Xu5P = Xylulose-5-phosphate; Zwf = glucose-6-phosphate déshydrogénase; 2PGA = 2-phosphoglycérate; 3PGA = 3-phosphoglycérate; 6PGL = 6-phosphogluconolactone; 6PGA = 6-phosphogluconate; 6PGD = 6-phosphogluconate déshydrogénase.

Si une cellule métabolise le glucose par la glycolyse, elle gagnera deux molécules d'ATP et deux molécules de NADH. Au contraire par la voie ED, elle gagnera une molécule d'ATP, une de NADH et une de NADPH. Cependant la voie ED a besoin de 3,5 fois moins de réactions enzymatiques pour cataboliser le glucose. Par conséquent le flux entre la voie EMP et la voie ED dépendra du besoin en ATP (dépend de la lumière) et du coût de production d'enzymes (dépend de la quantité de nutriment disponible). Toutes ces voies sont interconnectées (et connectées avec le CBB) et leur activation dépendra des besoins de la cellule.

Cependant, elles ont toutes pour but la régénération de pouvoir réducteur, d'énergie chimique (ATP) et convergent vers la formation d'intermédiaires plateformes tels que le G3P, le pyruvate ou l'acétyl-CoA. Pour plus de détails sur ces voies et leurs interactions se référer à notre revue (Veaudor *et al.*, 2020) située en annexe 1.

3. Le cycle de Krebs

Le cycle de Krebs (ou cycle tricarboxylique) diffère chez les cyanobactéries de celui des bactéries hétérotrophes. En effet, il est considéré comme incomplet du fait de l'absence de l'α-cétoglutarate déshydrogénase, l'enzyme catalysant la quatrième étape de ce cycle.
Néanmoins, les cyanobactéries possèdent 3 types de dérivation (voir notre revue (Veaudor *et al.*, 2020) située en annexe 1) :

- La première correspond à la conversion de l'α-cétoglutarate en succinate au moyen de 2 enzymes : l'α-cétoglutarate décarboxylase (KGDC) et la succinate semialdéhyde déshydrogénase (SSADH). Cela conduit à la production d'une molécule de NADPH, H^+ (Zhang and Bryant, 2011) ;
- La deuxième, minoritaire (retrouvée chez certaines espèces), repose sur un shunt glyoxylate dans lequel l'isocitrate est directement converti en succinate et en glyoxylate par l'isocitrate lyase (Zhang and Bryant, 2015) ;
- La troisième (Shunt GABA), récemment décrite chez *Synechocystis*, passe par la synthèse de glutamate et assurerait une interconnexion entre le métabolisme de l'azote et le cycle de Krebs. Cette voie produit du glutamate à partir d'α-cétoglutarate (glutamate déshydrogénase) qui est décarboxylé en γ-aminobutyrate (GABA) par la glutamate décarboxylase. Le GABA est ensuite converti en succinate semialdéhyde par la GABA aminotransférase (Zhang *et al.*, 2016).

4. Le métabolisme de l'azote

a. Présentation générale du métabolisme de l'azote

L'azote est bien souvent le nutriment dont la disponibilité est la plus limitée et temporaire dans le milieu naturel des cyanobactéries. Il est cependant très important dans leur métabolisme central notamment pour la synthèse des bases azotées et des acides aminés. Afin de satisfaire leurs besoins en azote dans un milieu qui en est généralement pauvre, les cyanobactéries peuvent assimiler l'azote sous de nombreuses formes minérales (diazote N_2, ion ammonium

NH_4^+, ion nitrate NO_3^-, ion nitrite NO_2^-) ou organiques (urée, acides aminés : comme l'arginine et la glutamine). Ces différentes formes de l'azote sont récupérées par la cyanobactérie grâce à différents transporteurs puis sont converties en ion ammonium. L'ion ammonium est par la suite converti en glutamate ou en carbamyl-phosphate (CP) par le système GS-GOGAT (Figure 23).

Le système GS-GOGAT fonctionne en 2 étapes successives catalysées par la glutamine synthase (GS) et la glutamine-oxoglutarate-aminotransférase (GOGAT) selon les équations suivantes :

Glutamate + NH_4^+ + ATP → **Glutamine** + ADP + P*i* catalysée par GS

Glutamine + α-cétoglutarate + $Fd_{réduite}$ → 2 **Glutamate** + $Fd_{oxydée}$ catalysée par la GOGAT.

L'ammonium joue un rôle central dans le métabolisme de l'azote. Par conséquent, quand il est présent dans le milieu de la cyanobactérie, il est rapidement assimilé et inhibe toutes les autres voies d'assimilation de ressources azotées (pour revue voir (Herrero *et al.*, 2001; Forchhammer, 2004; Esteves-Ferreira *et al.*, 2018)).

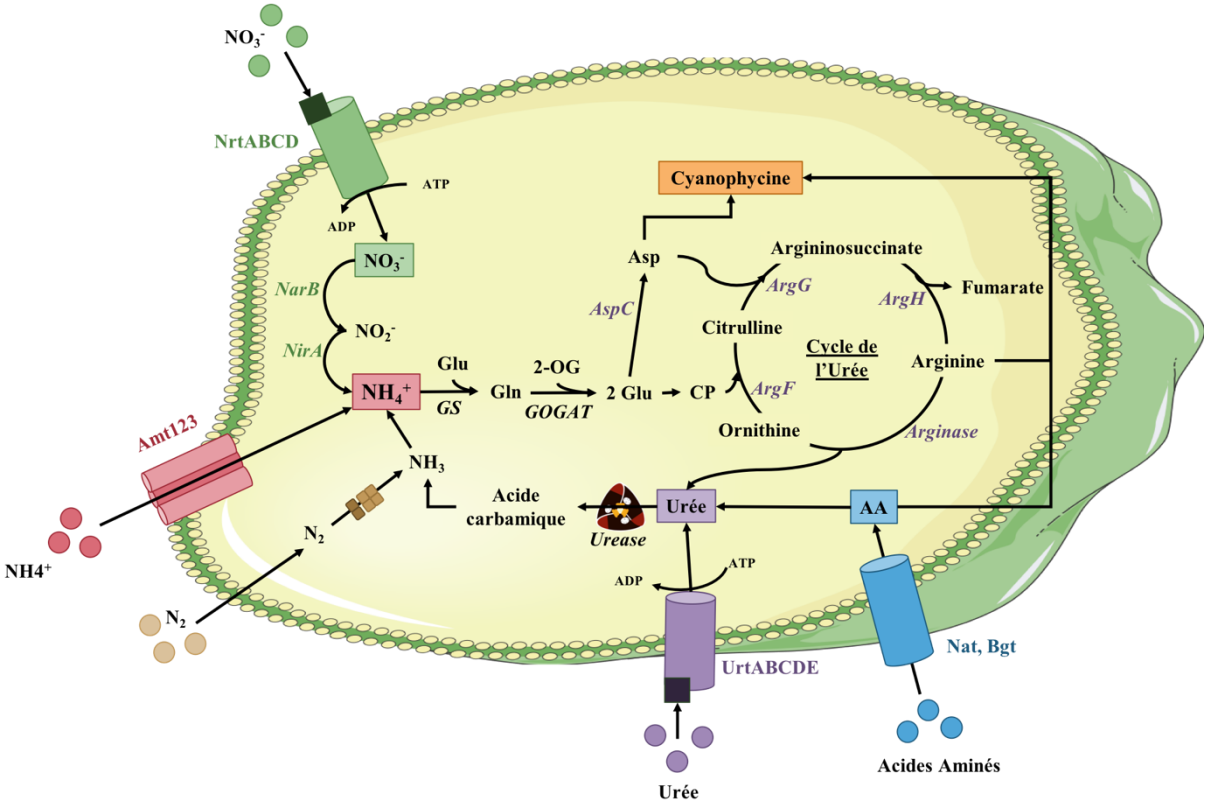


Figure 23 Représentation schématique des voies d'assimilation de ressources azotées par les cyanobactéries. Glu = Glutamate ; Gln = Glutamine ; CP = carbamyl-phosphate ; Asp = aspartate ; AA = acide aminé. NrtABCD = transporteur du nitrate ; Amt123 = perméase pour le trasnport de l'ammonium ; UrtABCDE = transporteur de l'urée ; Nat et Bgt = transporteur des acides aminés ; *GS* = glutamine synthase ; *GOGAT* = glutamine-oxoglutarate-aminotransférase ; *NarB* = nitrate réductase ; *NirA* = nitrite reductase ; *AspC* = Aspartate aminotransferase ; *ArgG* = Argininosuccinate synthase ; *ArgH* = Argininosuccinate lyase ; *ArgF* = Ornithine carbamoyltransferase.

Une partie de mon étude portant sur les souches diazotrophiques, je vais à présent décrire plus en détail les mécanismes de la fixation du diazote par la nitrogénase.

b. La fixation de diazote atmosphérique (N_2) par la nitrogénase

i. Un processus très couteux en énergie

Les deux molécules d'azote présentes dans le N_2 sont liées par une triple liaison, une des liaisons les plus forte rencontrées dans le vivant. Par conséquent,, le clivage de cette liaison nécessite une grande quantité d'énergie et ne peut être effectué sans l'action d'une enzyme particulière appelé nitrogénase (Dean *et al.,* 1993). Cette enzyme catalyse la conversion du diazote (N_2) en ammonium (NH_3) selon l'équation :

$$N_2 + 8e^- + 8H^+ + 16\ MgATP \rightarrow 2\ NH_3 + H_2 + 16\ MgADP + 16\ P_i$$

Les cyanobactéries diazotrophiques sont les seuls microorganismes capables de fixer le diazote en conditions aérobiques.

ii. Nécessité de séparer la fixation d'azote de la photosynthèse

La nitrogénase est rapidement et de manière irréversible inhibée par la présence d'oxygène (Raymond *et al.*, 2004). Par conséquent il est nécessaire de séparer la photosynthèse productrice d'oxygène de la fixation d'azote sensible à l'oxygène (Gallon, 1981; Stöckel *et al.*, 2008; Toepel *et al.*, 2008; Welsh *et al.*, 2008).

La majorité des cyanobactéries diazotrophiques sont des micro-organismes pluricellulaires (*Anabeana* PCC 7120, *Nostoc sp*) qui différencient certaines de leurs cellules en hétérocystes spécialisés dans la fixation du diazote (Wolk, 1996).
Cependant, chez les cyanobactéries unicellulaires non-hétérocystées (telles que *Cyanothece sp.* ou *Gloeothece sp.*), une séparation spatiale n'est pas envisageable et cette séparation est par conséquent temporelle. Lorsque ces cyanobactéries sont cultivées en alternance jour/nuit, elles réalisent la photosynthèse le jour et la fixation d'azote la nuit (Fay, 1992; Schneegurt *et al.*, 1994; Stöckel *et al.*, 2008; Toepel *et al.*, 2008; Welsh *et al.*, 2008).

iii. Structure et mécanisme d'action de la nitrogénase

La nitrogénase est une métalloenzyme composée de deux complexes enzymatiques (Figure 24).

- Une réductase (protéine à Fe) formée par un dimère de NifH qui contient un centre fer-soufre [Fe_4S_4] appelé cluster F et deux sites de liaisons à l'ATP (Burgess and Lowe, 1996; Hoffman *et al.*, 2014)

- Une dinitrogénase composée d'un tétramère α2β2 de sous-unités NifD et NifK. Chaque dimère αβ contient à l'interface entre la sous-unité α et la sous-unité β, un cluster métallique [Fe_8S_7] appelé cluster P. Le diazote est réduit au niveau du cluster M formé de [$MoFe_7S_9$C-R-homocitrate] (Einsle *et al.*, 2002).

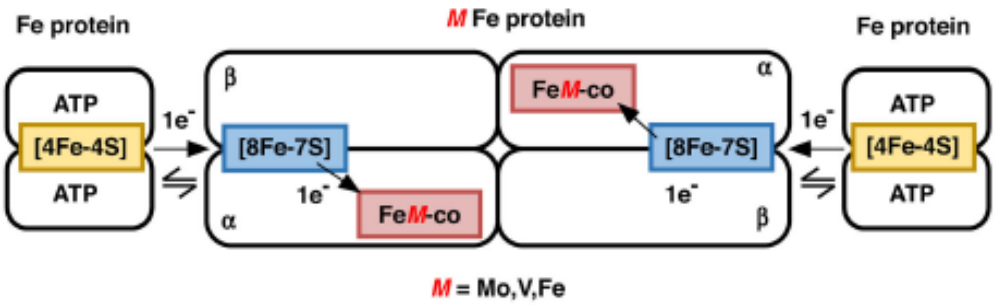


Figure 24 Structure de la nitrogénase. Extrait de (Seefeldt *et al.*, 2018).

L'hydrolyse de la liaison du diazote et la formation d'ammoniaque nécessitent l'accumulation d'électrons au sein du site actif de la nitrogénase.

Cela se fait selon le cycle suivant ((Burgess and Lowe, 1996) Figure 25) :

- La liaison de l'ATP avec la protéine Fe entraine un changement de conformation et amène le cluster F plus proche de la surface de la protéine.
- Ce qui entraine l'association de la protéine Fe liant deux molécules de MgATP avec une moitié de la nitrogénase. Le cluster F de la protéine Fe se trouve alors à proximité du cluster P de NifDK
- Le transport d'un électron du cluster F jusqu'au site actif M de la nitrogénase en passant par le cluster P : le cluster P donne d'abord un électron au cluster M puis le cluster P est rapidement réduit par le gain d'un électron provenant du cluster F. Il s'agit d'un transfert « deficit-spending » (Danyal *et al.*, 2011).
- L'hydrolyse de deux molécules d'ATP en ADP et P_i qui permet :
- Le relargage du phosphate inorganique de la protéine Fe (Yang *et al.*, 2016) et la dissociation de la réductase (oxydée avec 2 ADP liés) et de la nitrogénase réduite (Kurnikov *et al.*, 2001).

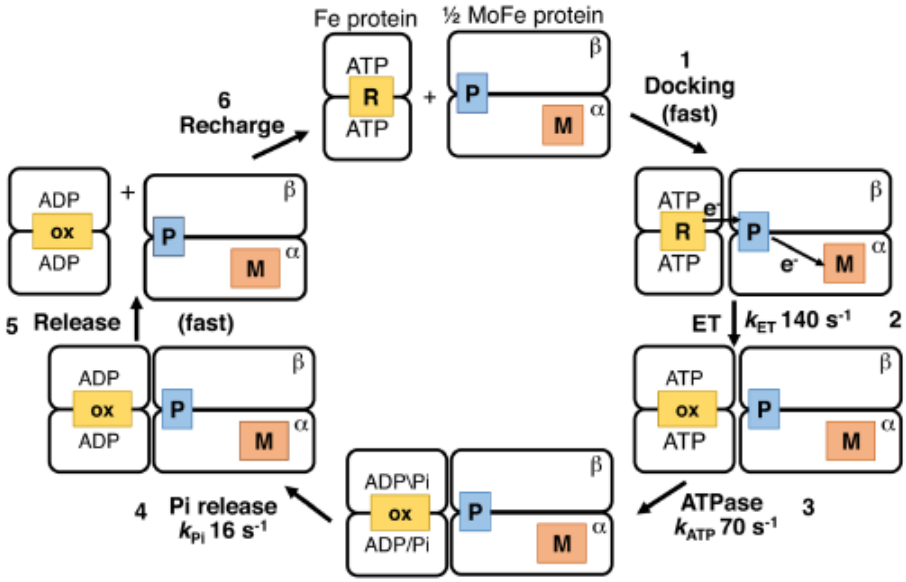


Figure 25 Schéma montrant la suite d'évènements qui permet le transfert d'un électron entre la réductase contenant le cluster F et la nitrogénase contenant le cluster P et M. Tiré de (Seefeldt *et al.*, 2018).

Ce cycle d'événement sera répété 4 fois afin d'établir la liaison du N_2 dans le site actif puis 4 autres fois pour permettre la réduction complète du diazote en ammoniaque et la production de H_2 (Burgess and Lowe, 1996; Hoffman *et al.*, 2014).
Les deux moitiés de la nitrogénase semblent coopérer de façon négative c'est-à-dire que les deux moitiés ne peuvent pas réaliser le cycle du transfert d'électrons en même temps et cela même si les deux sont liées à une protéine Fe. Chaque moitié doit attendre que l'autre ait fini le cycle afin de le commencer (Danyal *et al.*, 2016).
Je vais maintenant détailler le métabolisme de l'urée car j'ai développé lors de mon étude, des protocoles de culture de cyanobactérie en utilisant l'urée comme seule source d'azote.

c. Transport et hydrolyse de l'urée dans diverses cyanobactéries

i. Transport et hydrolyse de l'urée

Chez de nombreux organismes procaryotes et eucaryotes, l'urée ($CO(NH_2)_2$) est un déchet du métabolisme. Mais pour certaines cyanobactéries, telles que *Synechocystis* PCC 6803, *Synechococcus* PCC 7002 et *Cyanothece* PCC 7425, l'urée peut servir de source d'azote. Ces cyanobactéries possèdent un transporteur spécifique de type ABC (UrtABCDE) et une uréase (métalloenzyme multimérique Ure $(ABC)_3$) qui catalyse la dissociation de l'urée ($CO(NH_2)_2$) en ammoniaque (NH_3), en H_2O et en dioxyde de carbone (CO_2) (Valladares *et al.*, 2002) selon les équations :

$CO(NH_2)_2 + H_2O \rightarrow NH_3 + H_2N\text{--}COOH$ (activité urease)

$NH_3 + H_2N\text{--}COOH + H_2O \rightarrow 2\ NH_3 + H_2CO_3 \rightarrow 2\ NH_3 + H_2O + CO_2$ (reaction spontannée)

L'urée peut également être dissociée par l'action de l'urea carboxylase (EC 6.3.4.6) qui catalyse la réaction de transformation de l'urée en allophanate suivie par l'action de l'allophanate hydrolase (EC 3.5.1.54, (Kanamori *et al.*, 2005)) qui le décompose en ammoniaque. On a :

urea + ATP + HCO_3 → allophanate + ADP + Pi

allophanate + $H_2O \rightarrow 2\ NH_3 + 2\ CO_2$

ii. Présence des gènes liés au transport ou à l'hydrolyse de l'urée dans le génome des cyanobactéries

L'uréase est une enzyme très largement codée dans le génome des cyanobactéries (264 sur 308 génomes analysés possèdent *ureABC* et 255 sur 308 possèdent *ureDEFG)* tout comme les gènes codant pour le transport de l'urée (235 espèces sur 308 possèdent tous les gènes *urtABCDE*). Cependant, certaines (23 espèces) possèdent seulement les gènes codant pour l'uréase. Dans ce cas l'uréase servirait à détoxifier l'urée produit par le métabolisme (recyclage de l'azote perdu sous forme d'urée lors du catabolisme de l'arginine). Par ailleurs, certaines cyanobactéries (10 espèces) possèdent seulement les gènes codant pour le transporteur de l'urée, ce transporteur pourrait donc servir au transport d'autres nutriments (pour revue voir (Veaudor *et al.*, 2019)).

L'urea carboxylase et l'allophate hydrolase sont en revanche beaucoup moins présentes dans les génomes cyanobactériens. 19 espèces sur 308 analysées possèdent l'urea carboxylase et 13 possèdent l'allophanate hydrolase et seulement 5 espèces (dont *Cyanothece* PCC 7425, Tableau 6) possèdent ces deux gènes. La présence de ces deux gènes permet à ces cyanobactéries de cataboliser l'urée de façon indépendante de l'activité de l'uréase (Veaudor *et al.*, 2019)).

Tableau 6 Présence des gènes du transport et du catabolisme de l'urée dans les cyanobactéries sélectionnées pour l'étude

	UreABCDEFG	*UrtABCDE*	Urea carboxylase et protéines associées	Allophanate hydrolase
Cyanothece PCC 7425	oui	oui	oui	oui
Cyanothece PCC 7822	oui	oui	non	non
Synechocystis PCC 6803	oui	oui	non	non
Synechococcus PCC 7002	oui	oui	non	non
Synechococcus PCC 7942	non	non	non	non

iii. Toxicité de l'urée

Les cyanobactéries possédant l'uréase peuvent croitre aux dépends de l'urée comme source d'azote. Cependant, une forte concentration en urée ou une exposition prolongée est souvent toxique (Collier *et al.*, 1999). Cette toxicité serait due à la peroxydation des lipides (Sakamoto *et al.*, 1998) et semble être directement liée à une suractivité de l'uréase. En effet, une mutation du gène *UreG* chez *Synechocystis* PCC 6803 qui diminue fortement l'activité de l'uréase permet de prolonger la croissance en présence d'urée comparée à la celle de la souche sauvage (Veaudor *et al.*, 2018).

5. La balance C/N

Afin de maintenir son homéostasie interne, la cyanobactérie doit être capable de recueillir des informations sur sa balance carbone/azote puis de les communiquer grâce à un système de transduction sophistiqué (voir (Forchhammer and Selim, 2019) et voir (Veaudor *et al.*, 2020) en annexe 1). Ce dernier implique différents types d'acteurs :

- Des facteurs de transcription tels que NdhR (Jiang *et al.*, 2017), CmpR (Forchhammer and Selim, 2019), NtcA (Giner-Lamia *et al.*, 2017), LexA (Domain *et al.*, 2004; Kizawa *et al.*, 2017) et AbrB2 (Jiang *et al.*, 2017),

- Des métabolites : le 2-oxoglutarate (2OG) (Robles-Rengel *et al.*, 2019) et le 2-phosphoglycolate (2PG).
- Des protéines régulatrices : PII (Watzer *et al.*, 2019) et PipX (Forchhammer and Selim, 2019).
- Des ARNs non codant (Muro-Pastor and Hess, 2020).

VII. La voie MEP chez les cyanobactéries

La voie MEP est une voie métabolique secondaire permettant la synthèse des précurseurs des terpènes, l'isopentényl-pyrophosphate et le diméthylallyl-pyrophosphate. Elle a été découverte dans les années 1990 chez les plantes (Rohmer *et al.*, 1993; Lichtenthaler, 1999) puis différentes manipulations ont permis de démontrer son existence chez les cyanobactéries (Disch *et al.*, 1998).

1. Du pyruvate et glycéraldéhyde-3-phosphate aux précurseurs des terpènes (FPP, GPP et GGPP)

a. La synthèse de l'isopentényl-pyrophosphate (IPP) et du diméthylallyl-pyrophosphate (DMAPP)

La voie MEP est une cascade enzymatique comprenant 7 étapes (Figure 26) :

- Tout d'abord, la DXP synthase (DXS) catalyse la condensation du pyruvate et du glycéraldéhyde 3-phosphate en 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate (DXP (Miller *et al.*, 1999)),
- Le DXP subit ensuite une isomérisation réductrice pour former du 2-C-méthylérythritol-4-phosphate (MEP). Cette réaction est catalysée par la DXP réductase (DXR, IspC) et nécessite la présence de magnésium (Mg^{2+} (Miller *et al.*, 2000; Yin and Proteau, 2003)),
- Le MEP est couplé au CTP pour former le methylerythritol cytidyl diphosphate (CDP-ME) par l'action de la 2-C-méthyl-D-érythritol-4-phosphate cytidyltransférase (EC 2.7.7.60, MCT, YgbP, IspD),
- Le CDP-ME est ensuite phosphorylé en CDP-MEP par la 4-(cytidine-5'-diphospho)-2-C-méthyl-D-érythritol kinase (EC 2.7.1.148, CMK, YchB, IspE),
- Puis cyclisé en MEcPP par la 2-C-méthyl-D-érythritol-2,4-cyclodiphosphate synthase (EC 4.6.1.12, MDS, YgbB, IspF),
- Le MEcPP est réduit en du 4-hydroxy 3-methyl-butenyl 1-phosphate (HMBPP) par la (E)-4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényle diphosphate synthase (EC 1.17.7.1, HDS, GcpE, IspG).
- Enfin la 4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényle diphosphate réductase (EC 1.17.1.2, HDR, LytB, IspH) catalyse la réduction du HBMPP en une mixture d'IPP et de DMAPP (ratio 6 :1 (Cunningham *et al.*, 2000)).

Pour plus d'informations sur la structure et les mécanismes d'action de ces enzymes, se référer à (Frank and Groll, 2017).

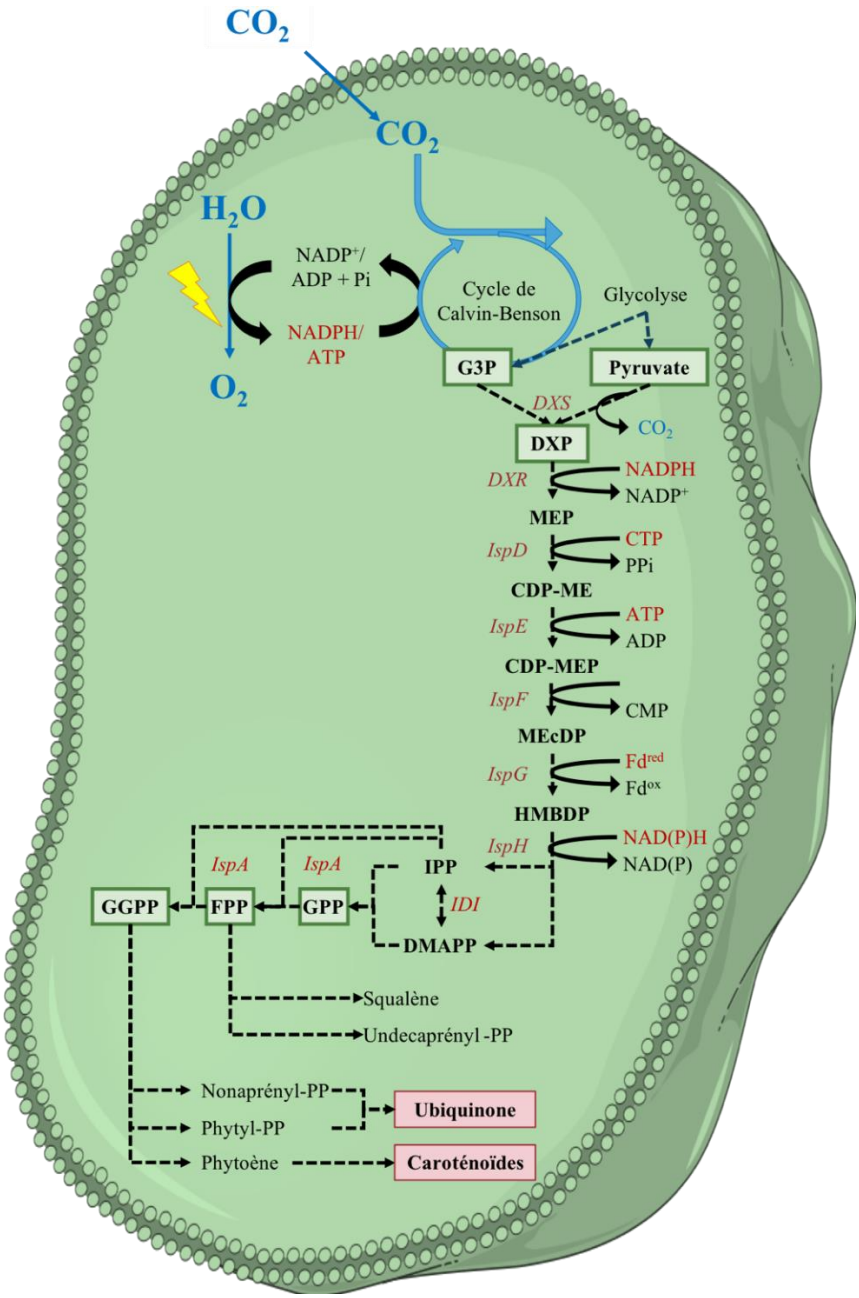


Figure 26 Représentation schématique de la voie MEP chez les cyanobactéries
G3P = glyceraldéhyde 3-phosphate; DXP = 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate; MEP = methylerythritol-4-phosphate; CDP-ME = 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol; CDP-MEP = 2-phospho-4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol; MEcDP = 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate; HMBDP = 4-hydroxy-3-methylbut-2-enyldiphosphate synthase; IPP = isopentenyl diphosphate; DMAPP = dimethylallyl diphosphate; GPP: geranyl diphosphate; FPP = farnesyl diphosphate; GGPP = geranylgeranyl diphosphate; DXS = 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase; DXR = 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase; IspD = 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidylyltransferase; IspE = 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol kinase; IspF = 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase; IspG = 4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase; IspH = 4-hydroxy-3-methylbut-2-enyldiphosphate reductase; IDI = isopentenyl diphosphate isomerase; IspA = geranyl diphosphate synthase = farnesyl diphosphate synthase = geranylgeranyl diphosphate synthase

b. Condensation de l'IPP et du DMAPP en molécules à longues chaines carbonées

L'enzyme IPP isomérase (IDI) qui catalyse l'interconversion de l'IPP et du DMAPP joue cependant un rôle important dans l'ajustement du ratio IPP : DMAPP en fonction des besoins de la cellule (plus la cellule aura besoin de terpènes à longue chaine carbonée et plus il lui faudra d'unités d'IPP et inversement). Le génome des cyanobactéries code pour l'isomérase IDI de type II (Barkley *et al.*, 2004) qui nécessite une flavine mononucléotide réduite et du magnésium pour fonctionner (Kaneda *et al.*, 2001; Barkley *et al.*, 2004). Cette enzyme n'est pas essentielle à la croissance de *Synechocystis* PCC 6803 en photoautotrophie mais son inactivation altère la formation des terpenoïdes et la croissance à forte intensité lumineuse (Barkley *et al.*, 2004; Poliquin *et al.*, 2008).

Par la suite, l'IPP et le DMAPP sont condensés en prényl diphosphates. Le géranyl pyrophostate (GPP, C10) provient de la condensation (réaction d'ionisation-condensation-élimination) d'une molécule d'IPP et d'une molécule de DMAPP et est le précurseur de tous les terpènes à 10 carbones. Des unités successives d'IPP sont ensuite ajoutées pour augmenter le nombre de carbone et former successivement le farnesyl pyrophosphate (FPP, précurseur des terpènes à 15 et à 30 carbones) puis le géranyl géranyl pyrophosphate (GGPP, précurseur des caroténoïdes et autres terpènes à 20 et à 40 carbones). Toutes ces réactions suivent la règle biogénique de l'isoprène et sont catalysées par des prényltransférases. Chez les cyanobactéries, une seule enzyme (IspA) catalyse successivement la synthèse du GPP puis du FPP puis du GGPP. Cela n'est pas le cas chez les plantes dont le génome code pour de nombreuses prényl transférases catalysant la synthèse du GPP et/ou du FPP et/ou du GGPP. Par exemple, le génome d'*Arabidopsis thaliana* code pour 14 prényl transférases dont 11 permettant la synthèse du GPP, FPP et GGPP ; deux permettant la synthèse du GPP et du FPP ; et une catalysant seulement la synthèse du GPP.

c. Les gènes codant pour les enzymes de la voie MEP chez nos cyanobactéries d'intérêt

Les séquences codantes des enzymes de la voie MEP (Tableau 7) sont dispersées dans le génome des cyanobactéries.

Tableau 7 Gènes codant pour les enzymes de la voie MEP chez nos cyanobactéries d'intérêt

	Synechocystis PCC 6803	*Synechococcus* PCC 7942	*Synechococcus* PCC 7002	*Cyanothece* PCC 7425	*Cyanothece* PCC 7822
DXS	*sll1945*	*Synpcc7942_0430*	*Synpcc7002_A1172*	*Cyan7425_4130*	*Cyan7822_0988*
DXR	*Sll0019*	*Synpcc7942_1513*	*Synpcc7002_A0818*	*Cyan7425_3999*	*Cyan7822_4633*
IspD	*slr0951*	*Synpcc7942_0681*	*Synpcc7002_A1905*	*Cyan7425_0571*	*Cyan7822_0322*
IspE	*Sll0711*	*Synpcc7942_0310*	*Synpcc7002_A2416*	*Cyan7425_0570*	*Cyan7822_0696*
IspF	*Slr1542*	*Synpcc7942_1170*	*Synpcc7002_A1166*	*Cyan7425_3983*	*Cyan7822_0609*
IspG	*Slr2136*	*Synpcc7942_0713*	*Synpcc7002_A0743*	*Cyan7425_3649*	*Cyan7822_1548*
IspH	*Slr0348*	*Synpcc7942_0673*	*Synpcc7002_A0517*	*Cyan7425_2354*	*Cyan7822_3197*
IDI	*Sll1556*	*Synpcc7942_01933*	*Synpcc7002_A1132*	*Cyan7425_3586*	*Cyan7822_3503*
IspA	*Slr0739*	*Synpcc7942_0776*	*Synpcc7002_A1085*	*Cyan7425_0972*	*Cyan7822_2713*

d. Spécificité de la voie MEP chez les cyanobactéries

Les cyanobactéries possèdent une voie MEP dite non-canonique. En effet, chez *Synechocystis* PCC 6803, des auteurs ont démontré que, bien que la souche possède tous les gènes homologues aux gènes de la voie MEP des plantes, les substrats habituels de cette voie ne semblaient pas augmenter la production de terpènes. Des études *in vitro* réalisées avec des extraits de cellule de *Synechocystis* PCC 6803 ont démontré que l'ajout de pyruvate et/ou de G3P ne stimulait pas l'activité de la voie MEP alors que des intermédiaires de la voie des pentoses phosphates (PPP) la stimulait (Ershov *et al.*, 2002; Poliquin *et al.*, 2004).

De plus, l'addition de fosmidomycine, un inhibiteur de l'enzyme DXR (Woo *et al.*, 2006), n'impacte ni la croissance en photoautotrophie de *Synechocystis* PCC 6803, ni la production de terpènes par cette souche (Ershov *et al.*, 2002). Ces résultats suggèreraient que les cyanobactéries pourraient utiliser les intermédiaires de la PPP pour produire des terpènes. Cependant, des résultats récents ont démontré que les intermédiaires de la PPP n'étaient pas directement les substrats de la voie MEP et que la stimulation *in vitro* de cette voie MEP par ces composants était indirecte (Poliquin *et al.*, 2012). Toutefois la production de terpènes (limonène) par *Synechocystis* PCC 6803 exprimant le gène codant pour la limonène synthase a significativement augmenté en surproduisant des enzymes de la PPP (Rpe et Rpi ; (Lin *et al.*, 2017)).
En conclusion, bien qu'un lien semble exister chez les cyanobactéries entre la voie MEP et la PPP, de nouvelles études doivent être réalisées afin d'en comprendre les mécanismes.

2. La synthèse des caroténoïdes à partir du GGPP

a. Les différents caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des isoprénoides à plus de 40 carbones qui jouent des rôles très importants chez les cyanobactéries (décrits en annexe 2.). Il existe plus de 600 caroténoïdes répartis en 2 classes :

- Les carotènes qui sont constitués seulement de carbone et d'hydrogène
- Les xantophylles qui sont constitués de carbone, d'hydrogène et d'oxygène. Ces derniers peuvent également être répartis en 2 catégories :
    - Les myxoxanthophylles et leurs dérivées qui ne possèdent qu'un cycle aromatique
    - Les xanthophylles (cryptoxanthine, zeaxanthine, échinenone, canthaxanthine, 30-hydroxyechinenone, nostoxanthine, et caloxanthine) qui possèdent 2 cycles aromatiques.

Synechocystis PCC 6803 produit majoritairement des myxoxanthophylles et des β-carotènes (Takaichi *et al.*, 2001).

b. La synthèse des caroténoïdes chez les cyanobactéries

La voie de production est identique chez les diverses cyanobactéries de l'étude et j'ai par conséquent choisi de montrer celle de *Synechococcus* PCC 7002 (Figure 27).

Deux molécules de géranyl géranyl pyrophosphate (GGPP ; C20) obtenues après addition d'une molécule d'IPP au farnésyl pyrophosphate (FPP) sont condensées pour donner une molécule à 40 carbones par la phytoène synthase (CrtB). Par la suite, des étapes séquentielles de désaturation et de cyclisation des extrémités de la molécule sont réalisées par la phytoène désaturase (CrtP / CrtI), la ζ-carotène désaturase (CrtQ) et la lycopène cyclase (CruP et CruA) pour produire les β-carotènes. L'enzyme β-carotène hydroxylase (CrtR) catalyse par la suite la formation des myxoxanthophylles, de la zeaxanthine, de la cryptoxanthine, et de la 3' hydroxyechinenone à partir des β-carotènes. L'enzyme β-carotène kétolase (CrtW ou CrtO) catalyse la formation de échinéones alors que l'enzyme 1,2-hydratase (CruF) catalyse la formation des myxoxanthophylles.

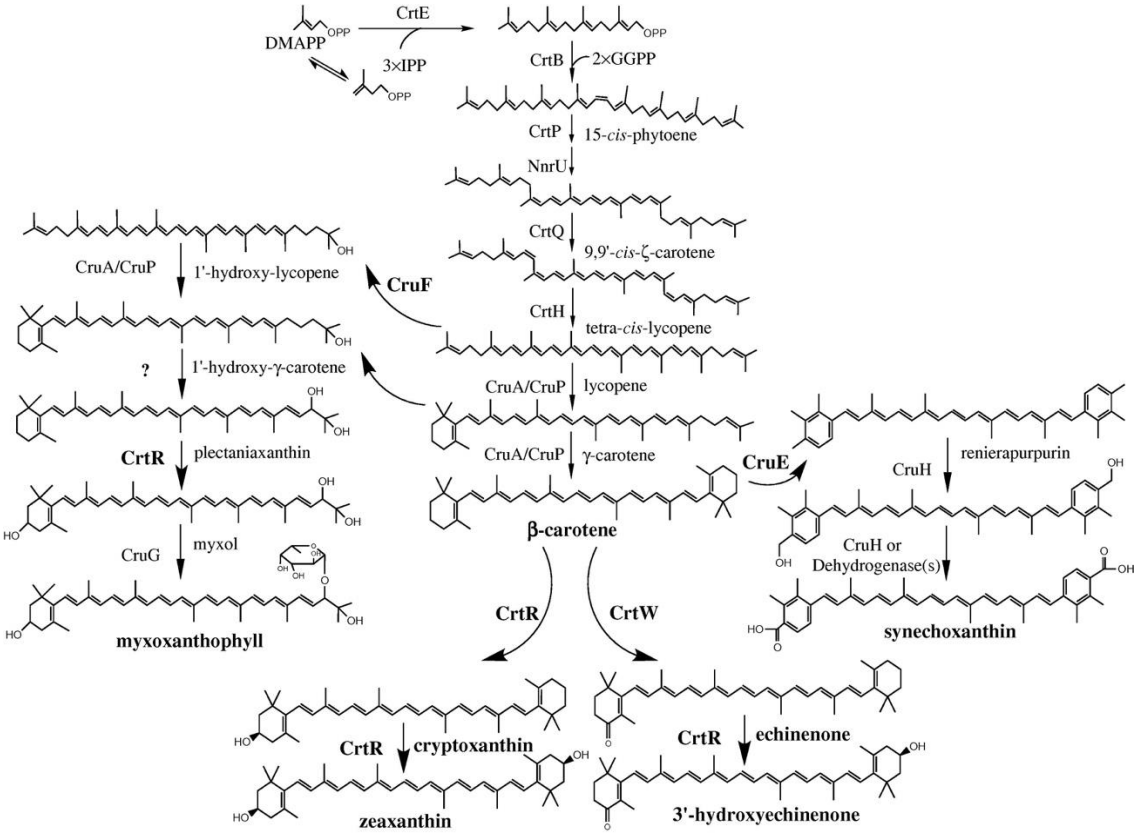


Figure 27 Production des caroténoïdes chez *Synechococcus* PCC 7002 (Zhu *et al.*, 2010b). CrtE = geranyl diphosphate synthase = farnesyl diphosphate synthase = geranylgeranyl diphosphate synthase ; CrtB = phytoène synthase ; CrtP = phytoène désaturase ; CrtQ = ζ-carotène desaturase ; CruP et CruA = lycopène cyclase ; CrtR = β-carotène hydroxylase ; CrtW = β-carotène kétolase ; CruF = 1,2-hydratase.

c. Inactivation des enzymes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes

Plusieurs mutants d'inactivation de la voie de biosynthèse des caroténoïdes ont été réalisés pour *Synechococcus* PCC 7002 (Zhu *et al.*, 2010b) et *Synechocystis* PCC 6803 ((Fernández-González *et al.*, 1997; Schäfer *et al.*, 2005; Kusama *et al.*, 2015) et voir le tableau en annexe 2).

L'inactivation simultanée des gènes *crtR, crtO, cruE* et *cruF* (le mutant ne synthétise plus que des β-carotènes) n'a pas d'impact délétère sur la croissance en photoautotrophie (à 50 µmol photos m^{-2} s^{-1}) de *Synechococcus* PCC 7002. Le taux de ROS était cependant plus élevé et le taux de chlorophylle α plus faible (Zhu *et al.*, 2010b).

Concernant les études menées sur *Synechocystis* PCC 6803, la délétion de *crtR* ou de *crtO* n'a pas eu d'effet drastique sur la croissance bien que la souche soit plus sensible au stress oxydant et à la forte lumière. En revanche, lorsque *crtR* et *crtO* sont inactivés simultanément, le mutant obtenu est très sensible à la forte lumière et réduit la synthèse des protéines de la membrane thylakoidienne ((Fernández-González *et al.*, 1997; Schäfer *et al.*, 2005; Kusama *et al.*, 2015).Les mutants Δ*crtB* et Δ*crtH/B* ne poussent qu'en hétérotrophie dans le noir et dans un environnement anaérobique (Tóth *et al.*, 2015).

Les effets de la délétion de *cruF* n'ont jamais été publiés chez *Synechocystis* PCC 6803. La délétion de *cruF* chez *Synechocystis* PCC 7002 n'a pas d'effet important sur sa croissance. Nous verrons par la suite (Partie résultats Chapitre 2.I.8.) qu'il en est de même chez *Synechocystis* PCC 6803.

3. Importance de la voie MEP pour les cyanobactéries

Les terpènes synthétisés par la voie MEP sont nécessaires aux cyanobactéries car ils interviennent dans :

- **La traduction :** l'isopentenyl ARNt, synthétisé à partir du groupement isopentenyl de l'IPP par une ARNt isopentenyltransférase (tRNA Δ2-IPP transferase), augmente l'efficacité de traduction.

- **Le métabolisme et la photosynthèse :** les hèmes, les ubiquinones et ménaquinones et les pigments photosynthétiques (chlorophylles et caroténoïdes) sont produits à partir du GGPP synthétisé par la voie MEP (Domonkos *et al.*, 2013). Les caroténoïdes jouent par exemple un rôle dans l'assemblage, la stabilisation anaérobique (Tóth *et al.*, 2015), la protection et le fonctionnement des photosystèmes. Ils élargissent le spectre d'absorption des longeurs d'onde et permettent une absorption plus efficace à basse intensité lumineuse (Bode *et al.*, 2009).

- **La structuration de leur membrane** : les myxoxanthophylles jouent un rôle dans la rigidité de la membrane et permettent donc à la souche de s'adapter à des changements de température. Le bactoprénol (un polyterpénoïde) permet également le transport des précurseurs du peptidoglycane.

- **La protection contre les stress abiotiques** : certaines études suggèrent que les hopanoïdes (triterpène) peuvent jouer un rôle dans la protection contre les stress lors de conditions environnementales extrêmes (Doughty *et al.*, 2009). Notamment, les caroténoïdes protègent les cyanobactéries contre l'excès d'énergie et le stress photo oxydatif en dissipant l'énergie contenue dans les chlorophylles. Cela est permis grâce aux « **Orange Carotenoids Proteins » (OCP)**. Ces protéines solubles se lient à un kéto-caroténoide **(**échinenone, 30-hydroxyechinenone et zeaxanthin) qui joue le rôle de chromophore. L'absorption de la lumière bleu-verte par le caroténoïdes induit un changement de conformation de ce dernier et donc de la protéine. La protéine passe alors de sa forme inactive (orange) à sa forme active (rouge) et va intéragir avec les phycobilisomes ce qui permet la dissipation de l'excès d'énergie sous forme de chaleur et donc évite l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (Kirilovsky and Kerfeld, 2013).
- **La protection contre les stress biotiques** : le diterpène noscomin produit par *Nostoc commune* tout comme les diterpènes abietane isolés chez *Microcoleous lacustris* ont des propriétés antibactériennes (Jaki *et al.*, 1999; Pérez Gutiérrez *et al.*, 2008).

De plus, la fonction de nombreux autres terpènes produits par les cyanobactéries (monoterpène, géosmin, germacrene A et D, a-*epi*-α-selinene, *etc*) reste encore inconnue (Pattanaik and Lindberg, 2015).

4. La régulation de la voie MEP chez les cyanobactéries

De nombreux auteurs ont étudié la régulation de la voie MEP chez les plantes (pour revue voir (Rodríguez-Concepción, 2006; Cordoba *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2013; Vranová *et al.*, 2013; Banerjee and Sharkey, 2014) et chez les bactéries hétérotrophes (majoritairement *E. coli* (Banerjee and Sharkey, 2014)). Cependant peu d'études se sont concentrées sur ces mécanismes chez les cyanobactéries. Par conséquent, je vais présenter ici les mécanismes de régulation qui sont susceptibles de s'appliquer à la voie MEP des cyanobactéries. Il semblerait que les enzymes limitantes de cette voie soient DXS, DXR, IspD, IspF, IspG, IspH et IDI. Pour revue voir (Banerjee and Sharkey, 2014).

a. DXS est régulée au niveau post-traductionnel et par les produits de la voie MEP

DXS est connue comme l'enzyme qui garde l'entrée « gatekeeper » de la voie MEP chez les micro-organismes mais aussi chez les plantes (Lois *et al.*, 2000; Rodríguez-Concepción and Boronat, 2002). Cette enzyme en plus d'avoir une efficacité enzymatique faible, est aussi régulée négativement par les produits de la voie MEP, IPP et DMAPP (Banerjee *et al.*, 2013).

Par ailleurs, des auteurs ont observé que la surexpression de *dxs* chez *Synechocystis* PCC 6803, entrainait une augmentation par 4 de la quantité d'ARNm mais seulement par 1,5 celle de protéine DXS présente dans la phase soluble (Kudoh *et al.*, 2014) une quantité importante de protéines DXS se retrouvant sous forme d'agrégats dans la partie insoluble. Il est donc important d'identifer les mécanismes, jusqu'à présent inconnus, qui participent à sa maturation et à la régulation de son activité (Kudoh *et al.*, 2017a, 2017b). Par exemple, chez *Arabidopsis thaliana*, les protéines impliquées dans la gestion des chocs thermiques (heat shock protein) J20 et Hsp70 jouent un rôle dans la maturation de DXS (Pulido *et al.*, 2013).

b. DXR est régulée par un mécanisme de phosphorylation

Les enzymes DXR de *E. coli* et de *Francisella tularensis* ont un site de phosphorylation (résidu Ser186 ou Ser 177) qui joue un rôle important dans la liaison de l'enzyme avec son substrat (le DXP (Mac Sweeney *et al.*, 2005; Jawaid *et al.*, 2009)). La substitution de ce résidu serine par un aspartate ou un glutamate (mimique une phosphosérine) inhibe complètement l'activité de l'enzyme. On peut donc en conclure que lorsque le résidu serine est phosphorylé cela inactive l'enzyme. Il s'agit donc ici d'un mécanisme de régulation par phosphorylation qui pourrait également exister chez nos cyanobactéries d'intérêt (Figure 28).

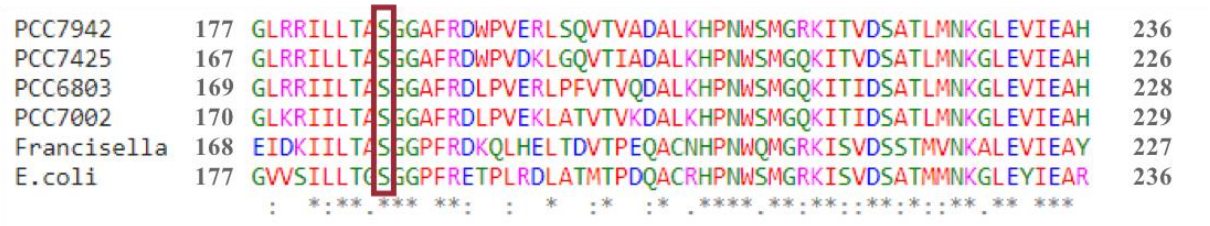


Figure 28 Présence d'un résidu sérine sur la protéine DXR à l'emplacement Ser186 pour *E. coli*, Ser177 pour *Francisella tularensis*, Ser178 pour *Synechocystis* PCC 6803, Ser185 pour *Synechococcus* PCC 7942, Ser176 pour *Cyanothece* PCC 7425, Ser179 pour *Synechococcus* PCC 7002. L'alignement a été réalisé avec Clustal Oméga.

Par ailleurs, l'activité de cette enzyme dépend aussi de la quantité de pouvoir réducteur (NADPH) présent dans la cellule donc de l'activité métabolique.

c. IspD est également régulée par un mécanisme de phosphorylation

Tout comme DXR, IspD semble être régulée par un mécanisme de phosphorylation. En effet, un résidu thréonine phosphorylable a été découvert chez *E. coli* et *Francisella tularensis* (Thr 140 et Thr 141). Ce résidu serait impliqué dans la liaison avec le substrat et sa phosphorylation inhiberait l'activité de l'enzyme (Richard *et al.*, 2001, 2004; Tsang *et al.*, 2011). Ce résidu thréonine étant présent dans la séquence des protéines de cyanobactéries, on peut faire l'hypothèse que cette régulation peut avoir lieu chez les cyanobactéries (Figure 29).

Figure 29 Présence d'un résidu thréonine sur la protéine IspD à l'emplacement Thr140 pour *E. coli*, Thr141 pour *Francisella tularensis*, Thr136 pour *Synechocystis* PCC 6803, pour *Synechococcus* PCC 7942 et pour *Cyanothece* PCC 7425 et Thr137 pour *Synechococcus* PCC 7002. L'alignement a été réalisé avec Clustal Oméga.

d. IspF pourrait être régulée par les différents produits de la voie MEP

La structure d'IspF chez différents organismes a révélé la présence d'une cavité hydrophobe capable d'interagir avec un groupement prenyl phosphate (PP). Cette cavité pourrait par conséquent contenir de l'IPP, du DMAPP, du GPP ou du FPP (Cristallographie chez *E. coli* Figure 30 *;* (Kemp *et al.*, 2005; Sgraja *et al.*, 2005). Les motifs permettant la formation de cette cavité et la liaison avec le groupement PP sont très conservés et auraient donc un rôle important à jouer dans la régulation de cette enzyme par les produits de la voie MEP (Kemp *et al.*, 2002; Richard *et al.*, 2002; Bitok and Meyers, 2012). Des expériences réalisées chez *E. coli* ont démontré que la présence de IPP, DMAPP, GPP et FPP augmentait l'activité de cette enzyme et que le GPP et le FPP stabilisaient cette enzyme (Bitok and Meyers, 2012).

Par ailleurs, les métabolites plus en amont de la voie (DXP, CDPME) n'ont pas montré d'effet activateur sur IspF sauf MEP. Lorsque IspF est liée au MEP (formation d'un supracomplexe IspF-MEP), la conformation de cette enzyme change ce qui la stabilise et augmente son activité par deux. Cependant, l'activité d'IspF peut alors être réprimée par la présence de FPP dans son environnment immédiat (Bitok and Meyers, 2012). Cela signifie que les produits de la voie MEP (majoritairement MEP et FPP) contrôlent l'activité d'une enzyme impliquée dans leur biosynthèse et donc le flux de carbone qui passe par cette voie.
Cependant, il est difficile de conclure sur le fait que ces mécanismes de régulation existent aussi chez les cyanobactéries (Figure 31).

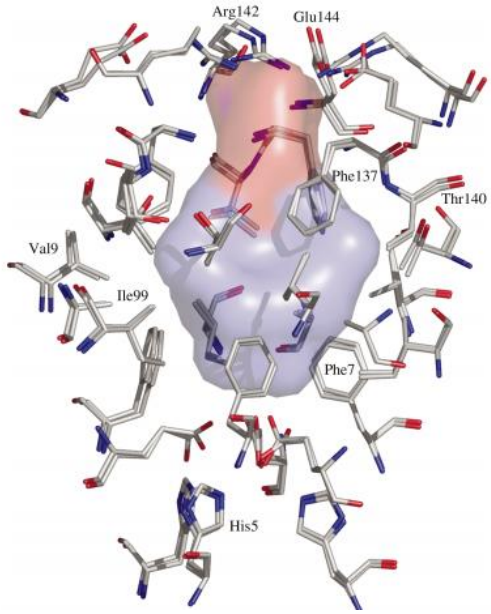


Figure 30 Représentation du site de liaison du GPP (en rouge et bleu transparent) au niveau de la poche hydrophobe de IspF chez *E. coli.* Les acides aminés important pour cette liaison sont indiqués (Kemp *et al.*, 2005).

```
E.coli      0  ---MRIGHGFDVHAFGGEGPIIIGGVRIPYEKGLLAHSDGDVALHALTDALLGAAALGDI  57
PCC7002     0  -MKIRIGNGYDVHRLVPGRPLILGGIQLEHHLGLDGHSDADVLTHAIMDAMLGALSLGDI  59
PCC6803     0  MTALRIGNGYDIHRLVGDRPLILGGVTIAHHLGLDGHSDADVLTHALMDALLGALSLGDI  60
PCC7942     0  MSRFRIGNGYDIHRLVEGRPLILGGIQLEHSLGLDGHSDADVLTHAIMDALLGALSLGDI  60
PCC7425     0  MTSIRIGNGYDIHRLVSDRPLILGGVNIPHELGLLGHSDADVLTHAIMDALLGALSLGDI  60
               :***:*:*:* :    *:*:**: : :  ** .***.**  **: **:*** :****

E.coli     58  GKLFPDTDPAFKGADSRELLREAWRRIQAKGYTLGNVDVTIIAQAPKMLPHIPQMRVFIA  117
PCC7002    60  GHYFPPTDPQWKGADSIELLKQVHQLIQERGWQIGNIDSVIVAERPKLKSHIQAMTQCLA  119
PCC6803    61  GHYFPPSDARWQGADSLKLLAQVHQLILERGWRINNLDNVIVAEQPKLKPHIQAMKENLA  120
PCC7942    61  GHYFPPTDPQWKGADSLKLLAQVNQLIRDRGWTIGNLDSVVVAEQPKLKPHIAAMRDRLA  120
PCC7425    61  GHYFPPGDPQWAGADSLKLLAQVHQLVQERGWQVGNIDSVIVAERPKLKPHLAAMRDRLS  120
               *: **  *  : **** :** :. : :  :*: :.*:* .::*: **:  *:  *   ::

E.coli    118  EDLGCHMDDVNVKATTTEKLGFTGRGEGIACEAVALLIKATK  159
PCC7002   120  EALGVDPDQVGVKATTNEKLDAMGEEKGICVHAVALLVQV--  159
PCC6803   121  KVLTIDPDLIGIKATTNERLGPTGREEGIAAYSVALLIKEG-  161
PCC7942   121  KVLELEPDQIGIKATTNEKLGPTGREEGICAYAVALLVRD--  160
PCC7425   121  AVLKVKPDQIGIKATTNEKLGPEGREEGICAYAVAVLVSVA-  161
               *  . * :.:****.:*:*  *. :**.  :**:*:
```

Figure 31 Les acides aminés importants pour la liaison du GPP ne sont pas présents chez les cyanobactéries. Les résidus 5 HGFDV 9 chez *E. coli* sont remplacés par NGYDI chez les cyanobactéries, l'isoleucine 99 est remplacée par une valine, la thréonine 134 par une asparagine et 139 FTGRGEGIACE par d'autres acides aminés. L'alignement a été réalisé avec Clustal Oméga.

e. L'activité de IspG et IspH dépend de la balance redox

Les enzymes IspG et IspH contiennent un centre fer-soufre [4Fe–4S] sensible au dioxygène.

Chez *Thermosynechococcus elongatus* BP-1, la ferrédoxine I interagit directement avec IspG et lui transfère ses électrons (Okada and Hase, 2005). Par conséquent, l'activité des enzymes IspG et IspH chez les cyanobactéries dépend de la quantité de ferrédoxine réduite.

Par ailleurs, chez *E. coli*, un efflux de MEcPP (substrat de IspG, Figure 26) a été observé après surexpression de plusieurs gènes codant pour les enzymes de la voie MEP (DXS, IDI, CMS, et MCS). Cet efflux serait permis grâce à la présence d'une pompe impliquée dans la résistance à la fosmidomycine (un antibiotique, pompe fsr , UniProtKB - P52067) (Fujisaki *et al.*, 1996; Zhou *et al.*, 2012). En alignant la séquence protéique de cette pompe avec le génome de nos cyanobactéries d'intérêt (BlastP), on remarque qu'aucune protéine apparentée ne semble être codée par leur génome.

f. Régulation de FPPS par son produit

L'enzyme FPPS humaine est inhibée par une forte concentration en FPP (son produit (Park *et al.*, 2017)). Cependant, aucune étude n'a été réalisée chez les cyanobactéries.

5. Les terpènes synthases chez les plantes

Tous les terpènes ont les mêmes précurseurs, leur diversité provient par conséquent de la diversité des terpènes synthases. Ces enzymes multimériques, ayant une activité faible, catalysent la formation d'un carbocation très réactif. La terpène synthase agit ensuite comme une chaperonne en créant un environnement propice à la formation d'un terpène en particulier. Certaines terpène synthases peuvent produire plus de 50 terpènes différents (Jones *et al.*, 2011).

Je vais décrire la structure et l'activité catalytique d'une des sesquiterpènes synthases utilisée dans mon étude. Il s'agit de l'E-α-bisabolène synthase d'*Abies grandis*. J'ai choisi de détailler les caractéristiques de cette enzyme car des études ont été réalisées dessus.

a. Séquences générales des sesquiterpènes synthases

La séquence des sesquiterpènes synthases contient deux domaines très conservés qui constituent la signature du site actif de classe I. Le premier domaine est **DD**XX**D**. Une mutation du 1er et du dernier aspartate entraine une perte de l'activité (Little and Croteau, 2002; McAndrew *et al.*, 2011). De même, une mutation du premier aspartate du deuxième motif conservé **D**XX**T**XXX**E** entraine la perte de l'activité de la terpène synthase (McAndrew *et al.*, 2011).
Un autre site actif de classe II (motif DXDD) peut également être présent mais ce site actif est plutôt caractéristique des diterpènes synthase (Keeling *et al.*, 2008).

b. Exemple de la séquence de l'E-α-bisabolène synthase d'*Abies grandis*

L'E-α-bisabolene synthase d'*Abies grandis* est composée de 817 acides aminés formant différents domaines (Figure 32) :

- Le domaine a (en bleu) contient le site actif de classe I qui est caractérisé par la présence des motifs de liaison aux métaux **D$_{566}$D**MY**D** et **D$_{713}$**TK**T**YKA**E**. Ces motifs lient le Mg^{2+}, ce qui initie la cyclisation du FPP en bisabolène (Christianson, 2006) ;
- Le domaine b (en violet) est structurellement similaire aux glycosyl hydrolases. Un autre site actif de classe II est situé à l'interface des domaines b et g. Ce site actif est non fonctionnel car il ne contient pas le motif DXDD (mais DLET) ;
- Le domaine g (en rouge)

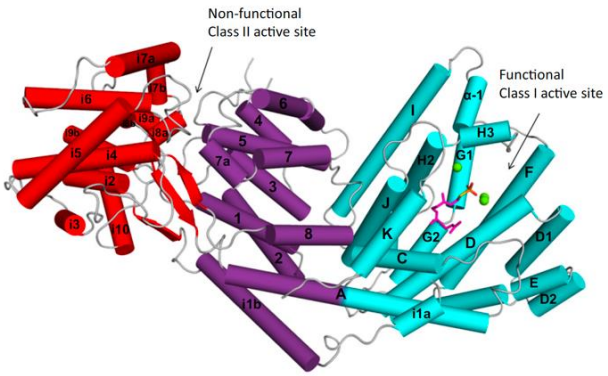


Figure 32 Structure de l'E-α-bisabolene synthase d'*Abies grandis*. Les structures hélicoïdales sont représentées sous forme de bâtonnets bleu pour le domaine a ; violet pour le domaine b et rouge pour le domaine g. Les ions Mg^{2+} et l'inhibiteur FSP sont représentés respectivement par des sphères vertes et des bâtonnets magenta. Extrait de (McAndrew *et al.*, 2011).

b. Mode d'action de l'α-bisabolène synthase de *Abies grandis*

En se basant sur la position de la chaine isoprenoïde dans la structure cristallisée de la bisabolène synthase en présence d'un inhibiteur (FPS Figure 33), McAndrew *et al*,. ont pu déterminer le mode d'action de cette enzyme : le FPP est cyclisé en bisabolène en passant par le bisabonyl, un cation intermédiaire (Figure 34 ; (McAndrew *et al.*, 2011)).

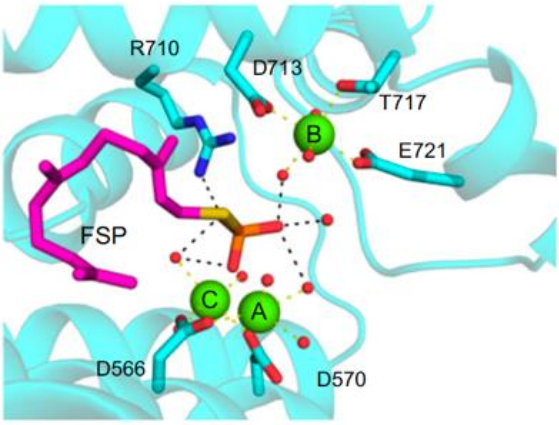


Figure 33 l'E-α-bisabolene synthase *d'Abies grandis* liée au farnesyl thiophosphate (FSP), un inhibiteur structurel proche du FPP. La coordination des métaux et les liaisons hydrogène sont représentées respectivement par des lignes pointillées jaunes et noires. Les ions Mg^{2+} sont représentés par des sphères vertes et les molécules d'eau par des sphères rouges. Extrait de (McAndrew *et al.*, 2011).

Tout d'abord, l'ionisation (dépendante du Mg^{2+}) du FPP entraîne la génération d'un diphosphate chargé négativement et d'un carbocation farnésylique. Le diphosphate ainsi créé est stabilisé par les ions Mg^{2+} et est éliminé du site actif. Le carbocation farnésyl est délocalisé et stabilisé par les carbonyles du squelette de I667, G668 (hélice Gl) et Q669 (hélice G2). Il se produit ensuite une attaque nucléophile créant une liaison entre les carbones C1 et C7 et entrainant le déplacement de la charge sur le carbone C8. Cela génère le cation bisabolyl avec une charge positive sur le carbone C8. Les hydrogènes en C7, C9 et C10 sont alors plus acides ce qui permet l'élimination de l'hydrogène en C9 par l'E782 (hélice J). On obtient alors une molécule de bisabolène.

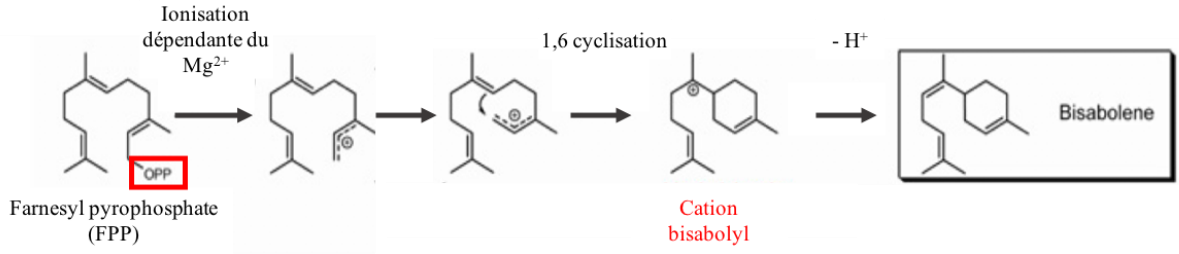


Figure 34 Cyclisation du FPP en bisabolène en passant par le bisabonyl, un cation intermédiaire. Extrait de (McAndrew *et al.*, 2011)

Chapitre 3 : La production de terpènes par les cyanobactéries

I. Intérêts des cyanobactéries en biotechnologies

Ces dernières années, les cyanobactéries ont attiré l'attention pour leurs capacités à produire de façon durable (photoproduction) diverses molécules d'intérêt à partir de ressources naturelles très abondantes (énergie solaire, eau, minéraux et dioxyde de carbone (Dittmann *et al.*, 2015; Savakis and Hellingwerf, 2015; Narainsamy *et al.*, 2016).

On parle ainsi d'usines cellulaires : « Cyanofactories » (Zhou *et al.*, 2016). Je vais dans un premier temps, donner les intérêts des cyanobactéries en biotechnologies puis je décrirai les différentes molécules pouvant être produites par les cyanobactéries et enfin je ferai l'état des lieux des travaux réalisés sur la production de terpènes.

1. Les cyanobactéries n'ont pas besoin de carbohydrates pour croître

La plupart des procédés de biotechnologies utilisent des micro-organismes hétérotrophes (*E. coli*, levures) capables de transformer des carbohydrates et substrats azotés en diverses molécules d'intérêt. Cependant, cette matière première (nutriments, sucres extraits de plantes sucrières ou de biomasses lignocellulosiques) a un cout monétaire et écologique important et entre en compétition avec l'alimentation humaine et animale.

L'utilisation des micro-organismes photosynthétiques, présente une alternative à ces procédés en réduisant les coûts de production et leur impact écologique. En effet, les cyanobactéries n'ont besoin que de lumière solaire, de dioxyde de carbone, de minéraux et d'eau (même polluée ou salée) pour croitre. L'énergie solaire est la ressource naturelle la plus disponible à la surface de la terre. Par exemple, le flux énergie solaire que reçoivent les États-Unis est égal à 23 000 térawatts par an. En comparaison, la quantité d'énergie utilisée par les États-Unis par an est égale à 3.16 térawatts (soit 7666 fois moins ; (Savage *et al.*, 2008)).

De plus, le dioxyde de carbone est un déchet physiologique ou issu des procédés industriels. Il est rejeté en grande quantité et a un impact très néfaste sur l'environnement. De ce fait, l'utilisation des cyanobactéries pour produire des biocarburants pourrait permettre de fermer le cycle du carbone : les cyanobactéries prélèvent du CO_2 dans l'atmosphère pour produire des carburants qui une fois brulés rejetteront du CO_2 dans l'atmosphère. Ainsi la quantité de CO_2 prélevée par les cyanobactéries est égale à celle rejetée lors de la combustion des carburants et donc ce procédé n'augmente pas la quantité de CO_2 dans l'atmosphère. Au contraire des ressources fossiles, où les hydrocarbures stockés dans la roche terrestre sont extraits et brulés, ajoutant du CO_2 dans l'atmosphère.

2. Les cyanobactéries convertissent de façon efficace l'énergie solaire

Les cyanobactéries convertissent l'énergie solaire en biomasse de façon bien plus efficace que les plantes terrestres (2-9% pour les cyanobactéries comparé à 0.25-3% pour les plantes (Dismukes *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2010a)). De plus, les cyanobactéries investissent moins d'énergie dans la production de biomasse (pas de racines ni de tiges) et plus de carbone peut donc être redirigé vers la production de molécules d'intérêt (Schuurmans *et al.*, 2015).

3. La culture des cyanobactéries ne rentre pas en compétition avec la production agro-alimentaire

La diversité naturelle des cyanobactéries leur permet de se développer dans de nombreux environnements, même ceux inhospitaliers pour l'agriculture (Habib *et al.*, 2008). Par conséquent, la production de molécules d'intérêt par des cyanobactéries ne rentre pas en compétition avec l'alimentation humaine ni pour les terres ni pour l'eau car certaines cyanobactéries peuvent pousser dans de l'eau saumâtre, de mer ou polluée (nitrate, Urée, etc..).

4. Les cyanobactéries sont génétiquement manipulables

Comme décrit précédemment, la génétique de souches modèles de cyanobactéries a été mise au point depuis de nombreuses années. Leur temps de génération « court » par rapport aux plantes et leur capacité à être transformée naturellement, couplés aux connaissances de plus en plus poussées sur leur métabolisme et au séquençage de leur génome (1769 en octobre 2020 selon la base de données NCBI), font des cyanobactéries, des micro-organismes intéressants pour la production de nombreuses molécules à haute valeur ajoutée.

5. Les molécules d'intérêt produites naturellement par les cyanobactéries

Les cyanobactéries synthétisent naturellement de nombreux composés ayant des propriétés pharmaceutiques intéressantes notamment des molécules antioxydantes, bactéricides, antivirales, fongicides, anticancéreuses, antituberculeuses, suppressives d'immunité et anti-inflammatoires (Xue *et al.*, 2018; Fidor *et al.*, 2019). De plus, certaines cyanobactéries sont radiorésistantes (Cassier-Chauvat *et al.*, 2016) et pourraient être utilisées pour la production de molécules marquées au Carbone 14 (^{14}C). Ces molécules marquées seraient ensuite injectées chez des petits mammifères afin d'étudier leurs rôles et leurs pharmacocinétiques (absorption, distribution, métabolisme et excrétion du principe actif et de ses métabolites (Videau *et al.*, 2016; Cassier-Chauvat *et al.*, 2017).

Par ailleurs, les différents pigments photosynthétiques (la phycocyanine et la phycoérythrine notamment) produits par les cyanobactéries, peuvent être utilisés comme marqueur en cytométrie en flux ou en microscopie confocale ; comme colorant alimentaire naturel ou comme pigment en cosmétique.

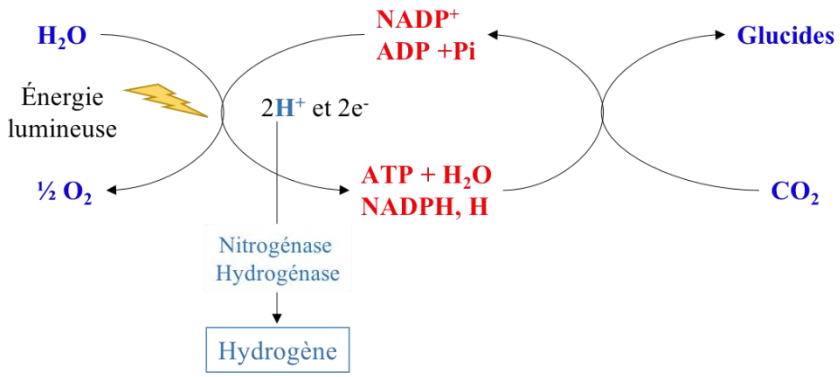
Elles synthétisent dans leur cytoplasme des PHBs sous forme de granules insolubles dans l'eau (Dittmann *et al.*, 2015). Ces granules peuvent facilement être récupérées afin de servir pour la production durable de bioplastique.

Les biofilms formés par les cyanobactéries ont également de nombreuses applications. Tout d'abord, ils modifient la flottabilité des cellules, facilitant ainsi leur récolte (Planchon *et al.*, 2013; Rossi and De Philippis, 2015). Ensuite, ils peuvent être utilisés pour la dépollution des eaux et des sites (aquatiques ou terrestres) pollués par du pétrole ou des métaux lourds (De Philippis *et al.*, 2011; Adapa *et al.*, 2016). Par exemple, il a été montré que plusieurs espèces de *Cyanothece* étaient capables d'adsorber de l'or, du cobalt, du chrome, du cuivre, du nickel, du palladium, du ruthenium et du zinc (Micheletti *et al.*, 2008; Colica *et al.*, 2010).

Enfin, les cyanobactéries produisent naturellement des molécules pouvant être utilisées comme biocarburants (hydrogène ou acides gras).

En plus de la production naturelle de molécules d'intérêt, elles peuvent être ingénierées pour la production d'alcool et de terpènes (Figure 35). Dans mon travail de Thèse, nous avons choisi de nous intéresser à la production de terpènes du fait de toutes leurs propriétés attractives énoncées dans le chapitre 1 de l'introduction.

Phase lumineuse photosynthèse



Fixation et devenir du CO_2

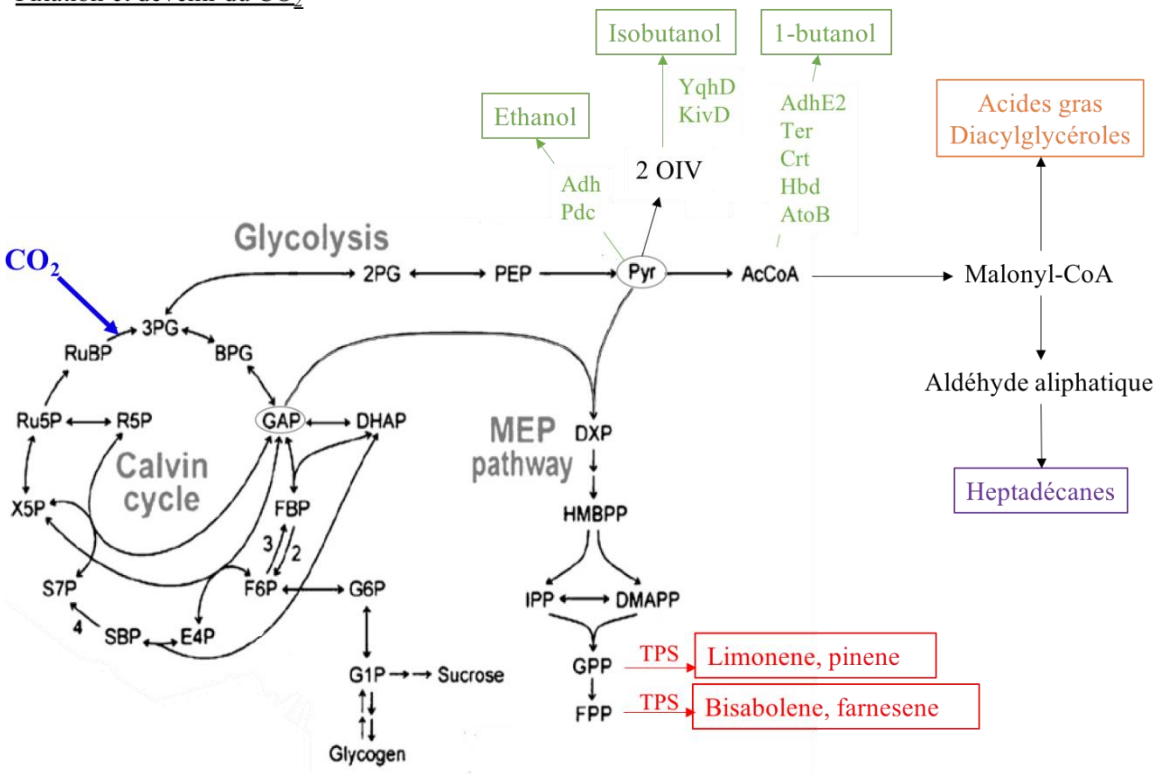


Figure 35 Voies de production des biocarburants chez les cyanobactéries, les flèches noires représentent les voies de synthèse naturelles alors que celles en couleur représentent les enzymes produites de façon hétérologue. Adaptée de (Rosgaard *et al.*, 2012)

II. La production de terpènes par les cyanobactéries

La production de terpènes chez les cyanobactéries est un sujet d'étude récent. Le premier article sur ce sujet date de 2010 (Lindberg *et al.*, 2010).
Depuis 2010, 26 articles ont démontré la possibilité de produire des terpènes chez plusieurs cyanobactéries (*Synechocystis* PCC 6803, *Synechococcus* PCC 7942, *Synechococcus* PCC 7002, *Anabaena* PCC 7120). Le tableau 8 donne les rendements en terpènes obtenus dans les différents travaux lorsque le gène codant pour une terpène synthase était exprimé. On remarque que les auteurs ont utilisé diverses stratégies :

- Le gène codant pour la terpène synthase est cloné et introduit dans un plasmide réplicatif ou dans le chromosome ;
- Les terpènes synthases proviennent de différentes espèces de plantes et sont souvent optimisées au biais de codon de la cyanobactérie châssis (annoté OBC dans le tableau) ;
- L'expression du gène codant pour les terpènes synthases peut être constitutive ou induite selon le promoteur choisi ;
- Le dodécane, une molécule hydrophobe, est souvent utilisé pour piéger les terpènes (molécules volatiles et peu solubles dans l'eau) et permettre de les quantifier par GC-MS. D'autres auteurs ont développé des systèmes utilisant des résines retenant les terpènes ou récupéré les molécules présentes dans l'espace supérieur du photobioréacteur (head space) ;
- Les manipulations ont été généralement effectuées dans des conditions « de laboratoire » c'est-à-dire en petits volumes (erlenmeyers). Cependant, certains auteurs ont réalisé des cultures en plus grand volume et/ou en utilisant des procédés permettant d'obtenir de forte biomasse ;
- La durée de mesure de production est souvent assez courte (moins de 7 jours) mais certains auteurs ont réalisé des études de production de longue durée (jusqu'à 1 mois) ;
- Les rendements de production peuvent être exprimés en mg/L, mg/nombre de cellules, mg/DO

Toutes ces variations dans la conduite des expériences (différents paramètres) rendent les résultats des diverses publications difficiles à comparer. Il est par conséquent compliqué de déterminer les paramètres importants pour une photoproduction efficace de terpènes. Je vais essayer dans la partie suivante de déterminer quels sont ces paramètres.

Les rendements obtenus en exprimant le gène codant pour la terpène synthase d'intérêt restent cependant très faibles et en deçà des rendements obtenus pour d'autres micro-organismes (*E. coli, S. cerevisae)*. Cela est notamment dû à des différences importantes de biomasse car comme nous le verrons dans la suite de ce manuscrit (Résultats Chapitre 2.I.5.), les rendements de production sont directement liés au nombre de cellules productrices.
C'est pourquoi des étapes d'ingénierie métabolique et génétique ont été réalisées ainsi que du génie des procédés.

Tableau 8. Tableau récapitulatif des différentes études de photoproduction de terpènes par les cyanobactéries. Ici les rendements obtenus sont ceux avec juste le gène codant pour une terpène synthase est exprimé. TPS = terpène synthase ; OBC = Optimisée au biais de codon de la cyanobactéries ; POBC = Pas optimisée au biais de codon de la cyanobactéries ; I = promoteur permettant l'expression induite du gène sous son contrôle ; C = promoteur permettant l'expression constitutive du gène sous son contrôle ; Ptrc = promoteur hybride fort induit par l'IPTG ; Ptrc1O = Ptrc avec un opérateur *lac* ; Pnir = promoteur constitutif régulant chez les cyanobactéries l'expression du gène codant pour la nitrate réductase ; PpsbA1 et PpsbA2 = promoteur fort induit par la lumière régulant chez les cyanobactéries l'expression du gène codant pour la protéine D1 du photosystème II ; PpetE = promoteur inductible au cuivre régulant chez les cyanobactéries la synthèse de la plastocyanine ; Ptic2op = promoteur induit par l'IPTG ; PrbcL = promoteur constitutif régulant chez les cyanobactéries l'expression u gène codant pour la grande sous-unité de la RubisCO ; Pcpc = promoteur constitutif régulant chez les cyanobactéries la synthèse de la phycocyanine ; Ptac-lac= promoteur fort induit par l'IPTG ; PnrsB = promoteur inductible au Nickel régulant l'activité de l'opéron nrsBACD (résistance au nickel) ; HDC = système de culture à forte densité cellulaire. ; DCW = poids sec ; pSHDY *= vecteur d'expression dérivant de pSHDY (RSF1010) avec une mutation (Y25F) dans le gène *mobA* ; A7120 = *Anabaena* PCC 7120 ; S6803 = *Synechocystis* PCC 6803 ; S7002 = *Synechococcus* PCC 7002 ; S7942 = *Synechococcus elongatus* PCC 7942.

Terpènes	**Souche**	**Synthase (espèce, OBC ou POBC)**	**Promoteur (I ou C)**	**Plasmide/site d'insertion**	**Culture**	**Piégeage terpènes**	**Rendement avec en présence de la TPS (temps)**	**Références**
Amorphadiène ($C_{15}H_{24}$)	S7942	Amorpha-4,11 diene synthase (*A.annua*, POBC)	Ptrc (I)	Site neutre II	Culture de 100 mL avec 5% de CO_2	Hexadecane	Non indiqué	(Choi *et al.*, 2016)
α-farnésène ($C_{15}H_{24}$)	A7120	E-α-farnésène synthase (*Picea abies*, OBC)	Double promoteur Pnir (C) / PpsbA1 (I)	Plasmide pZR1188	Erlenmeyers	Résine	305,4 µg/L (15 j)	(Halfmann *et al.*, 2014a)
	S7942	E-α-farnésène synthase (*Picea abies* et *Malus domestica*, OBC)	Ptrc (I)	Site neutre II	Bouteille Duran avec bullage CO_2	Dodécane	Non quantifiable (7 j)	(Lee *et al.*, 2017)
(-) patchoulol ($C_{15}H_{26}O$)	S6803	patchoulol synthase (*Pogostemon cablin*, OBC)	PpetE (I)	Plasmide pSHDY*	Plaques 6 puits, multicultivateur ou HDC	Dodécane	De 1 à 96 mg/L selon le mode de culture (4 à 8 j)	(Dienst *et al.*, 2020)

(-)-α-bisabolol ($C_{15}H_{26}O$)	S6803	(−)-α-bisabolol synthase (*Matricaria recutita*, OBC)	PpetE (I)	Plasmide pSHDY*	Plaques 6 puits, multicultivateur ou HDC	Dodécane	De 0,59 à 17 mg/L selon le mode de culture (4 à 8 j)	(Dienst *et al.*, 2020)
E- α – Bisabolène ($C_{15}H_{24}$)	S6803	E-a-bisabolène synthase *(Abies grandis*, OBC)	PpetE (I)	Plasmide pSHDY*	Plaques 6 puits, multicultivateur ou HDC	Dodécane	12,5 à 179 mg/L selon le mode de culture (4 à 8 j)	(Dienst *et al.*, 2020)
	S6803	E-a-bisabolène synthase (*Abies grandis*, OBC)	Ptic2op (I)	Site neutre slr0168	Erlenmeyers	Dodécane	De 0,1 à 1,5 mg/L selon biais de codon (5 j)	(Sebesta and Peebles, 2019)
	S7002	E-a-bisabolène synthase (*Abies grandis*, OBC)	PcpcBA (C)	Site neutre (A0935 - A0936)	Erlenmeyers	Dodécane	De 0,5 à 0,7 mg/L selon clones (4 j)	(Davies *et al.*, 2014)
Limonène ($C_{10}H_{16}$)	S7002	4S-limonène synthase (*Mentha spicata*, OBC, sans peptide signal)	PcpcBA (C)	Site neutre (A0935 - A0936)	Erlenmeyers	Dodécane	4 mg/L (4 j)	(Davies *et al.*, 2014)
	A7120	Limonène synthase (*Picea sitchensis*, POBC)	Double promoteur Pnir (I) / PpsbA1 (I)	Plasmide pZR1188	Erlenmeyers	Résine	114 µg/L (14 j)	(Halfmann *et al.*, 2014b)
	S6803	Limonène synthase (*Mentha spicata* et *Citrus limon*, OBC, sans peptide signal)	Ptrc1O (C)	Site neutre NSP1 sur pCC5.2	Erlenmeyers	Dodécane	3 mg/L (LS MS) et 1,5 mg/L (LS CL) (7 j)	(Lin *et al.*, 2017)

	S6803	Limonène synthase (*Schizonepeta tenuifolia*, OBC, sans peptide signal)	Ptrc (I)	Site neutre slr203	Erlenmeyers	Piégeage à froid en utilisant de l'octane	250 µg/L (7 j)	(Kiyota *et al.*, 2014)
	S7942	4S-limonène synthase (*Mentha spicata*, OBC, sans peptide signal)	Ptrc (I)	Site neutre I	Bouteille 1L avec 5% CO_2	Polymère absorbant HayeSep	8.5 µg/L/OD/d	(Wang *et al.*, 2016)
(+)-α-pinène ($C_{10}H_{16}$)	S6803	(+)-α-pinene synthase (*Pinus taeda*, OBC, sans peptide signal)	Ptrc (I)	slr2031	Bouteille avec 1% (v/v) CO_2	Piégeage à froid en utilisant de l'octane	40 µg/L (7 j)	(Tashiro *et al.*, 2016)
Linalool ($C_{10}H_{18}O$)	*Anabaena sp.*	Linalool synthase (*Lavandula angustifolia, Mentha citrata, Clarkia breweri*)	Pnir (I) / PsbA (I)	Plasmide pZR1188	Erlenmeyers puis tranfert dans des tubes fermés	Echantillonage dans le headspace		(Zhou and Gibbons, 2012)
Isoprène (C_5H_8)	S6803	Isoprene synthase (*Pueraria montana*, OBC, sans peptide signal)	Ptrc (I)	Plasmide pPMQAK1	Erlenmeyers puis tranfert dans des tubes fermés	Echantillonage dans le headspace	23 µg/ g DCW	(Englund *et al.*, 2018)
	S6803	Isoprene synthase (*Pueraria montana*, OBC, sans peptide signal)	PrbcL (C), Ptac-lac (I)	Plasmide pVZ325	Flasques Schott	Echantillonage dans le headspace	De 0,25 à 1,16 ng/mL/h/OD750 selon le promoteur	(Pade *et al.*, 2016)

	S6803	Isoprene synthase (*Pueraria montana*, OBC, sans peptide signal)	PpsbA2 (I)	Site neutre slr0168	Photobioréacteur de 1 L avec bullage CO_2	Echantillonage dans le headspace	140 µg/L (8 j)	(Bentley *et al.*, 2014)
	S6803	Isoprene synthase (*Pueraria montana*, OBC, sans peptide signal)	PpsbA2 (I)	Site de psbA2	Photobioréacteur de 1 L avec bullage CO_2	Echantillonage dans le headspace	125 µg/L (4 j)	(Chaves *et al.*, 2014)
	S7942	Isoprene synthase (*Eucalyptus globulus, Populus alba, Populus trichocarpa, Populus deltoids, Populus canescens* et *Pueraria montana*, POBC ou OBC)	Ptrc (I) Pcpc (C) PspbA2 (I)	Site neutre II	Erlenmeyers	Echantillonage dans le headspace	De 0,02 à 7,7 mg/L selon promoteur et la TPS (3 j)	(Gao *et al.*, 2016)
	S6803	Isoprene synthase (*Pueraria montana*, POBC ou OBC)	PpsbA2 (I)	Site de psbA2	Non décrit	Echantillonage dans le headspace	Non quantifié	(Lindberg *et al.*, 2010)
β – caryophyllène ($C_{15}H_{24}$)	S6803	β -Caryophyllene synthase (QHS1) (*Artemisia annua*, POBC)	PpsbA2 (I)	Site de psbA2	Non décrit	Séparation basée sur un mélange chloroforme: méthanol	46,4 ng/ mL culture/semaine	(Reinsvold *et al.*, 2011)
β – phellandrene ($C_{10}H_{16}$)	S6803	Fusion cpcB avec β -phellandrène synthase (*Lavandula angustifolia*, OBC)	Pcpc	Site de cpc (délétion ou non de cpcB et cpcA)	Photobioreacteur de 1 L	Echantillonage dans le headspace et extraction dans l'hexane	Analyse qualitative par UV puis GC-FID	(Formighieri and Melis, 2015)

	S6803	β-phellandrene synthase (*Lavandula angustifolia*, OBC)	PpsbA2 (I) promoter Ptrc-lacO1 (I) Pcpc (C)	Site de psbA2 Site de cpc	Erlenmeyers et photobioreacteur de 1 L	Héxane	De 11 à 259 µg/g DCW selon site insertion (2 j)	(Formighieri and Melis, 2014b)
	S6803	β -phellandrène synthase (*Lavandula angustifolia*, OBC)	Pcpc	Site de cpc Fusion ou non avec cpcB	Photobioreacteur de 1 L	Echantillonage dans le headspace et extraction dans l'hexane	De 0,33 à 0,5 µg/g DCW si pas fusion et de 4,47 à 5,96 mg/ g DCW si fusion	(Formighieri and Melis, 2016)
	S6803	β-phellandrene synthase (*Lavandula angustifolia*, OBC, sans peptide signal)	Non indiqué	Site de psbA2	Photobioreacteur de 1 L	Echantillonage dans le headspace	0,2 mg/L culture (8 j)	(Bentley *et al.*, 2013)
	S6803	Fusion cpcB avec β-phellandrene synthase (*Abies grandis, Lavandula angustifolia, Solanum lycopersicum, banksiana, Picea sitchensis*, OBC sans peptide signal*)* neryl-diphosphate synthase (*Solanum lycopersicum*, , OBC sans peptide signal)	Pcpc	Site de cpc	Photobioreacteur de 1 L	Echantillonage dans le headspace	De 0,31 à 0,76 mg/g poids sec Analyse qualitative par UV puis GC-FID	(Formighieri and Melis, 2018)

13R Manoyl Oxyde ($C_{20}H_{34}O$)	S6803	Diterpene synthase TPS2 et TPS3 (*C. forskohlii*)	PpsbA2 (I) PnrsB (I)	Site de psbA2 Site neutre slr0168 Site de sqs	Erlenmeyers	10% KOH dans le méthanol puis héxane	De 0,1 à 0,24 mg/g poids sec selon site d'insertion (4 j)	(Englund *et al.*, 2015)
Squalène ($C_{30}H_{50}$)	S6803	Squalene synthase *(B. braunii*, OBC, sans signal peptide)	PnrsB (I)	Site de la squalène synthase endogène	Erlenmeyers et photobioreacteur	Heptane et acetonitrile	5,2 mg/L (8j)	(Pattanaik *et al.*, 2020)
Squalène	S7942	Squalene synthase tronquée (*S. cerevisiae*, POBC)	Ptrc (I)	Site neutre II	Culture de 100 mL avec 5% de CO_2	Hexadecane	0.0001 mg/L/OD730	(Choi *et al.*, 2016)

III. Les stratégies utilisées pour augmenter la production de terpènes

Dans un premier temps, je décrirai brièvement les outils génétiques dont nous disposons pour produire puis améliorer la production de terpènes par les cyanobactéries ; ensuite je développerai les stratégies mises en place.

1. Les outils génétiques

Les avancées de la biologie de synthèse mettent à notre disposition de nombreux outils permettant d'exprimer de façon efficace un ou des gène(s) hétérologue(s), de modifier l'expression d'un gène endogène (surexpression ou inactivation) mais également d'évaluer (analyses transcriptomiques, métabolomiques, protéomiques) l'effet de ces modifications sur les cyanobactéries et d'identifier de nouvelles voies potentielles d'amélioration de la production.

a. Système d'expression d'un gène hétérologue

On peut exprimer un gène hétérologue dans les cyanobactéries de diverses manières. Il peut :

- soit être inséré dans le chromosome ou un plasmide indigène (naturellement présent) dans un site neutre déjà identifié ;
- soit être exprimé à partir d'un plasmide navette (souvent à large spectre d'hôte) qui se répliquera de façon autonome dans la cyanobactérie. Ce plasmide peut avoir le même nombre de copies que le chromosome de la cyanobactérie. C'est par exemple, le cas du plasmide RSF1010 qui a le même nombre de copie, chez *Synechocystis* PCC 6803, que le chromosome de la souche (environ 20). Cependant certains auteurs utilisent des plasmides à grand nombre de copies (pZR1188, replicon pDU1 (Schmetterer and Wolk, 1988; Wolk *et al.*, 1988; Halfmann *et al.*, 2014a) par exemple).

Jusqu'à présent, dans la très grande majorité des publications présentant la production de terpènes, les gènes codant pour les terpènes synthases ou les enzymes de la voie MEP sont insérés au niveau de sites neutres du chromosome. Le site d'insertion est très important : dans leur étude, Formighieri et Melis ont multiplié par 21 la production de β-phéllandrène en insérant la terpène synthase au niveau du site *cpc* (synthèse de la phycocyanine) plutôt qu'au niveau du site de *psbA2* (synthèse de la protéine D1 du photosystème II, (Formighieri and Melis, 2014b)).

Le tableau 9 ci-dessous résume les avantages et inconvénients de chacune des techniques.

Tableau 9 Avantages et inconvénients des différents systèmes d'expression

	Plasmide hétérologue	Chromosome	Plasmide endogène
Avantages	Peut avoir un plus grand nombre de copies ; Utilisable dans de nombreuses souche de cyanobactéries (Marraccini *et al.*, 1993; Mermet-Bouvier *et al.*, 1993) ; Une même construction (plasmide) peut être introduite dans plusieurs cyanobactéries	Plus stable ; Si le mutant est ségrégé alors pas toujours besoin de maintenir la pression de sélection	Plus de copie que le chromosome (Xu *et al.*, 2011) ; Si le mutant est ségrégé alors pas toujours besoin de maintenir la pression de sélection
Inconvénients	Conservation de la pression de sélection	Besoin de connaitre les sites neutres qui sont difficiles à identifier ; Une construction par souche de cyanobactéries ; Étape de ségrégation	Fonction peu connue ; Souvent de petite taille donc difficile d'insérer de longues séquences ; Besoin de connaitre les sites neutres ; Une construction par souche de cyanobactéries ; Étape de ségrégation

b. Choix et optimisation des promoteurs et RBS

Le choix des promoteurs et RBS est important pour maximiser l'expression des gènes d'intérêt. Cependant, parfois une transcription et traduction plus modérées permettent d'obtenir *in fine*, une plus grande quantité de protéine hétérologue. Le promoteur et le RBS utilisés doivent donc être choisis précautionneusement en fonction du gène à exprimer et du châssis dans lequel on veut l'exprimer. Il est important de noter que plusieurs séquences promotrices typiques de *E. coli* ne fonctionnent pas chez les cyanobactéries (P_{lac}, P_{tet} (Huang *et al.*, 2010)) alors que d'autres sont très efficaces ($p_{R,}$ p_{tac} (Marraccini *et al.*, 1993; Mermet-Bouvier and Chauvat, 1994)).

i. Les différents promoteurs utilisés pour l'expression de gènes chez les cyanobactéries

Les promoteurs utilisés sont souvent des promoteurs natifs/endogènes qui contrôlent les gènes impliqués de la photosynthèse (PpsaA, PpsaD, PpsbA1, PpsbA2 et Pcpc) ou dans la fixation du CO_2 (PrbcL, Pcmp, Psbt). Cependant des promoteurs d'*E. coli* ou de phages ($P_{tac,}$ $P_{R,}$ P_{trc}) sont également utilisés. Ces divers promoteurs permettent soit une expression constitutive ou soit régulée des gènes d'intérêt.

Les promoteurs permettant une expression régulée sont particulièrement intéressants si la protéine à produire est toxique ou bien si on veut découpler dans le temps, formation de biomasse et production d'une molécule d'intérêt. Cependant, il est important de prendre en considération les points suivants (Berla *et al.*, 2013).

- L’expression du gène contrôlé par le promoteur doit être nulle en absence d’inducteur ;
- L’induction de la transcription à une certaine concentration en inducteur doit pouvoir être prédite avec certitude (soit réponse « on off » soit réponse graduelle).
- L’inducteur ne doit pas avoir d’effet néfaste sur la croissance de la cyanobactérie à la concentration utilisée et ne doit pas agir sur d’autres promoteurs endogènes.
- L’inducteur doit être à un prix abordable et stable dans les conditions de culture de la cyanobactérie.

Plusieurs promoteurs induits par la lumière (PpsbA2) ou des métaux (tels que PnrsB, un promoteur natif inductible au nickel ou PpetE, un promoteur inductible au cuivre) ont été utilisés chez les cyanobactéries (Englund *et al.*, 2016). L’utilisation de promoteur induit par des métaux toxiques pose des problèmes de pollution importants.

ii. Effet du promoteur choisi sur la production de terpènes et autres molécules d’intérêt

Les rendements en terpènes ont été significativement améliorés en utilisant des promoteurs forts pour contrôler l’expression des gènes codant pour les terpènes synthases.

La production d’isoprène par *Synechocystis* PCC 6803 est passée de 0,25 (Ptac-lacI) à 1,16 (PrbcL) ng/mL/h/OD_{750nm} en changeant de promoteur (Pade *et al.*, 2016). De même, la production d’isoprène a été multipliée par 4 à 6,5 en remplaçant le promoteur PspbA2 par Pcpc ou par Ptrc pour l'expression du gène codant pour l’isoprène synthase de *Populus alba,* de *Pueraria montana* et de *Populus canescens*. De même, l'utilisation des promoteurs Pcpc ou Ptrc a permis de multiplier par 13 ou 22 la production d’isoprène par rapport à l'expression du gène codant pour l’isoprène synthase de *Eucalyptus globulus* à partir du promoteur PspbA2 (Gao *et al.*, 2016). Enfin la production de β-phéllandrène par *Synechocystis* PCC 6803 a été 21 fois plus importante lorsque le promoteur Ptrc et la région 5′UTR provenant du gène 10 (gène très exprimé) du bactériophage T7 ont été ajoutés pour amplifier l’expression du gène codant pour la β-phéllandrène synthase (Formighieri and Melis, 2014b).

L’augmentation de la production d’une molécule d’intérêt en changeant le promoteur du gène permettant la synthèse de cette molécule est une stratégie qui s’est également avérée payante pour la production de butanol chez *Synechococcus* PCC 7942 (Liu *et al.*, 2019).

iii. Optimisation des RBS (site de liaison de ribosome) et production de terpènes et autres molécules d’intérêt

Par ailleurs, l’optimisation des RBS permet également d’augmenter la production de molécule d’intérêt chez les cyanobactéries (Englund *et al.*, 2016) mais de façon moins importante. Cette stratégie a permis d’augmenter par 1,8 la production de 2-3 butanediol chez *Synechococcus* PCC 7942 (Oliver *et al.*, 2013), par 4 la production de limonène par cette même souche (Wang *et al.*, 2016). Par ailleurs, un article récent a démontré l’importance de l’optimisation du RBS pour la production de bisabolène par *Synechocystis* PCC 6803. Les auteurs ont regardé la

production de bisabolène en fonction (i) du biais de codon utilisé pour optimiser la terpène synthase et (ii) du RBS utilisé. Les rendements obtenus variaient de 0,4 mg/L à 7,9 mg/L cependant d'après les résultats présentés dans la publication, il est difficile de différencier l'impact du biais de codon de celui RBS (Sebesta and Peebles, 2019).

L'optimisation du RBS améliore l'expression des gènes d'intéret et doit être réalisée pour chaque gène à (sur)exprimer. Par exemple, le rendement en acétoine a été augmenté d'un facteur 4 en optimisant les RBS pour chacune des protéines ALS et ALDC et le rendement en 2,3-butanediol a été augmenté d'un facteur 2 en utilisant la même stratégie (Oliver *et al.*, 2014).

c. Étude du transcriptome

Les analyses transcriptomiques permettent de se renseigner sur l'effet des modifications génétiques et de trouver des enzymes limitantes (Pade *et al.*, 2016). Bien qu'aucune différence de croissance et de pigmentation des cellules n'ait été observée, les analyses transcriptomiques ont montré : une surexpression des gènes codant pour le système ubiquitine, pour la protéase HtrA, pour la protéine de réponse au choc thermique HspA et pour plusieurs transposases. La transcription des gènes du métabolisme primaire est majoritairement peu affectée mais on remarque tout de même une répression des gènes de la glycolyse et de la voie des pentoses phosphates oxydative, comme ceux codant pour : la phosphoglycerate kinase (*pgk*, slr0394), la phosphoglycerate mutase (*yibO*, slr1945), la transketolase (*tktA*, sll1070) et la phosphoribulokinase (*prk*, sll1525). De plus, il semblerait que la production de terpène modifie la production d'énergie par la cellule (sous-régulation de l'ATP synthase) et ses besoins en cuivre, en phosphate et en soufre (Pade *et al.*, 2016).

d. Étude du protéome

Les analyses protéomiques permettent d'identifier l'impact de l'ingénierie métabolique sur la cellule et d'identifier des mécanismes de régulation (post-transcriptionnelle, traductionnelle et post-traductionnelle) notamment par comparaison avec le transcriptome. Par exemple, s'il y de nombreux ARNm mais que très peu de protéines synthétisées à partir de ces ARNm, on peut supposer l'existence de mécanisme de maturation, ou de mauvais repliement de la protéine.

Un phosphoprotéome réalisé chez *Synechococcus* PCC 7002 a permis d'identifier deux protéines de la voie MEP (IspH et IDI) régulées de façon post-traductionnelle par des mécanismes de phosphorylation (Yang *et al.*, 2013). Une étude de protéomique réalisée chez *Synechocystis* PCC 6803 a également permis d'identifier de nombreuses protéines (dont IspD) modifiées de façon post-traductionnelle par glutathionylation (liaison d'une molécule de glutathion à un résidu cystéine). La glutathionylation est un mécanisme crucial pour la régulation de la fonction des protéines et la transduction de signal (Chardonnet *et al.*, 2015).

En utilisant les connaissances ainsi acquises et des techniques d'ingénierie des protéines, il est envisageable de modifier la séquence de ces protéines afin qu'elles ne soient plus soumises à ces régulations et soient toujours sous leur forme active.

e. Ingénierie des protéines

L'ingénierie des protéines permet non seulement d'améliorer l'activité catalytique/la spécificité d'une enzyme (Tashiro *et al.*, 2016), mais également de jouer sur les mécanismes de régulation (phosphorylation, glutathionylation, boucle de régulation) qui en contrôlent l'activité et enfin de rapprocher spatialement des protéines de la même voie métabolique (Albertsen *et al.*, 2011; Sarria *et al.*, 2014; Gao *et al.*, 2016). Des exemples seront donnés dans la suite de mon manuscrit.

f. Métabolomique

La métabolomique permet d'analyser les effets des modifications génétiques effectuées chez les cyanobactéries et d'identifier les intermédiaires métaboliques qui s'accumulent et peuvent être toxiques pour la cellule (Jazmin *et al.*, 2017; Fathima *et al.*, 2018; Cheah *et al.*, 2020). La quantité d'IPP, de DMAPP et des autres intermédiaires de la voie MEP est très faible dans la cellule et les techniques d'analyses métabolomiques non ciblées ne permettent pas de les quantifier (Pade *et al.*, 2016). C'est pourquoi des méthodes ont été développées afin de regarder spécifiquement les métabolites contenant des groupements phosphate et ainsi quantifier les intermédiaires de la voie MEP (Zhou *et al.*, 2012).

Des auteurs ont comparé le métabolome de *Synechocystis* PCC 6803 sauvage et de trois mutants producteurs d'isoprène (une copie du gène codant l'isoprène synthase (*ispS*) sous le contrôle du promoteur PrbcL ; deux copies de *ispS*, une sous le contrôle du promoteur PrbcL et une sous le contrôle du promoteur Ptac-lacI ou deux copies d'*ispS*, une sous le contrôle du promoteur PrbcL et une sous le contrôle du promoteur PpsaA). Les auteurs ont remarqué que la souche n'ayant qu'une copie d'*ispS* produisait plus d'isoprène que les deux autres. L'analyse métabolomique a révélé que le métabolisme central de cette souche et le ratio C/N n'étaient que peu affectés par la production d'isoprène alors que ce n'était pas le cas pour les deux souches possédant deux copies d'*ispS*. La souche ne possédant qu'une copie d'*ispS* compense la redirection d'une partie du carbone vers la production d'isoprène en réduisant son pool de glycerate-3-phosphate, de glycerate-2-phosphate et de PEP. Le métabolisme de l'azote (glutamine, glutamate, 2-oxoglutarate) n'est pas affecté par la production de terpènes car la souche peut stocker de l'azote sous forme d'acides aminés azotés afin de rétablir le ratio C/N (Pade *et al.*, 2016).

h. La modélisation

Au fur et à mesure que de nouvelles analyses "omics" ou des cribles viennent apporter des informations sur le métabolisme des cyanobactéries et les effets des modifications de ce métabolisme, ces résultats sont compilés afin d'améliorer les prédictions des outils de modélisation. Ces modélisations peuvent permettre d'identifier de nouvelles « cibles » (gène à inactiver ou à surexprimer afin d'améliorer la synthèse des terpènes). Ces gènes peuvent être distants de la voie MEP, ils peuvent être impliqués dans le métabolisme du carbone ou dans la synthèse des cofacteurs ; ils peuvent également faire partie des voies compétitrices (Alper *et al.*, 2005a, 2005b; Jin and Stephanopoulos, 2007; Asadollahi *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2013;

Lin *et al.*, 2017; Englund *et al.*, 2018). Ces modélisations ont, par exemple, permis d'identifier deux enzymes de la voie des pentoses phosphates (Rpe et Rpi) comme des cibles potentielles pour améliorer la production de terpènes (Lin *et al.*, 2017) comme cela sera décrit plus tard dans ce manuscrit.

2. Choix du châssis

Bien qu'il soit maintenant connu que le choix du châssis est important pour une production forte et stable de molécules d'intérêt, les études portant sur la production de terpènes par les cyanobactéries se sont toujours concentrées sur les cyanobactéries modèles unicellulaires (surtout *Synechocystis* PCC 6803 ou *Synechococcus* PCC 7942) ou pluricellulaires (*Anabaena* PCC 7120). Aucune étude comparative portant sur la production d'un ou de plusieurs terpènes par plusieurs souches de cyanobactérie n'a été publiée à ce jour.

Au regard des études réalisées, il semblerait que :

- *Synechocystis* PCC 6803 produise plus d'E-α-bisabolène (12,5 mg/L en 4 jours dans des plaques 6 puits) que *Synechococcus* PCC 7002 (0,7 mg/L en 4 jours en erlenmeyers). Dans ces deux études sont basées sur l'expression du gène codant pour l'E- α -bisabolène synthase d'*Abies grandis* a été utilisé, cependant, dans le cas de l'étude réalisée sur *Synechocystis* PCC 6803, ce gène était cloné dans un plasmide dérivant du RSF1010 sous le contrôle du promoteur PpetE alors que l'étude réalisée sur *Synechococcus* PCC 7002, le gène était intégré dans le chromosome au site neutre (A0935 - A0936) sous le contrôle du promoteur Pcpc. Il est par conséquent délicat de comparer les résultats de production obtenus (Davies *et al.*, 2014; Dienst *et al.*, 2020).

- *Anabaena* PCC 7120 et *Synechococcus* PCC 7942 ne sont pas des bon châssis pour la production de limonène (114 µg/L après 14 jours de culture (Halfmann *et al.*, 2014b) et 8,5 µg/L/OD/jours (Wang *et al.*, 2016) respectivement) alors que *Synechococcus* PCC 7002 et *Synechocystis* PCC 6803 semblent être de meilleurs châssis (4 mg/L en 4 jours (Davies *et al.*, 2014) et 3 mg/L en 7 jours (Lin *et al.*, 2017) respectivement). Cependant, les systèmes d'expression des gènes codant pour les terpènes synthases et les modes opératoires diffèrent entre ces études qui sont donc difficilement comparables.

- *Synechococcus* PCC 7942 semble être un meilleur châssis pour la production d'isoprène que *Synechocystis* PCC 6803 (7,7 mg/L en 3 jours vs 1,16 ng/mL/h/OD_{750nm} = 83,5 µg/L/OD_{750nm} en 3 jours).

Ces comparaisons semblent indiquer qu'une souche peut être un bon châssis pour la production d'un terpène donné et un mauvais châssis pour la production d'un autre. Pour l'instant, il est donc impossible de prédire quel sera le meilleur châssis pour la production d'une molécule carbonée donnée.

3. Choix et optimisation des terpènes synthases

Les cyanobactéries synthétisent les précurseurs des terpènes, cependant elles ne possèdent pas les enzymes codant pour les terpènes synthases d'intérêt (la bisabolène, la farnesène, la pinène, la limonène et la santalène synthases). Ces enzymes sont codées dans le génome de nombreuses plantes, il est donc possible de récupérer leurs séquences pour les produire de façon hétérologue chez les cyanobactéries.
Les terpènes synthases ont souvent une faible efficacité catalytique et peu d'affinité pour le GPP, le FPP et le GGPP (de l'ordre du µM). Il faut donc une forte concentration en précurseurs pour que la réaction ait lieu. De plus, elles produisent bien souvent plusieurs composés. La limonène synthase de la menthe (*Mentha piperita* et *Mentha spicata*) a une constante catalytique de 0,3 s^{-1} (Alonso *et al.*, 1992; Rajaonarivony *et al.*, 1992) et produit non seulement du 4S-limonène (94%) mais aussi du β-pinène (2%), du myrcène (1,9%) et de l'α-pinène (1,8%) (Colby *et al.*, 1993).

Par conséquent, le choix de la terpène synthase est crucial. L'enzyme choisie doit avoir une forte activité catalytique, une bonne solubilité lorsqu'elle est produite dans les divers châssis et une forte spécificité pour le produit désiré.

a. Comparaison des terpènes synthases de différentes espèces afin de sélectionner la plus adaptée

Le choix de la terpène synthase est la première grande étape dans la construction d'un châssis de surproduction de terpènes. Plusieurs études ont démontré l'impact direct de ce choix sur la production de terpènes. Lee *et al.*, ont montré que la production d'α-farnésène par *Synechococcus* PCC 7942 est supérieure (x 11,5) en utilisant la séquence de la farnésène synthase de *Malus domestica* plutôt que celle de *Picea abies* (Lee *et al.*, 2017).

Dans une autre étude, il a été démontré que la production d'isoprène par *Synechococcus* PCC 7942 était multipliée jusqu'à 27 fois en utilisant la séquence de l'isoprène synthase d'*Eucalyptus globulus* plutôt que celles de *P. montana, P. trichocarpa, P. canescens* ou de *P. alba* (Gao *et al.*, 2016). Enfin, la limonène synthase de *Mentha spicata* permet un rendement en limonène deux fois supérieur à celui de *Citrus limon* (Lin *et al.*, 2017).

Cependant, très peu de recherches ont été menées sur l'activité catalytique et la spécificité des différentes terpènes synthases (Tashiro *et al.*, 2016). De plus, le fait qu'une terpènes synthase ait une forte activité chez un micro-organisme ne veut pas dire qu'elle sera la meilleure chez un autre micro-organisme (d'autant plus quand on compare une activité chez un eucaryote à celle d'un procaryote). Les cribles décrits précédemment pourraient permettre de comparer de nombreuses terpènes synthase de diverses plantes mais la synthèse (gène synthétique) des gènes codant pour ces terpènes synthases est couteuse.

b. Modification de la séquence codante des terpènes synthases pour permettre leur expression dans des micro-organismes procaryotes.

i. Élimination du peptide signal et des introns

Chez les plantes, les monoterpènes synthases sont codées par le noyau, après leur synthèse elles transitent jusque dans le chloroplaste grâce à la présence d'un peptide signal.
De ce fait, pour obtenir une terpènes synthase active chez un procaryote, il faut enlever tous les introns (pour cela on utilise la séquence d'ADNc, c'est-à-dire la séquence du simple brin ADN obtenu à partir de l'ARNm) et le peptide de transit. Il faut également si possible choisir des enzymes qui ne nécessitent pas de régulations post-traductionnelles typiques des protéines eucaryotes si elles sont connues.

La détermination du site de clivage du peptide signal est une étape critique car cela peut avoir un effet significatif sur l'activité de l'enzyme. Plusieurs outils tels que SignalP ou ChloroP ont été mis au point afin d'identifier les sites probables de clivage (Emanuelsson *et al.*, 1999; Petersen *et al.*, 2011) ce qui permet de ne pas enlever des acides aminés qui seraient importants pour le bon fonctionnement de la protéine mature. L'effet de l'élimination du peptide signal de la limonène synthase de *Mentha spicata* a été présenté par (Williams *et al.*, 1998). Le peptide signal de cette enzyme est prédit comme étant consitués par les 48 premiers acides aminés et précédé deux résidus arginine (R58 R59) très conservés et très importants pour l'activité de la limonène synthase. Une protéine tronquée des 53 premiers acides aminés possède une meilleure constante catalytique (0,036 s^{-1}) et affinité (8,6 µM) pour le GPP par rapport à la pré-protéine (k_{cat} = 0,0 $2s^{-1}$ et K_m = 14,9 µM, données *in vitro).* En revanche, le clivage au niveau des deux arginines a produit une protéine n'ayant plus que 1% de son activité initiale (Williams *et al.*, 1998). Cela démontre l'importance de la localisation précise du peptide signal. Comme cela a été résumé dans le tableau 8, la majorité des études réalisées sur les cyanobactéries utilisent des monoterpènes synthases dont le peptide de transit a été enlevé.

ii. Optimisation du biais de codon

Dans la plupart des études, la séquence codante pour la terpène synthase est optimisée pour le biais de codon de la cyanobactérie châssis (annotée OBC dans le tableau 8) et il a été démontré que cela augmentait la quantité de la protéine correspondante et donc la production du terpène d'intérêt. Lindberg et collaborateurs ont montré que la production d'isoprène était multipliée par 10 lorsque la séquence codant pour l'isprène synthase était optimisée au biais de codon du châssis (*Synechocystis* PCC 6803 (Lindberg *et al.*, 2010)). Gao *et al.*, ont observé une incidence moins importante de l'optimisation du biais de codon sur la synthèse d'isoprène. L'augmentation de la production était de 0,88 à 2,5 selon l'isoprène synthase choisie (Gao *et al.*, 2016). Cependant, cela peut venir du logiciel utilisé pour l'optimisation. En effet, une étude récente a montré de grandes variations dans la production de bisabolène selon la séquence optimisée de la bisabolène synthase déterminée avec divers logiciels. Les rendements varient de 0,1 mg/L en exprimant le gène, codant pour la bisabolène synthase, optimisé par le logiciel EuGene HCR à 1,6 mg/L en utilisant le logiciel GenScript (Sebesta and Peebles, 2019).

iii. Optimisation des terpènes synthase

Il est possible de modifier l'activité catalytique (Yoshikuni *et al.*, 2006b) ou d'améliorer la stabilité, la spécificité des terpènes synthases par évolution dirigée ou par mutagénèse dirigée (en se servant des structures) et aléatoire (Yoshikuni *et al.*, 2008). Un algorithme permettant de « redésigner » les terpènes synthases et les enzymes de la voie MVA a été développé (Yoshikuni *et al.*, 2006a). Cependant, cela nécessite par la suite la mise en place d'un crible afin de déterminer rapidement les mutations intéressantes. A titre d'exemple, l'activité de l'isoprène synthase de *Populus alba* est fortement améliorée en augmentant sa solubilité par l'introduction d'une mutation L70R (Bott *et al.*, 2012). Une étude de mutagénèse aléatoire réasliée sur la pinène synthase de *Pinus taeda* a également permis de multiplier par plus de 2 la production de pinène chez *E. coli* (Tashiro *et al.*, 2016). L'expression du gène codant pour la pinène synthase muté a également amélioré la production de pinène par *Synechocystis* PCC 6803 mais les rendements obtenus restent tout de même très faibles (80 µg/L (Tashiro *et al.*, 2016)).

iv. Insertion de deux copies des gènes codant pour les terpènes synthases

Sachant que les terpènes synthases sont des enzymes à faible activité catalytique et donc limitante pour la production de terpènes, intuitivement, il est intéressant d'exprimer deux copies du gène codant pour la terpène synthase. Cela a été réalisée dans le cadre de la production d'isoprène chez *Synechocystis* PCC 6803 et les auteurs ont démontré, par une analyse transcriptomique et métabolomique (décrite précédemment), que l'expression de deux copies du gène *ispS* codant pour l'isoprène synthase perturbait fortement le métabolisme de la cellule bien que sa croissance ne soit pas impactée. Le mutant n'ayant qu'une copie d'*ispS* produisait une quantité plus importante de ce terpène (Pade *et al.*, 2016). Cela reste cependant à tester avec d'autres terpènes synthases car on ne connait pas leur efficacité catalytique.

4. Ingénierie de la voie MEP

a. La voie du MVA et du MEP

La voie MVA convertit 3 GAP + 3 ADP + 4 $NAD(P)^+$ en IPP/DMAPP + 4 CO_2+ 3 ATP + 4NAD(P)H.
La voie MEP convertit 2 GAP + ADP + CTP en IPP/DMAPP + CO2 + ATP + CMP.

La voie MVA est plus efficace pour la régénération de l'énergie car trois molécules d'ATP sont produites par cette voie alors qu'une seule l'est par la voie MEP. La voie MEP est donc déficiente en énergie et ne permet pas la régénération de pouvoir réducteur (Dugar and Stephanopoulos, 2011). Cependant, la voie MEP utilise le carbone de façon plus efficace car 83% du carbone est transformé en IPP/DMAPP par cette voie alors que c'est seulement 56% pour la voie MVA (Dugar and Stephanopoulos, 2011).

Par ailleurs, les résultats de production de terpènes obtenus après expression des gènes de la voie MVA chez les cyanobactéries sont bien inférieurs à ceux obtenus chez d'autres micro-organismes. Par exemple, la production de patchoulol par *Rhodobacter* a été multipliée par 26 (Troost *et al.*, 2019) alors que la production d'isoprène par *Synechocystis* PCC 6803 a été multipliée seulement par 2,3 (Bentley *et al.*, 2014) et la production de β-phellandrène par cette même souche par 1,9 (Formighieri and Melis, 2016). Cela n'est pas très étonnant car la quantité d'acétyl-CoA dans les cyanobactéries est inférieure à celle de pyruvate et de G3P (Tableau 10). Par conséquent, la voie MEP est à privilégier chez les cyanobactéries.

Tableau 10 Concentration en acétyl-CoA, pyruvate, G3P et IPP/DMAPP pour les souches de cyanobactéries unicellulaires modèles et pour *E.* coli. Les données proviennent de (Lan and Liao, 2012; Dempo *et al.*, 2014; Gao *et al.*, 2016). DCW = poids sec

	Acétyl-CoA	Pyruvate	G3P	IPP/DMAPP
Synechocystis PCC 6803	0,44 µM / DCW	10,5 µM / DCW	0,26 µM / DCW	0,014 µM / DCW
Synechococcus PCC 7002	0,062 µM / DCW	18 µM / DCW	0,56 µM / DCW	0,0096 µM / DCW
Synechococcus PCC 7942	0,065 µM / DCW 53 µM	5,8 µM / DCW 1851 µM	0,19 µM / DCW 51 µM	0,016 µM / DCW
E. coli	1064 µM	164 µM	10 µM	

b. Surexpression des gènes endogènes ou expression de gènes hétérologues codant pour les enzymes de la voie MEP

Dans la nature, les plantes et autres organismes produisant de grandes quantités de terpènes ont généralement, dans leur génome, plusieurs copies des gènes codant pour les enzymes de la voie MEP. Par exemple, l'enzyme DXS présente de nombreuses isoformes chez les plantes et certains micro-organismes : 5 chez *Populus trichocarpa* (Tuskan *et al.*, 2006) ou 3 chez *Botryococcus braunii* (Matsushima *et al.*, 2012).

Les cyanobactéries ne possèdent qu'un gène codant pour chacune de ces enzymes. Par conséquent, surexprimer certains gènes endogènes de la voie MEP ou exprimer ces mêmes gènes mais provenant d'organismes différents semblent être une cible intéressante pour augmenter la production de terpènes si les substrats des terpènes synthases sont limitants en quantité. Cependant, cela doit être fait avec précaution afin de ne pas créer de nouveaux « goulots d'étranglement » qui mèneraient à l'accumulation d'intermédiaires toxiques (Kim and Keasling, 2001; Martin *et al.*, 2003; Yoon *et al.*, 2006; Rodríguez-Villalón *et al.*, 2008; Ajikumar *et al.*, 2010).

Plusieurs enzymes de la voie MEP ont été identifiées par (Yuan *et al.*, 2006) comme étant limitantes chez *E. coli*. Il s'agit de DXS, IDI, IspD et IspF. Cependant, la voie MEP étant peu

utilisée par *E. coli* (Ajikumar *et al.*, 2008), il est difficile de faire la correspondance avec les enzymes limitantes chez les cyanobactéries.

i. DXS

DXS est l'enzyme régulant le flux entrant dans la voie MEP. C'est une enzyme limitante qui peut être surproduite afin d'augmenter la production de terpènes. Cependant, cette enzyme a tendance à s'agréger quand on la surproduit. Par exemple, la protéine endogène de *Synechocystis* PCC 6803 ou celle d'*E. coli* s'agrègent quand elles sont produites en trop forte quantité chez *Synechocystis* PCC 6803. Des auteurs ont observé une multiplication par 4 du niveau d'ARNm codant pour la DXS de *Synechocystis* PCC 6803 mais seulement par 1,5 celui de protéine DXS soluble (Kudoh *et al.*, 2017a). Le ratio de protéine DXS soluble/insoluble était très faible. Il est possible que cette enzyme subisse des modifications post-traductionnelles qui la stabilise et lui permettent de se replier dans sa conformation mature.

Les auteurs ont ensuite exprimé indépendamment 11 gènes codant pour les enzymes DXS de 9 espèces différentes chez *Synechocystis* PCC 6803. Leurs résultats (Kudoh *et al.*, 2017b) leur ont permis de conclure que :

- La protéine avec la plus grande solubilité mais aussi la moins stable était celle de *Paracoccus aminophilus*
- La protéine de *Rhodobacter capsulatus* possède la plus grande activité mais est la plus sensible à l'inhibition par l'IPP et le DMAPP.
- La protéine DXS de *Bacillus* a la plus grande tolérance aux protéases.
- L'activité de DXS de *Populus trichocarpa* est fortement régulée par la quantité d'IPP et de DMAPP.

Une étude, réalisée sur *Synechocystis* PCC 6803, vient modérer l'influence de la DXS choisie sur les rendements en terpènes. En effet, les enzymes DXS de *Synechocystis* PCC 6803, *E. coli*, *Botryococcus braunii*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Deinococcus radiodurans* et *Coleus forskohlii* ont été (sur)produites et les rendements en isoprène variaient selon l'espèce d'un facteur 1,5 au maximum. : 54 µg/L (DXS d'*Agrobacterium tumefaciens*) à 83 µg/L (DXS de *E. coli*) (Englund *et al.*, 2018).

L'influence de la (sur)expression de *dxs* sur l'augmentation de la production de terpènes reste mitigée. Si la production de manoyl oxide a été multipliée par 4,5 chez *Synechocystis* PCC 6803, en surexprimant le gène *dxs* de *Coleus forskohlii* en conditions de faible lumière (20 µmol photons m^{-2} s^{-1} (Englund *et al.*, 2015)), de nombreux auteurs n'ont pas vu d'impact significatif (production x 1,1 à 1,6 (Choi *et al.*, 2016; Gao *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016; Englund *et al.*, 2018) voir une diminution (Pade *et al.*, 2016)) de la production de terpènes.
Chez *E. coli*, l'effet de la (sur)expression de *dxs* sur la production de terpènes est également très variable (Harker and Bramley, 1999; Matthews and Wurtzel, 2000; Huang *et al.*, 2001; Kim and Keasling, 2001).

ii. DXR

La surexpression de *dxr* chez *Synechocystis* PCC 6803 diminue la production de terpènes (amorphadiène et squalène : rendement x 0,13 - 0,34 (Choi *et al.*, 2016) ; isoprène : rendement x 0,88 - 1,05 (Englund *et al.*, 2018)).
Il semblerait cependant que le génome de plusieurs cyanobactéries dont *Cyanothece* PCC 7425 code pour une enzyme « DXR like » (DXR-II ou DLO) capable de convertir le DXP en MEP (Sangari *et al.*, 2010). Il serait ainsi intéressant d'étudier la présence dans divers génomes cyanobactériens des gènes correspondants et de produire les enzymes « DXR like » afin de s'affranchir des régulations naturelles de la voie MEP (Sangari *et al.*, 2010; Carretero-Paulet *et al.*, 2013).

iii. IspD

IspD est une enzyme limitante qui a besoin de CTP pour fonctionner.

Chez *Synechocystis* PCC 6803, la surproduction de IspD augmente la production d'isoprène (rendement x 1,5 en surexprimant *ispD* endogène ; x 1,4 en exprimant *ispD* de *E. coli* ; pas d'augmentation entre mutant exprimant *dxs* de *Coleus forskohlii* et *ispD* endogène et celui exprimant juste *dxs ;* (Englund *et al.*, 2018)).

iv. IspE

L'expression d'*ispE* d'*E. coli* n'a pas augmenté la production d'isoprène par *Synechocystis* PCC 6803 alors que la surexpression d'*ispE* endogène l'a faiblement augmenté (rendement x 1,2 (Englund *et al.*, 2018)). En conséquence, *ispE* ne semble pas être une cible d'intérêt pour l'amélioration de la production de terpènes chez les cyanobactéries.

v. IspF

L'expression d'*ispF* de *E. coli* a entrainé une diminution de la production d'isoprène par *Synechocystis* PCC 6803 alors que la surexpression d'*ispF* endogène l'a très peu augmenté (rendement x 1,1 (Englund *et al.*, 2018)). Cette enzyme n'est donc pas une cible à privilégier.

vi. IspG et IspH

L'analyse des flux au travers de la voie MEP a montré que la réaction catalysée par IspG est peu efficace chez *Synechococcus* PCC 7942 (Gao *et al.*, 2016). Dans cette étude, l'expression de *ispG* de *Synechococcus* PCC 7942 ou de *Thermosynechococcus elongatus* a augmenté par 1,3-1,6 la production d'isoprène d'un mutant exprimant également *idi* et *dxs* par rapport au rendement obtenu pour ce même mutant sans expression de *ispG* (Gao *et al.*, 2016).

Dans une autre étude, l'expression de *ispG* de *E. coli* a entrainé une diminution de la production d'isoprène par *Synechocystis* PCC 6803 et la surexpression du gène endogène n'a pas eu d'effet

sur la production. Il en va de même pour la surexpression de *ispH* endogène ou d'*E. coli* (Englund *et al.*, 2018). Ces résultats démontrent la nécessité de (sur)exprimer plusieurs gènes codant pour les enzymes de la voie MEP afin d'augmenter le rendement (Gao *et al.*, 2016). Des conclusions similaires ont été obtenues pour la production de terpènes par *E. coli* (Cunningham *et al.*, 2000; Yuan *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2012).
L'activité catalytique de IspG et IspH est également améliorée en surexprimant les gènes codant pour les flavodoxines et flavodoxines NADP+ oxidoreductases (fldA, PetF et PetH (Englund *et al.*, 2018)). Dans l'étude réalisée par Englund *et al*, la surproduction de PetF a augmenté par 1,3 la production d'isoprène dans le mutant SynIDI-CfDXS-SynIspD (Englund *et al.*, 2018).

vii. IDI

Le gène *idi* codant pour IDI est souvent (sur)exprimé pour équilibrer le ratio DMAPP/IPP mais l'impact sur la production dépend de la longueur de la chaine carbonée de la molécule à produire. Chez *Synechococcus* PCC 7942, le ratio IPP/DMAPP est peu élevé : 0,03 (Gao *et al.*, 2016) et cela affecte la production de terpènes à courte chaine carbonée dont la production dépend de la disponibilité en DMAPP (1 DMAPP = 1 isoprène ; 1 DMAPP + 1 IPP = 1 monoterpène ; 1 DMAPP + 2 IPP = 1 sesquiterpène).

De ce fait, *idi* est souvent (sur)exprimé. Cependant, il est souvent assez compliqué d'établir l'influence réelle de la (sur)expression de *idi* car il est souvent (sur)exprimé avec plusieurs autres gènes de la voie MEP notamment *dxs* et *ispA* (Halfmann *et al.*, 2014b; Kiyota *et al.*, 2014; Choi *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2017; Pattanaik *et al.*, 2020).

Les gènes *idi* de plusieurs espèces ont été exprimés chez *Synechococcus* PCC 7942 augmentant ainsi par 2,25 le ratio DMAPP/IPP et par 1,4 (*idi* de *B. subtilis*) ou 2 (*idi* de *S. cerevisiae* et de *S. elongatus*) la production d'isoprène (Gao *et al.*, 2016). La production d'isoprène chez *Synechocystis* PCC 6803 a également été multipliée par 1,6 en surexprimant *idi* endogène (Englund *et al.*, 2018). En revanche, dans ces deux études, on ne remarque pas de synergie entre la (sur)expression de *dxs* et celle d'*idi*. La production par les mutants (sur)exprimant ces deux gènes n'est pas supérieure à celle des mutants n'en (sur)exprimant qu'un seul.
Concernant la production de sesquiterpènes, la surexpression de *idi* endogène a augmenté la production d'amorphadiène par 1,5 et dans cette étude, les auteurs ont remarqué une synergie entre la surexpression de *dxs* et celle d'*idi* (Choi *et al.*, 2016).

Par ailleurs, il faut aussi garder en mémoire que IDI a besoin d'être phosphorylée pour être active. Ce mécanisme de modifications post-traductionnelles doit donc être pris en compte lorsque l'on surproduit une protéine. De l'ingénierie des protéines pourrait permette de créer des protéines toujours actives et dont le sens catalytique (IPP → DMAPP et inversement) est adapté au terpène à produire.

viii. GPP et FPP synthase

Chez les cyanobactéries, une seule protéine (IspA) catalyse la production de GPP, de FPP et de GGPP. Ce n'est pas le cas pour les plantes, dans le génome desquelles, on trouve de nombreux gènes codant pour des prényl transférases. Certaines de ces enzymes catalysent la synthèse de GPP, de FPP et de GGPP alors que d'autres sont spécialisées dans la production d'un prénylphosphate en particulier. La surproduction de prenyl transférase endogène ou l'expression des gènes provenant d'un autre organisme sont des stratégies très utilisées pour accroitre la production de terpènes.
L'expression de gènes hétérologues est d'autant plus intéressante que les protéines pour lesquelles ils codent ne sont pas soumises aux régulations endogènes et qu'elles peuvent être spécialisées dans la production d'un prenyl phosphate particulier. Il est également possible d'utiliser des méthodes d'ingénierie des protéines afin de modifier l'activité catalytique des prenyl transférases. Par exemple, l'utilisation de GGPPS et FPPS tronquées peut favoriser l'accumulation de GPP (Narita *et al.*, 1999). Il faut cependant faire attention à ne pas réduire l'activité catalytique de l'enzyme (Reiling *et al.*, 2004) ou entrainer la formation de co-produit(s) non désiré(s) (Fischer *et al.*, 2011). L'introduction d'une mutation (Ser81Phe) dans la FPPS native de *E. coli* a permis de générer une enzyme produisant préférentiellement du GPP et non du FPP. Cela a ainsi permis d'augmenter par 30 la production de 1,8-cinéole et par 5 celle de linalool (Mendez-Perez *et al.*, 2017).

Chez les cyanobactéries, il est souvent assez compliqué d'établir l'influence réelle de la (sur)expression de *ispA* car ce gène est souvent (sur)exprimé avec plusieurs autres gènes de la voie MEP (Halfmann *et al.*, 2014b; Kiyota *et al.*, 2014; Choi *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2017; Pattanaik *et al.*, 2020). On peut noter que cette stratégie a permis d'améliorer la production d'amorphadiène (x 14,7 (Choi *et al.*, 2016)), de limonène (x 2 (Wang *et al.*, 2016)), de squalène (x 49800 si surexpression de *dxs, idi* et *ispA* (Choi *et al.*, 2016)) et de farnésène (si surexpression de *dxs, idi* et *ispA* (Lee *et al.*, 2017)) par *Synechococcus* PCC 7942, tout comme la production de limonène par *Anabaena* PCC 7120 (x 5,8 en surexprimant *dxs, idi* et *ispA* (Halfmann *et al.*, 2014b)).
La production de limonène par *Synechocystis* PCC 6803 a été augmentée par 1,4 (Lin *et al.*, 2017) et celle de manoyl oxyde a été diminuée (x 0,3, terpène synthase au site neutre I ; x 0,5 au site de squalène synthase (Englund *et al.*, 2015)) ou augmentée (x 2,8 terpène synthase au site de *psb2A* (Englund *et al.*, 2015)) en surproduisant cette enzyme. De même, la production de squalène par cette même souche a été augmentée (x1,6) en (sur)exprimant *dxs, idi* et *ispA* (Pattanaik *et al.*, 2020).

C'est donc une stratégie intéressante qui mériterait d'être plus étudiée, notamment dans le choix d'*ispA*. Cela peut, cependant, réduire le flux de carbone vers la synthèse des pigment et donc impacter la croissance de la cyanobactérie (Englund *et al.*, 2015; Choi *et al.*, 2016; Lin *et al.*, 2017).

c. Fusion d'enzymes

Dans la nature, des scientifiques ont découvert plusieurs exemples de fusion des protéines de la voie MEP. Notamment, une fusion bifonctionnelle IpsDF qui catalyse deux réactions non consécutives de la voie MEP (Gabrielsen *et al.*, 2004; Testa *et al.*, 2006; Pérez-Gil *et al.*, 2010) et qui s'associe avec IspE (étude *in vitro* (Lherbet *et al.*, 2006)). La protéine de fusion bifonctionnelle IDI - squalène synthase a aussi été identifiée dans le génome de *Nannochloropsis gaditana* (Jinkerson *et al.*, 2013).
Bien que cela puisse entrainer une perte d'activité catalytique, les fusions de protéines entrainent un rapprochement spatial de diverses enzymes impliquées dans la même voie métabolique évitant ainsi l'accumulation d'intermédiaires.

De façon synthétique, il est possible de fusionner le gène codant pour une enzyme de la voie MEP ou pour une terpène synthase avec un gène fortement exprimé chez les cyanobactéries. Ainsi, le gène codant pour la sous-unité β de la phycocyanine a été fusionné avec celui codant pour l'isoprène synthase (*cpcB–IspS*) afin d'augmenter l'abondance de cette terpène synthase. Dans ce cas, même si l'activité de l'IspS était réduite à cause de la fusion, l'augmentation importante de sa production a permis de multiplier par 27 la production d'isoprène par *Synechocystis* PCC 6803 (Chaves *et al.*, 2017).

De même, la fusion du gène codant pour la sous-unité β de la phycocyanine avec celui codant pour la β-phellandrène synthase a augmenté par 12 la production de β-phellandrène par *Synechocystis* PCC 6803 (Formighieri and Melis, 2016). Enfin, la fusion du gène codant pour l'isoprène synthase avec celui codant pour IDI de *S. cerevisiae* a augmenté par 3 la production d'isoprène par *Synechococcus* PCC 7942 (Gao et *al.*, 2016). Néanmoins, toutes ces études ont montré qu'il fallait choisir le linker avec précaution.

Dueber *et al.*, (2009) ont poussé ce concept plus loin et ont créé un échafaudage synthétique permettant de relier les trois premières enzymes de la voie MVA induisant une augmentation significative (x 77) de la production de mélanovate. La même stratégie a été utilisée par Conrado *et al*,. en liant les enzymes de la voie MVA à un domaine zinc-finger (Conrado *et al.*, 2012). Cela n'a encore jamais été réalisé pour les enzymes de la voie MEP.

d. Lever les retro inhibitions

Certaines enzymes de la voie MEP, comme DXS, sont inhibées par les produits de la voie MEP (IPP, DMAPP ou les prényl diphosphates). Afin de résoudre cela, l'activité des prényltransférases et des terpènes synthases doit être maximisée afin d'éviter l'accumulation de ces intermédiaires (Ajikumar *et al.*, 2010; Banerjee *et al.*, 2013; Hemmerlin, 2013).
Afin de mieux équilibrer les flux au travers de la voie MEP et relier la production des protéines à la quantité de précurseur présent, il est possible d'utiliser des boucles de régulation couplées à des biosenseurs.

5. Amélioration la fixation du CO_2 et la production de pouvoir réducteur

La quantité de G3P et donc celle d'hydrocarbures dépend directement de la quantité de CO_2 fixé (Formighieri and Melis, 2014a). Afin d'augmenter la quantité de CO_2 fixé, il est nécessaire de développer les connaissances sur les mécanismes du transport et de la concentration du carbone (CCM) au sein des carboxysomes et d'améliorer l'efficacité du cycle de Calvin.

Plusieurs études (Bracher *et al.*, 2017; Satagopan *et al.*, 2019) ont permis d'identifier deux mutations situées dans la grande sous-unité de la RubisCO (RbcL) et six mutations situées dans la petite sous-unité (RbcS) qui amélioraientt à la fois l'efficacité catalytique et la spécificité de l'enzyme (Wilson *et al.*, 2018).
Un autre axe d'étude consiste à surexprimer les gènes codant pour une RubisCO endogène ou hétérologue. Il a par exemple été démontré que la surexpression du gène codant pour l'enzyme endogène chez *Synechocystis* PCC 6803 augmentait la fixation du CO_2 (Zhang *et al.*, 2017). L'expression des gènes de la RubisCO de *Synechococcus* PCC 6301 a amélioré la production d'isobutyraldehyde (x 1,5) par *Synechococcus* PCC 7942 (Atsumi *et al.*, 2009). De même, l'expression des gènes de la RubisCO de *Synechococcus* PCC 7942 a amélioré la production d'acides gras par *Synechococcus* PCC 7002 (Ruffing, 2014).

La RubisCO n'est pas la seule enzyme pouvant être surproduite afin d'améliorer la fixation du CO_2 et la production de molécule d'intérêt ; la surproduction de la PRK, de la sedoheptulose bisphosphatase, de la fructose bisphosphate aldolase ou de la transketolase améliore également cette assimilation et donc l'accumulation de biomasse et de molécules d'intérêt (Liang and Lindblad, 2016; Liang *et al.*, 2018; De Porcellinis *et al.*, 2018). Jusqu'à présent, aucun mutant du cycle de Calvin n'a été étudié dans le cadre de la production de terpènes.

Il est également important d'améliorer l'abondance des cofacteurs (notamment NADPH et ferrédoxine réduite) afin d'augmenter la production de molécules d'intérêt par les cyanobactéries (Gao *et al.*, 2012; Lan and Liao, 2012; Li and Liao, 2013). Afin de maximiser la production d'isoprène, le ratio NADPH/ATP devrait être de 1,35 (Oliver and Atsumi, 2014). Plusieurs stratégies (détaillées dans les perspectives) pourraient être utilisées afin de rétablir ce ratio mais à ma connaissance cela n'a jamais été appliqué pour augmenter la production de terpènes par les cyanobactéries.

Une fois le CO_2 assimilé, il est important de le rediriger vers la production des précurseurs des terpènes (pyruvate et G3P).

6. Rediriger le carbone fixé vers la voie MEP

La distribution du carbone fixé est fortement régulée chez les micro-organismes photosynthétiques : environ 80% du carbone fixé est utilisé pour la production de biomasse et seulement 5% de ce carbone est alloué à la voie MEP pour la synthèse des caroténoïdes, des

quinones et des chlorophylles (Melis, 2013). De ce fait, il faut augmenter et équilibrer le pool des précurseurs de la voie MEP (pyruvate et G3P) car la quantité de pyruvate produit par les cyanobactéries est bien supérieure à celle de G3P (Dempo *et al.*, 2014; Gao *et al.*, 2016).
La surexpression (*PPS*, phosphoénol pyruvate carboxykinase) ou l'inactivation (*pykAF*, *pgi*, *zwf*) de plusieurs gènes codant pour des enzymes impliquées dans le métabolisme central de carbone a permis d'augmenter la production de terpènes chez *E. coli* (Farmer and Liao, 2001).

Afin d'améliorer la production de terpènes par les cyanobactéries, il serait possible de surexprimer les gènes codant pour la phosphoénol pyruvate carboxykinase, la malate déshydrogénase, l'enzyme Malic, la fructose bisphosphate aldolase et la fructose-1,6 biphosphatase ; et d'inactiver (partiellement ou totalement) les gènes codant pour la phosphoénol pyruvate carboxylase et la pyruvate déshydrogénase.
Ces stratégies ont permis d'augmenter la production d'aldéhyde, d'isobutyraldehyde, de lactate, d'éthanol par *Synechococcus* PCC 7942 ou *Synechocystis* PCC 6803 (Cheah *et al.*, 2020; Jazmin *et al.*, 2017; Angermayr *et al.*, 2014; Liang *et al.*, 2018). Je discuterai de l'intérêt de ces modifications génétiques dans les perspectives de ce manuscrit.

7. Ingénierie de la voie des pentoses phosphates (PPP)

L'ajout de fosmidomycine, un inhibiteur de la deoxyxylulose phosphate reductoisomerase, n'empêche pas la production de terpenoïdes par *Synechocystis* PCC 6803. Cela laisse à penser qu'il existe d'autres voies permettant la synthèse des intermédiaires de la voie MEP. Notamment, le lien entre la PPP et la voie MEP (voir chapitre 2 VII.1.) pourrait être étudié afin de rediriger plus de carbone vers la synthèse de terpènes et également de contourner les régulations de la voie MEP (notamment la régulation négative de DXS par IPP et DMAPP (Banerjee and Sharkey, 2014)).

Une étude menée en 2017 vient accentuer l'intérêt de l'ingénierie de la PPP pour la production de terpènes. Dans cet article, les auteurs ont surexprimé deux gènes de la PPP codant pour la ribose 5-phosphate isomérase (rpi) et la ribulose 5-phosphate 3-épimerase (rpe) et cela a augmenté de 1,3 la production de limonène. En exprimant en plus *ispA* d'*Abies grandis*, le rendement a été multiplié par 2,2 (Lin *et al.*, 2017).

8. Inactivation des voies compétitrices

Plusieurs voies métaboliques entrent directement (caroténoïdes) ou indirectement (stockage du carbone sous forme de glycogène ou PHB) en compétition avec la voie MEP pour le pool de précurseur (G3P et pyruvate ou IPP et DMAPP). L'inactivation partielle ou totale de ces voies pourrait permettre d'améliorer les rendements de production de terpènes.

Cela a été réalisé chez *Synechococcus* PCC 7002 pour la production de limonène (Davies *et al.*, 2014) et de bisabolène et chez *Synechocystis* PCC 6803 pour la production d'isoprène (Bentley

et al., 2014). L'inactivation de la délétion de la voie du stockage de carbone sous forme de glycogène (Δ*glgC*, Δ*glgA* ou Δ*glgX*) n'a pas eu d'effet sur les rendements de production.
De plus, l'inactivation du gène codant pour la squalène hopene cyclase n'a pas amélioré le rendement en manoyl oxide chez *Synechocystis* PCC 6803. Le pool de précurseur (ici de FPP) était plus important mais la terpène synthase n'avait pas une activité catalytique suffisante pour attirer ce pool vers la production du terpène désiré.
Cependant, l'inactivation des voies compétitrices (Δ*glgC* ou Δ*phaA* et Δ*phaB* ou Δ*phaC* et Δ*phaE* ou Δ*slr1556*) est une stratégie qui s'est montrée efficace pour améliorer la production d'éthanol, d'acide l'actique, de mannitol, d'alcanes et d'acide lactique par *Synechocystis* PCC 6803 et par *Synechococcus* PCC 7942 (Gao *et al.*, 2012; Van der Woude *et al.*, 2014; Namakoshi *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2013; Jacobsen and Frigaard, 2014) .

9. Optimisation des conditions de culture

a. Choix d'un système de culture adapté

La majorité des recherches sur la production de molécules d'intérêt par les cyanobactéries ont été réalisées dans des conditions de laboratoire, généralement en erlenmeyers ou dans des petits photobioréacteurs alimentés par un air enrichi en CO_2.
Les faibles rendements obtenus résultent en partie des limitations inhérentes aux systèmes de culture établis, en particulier en ce qui concerne l'apport de nutriments essentiels (carbone sous forme CO_2 ou HCO_3^-) et de lumière. Les changements de conditions du milieu (alcalinisation par exemple) sont également moins bien maitrisés en erlenmeyers qu'en photobioréacteurs.
De ce fait, la production d'isoprène par *Synechocystis* PCC 6803 était fortement améliorée quand la souche était cultivée en photobioréacteurs avec 5% CO_2 (rendement x 8 (Gao *et al.*, 2016)) ou en système de culture « open pound » (production par cellule x 5 (Pade *et al.*, 2016)).
La production de bisabolène, de bisabolol et de patchoulol par *Synechocystis* PCC 6803 a également été fortement améliorée en changeant de mode de culture tel que décrit dans le tableau 11 ci-dessous (Dienst *et al.*, 2020).

Tableau 11 Rendements en bisabolène, bisabolol et patchoulol par *Synechocystis* PCC 6803 selon le système de culture (Dienst *et al.*, 2020). HDC = système de culture à haute densité cellulaire

Bisabolol	Plaques 6 puits	0,59 mg/L en 4 jours	Rendement x 13-16 en HDC
	Multicultivateur	1,3 mg/L en 8 jours	
	Cultivateur HDC	9,86 mg/L en 4 jours 17, 3mg/L en 8 jours	
Patchoulol	Plaques 6 puits	1 mg/L en 4 jours	Rendement x 24-33 en HDC
	Multicultivateur	2,9 mg/L en 8 jours	
	Cultivateur HDC	24,5 mg/L en 4 jours 96,3 mg/L en 8 jours	
Bisabolène	Plaques 6 puits	12,5 mg/L en 4 jours	Rendement x 4,5-24 en HDC
	Multicultivateur	7,4 mg/L en 8 jours	
	Cultivateur HDC	57,22 mg/L en 4 jours 179,4 mg/L en 8 jours	

Bien que la production par cellule reste constante entre ces différentes conditions de culture, le système HDC permet d'atteindre de très fortes biomasses et par conséquent d'augmenter significativement les rendements (Dienst *et al.*, 2020). Des études, en mode de culture semi-continue ou continue et à plus grande échelle, devront être réalisées afin d'étudier le potentiel du système HDC pour la production de terpènes par les cyanobactéries.

b. Impact de la lumière

La lumière est un paramètre important à prendre en considération afin d'améliorer la production de molécules d'intérêt par les cyanobactéries.
L'amélioration de la production à forte lumière semble dépendre du contexte métabolique (expression du gène codant pour la terpène synthase seule ou également d'autres enzymes de la voie MEP) mais également du site d'intégration et du promoteur contrôlant l'expression du gène. En effet, il a été démontré que la production de manoyl oxyde par *Synechocystis* PCC 6803 était fortement améliorée (production par cellule x 4,4) à forte lumière (100 µE) si les gènes codants pour les terpènes synthases étaient intégrées au site *psbA2* alors que cette production était fortement diminuée (x 0,28) lorsque ces gènes étaient intégrées au site neutre I (Englund *et al.*, 2015). L'augmentation ou la diminution étaient moins importantes pour le mutant exprimant non seulement les gènes codant pour les terpènes synthases mais également ceux codant pour DXS et/ou GPPS (Englund *et al.*, 2015).

De même, la production de β-phéllandrène par *Synechocystis* PCC 6803, à forte intensité lumineuse, a été augmentée (production par cellule x 3,5 et rendement x 5) lorsque le gène codant pour la terpène synthase était intégrée au site de *psbA2* sous le contrôle du promoteur psbA2. Cependant, si le gène codant pour la terpène synthase était sous le contrôle du promoteur Ptrc ou si il était intégrée au site de *cpc*, alors la production restait inchangée ou diminuait fortement à forte intensité lumineuse (Formighieri and Melis, 2014b).

Enfin la production de limonène par *Anabaena* PCC 7120 n'est pas modifiée en conditions de culture à forte lumière dans le mutant exprimant seulement le gène codant pour la terpène synthase. Cependant, cette production est augmentée dans un mutant dans lequel les gènes *dxs-idi-ispA* sont surexprimés en plus de l'expression de celui codant pour la terpène synthase (Halfmann *et al.*, 2014b).

c. Alternance jour/nuit

En conditions de culture dites en « open pound », les cyanobactéries sont soumises à une alternance de période de jour et de nuit. Il est donc important de déterminer l'impact de ce cycle sur la production de terpènes. Il a été démontré qu'il fallait deux fois plus de temps pour obtenir le même rendement en alternance jour/nuit qu'en lumière continue (production bisabolène par *Synechocystis* PCC 6803 (Sebesta and Peebles, 2019)).

d. Influence du milieu de culture

Plusieurs conditions de culture ont été testées afin d'améliorer la production de terpènes. Il a notamment été démontré que l'augmentation du pH (alcalinisation) et de la concentration en sel dans le milieu de culture avait un effet néfaste sur la production d'isoprène par *Synechocystis* PCC 6803 (Chaves *et al.*, 2014; Pade *et al.*, 2016). Par ailleurs, l'ajout de glucose ou de carbone ($NaHCO_3$) n'a pas amélioré la production de squalène par cette même cyanobactérie (Pattanaik *et al.*, 2020).

10. Amélioration de la résistance des cyanobactéries aux stress xénobiotiques

Les cyanobactéries peuvent modifier leur génome (apparition de mutation) afin de réduire l'inhibition de croissance causée par l'accumulation de composés toxiques (Jones, 2014; Cassier-Chauvat *et al.*, 2016). On parle alors d'instabilité génétique, c'est un facteur important à prendre en considération pour l'utilisation des cyanobactéries en biotechnologie. Des auteurs ont, par exemple, remarqué une diminution importante de la productivité d'éthylène après chaque repiquage de *Synechococcus* PCC 7942 due à l'apparition de mutation dans le gène codant pour l'ethylène forming enzyme (Takahama *et al.*, 2003).
Il est par conséquent crucial de déterminer si la production de terpènes est délétère pour la croissance de la cyanobactérie mais également de travailler sur des moyens de réduire cette toxicité si cela était nécéssaire. De plus, il est important de créer des souches de cyanobactéries suffisamment robustes pour croitre rapidement dans des conditions de culture industrielle.

a. Toxicité des terpènes

La toxicité des terpènes a très peu été étudiée chez les cyanobactéries. Aucun auteur n'a signalé une perte importante de croissance dans les souches productrices de terpènes par rapport à la souche sauvage. Cependant, les concentrations produites sont très faibles et les difficultés rencontrées pour augmenter cette production pourraient être dues à un effet délétère des terpènes. Une étude a déterminé le stress xénobiotique causé par l'ajout de terpènes dans le milieu de culture. Ainsi, il a été démontré que le géraniol, le géranial, le linalool et le farnésène était toxique pour *Synechocystis* PCC 6803 à une concentration supérieure 0,02% v/v. La croissance de la souche en présence de farnésène pouvait être restaurée en ajoutant du dodécane (piège les terpènes) au milieu de culture (Hellier *et al.*, 2013).
Une étude de toxicité des terpènes réalisée sur *Synechocystis* PCC 6803 par notre laboratoire ((Kammerscheit, 2019) et tableau 12) a démontré que :

- Certains terpènes inhibent la croissance de la cyanobactérie ;
- La toxicité des terpènes dépend plus de la présence de groupements fonctionnels (aldéhyde, alcool, cétone) que de la longueur de leur chaîne carbonée ;
- Certains stéréoisomères sont plus toxiques que d'autres. Par exemple, la forme S du limonène est moins toxique que la forme R ;

- Certains terpènes (terpinéol, farnésol) peuvent induire une modification de la pigmentation ;
- Certains terpènes (nerolidol) provoquent l'agrégation de la culture et l'attachement des cellules contre la paroi des erlenmeyers.

Tableau 12 – Toxicité des différents terpenoïdes testés dans l'étude réalisée par Xavier Kammerscheit. DMI = Dose minimale inhibitrice, c'est-à-dire la dose minimale à laquelle on n'observe plus de croissance.

Nom	Caractéristiques structurales	Groupe fonctionnel	DMI
Isoprène	Hémiterpène (C5) acyclique	-	> 150 mM
(+)-β-citronellène	Monoterpènes (C10) acycliques	-	> 100 mM
(+/-)-linalool		Alcool	> 1 mM
(-)-linalool		Alcool	> 2 mM
Citral		Aldéhyde	> 2 mM
(+/-)-limonène	Monoterpènes (C10) monocycliques	-	> 35 mM
(R)-(+)-limonène		-	> 10 mM
(S)-(-)-limonène		-	> 20 mM
Terpinolène		-	> 10 mM
p-cymène		-	> 10 mM
Terpinéol		Alcool	> 2 mM
(+)-carvone		Cétone	> 1 mM
(-)-carvone		Cétone	> 0,1 mM
(+)-α-pinène	Monoterpènes (C10) bicycliques		> 10 mM
(-)-α-pinène			> 60 mM
(+)-β-pinène			> 10 mM
(-)-β-pinène			> 10 mM
Farnesol	Sesquiterpènes (C15) acycliques	Alcool	> 1 mM
Nerolidol		Alcool	> 30 mM*
Squalène	Triterpène (C30) acyclique	-	> 150 mM

b. Stratégies permettant de diminuer la toxicité des terpènes

Les exopolysaccharides pourraient jouer un rôle important dans la tolérance aux terpènes présents dans le milieu extracellulaire. Pour démontrer cela, une comparaison entre la croissance d'une souche sauvage et celle d'une souche dépourvue d'exopolysaccharides (mutant Δ*slr1875-sll1581* (Jittawuttipoka *et al.*, 2013)) a été réalisée. La croissance du mutant en présence de (+/-)-limonène (20 mM) et de (S)-(-)-limonène (5 mM) était fortement ralentie (Kammerscheit, 2019).

Ensuite, l'impact de la délétion des gluthation-S-transférases sur la résistance de *Synechocystis* PCC 6803 à différents terpènes a été étudié. Certains mutants (Δ*sll0067,* Δ*sll1147,* Δ*sll1545* et Δ*slr0236*) étaient un peu plus résistants au limonène que la souche sauvage, tandis que d'autres (Δ*sll1902* et Δ*slr0605*) l'étaient moins. Par conséquent, des études plus approfondies sur le rôle

des gst dans la gestion du stress xénobiotique sont à réaliser afin de créer des mutants plus résistants à ces stress et à d'autres stress générés par la culture à grande échelle (Kammerscheit *et al.*, 2019a, 2019b).

c. Toxicité du solvant utilisé pour piéger les terpènes

Par ailleurs, la toxicité des terpènes n'est pas le seul facteur à prendre en compte. Afin de piéger les terpènes et les extraire du milieu de culture, des solvants tels que le dodécane, l'hexadécane ou le tetradécane peuvent être utilisés. Il est alors important de vérifier que ces solvants n'ont pas d'impact négatif sur la croissance du châssis. Des auteurs ont, par exemple, démontré que l'ajout de 20% de dodécane au milieu de culture de *Synechococcus* PCC 7942 inhibait de 20% la croissance de la souche après 5 jours alors que l'ajout d'hexadécane ou de tetradécane n'avait pas d'effet sur la croissance de la souche (Choi *et al.*, 2016). Nous observons également une forte inhibition de la croissance de *Synechococcus* PCC 7942 comme cela sera décrit dans la partie résultats.

Objectifs de mon étude

Comme cela vient d'être décrit dans cette introduction, la production de terpène par les cyanobactéries est un sujet récent. De nombreux auteurs modifient une seule souche de cyanobactéries pour la production d'un seul terpène puis tente d'améliorer la production en utilisant des méthodes d'ingénierie métabolique. Les stratégies d'expression des gènes codant pour les terpènes synthases et les modes opératoires étant très divers, il est difficile de comparer les niveaux de production de chaque espèce et donc d'identifier laquelle est un bon châssis pour la production de terpène.

Pour répondre à cette problématique, le laboratoire a décidé de réaliser une étude comparative de la production de plusieurs mono (limonène, pinène) et sesquiterpènes (bisabolène, farnésène, santalène) par 5 souches de cyanobactéries (*Synechocystis* PCC 6803, *Synechococcus* PCC 7942, *Synechococcus* PCC 7002, *Cyanothece* PCC 7425 et *Cyanothece* PCC 7822) possédant divers avantages (marines ou d'eaux douces, capacité à pousser sur l'urée ou sur le diazote comme seule source d'azote, dépollution des eaux calcaires, temps de génération court, *etc*). Les étapes de cette étude sont détaillées dans la Figure 36.

Dans le 1er chapitre des résultats, je présenterai la stratégie utilisée pour exprimer les gènes codant pour les terpènes synthases dans nos cyanobactéries d'intérêt puis je détaillerai les étapes de la mise en place des protocoles de quantification des terpènes par la méthode GC-MS (chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse).
Ensuite, dans le 2nd chapitre, je présenterai et discuterai les résultats de production de terpènes « biocarburants » (limonène, pinène, bisabolène et farnésène) obtenus pour chacune des cyanobactéries d'intérêt. Je montrerai également comment il est possible d'améliorer la production de certains terpènes par certaines souches en modifiant les conditions de culture ou en inactivant les voies rentrant en compétition avec la production de terpènes.
Dans un 3ème chapitre, je comparerai la production de santalène par différentes souches de cyanobactérie.
En conclusion, je comparerai les rendements de production afin de définir les bons châssis pour la production d'un terpène en particulier. Nous verrons qu'une souche peut être une bonne productrice d'un terpène mais pas d'un autre.
Enfin, je donnerai les perspectives générales de mon étude.

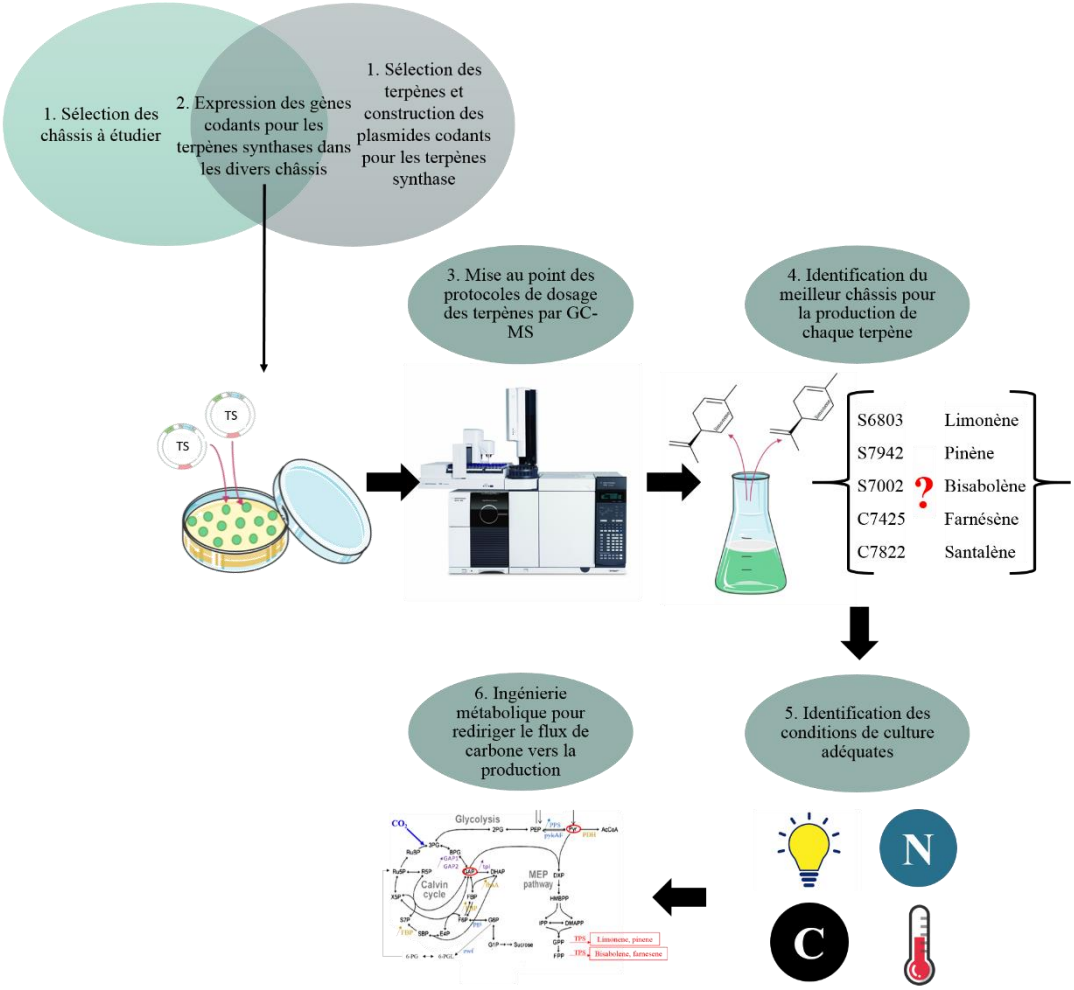


Figure 36 Représentation schématique des différentes étapes de mon projet de doctorat. S6803 = *Synechocystis* PCC 6803, S7942 = *Synechococcus* PCC 7942, S7002 = *Synechococcus* PCC 7002, C7425 = *Cyanothece* PCC 7425 et C7822 = *Cyanothece* PCC 7822.

Résultats et discussion

Les figures présentées dans cette partie sont en anglais car certaines sont publiées dans l'article (Chenebault *et al.*, 2020) et d'autres seront utilisées pour les manuscrits qui seront soumis pour publications prochainement.

Chapitre 1 : Obtention des souches productrices de terpènes et mise au point de la méthode de quantification des terpènes par GC-MS

I. Construction des plasmides d'expression des gènes codant pour les terpènes synthases

1. Stratégie

Je vais décrire ici la stratégie qui a été mise en place afin de construire des vecteurs permettant une forte expression des gènes codant pour les terpènes synthases (TPS) et donc potentiellement une forte production de terpènes dans les diverses souches de cyanobactéries (châssis) retenues pour cette étude. Nous avons, dans un premier temps, choisi de cloner les gènes codant pour les terpènes synthases dans un vecteur à large spectre d'hôte, pFC1 dont les caractéristiques sont décrites ci-dessous (Mermet-Bouvier and Chauvat, 1994), plutôt que d'introduire ces gènes dans le chromosome des cyanobactéries. En effet, en utilisant ce plasmide, une seule construction peut être introduite dans de nombreuses cyanobactéries alors que, dans le cas d'une insertion dans le génome, une construction spécifique est requise pour chacune des cyanobactéries. De plus, afin de ne pas impacter la croissance des cyanobactéries, l'insertion d'un gène dans le génome doit se faire au niveau d'un site neutre, c'est-à-dire un site du génome pouvant être modifié sans que cela n'ait de conséquences néfastes connues sur la croissance et la physiologie de la souche. Aucun site neutre n'a encore été décrit pour les deux *Cyanothece* utilisées dans cette étude (*Cyanothece* PCC 7425 et PCC 7822).

2. Le vecteur d'expression pFC1

Le vecteur d'expression pFC1 est un outil génétique développé au laboratoire (Mermet-Bouvier and Chauvat, 1994). Il est utilisé pour produire des protéines codées par des gènes endogènes ou exprimer des gènes hétérologues. pFC1 dérive du plasmide RSF1010, un vecteur à large

spectre d'hôtes (essentiellement pour les bactéries à gram-négatif) possédant sa propre machinerie de réplication ainsi qu'une origine de transfert (*oriT*) nécessaire à son transfert par conjugaison. Les gènes d'intérêt peuvent être clonés au niveau d'un site de clonage multiple (comprenant un site unique *Nde*I 5'-CAT**ATG**-3') présent à proximité du promoteur fort du bactériophage lambda (p_R) et de la séquence Shine Dalgarno.
Le répresseur thermolabile (cI_{857}), exprimé de façon constitutive, se fixe au promoteur p_R et peut ainsi influencer la transcription du gène sous le contrôle de ce promoteur. Le système ainsi obtenu est un système d'expression thermorégulée. A 30°C (répresseur fonctionnel), il n'y a pas (ou une très faible) expression des gènes clonés en aval du p_R, une expression moyenne à 33-34°C et une forte expression à 39°C (répresseur dénaturé).
Le plasmide pFC1 possède également une cassette de résistance au chloramphénicol (Cm^R) et une cassette de résistance à la streptomycine/spectinomycine (Sm/Sp^R) permettant la sélection des souches recombinantes et le maintien du plasmide dans les souches de *E. coli* et de cyanobactéries (Figure 37).

Un vecteur d'expression, dérivé du plasmide pFC1 appelé pC (Figure 37), permet l'expression forte et constitutive des gènes. Il a été obtenu par religation après digestion par *Psi*I (2 sites), générant une ORF cI_{857} tronquée de 532 pb (Veaudor *et al.*, 2018). Ce vecteur peut être utilisé si les gènes à exprimer ne sont pas toxiques pour *E. coli* ou les cyanobactéries.

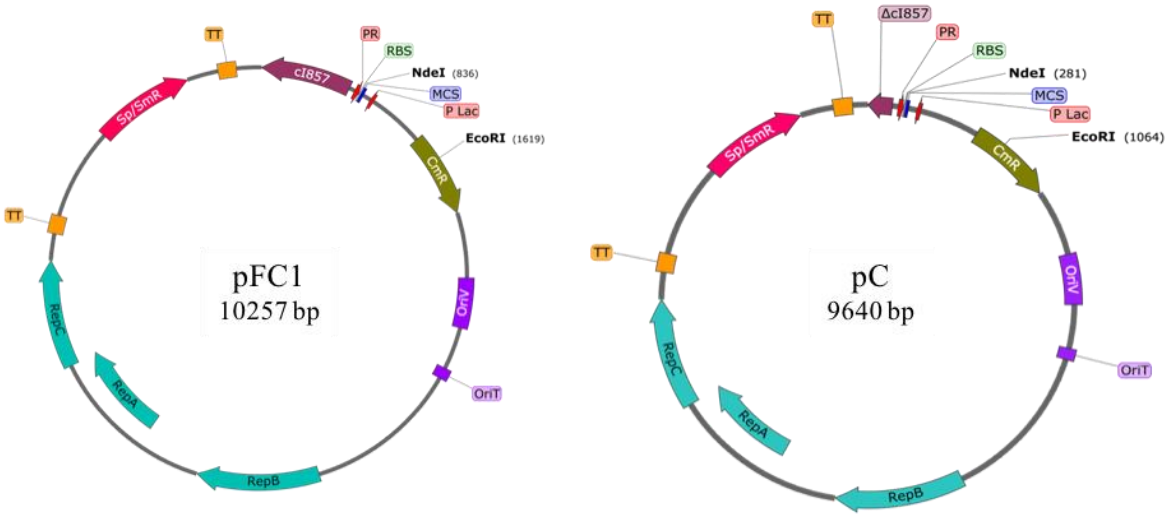


Figure 37 Cartes des plasmides pFC1 et pC

L'impact de la production des terpènes synthases n'étant pas connu, les gènes codant pour ces enzymes ont été clonés dans pFC1 et dans pC. Cela permet soit une expression du gène qui est dépendante de la température (version pFC1), soit une expression constitutive du gène (version pC). Ainsi, s'il s'avérait que ces gènes soient toxiques pour les cyanobactéries, il était possible de découpler la production de biomasse (à 30°C) de la production de terpènes (à 39°C).

3. Construction des plasmides codant pour la bisabolène et la farnésène synthase

a. Choix des terpènes synthases

Nous avons choisi les gènes codant pour les terpènes synthases dont la séquence était connue au début de ma thèse et ayant déjà été utilisées dans la littérature pour la production de terpènes de manière hétérologue. Les terpènes synthases retenues convertissent de façon efficace le FPP en α-farnésène ou en E-α-bisabolène de haute pureté.
Ce sont :

- Le gène codant pour l'**α-farnésène synthase de *Picea abies*** qui avait déjà été exprimée par (Halfmann *et al.*, 2014b) chez *Anabaena* PCC 7120.
- Le gène codant pour l'**E-α-bisabolene synthase de *Abies grandis*** qui a été exprimée par (Davies *et al.*, 2014b) chez *Synechococcus* PCC 7942. Cette enzyme a une forte affinité pour le FPP (49,5 ± 6,3 µM), une bonne constante catalytique (0,11 min^{-1}) et ne produit que du E- α-bisabolène (McAndrew *et al.*, 2011).

La séquence des gènes codant pour les TPS a été adaptée au biais de codons de *Synechocystis* PCC 6803 (très similaire à celui des quatres autres cyanobactéries utilisées dans cette étude, voir annexe 3).

b. Les deux stratégies mises en place pour cloner les gènes codant pour les terpènes synthases dans le pFC1 ou le pC

Le site unique *EcoR*I présent dans le pFC1 et le pC est situé au milieu du gène codant pour la chloramphénicol acetyl transférase (*cat* ; Figure 37). Par conséquent, lors du clonage d'une séquence codante par restriction en *Nde*I- *EcoR*I, le gène *cat* est tronqué et le gène hétérologue est inséré à la place. De ce fait, les cellules portant ces plasmides sont sensibles au chloramphénicol.

La première stratégie de clonage consistait à reconstituer le gène codant pour la résistance au chloramphénicol et de le placer sous le contrôle du p_R. Ainsi, si les mutants restent résistants au chloramphénicol, cela signifie que le gène codant pour la terpène synthase et le début du gène *cat* sont stables et exprimés. Cela permet également d'anticiper l'apparition de mutations dans le promoteur p_R. Cependant cette stratégie n'a pas fonctionné, aucune colonie contenant la construction désirée n'a été obtenue pour une raison inconnue.

La deuxième stratégie a donc consisté à cloner le gène codant pour la terpène synthase entre les sites *Nde*I- *EcoR*I sans reconstituer le gène *cat.* Je présente, ici, uniquement cette stratégie de clonage et uniquement dans le plasmide pC car elle est identique à celle réalisée dans le vecteur d'expression pFC1 qui n'a pas été utilisé par la suite.

c. Construction du plasmide codant pour la bisabolène synthase

i. Adaptation au biais de codons de *Synechocystis* PCC 6803 et ajout de sites de restrictions

La séquence originale de l'*E-α-bisabolène synthase* d'*Abies grandis* (GenBank AF006195.1, séquence en annexe 4) a été adaptée au biais de codons de *Synechocystis* PCC 6803 en utilisant le logiciel GENEius (Eurofins Genomics). Cette séquence sera appelée *bs*. Lors du design, un site de restriction *Nde*I (**catATG**) a été ajouté au début du gène *bs* afin de cloner ce gène au niveau du site de clonage multiple, sous le contrôle du p_R et à bonne distance du RBS associé. Un site de restriction *EcoR*I (**gaattc**) a également été ajouté par amplification PCR (amorce pEX_Fw et BS isolation with *EcoR*I ; séquence en annexe 4).

Deux autres sites de restriction (*Xba*I : **TCTAGA** et *Sma*I : **CCCGGG**) ont également été ajoutés à la fin de la séquence codante *bs*. Cela permettra de cloner un/deux autre(s) gène(s) en aval de *bs* et de créer un opéron sous le contrôle du p_R.

ii. Validation de la construction

- ✓ Les sites de restrictions ajoutés (*Nde*I, *EcoR*I, *Xba*I et *Sma*I) sont uniques.
- ✓ La protéine bisabolène synthase obtenue après adaptation du biais de codons est bien la même que la protéine naturellement produite par *Abies grandis* (UniProtKB/Swiss-Prot: O81086.1).

iii. Réalisation du clonage de la *bs* dans pC

Le gène *bs* est obtenu par amplification PCR à partir du plasmide pEX-A258-BS (envoyé par Eurofins Genomics). Ensuite, le clonage est réalisé par digestion *Nde*I-*EcoR*I puis ligation du gène *bs* dans pC (Figure 38). Ainsi, le gène *bs* est exprimé de façon constitutive à partir du promoteur fort p_R.

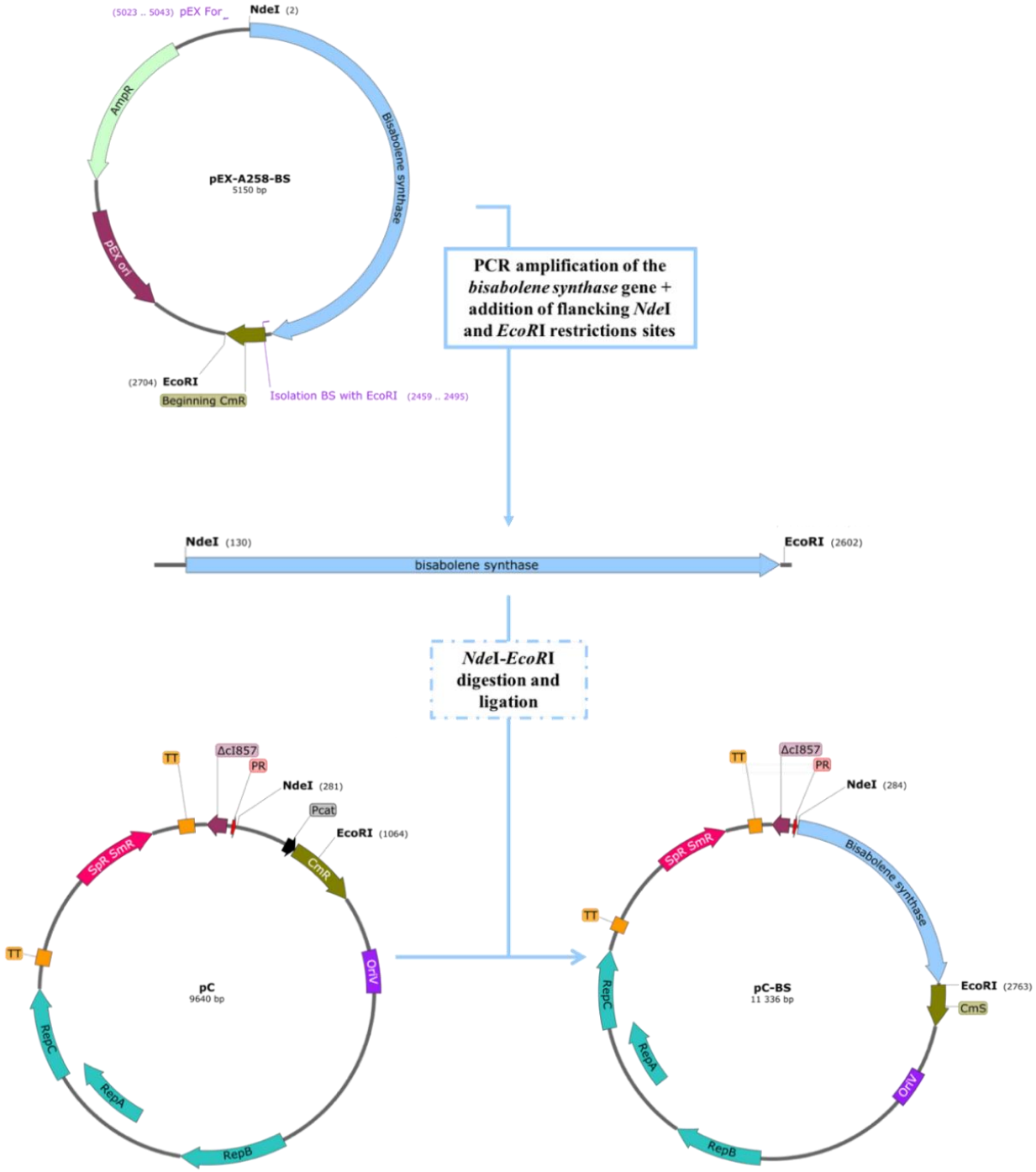


Figure 38 Construction du plasmide pC-BS pour l'expression constitutive du gène *bs* codant pour l'E-α-bisabolene synthase. Une amplification PCR est utilisée pour extraire *bs* à partir du plasmide pEX-A258-BS (envoyé par Eurofins Genomics) puis une digestion est réalisée en utilisant les enzymes *Nde*I et *Eco*RI pour cloner *bs* dans le vecteur pC. Ainsi, le gène *bs* (en bleu) est exprimé de façon constitutive à partir du promoteur fort p_R (en rouge). A noter que le gène *cat* présent dans pC-BS a été tronqué par la restriction enzymatique.

d. Construction du plasmide codant pour la farnésène synthase

i. Adaptation au biais de codons de *Synechocystis* PCC 6803 et ajout des sites de restrictions

La séquence originale de l'*α-farnésène synthase* de *Picea abies* (AY473627.1) a été adaptée de la même façon que *bs* au biais de codons de *Synechocystis* PCC 6803 (cette séquence est appelée *fs* et se trouve en annexe 5) et les deux sites de restrictions *Nde*I et *EcoR*I ont été ajoutés. Deux autres sites de restriction (*Xba*I : **TCTAGA** et *XhoI* : **CTCGAG**) ont également été ajoutés à la fin de la séquence de *fs*.

ii. Validation de la construction

- ✓ Les sites de restrictions ajoutés sont uniques (*Nde*I, *Eco*RI, *Xba*I et *XhoI*)
- ✓ La protéine farnésène synthase obtenue après adaptation du biais de codons est bien la même que la protéine naturellement produite par *Picea abies* (GenBank: AAS47697.1, annexe 5).

iii. Réalisation du clonage de la *fs* dans pC

Le gène *fs* est obtenu par amplification PCR à partir du plasmide pEX-A258-FS (envoyé par Eurofins Genomics). Ensuite, le clonage est réalisé par digestion *Nde*I-*EcoR*I puis ligation du gène *fs* dans pC (Figure 39). Ainsi, le gène *fs* est exprimé de façon constitutive à partir du promoteur fort p_R.

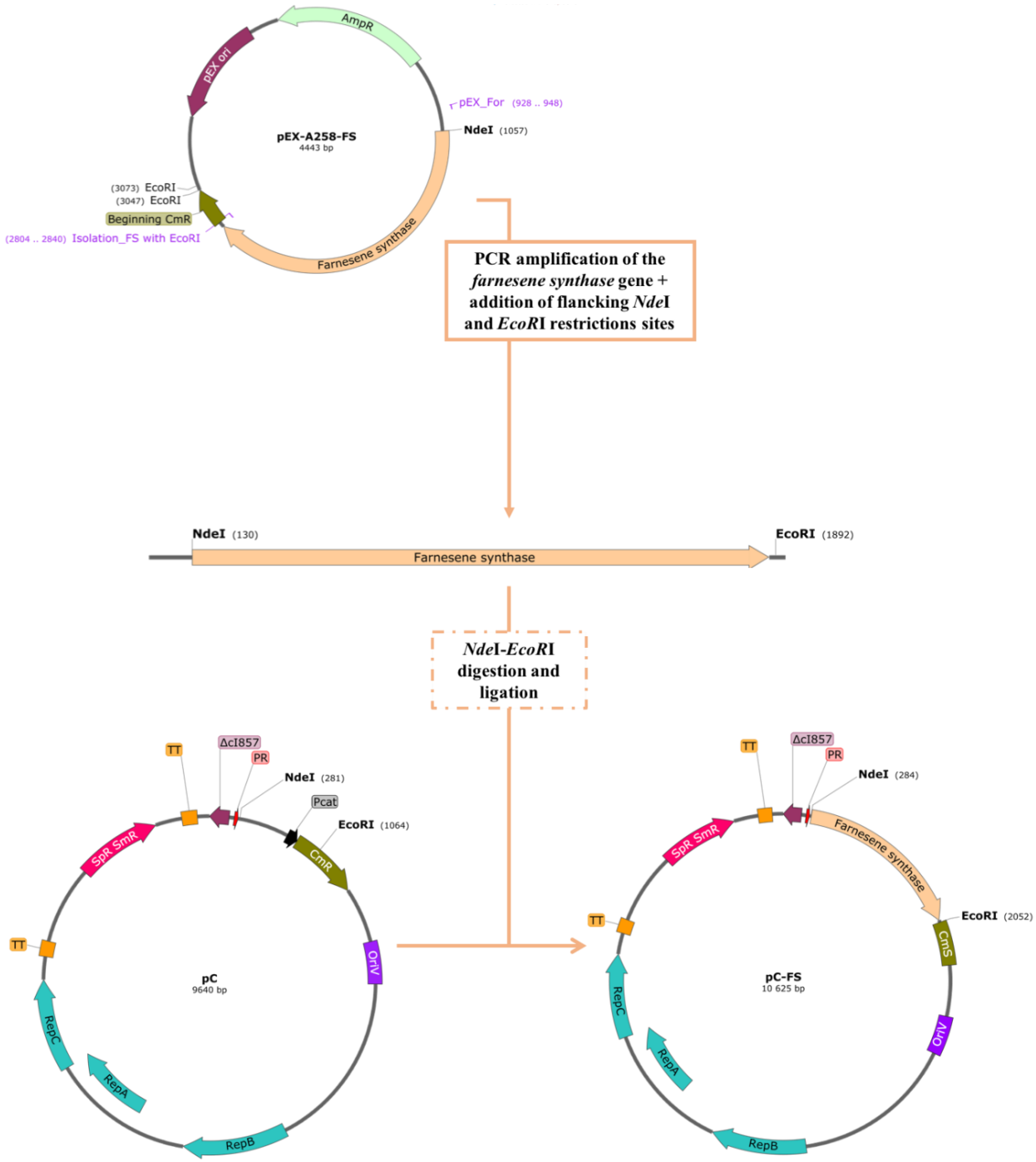


Figure 39 Construction du plasmide pC-FS pour l'expression constitutive du gène *fs* codant pour l'α-farnésène synthase. Une amplification PCR est utilisée pour extraire *fs* à partir du plasmide pEX-A258-FS (envoyé par Eurofins Genomics) puis une digestion est réalisée en utilisant les enzymes *NdeI* et *EcoR*I pour cloner *fs* dans le vecteur pC. Ainsi, le gène *fs* (en orange) est exprimé de façon constitutive à partir du promoteur fort p_R (en rouge). A noter que le gène *cat* présent dans pC-FS a été tronqué par la restriction enzymatique.

e. Introduction des plasmides dans *E. coli* puis dans les divers châssis cyanobactériens

Les plasmides ainsi obtenus ont été introduits chez *E. coli* TOP10 par transformation puis chez les cyanobactéries par conjugaison en sélectionnant sur les clones résistants à la streptomycine et spectinomycine. Les constructions ont été vérifiées tout d'abord par PCR puis séquençage ADN avant et après propagation dans les cyanobactéries. Elles sont nommées pC-BS et pC-FS pour expression constitutive du gène codant pour la terpène synthase (clonage dans pC) et pT-BS et pT-FS pour expression thermorégulée du gène codant pour la terpène synthase (clonage dans pFC1). Comme cela sera démontré dans la suite de mon manuscrit, l'expression des gènes codants pour les terpènes synthases n'a pas d'effet néfaste sur la croissance des cyanobactéries utilisées dans mon étude. J'ai donc travaillé uniquement avec les plasmides d'expression constitutive des gènes codant pour les terpènes synthases.

4. Les vecteurs d'expression des gènes codant pour la limonène, la pinène et la santalène synthase

Les plasmides pC-LS, pC-PS et pC-SS permettant l'expression constitutive de la limonène, de la pinène et de la santalène synthase ont été obtenus de manière similaire par Encarnacion Diaz Santos (post-doctorante au laboratoire), c'est-à-dire par clonage après restriction *Nde*I - *Eco*RI des gènes codant pour les différentes terpènes synthases (ORF des plantes adaptées au biais de codons de *Synechocystis* PCC 6803 et synthétisées par Eurofins) dans le plasmide pC.

Les séquences codantes utilisées sont :

- Le gène (*ls*) codant pour la 4S-limonene synthase de *Mentha spicata* (menthe verte, GenBank : Q40322) sans les 168 premières paires de bases codant pour le peptide de localisation du chloroplaste (voir introduction Chapitre 2 VII. 5 et (Chenebault *et al.*, 2020)).
- Le gène (*ps*) codant pour la (+)-α-pinene synthase de *Pinus taeda* (pin à torche), GenBank : Q84KL3) sans les 48 premières paires de bases codant pour le peptide de localisation du chloroplaste (voir introduction Chapitre 2 VII. 5.).
- Le gène (*ss*) codant pour la santalène synthase de *Santalum album* (Santal blanc indien, GenBank : HQ343276.1).

Ces plasmides ont été introduits chez *E. coli* TOP10 par transformation puis dans les cyanobactéries par conjugaison (Mermet-Bouvier and Chauvat, 1994; Chenebault *et al.*, 2020). Les conjugants obtenus ont été vérifiés par PCR et séquençage ADN.

Afin de mesurer la production de terpènes dans les 5 châssis cyanobactériens, il était important de mettre au point une méthode pour quantifier ces molécules.

II. Mise au point du protocole de quantification des terpènes par GC-MS

1. Principe de la quantification et description de la méthode GC-MS

Comme cela a été réalisé par de nombreux auteurs (Davies *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2017; Lin *et al.*, 2017; Sebesta and Peebles, 2019; Dienst *et al.*, 2020) et nous-même (Chenebault *et al.*, 2020), la souche de cyanobactérie contenant un plasmide codant pour une terpène synthase est cultivée en présence de dodécane. Cette molécule hydrophobe va piéger les terpènes (volatiles) produits par la souche. Lorsque la culture n'est pas agitée, le dodécane forme une couche au-dessus de la culture et peut être prélevé. Plusieurs échantillons sont ainsi prélevés à différents temps au cours de la culture afin de quantifier par GC-MS le terpène produit.

La méthode de GC-MS permet d'identifier et de quantifier les composés volatils d'une solution. Elle se décompose en une chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (Figure 40) :

- La première étape (la chromatographie en phase gazeuse) permet la séparation des molécules. Elle est composée d'un injecteur permettant la volatilisation des molécules de l'échantillon dans la phase mobile gazeuse (ici de l'hélium) ainsi que d'une colonne d'affinité placée dans un four. Ainsi, deux facteurs permettent la séparation des molécules. Tout d'abord, la température du four augmente peu à peu permettant la séparation des molécules selon leur volatilité, ensuite, ces molécules sont séparées en fonction de leur affinité avec la colonne. Cette affinité dépend de la polarité de la molécule et de celle de la phase stationnaire de la colonne.
- Le spectromètre de masse, permet l'identification des molécules grâce à leurs compositions en ions. Le spectromètre de masse est composé d'un ionisateur qui casse les molécules, libérant ainsi de nombreux ions spécifiques de la molécule cassée. Ces ions vont osciller au long du quadripôle soumis à une tension continue (U) et une tension alternative ou variable (V) ce qui permettra leur séparation progressive selon leurs rapports masse/charge. Un détecteur permet la conversion des ions en signal électrique.

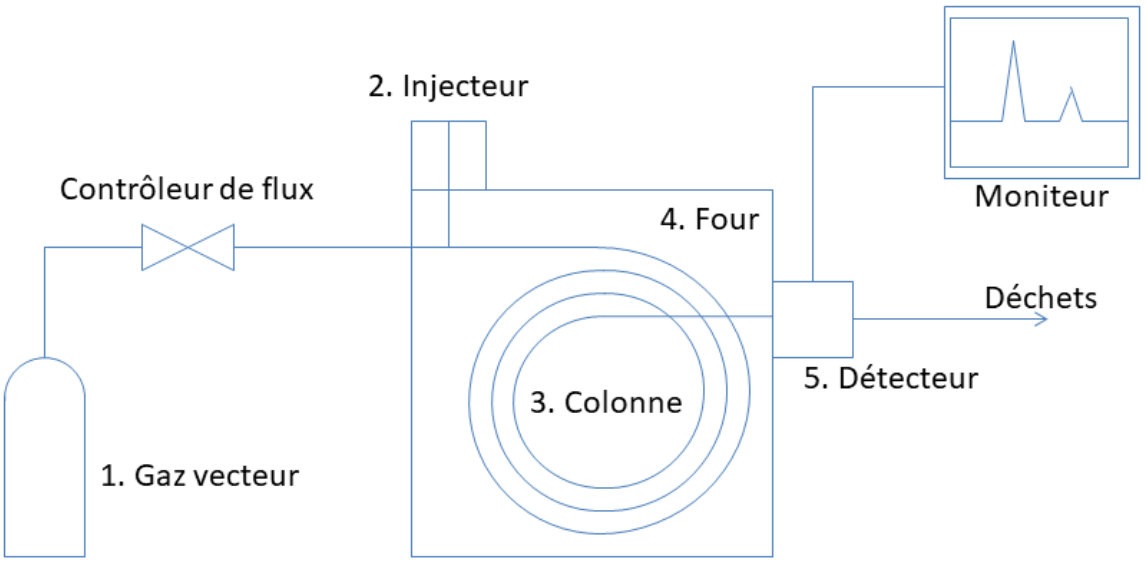


Figure 40 Réprésentation schématique d'une chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse

Les protocoles de quantification des terpènes ont été developpés avec l'aide d'autres étudiants du laboratoire (Encarnacion Diaz-Santos et Xavier Kammerscheit) et de l'équipe Analyses du SCBM (Service de Chimie Bio-Organique et de Marquage).

2. Détermination des paramètres à utiliser pour la détection et la quantification par GC-MS

a. Les paramètres utilisés

Une GC-MS (Trace1300 (GC) + ISQ LT (MS), ThermoScientific), équipée d'une colonne TG-5 MS (phase stationnaire : 5% phényl polysilphénylène-siloxane ; dimension : 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) a été utilisée pour quantifier les terpènes produits. Les paramètres ci-dessous ont été établis après une étude bibliographique (Davies *et al.*, 2014; Halfmann *et al.*, 2014a; Kiyota *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2016).
Pour la quantification des terpènes (bisabolène, farnésène, limonène, pinène et santalène), le protocole suivant a été utilisé : l'Helium (He : 1 mL/min) est utilisé comme gaz vecteur, le volume d'injection de l'échantillon est de 1 µL, la tension d'ionisation est de 70 eV. Pour ce qui est de la température de la ligne de transfert, celle-ci est fixée à 250°C, et la température de la source d'ions à 200°C. L'analyse a été effectuée dans le mode de surveillance ionique masse/charge (m/z) = 50-650 afin de pouvoir regarder la composition en ions des différentes molécules et donc les identifier. Chaque molécule a une composition bien particulière (Figure 41).

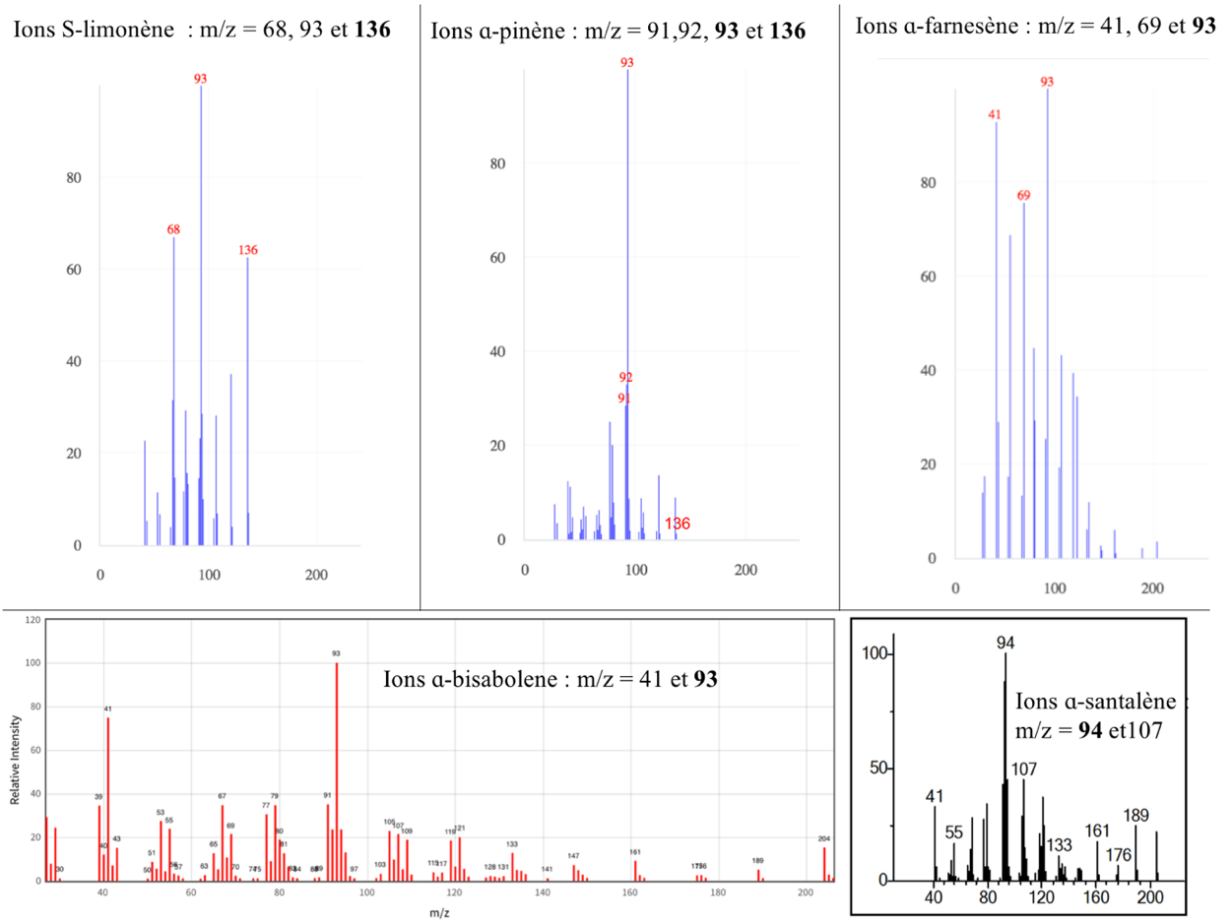


Figure 41 Les spectres d'ion des terpènes d'intérêt

Les autres paramètres ont été déterminés après les expériences préliminaires décrites ci-dessous.

b. Expériences préliminaires servant à définir la méthode de quantification

i. Paramètres à déterminer

Avant de commencer le dosage des terpènes par GC-MS, il est nécessaire :

- D'identifier les éventuels signaux parasites inhérents à la présence d'une couche de dodécane à la surface des cultures de cyanobactéries qui peuvent potentiellement « relarguer » des composés hydrophobes. Si c'est le cas, il faut vérifier que ces signaux parasites ne perturbent pas la qualité du chromatogramme en caractérisant les différents pics d'intérêt et les pics parasites (temps de rétention, aire, largeur à la base…).

- D’optimiser la qualité du chromatogramme :
    - En diminuant le débit de la phase mobile (augmentation de la finesse des pics),
    - En modifiant le gradient de température (augmentation de la séparation des pics),
    - En modifiant le mode split/splitless (augmentation de la finesse et optimisation de la forme des pics) : En mode split, une grande partie de l’échantillon est injectée, vaporisée et mélangée au gaz vecteur avant d’être éliminée de l’injecteur par une vanne de fuite. Le mode split est utilisé pour des échantillons à forte concentration. A l’inverse, la vanne de fuite est fermée en mode splitless et la totalité de l’échantillon injecté est transférée dans la colonne. Cela est préconisé pour des échantillons très dilués,
    - En s’intéressant à un ion (défini par son rapport m/z) particulier du terpène d’intérêt (l’ion 136 pour le limonène et l’ion 93 pour le pinène, le bisabolène, le farnésène et le santalène, Figure 42), il est possible d’extraire un chromatogramme montrant uniquement le signal d’un ion.

En augmentant la séparation, la finesse et la forme des pics, on améliore les qualités quantitatives de la chromatographie, puisque ces paramètres ont une influence sur l’intégration réalisée lors du calcul des surfaces de chacun des pics d’intérêt.

Pour la quantification de chaque terpène, un standard interne de concentration connu est ajouté afin de standardiser les mesures et minimiser les variations dues à des fluctuations lors de l’injection, de la séparation et de la détection des terpènes. Ce standard interne étant de concentration toujours identique, il permet également d’anticiper des problèmes sur l’appareillage.

Les manipulations préliminaires ont donc été réalisées en injectant en GC-MS :

- Du dodécane qui a été en contact avec une souche de cyanobactérie sauvage (permet d’identifier d’éventuels signaux parasites dus au métabolisme de la cyanobactérie)
- Du dodécane pur
- Du dodécane contenant le terpène d’intérêt (standard commercial)
- Du dodécane contenant le standard interne pur
- Du dodécane contenant le terpène d’intérêt et le standard interne

ii. Choix des standards internes

Les différents standards internes ont été choisis en se basant sur la littérature et en respectant les conditions suivantes :

- Les propriétés physico-chimiques et structurales du standard interne sont proches du terpène à doser (Tableau 13) :
    - Utilisation du pinène pour le dosage du limonène et vice-versa car ce sont tous les deux des monoterpènes C10 cycliques
    - Utilisation du β-caryophyllène pour le dosage du bisabolène et du farnésène car ce sont des sesquiterpènes C15
    - Utilisation du cis/trans-nérolidol pour le dosage du santalène. Le nérolidol est un sesquiterpenoides (groupement alcool) alors que le santalène est un sesquiterpène. L'objectif final étant de produire des santalols (constituant majeur de l'huile de bois de santal) et non du santalène, j'ai choisi de réaliser mon dosage avec un sesquiterpène alcool comme standard interne. De plus, pour le dosage du santalène, différents standards internes ont été testés et seul le nérolidol a un temps de rétention différent des nombreux terpènes/terpénoïdes présents dans l'huile essentielle de bois de santal.

- Le temps de rétention du standard interne doit être suffisamment différent de celui du terpène à doser et/ou des éventuels terpènes/terpénoïdes présents dans l'huile essentielle ou le mix d'isomères utilisé pour la gamme d'étalonnage (Tableau 13).

Tableau 13 Caractéristiques des terpènes à quantifier et de leurs standards internes. * temps de rétention avec les programmes de four définis dans les paragraphes suivants.

Terpène à quantifier	Nombre de carbone	Masse molaire (g/mol)	Température d'ébullition (°C)	Ion (m/z) majoritaire	Temps de rétention*
Limonène	10	136	177-178	68, 93 et 136	6,89
Pinène	10	136	155-156	93 et 136	5,41
Bisabolène	15	204	262-280	41 et 93	20,83
Farnésène	15	204	260-280	41, 69 et 93	19,6
β-caryophyllène	15	204	262-264	41, 69, 93 et 133	17,31
α-santalène	15	204	251-253	94 et 107	17,23
α-exo-bergamotène	15	204	258-260	93 et 119	17,62
β-santalène	15	204	261-262	94 et 122	18,36
Epi-β-santalène	15	204	261-262	94 et 122	19,1
Cis et trans-nérolidol	15	222	263-266	41, 69 et 93	20,5 et 21,55

iii. Les paramètres retenus pour la quantification du limonène et du pinène

Quantification du limonène

Ces expériences préliminaires ont permis de définir les programmes du four et les rapports de division (split) suivants.

Pour la quantification du limonène (réalisée par Xavier-Kammerscheit, doctorant au laboratoire) et du pinène (réalisée par moi-même), l'injection a été effectuée avec un split de 25:1 (limonène) ou 5:1 (pinène). Le programme du four est le suivant :

- 50°C pendant 1 min,
- Passage de 50°C à 150°C à raison de 10°C/min
- Passage de 150°C à 250°C à raison de 20°C/min
- 250°C pendant 5min

Ce programme permet la séparation du pic de S-(-)-limonène (temps de rétention de 6,89 minutes) de celui d'α-pinène (temps de rétention de 5,42 minutes).

En utilisant ce programme four avec un split de 25:1 et en regardant les données pour les ions m/z = 136, les deux pics sont correctement définis, on peut quantifier la production de limonène par nos cyanobactéries et il n'y a pas de pic parasite du au relargage de molécules par les cyanobactéries.

Quantification du pinène

Pour la quantification du pinène qui, comme cela sera décrit dans la suite de ce document, est synthétisé en quantité plus faible, il fallait développer un protocole de quantification avec un seuil de détection plus bas. Par conséquent, j'ai modifié le split (5 : 1) afin d'injecter une plus grande partie de l'échantillon et j'ai également choisi de m'intéresser spécifiquement à l'ion m/z = 93 car c'est celui qui est le plus présent dans la molécule de pinène. En utilisant ces paramètres et le programme du four décrit ci-dessus, j'ai pu obtenir une bonne séparation de la molécule d'α-pinène et de celle de S-(-)-limonène (standard interne). Les pics étaient bien définis, il n'y avait pas de pic parasite et le seuil de détection était assez bas pour que je puisse quantifier la production de pinène par mes souches de cyanobactéries.

iv. Les paramètres retenus pour la quantification du bisabolène et du farnésène

Pour la quantification du bisabolène et du farnésène, ces paramètres ont été plus difficiles à définir car les standards utilisés (mixtures d'isomères contenant du farnésène et du bisabolène) contiennent de nombreux isomères (Figures 42).

Détermination du programme du four

Il était important de définir un programme de four qui permettait la séparation des différentes molécules contenues dans les standards. Pour ce faire, deux programmes extraits de la littérature ont été testés pour séparer, dans un premier temps, les différentes molécules contenues dans le mix d'isomères de farnésène. Le programme 1 est extrait de (Diaz-Chavez *et al.*, 2013) et dure

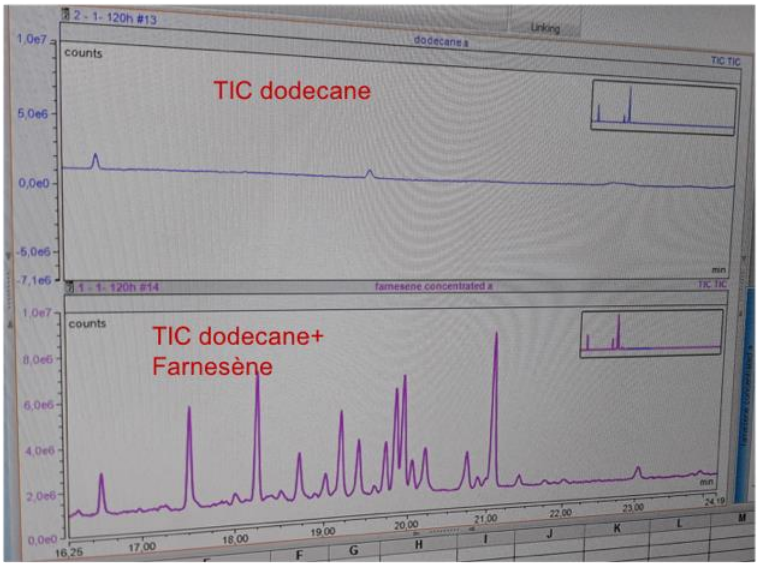
49,4 min et le programme 2 est similaire au programme utilisé dans l'article (Lee *et al.*, 2017) et dure 31 minutes.

On remarque que les pics sont bien mieux définis et séparés (1er pic à 17,5 minutes et le dernier à 23 min) dans le programme 1 que dans le programme 2 (Figure 42). J'ai donc choisi de travailler avec le programme 1.

Injection de dodecane ou de dodecane + mix de farnesène à 0,813g/L

Programme 1

Maintenir à	40°C	3 min
10°C/min	130°C	9 min
2°C/min	180°C	25 min
50°C/min	300°C	2,4 min
Maintenir à	300°C	10 min
	Total	49,4 min



Programme 2

Maintenir à	50°C	1 min
10°C/min	200°C	15 min
20°C/min	300°C	5 min
Maintenir à	300°C	10 min
	Total	31 min

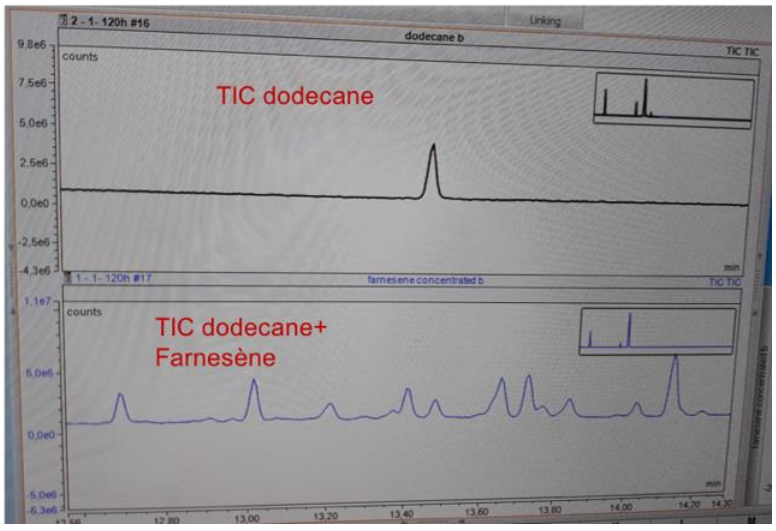


Figure 42 Deux programmes testés pour la séparation des différentes molécules contenues dans le mix d'isomères de farnésène.

Par la suite, j'ai testé 3 split différents (5:1, 10:1 et 25:1). Il faut savoir que, plus on augmente le split, moins il y a de pics parasites et moins les pics risquent de « s'étaler » à forte concentration. Cependant, en l'augmentant trop, on risque aussi d'augmenter notre limite de détection et donc de ne pas voir de faibles productions.
J'ai travaillé avec une concentration médiane (C_{med} valant 25 mg/$L_{dodécane}$ du mix composé de nombreuses molécules) afin de définir le split et de trouver l'ion (*ie.* rapport masse/charge) adapté à la quantification du farnésène et du bisabolène. Les ions les plus présents dans ces molécules sont les ions 41, 69 et 93 (Figure 40). 10 mg/L de trans-caryophyllène (IS) ont été ajoutés à chaque échantillon et le programme de four 1 a été utilisé.

En regardant tous les ions (canal TIC, Figure 43, panel du haut), on voit les différents pics de molécules constituant le mix d'isomères. Seulement, la ligne de base n'est pas stable (surtout à split 5 :1) car le pic dodécane sort juste avant mes molécules. On voit aussi que les pics sortent à peine du bruit de fond (surtout à split 1:25). On ne peut donc pas travailler en TIC.

En regardant les données obtenues pour l'ion m/z = 41 et m/z =69 (Figure 43, panel milieu et bas), on voit différents pics de molécules constituant le mix d'isomères. Cependant, ces pics sortent à peine du bruit de fond (même au split 5 :1), les pics sont petits et mal définis. Ces ions ne peuvent pas être utilisés pour la détection du bisabolène et du farnésène.
Il est aussi important de noter que le pic de caryophyllène (IS) est asymétrique (entouré en orange). Il semblerait qu'une molécule du mix d'isomères ait un temps de rétention similaire à celui du standard interne.

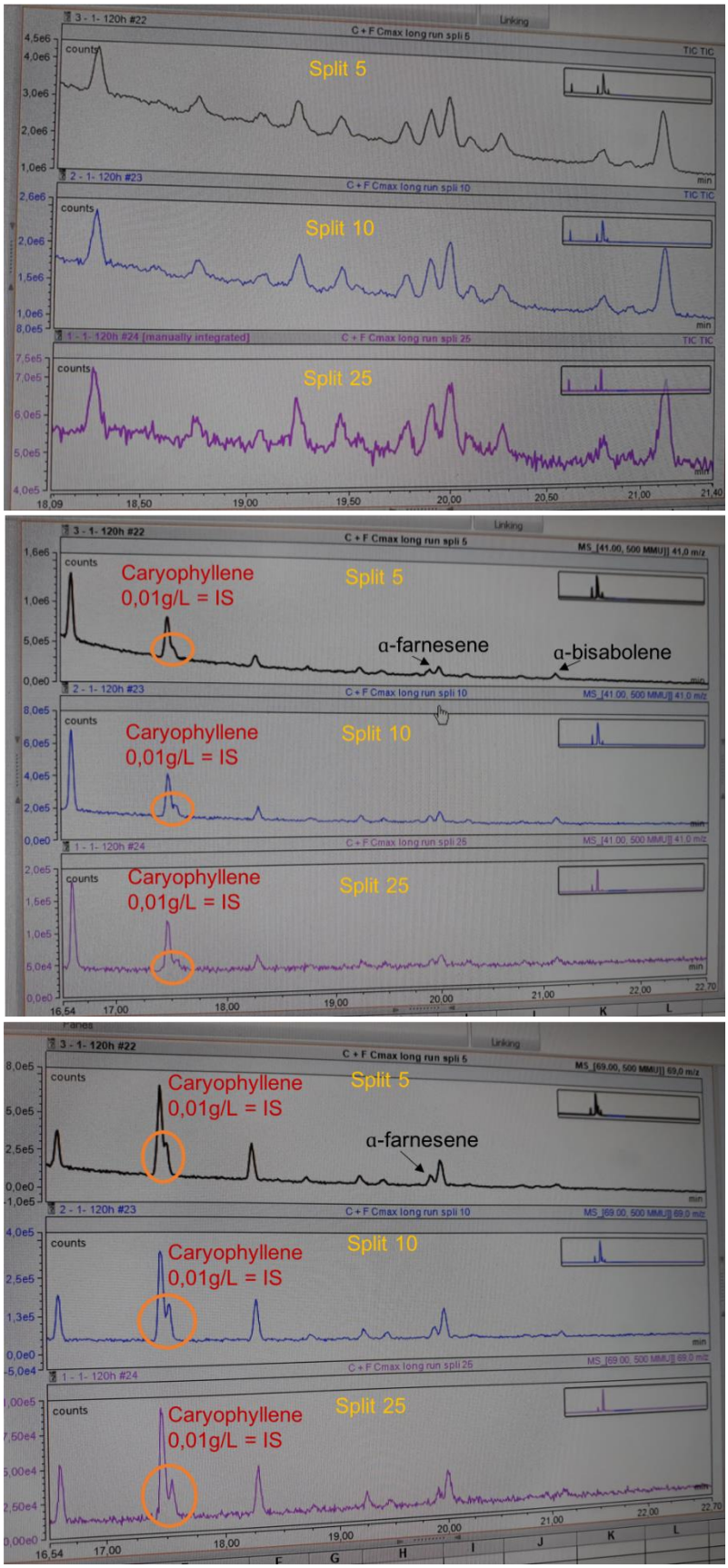


Figure 43 Chromatogramme obtenu en injectant C_{med} (25mg/ $L_{dodécane}$) à différents splits (5:1, 10:1 et 25:1) et en extrayant les données obtenues pour le canal TIC (tous les ions ; haut), l'ion 41 (milieu) et l'ion 69 (bas).

Enfin, en regardant les données obtenues pour l'ion m/z = 93 (Figure 44), on voit de nombreux pics qui n'étaient pas visibles en extrayant les données à m/z = 41 et m/z = 69. Il semble donc que l'ion m/z = 93 soit le plus adapté à la quantification du bisabolène et du farnésène. De plus, la ligne de base est stable. J'ai donc choisi d'extraire les données correspondantes à l'ion m/z = 93 et de travailler avec un split d'injection de 5:1.

Cependant, le pic de caryophyllène est toujours asymétrique (entouré en orange) et il y a donc une molécule présente dans le mix d'isomères qui a un temps de rétention similaire au caryophyllène. De plus, 3 isomères de farnésène (dont l'α-farnésène) ont un temps de rétention très proche (autour de 19,8 minutes ; Figure 44). Afin de ne pas fausser les résultats, il était donc nécessaire de modifier le programme du four afin que ces molécules aient un temps de rétention différent. De ce fait, le passage de 130°C à 150°C se fait à raison de 1°C par minute au lieu de 2°C par minute. Ainsi, le pic de la molécule présente dans le mix est séparé du pic du standard interne et l'ensemble des pics est mieux séparé (Figure 45).

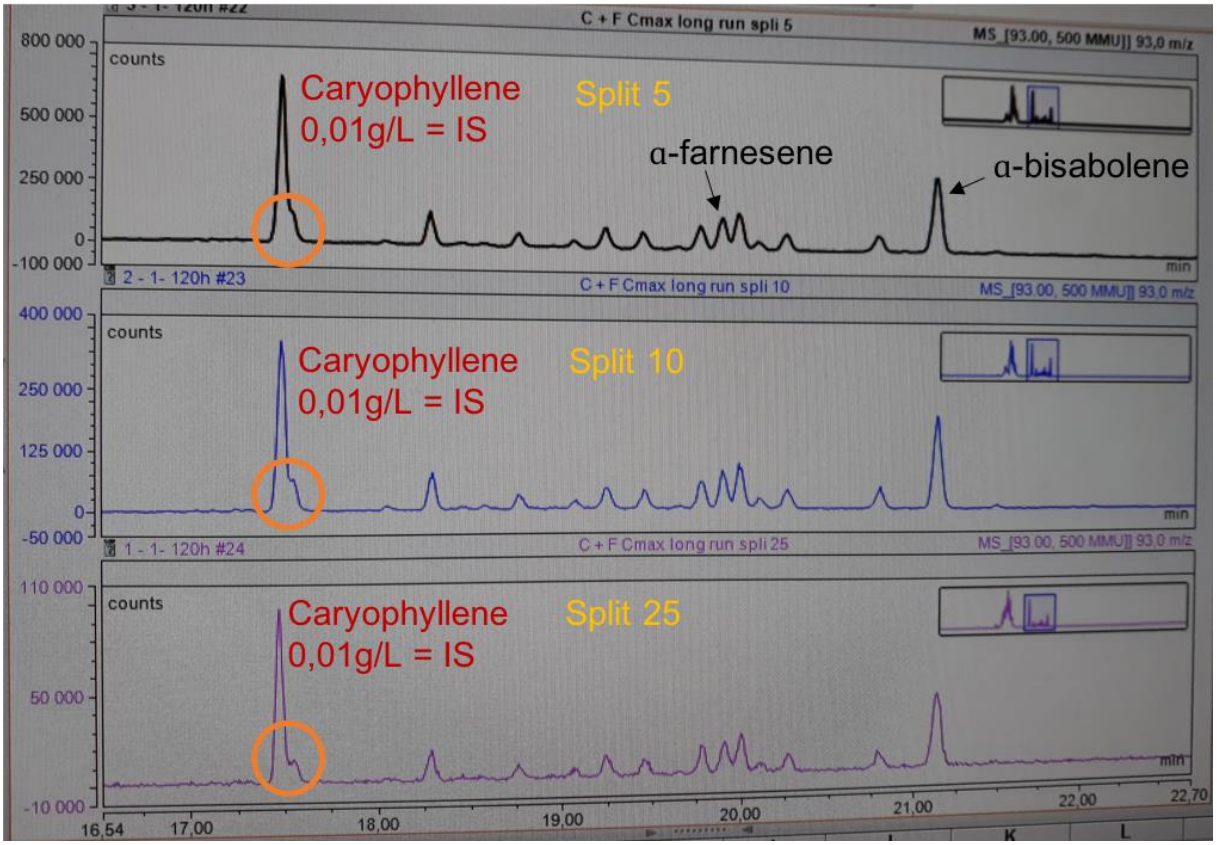


Figure 44 Chromatogramme obtenu en injectant C_{med} (25mg/ $L_{dodécane}$) à différents splits (5:1, 10:1 et 25:1) et en extrayant les données obtenues pour l'ion 93. Le programme 2°C/min a été utilisé.

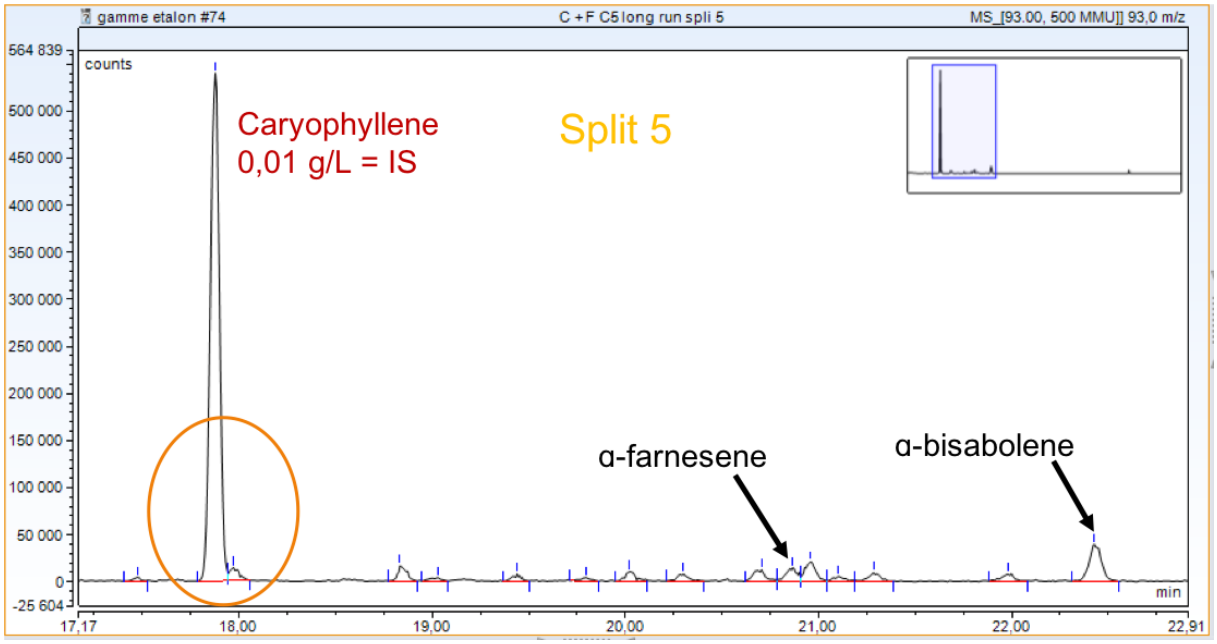


Figure 45 Chromatogramme obtenu en injectant 38,6 mg/ $L_{dodécane}$ du mix d'isomère du farnésène avec un split 5:1 et extrayant les données obtenues pour l'ion 93. Le programme 1°C/min a été utilisé.

Dans un souci pratique (nombre d'échantillons pouvant être injectés par jour), le dernier cycle du four monte jusqu'à 270°C au lieu de 300°C et reste à cette température pendant 5 minutes au lieu de 10 minutes. Ce programme reste cohérent avec ceux précédemment utilisés pour la quantification du farnésène et du bisabolène (Peralta-Yahya *et al.*, 2011; Halfmann *et al.*, 2014a; Yang *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2017).

Le programme de four utilisé pour analyser les productions est donc le suivant :

- 40°C pendant 3 min
- Passage de 40°C à 130°C à raison de 10°C/min
- Passage de 130°C à 150°C à raison de 1°C/min
- Passage de 150°C à 270°C à raison de 50°C/min
- 270°C pendant 5 min

Ce programme dure 39 minutes et donc pour des raisons pratiques (nombre d'échantillons pouvant être injecté par jour), le passage de 130°C à 150°C a été fait à raison de 1°C/min pour la réalisation de la gamme (avec le mix contenant de nombreux isomères) mais a ensuite été augmenté à 2°C/min pour la quantification de la concentration en terpènes dans les échantillons (les souches ne produisent que de l'α-farnésène ou que de l'E-α-bisabolène). Cela n'impacte pas la qualité des résultats. Pour en être sure, j'ai injecté de nombreux échantillons de dodécane prélevés dans la culture (à plusieurs temps) des souches de cyanobactéries possèdant le plasmide pC-BS ou pC-FS et je les ai injectés avec le programme « 1°C/min » et le programme «2°C/min ».

v. Les paramètres retenus pour le dosage du santalène

Comme dans le cas du dosage du farnésène et du bisabolène, l'huile de bois de santal contient de nombreux isomères (surtout des santalol) qu'il faut séparer (temps de rétention différents) afin de permettre une quantification juste de chacun. De plus, les santalène (α, β et *epi*-β) sont présents en très faible quantité dans l'huile, il faut par conséquent injecter de forte concentration d'huile et utiliser un split faible (5:1) pour les détecter.

Le programme utilisé est similaire à celui de (Diaz-Chavez *et al.*, 2013) et a été déterminé en réalisant des manipulations similaires à celles réalisées pour le dosage du farnésène et du bisabolène.
Finalement, les paramètres suivants ont été retenus :

- Un split de 5:1
- Une extraction des données à m/z = 93
- Le programme de four :
    - 40°C pendant 3 min
    - Passage de 40°C à 130°C à 10°C/min
    - Passage de 130°C à 150°C à 2°C/min
    - Passage de 150°C à 270°C à 50°C/min
    - 270°C pendant 5 min

Une fois ces expériences préliminaires effectuées et les paramètres importants déterminés, une gamme étalon est réalisée afin de quantifier les terpènes produits par les souches de cyanobactéries en fonction de son aire et de celle du standard interne. La réalisation d'une gamme étalon permet également de déterminer la limite de détection et de linéarité de la méthode. Cela permet également de s'assurer de la répétabilité/reproductibilité et la justesse de la méthode.

3. Réalisation des gammes étalons

a. Méthode utilisée pour la quantification des terpènes

Les gammes étalons ont été réalisées comme décrit dans le schéma ci-dessous (Figure 46).

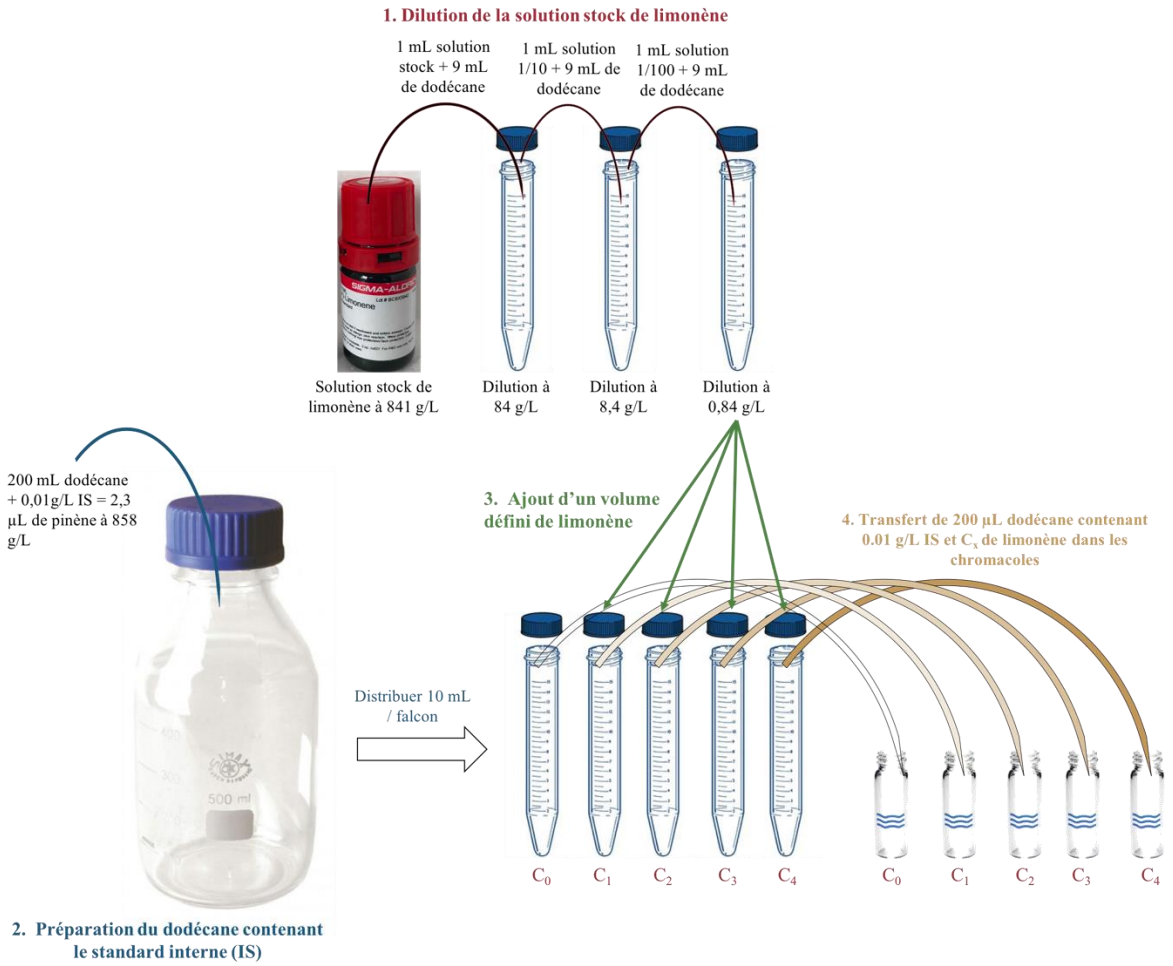


Figure 46 Réalisation de la gamme étalon nécessaire à la quantification des terpènes d'intérêt. Ici, le schéma montre la réalisation de la gamme étalon du S-(-)-limonène.

Les différents chromacoles, contenant des concentrations croissantes en standard du terpène à quantifier et une concentration constante en standard interne, sont injectés en GC-MS en utilisant les paramètres définis ci-dessus. Les aires du/des pics du/des terpène(s) d'intérêt ainsi que l'aire du standard interne sont mesurées. Les courbes étalons sont tracées comme suit : en abscisse, la concentration en terpène d'intérêt et en ordonnées, le rapport Aire terpène d'intérêt/Aire standard interne. Le coefficient directeur de la droite ainsi tracée permet de faire le lien entre la concentration en un terpène donné dans le dodécane et l'aire de son pic tout en normalisant cette aire avec l'aire du standard interne (toujours de même concentration mais l'aire peut varier en fonction de la réalisation de l'injection et de la détection des ions).

Par la suite, afin d'étudier la production de terpènes au cours du temps, 20% (Vol/Vol_{tot}) de dodécane ont été ajoutés au milieu de culture des cyanobactéries. Les terpènes produits par les

cyanobactéries sont donc concentrés 5 fois dans le dodécane par rapport à leur concentration dans le milieu de culture. La concentration en mg/$L_{dodécane}$ est donc égale à 5 x la concentration en mg/$L_{culture}$. Tous les résultats de production pour chaque cyanobactérie qui seront présentés dans la suite le chapitre II et III des résultats seront exprimés en mg/$L_{culture}$ mais les courbes étalons sont réalisées en exprimant la concentration en mg/$L_{dodécane}$. Je détaillerai les calculs permettant de calculer la concentration en mg/$L_{culture}$ dans la suite de mon manuscrit.

b. Réalisation de la gamme étalon pour la quantification du limonène

Le tableau en annexe 6 montre les concentrations en limonène utilisées pour réaliser la gamme étalon et les résultats obtenus. La courbe d'étalonnage a un coefficient directeur de 145,1 (Figure 47). Pour obtenir la concentration en limonène dans le dodécane, il faut donc diviser le rapport Aire pic limonène/Aire pic pinène par 145,1.
La limite de détection est de 0,1 mg/$L_{dodécane}$ soit 0,02 mg/$L_{culture}$. Par ailleurs, la droite reste linéaire jusqu'à 100 mg/$L_{dodécane}$ soit 20 mg/$L_{culture}$.

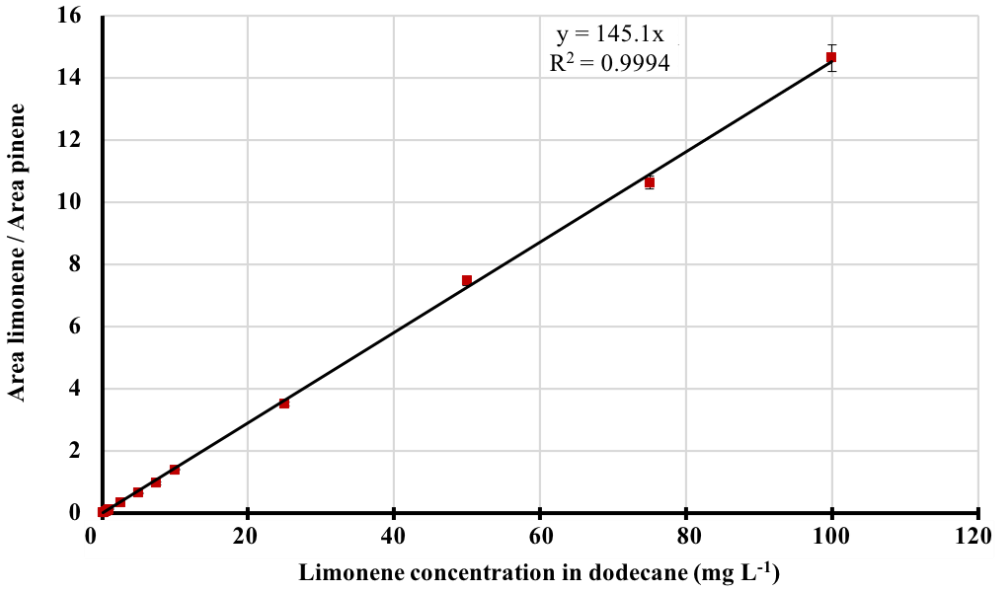


Figure 47 Courbe étalon permettant la quantification du S-limonène.

Le tableau en annexe 6 montre également la variation des aires obtenues pour le pinène (de 19379 à 36994) alors que chaque échantillon contient la même concentration en pinène. Les variations proviennent donc de l'injection, séparation et quantification par la GC-MS. C'est à cause de ces variations sur l'appareillage qu'il est nécessaire de supplémenter chacun de nos échantillons avec un standard interne de même concentration. Ainsi, il est possible de normaliser l'aire obtenue pour le limonène par celle obtenue pour le pinène.

c. Réalisation de la gamme étalon pour la quantification du pinène

La courbe étalon permettant la quantification du pinène a été réalisée de la même manière que celle pour la quantification du limonène, c'est-à-dire par injection de concentrations croissantes en pinène et une concentration fixe (10 mg/L) de standard interne (limonène). Le tableau en

annexe 6 détaille les concentrations utilisées et les résultats d'aire obtenus. Nous avons choisi d'injecter seulement de faibles concentrations de pinène pour réaliser la gamme car nos productions en pinène sont très faibles. Le coefficient directeur de la droite est de 223,15 (Figure 48).

La limite de détection est de 0,1 mg/$L_{dodécane}$ soit 0,02 mg/$L_{culture}$. Par ailleurs, la courbe reste linéaire jusqu'à 5 mg/$L_{dodécane}$ soit 1 mg/$L_{culture}$.

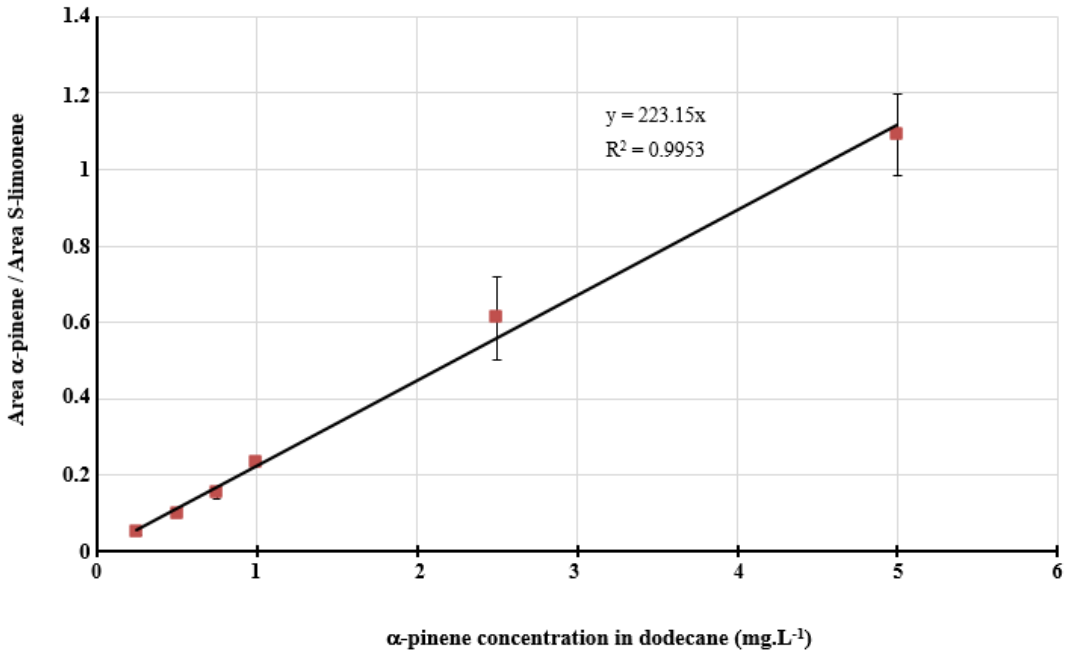


Figure 48 Courbe étalon permettant la quantification de l'α-pinène.

d. Réalisation de la gamme étalon pour la quantification de l'E-α-bisabolène et de l'α-farnésène en utilisant un mix d'isomères

Pour la quantification de l'E-α-bisabolène et de l'α-farnésène, aucun standard pur n'existe. Un mix contenant de nombreux isomères a par conséquent dû être utilisé. La proportion de chaque isomère dans le mix n'étant pas spécifiée, il a donc fallu la déterminer. Cette étape est nécessaire afin de déterminer la concentration en E-α-bisabolène et en α-farnésène ajoutée lors de l'addition du mix d'isomères.

i. Détermination de la quantité de chaque isomère dans le mix

Afin de déterminer la proportion de chaque molécule dans le mix d'isomères, j'ai utilisé la même stratégie que celle décrite dans (Wichmann *et al.*, 2018).

De fortes concentrations du mix d'isomères ont été injectées en GC-MS et les molécules d'intérêt (*ie* l'E-α-bisabolène et l'α-farnésène) ont été identifiées en se basant sur leur temps de rétention et leur spectre de masse. Le rapport de l'aire de ces pics sur l'aire totale de tous les

pics en mode d'identification TIC (détection de tous les ions) permet de déterminer le pourcentage massique et molaire (car tous les isomères du mix ont la même masse molaire = 204 g/mol) de chacun des terpènes dans le mix. Cette méthode m'a permis de déterminer qu'il y avait 19,31% ± 0,9% de E-α-bisabolène dans le mix d'isomères et 7,78% ± 0,37% d'α-farnésène dans ce même mix. Cela signifie que si on ajoute 1 g/L du mix d'isomères, on ajoutera 0,193 g/L de E-α-bisabolène et 0,0778 g/L d'α-farnésène.

ii. Réalisation de la gamme

Les courbes étalons permettant la quantification de l'E-α-bisabolène et de l'α-farnésène ont été réalisées de la même manière que celle pour la quantification du limonène, c'est-à-dire par injection de concentrations croissantes du mix d'isomères et d'une concentration fixe (10 mg/L) en standard interne (β-caryophyllène). Les tableaux en annexe 6 détaillent les concentrations utilisées et les résultats d'aire obtenus.

Le coefficient directeur de la droite étalon du bisabolène est 93,9 (Figure 49) et celui de la droite étalon du farnésène est 71,9 (Figure 50). La limite de détection est de 0,15 mg/$L_{dodécane}$ soit 0,03 mg/$L_{culture}$ pour le bisabolène et de 0,2 mg/$L_{dodécane}$ soit 0,04 mg/$L_{culture}$ pour le farnésène.

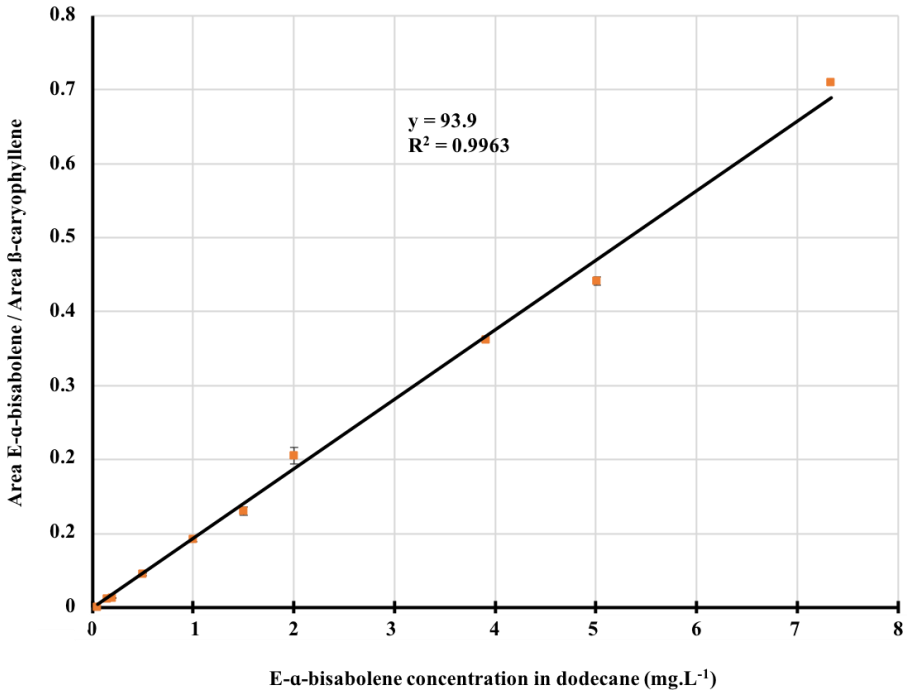


Figure 49 Courbe étalon permettant la quantification de l'E-α-bisabolène.

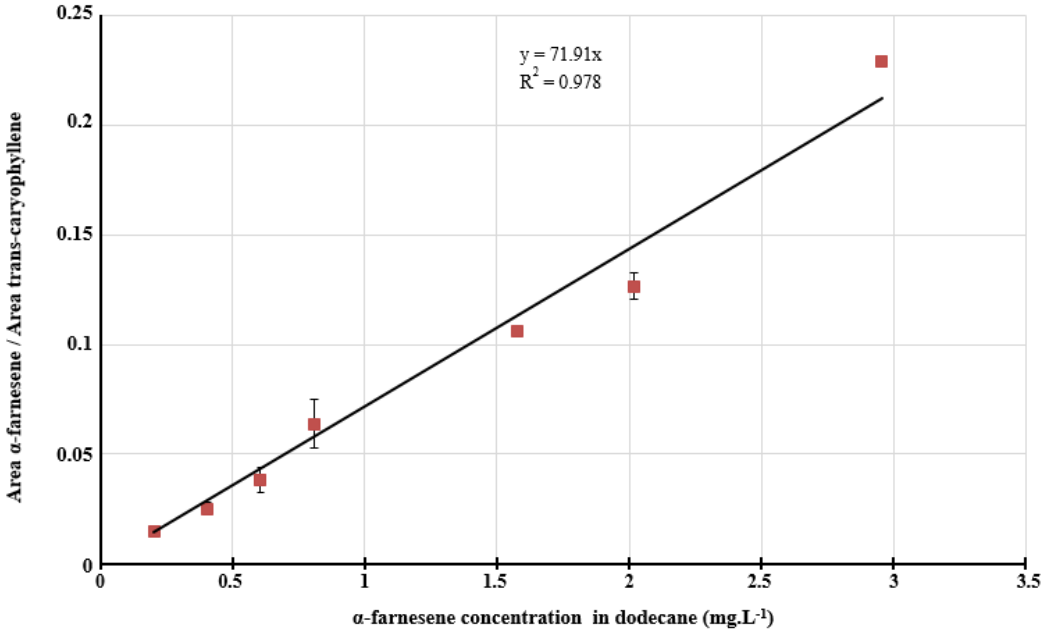


Figure 50 Courbe étalon permettant la quantification de l'α-farnésène.

e. Réalisation de la gamme étalon pour la quantification des isomères du santalène

Le protocole de quantification par GC-MS des santalènes est en train d'être mis au point. L'huile de bois de santal utilisée comme standard commercial contient de nombreux isomères de santalol et peu d'isomères de santalène. Il est donc peu aisé de déterminer la quantité de chaque isomère dans l'huile et de réaliser une gamme étalon afin de quantifier la production d'α-, β-, *epi*-β-santalène et d'α-*exo*-bergamotène.

4. Vérification de la justesse et de la répétabilité et reproductibilité des résultats

Afin de vérifier la justesse, la répétabilité et la reproductibilité des résultats, plusieurs concentrations connues en terpènes d'intérêt ont été injectées. Les échantillons à diverses concentrations ont :

- Soit été injectés à partir d'une même préparation (vérification de la justesse et de la répétabilité)
- Soit été injectés à partir d'une autre préparation (vérification de la reproductibilité).

Un échantillon de bisabolène à $C1 = 0{,}51\ mg/L_{dodécane}$ et un autre à $C2 = 1{,}02\ mg/L_{dodécane}$ ont été injectés plusieurs fois avec toujours 10 mg/L de standard interne (caryophyllène). Les valeurs obtenues sont détaillées dans le tableau 14 (C1 et C2).

Les résultats sont justes : le biais relatif (100 x ((M - Valeur réelle) /Valeur réelle) (en %)), c'est-à-dire l'écart entre la concentration trouvée et la concentration réelle, est de 0,7% pour l'échantillon à C1 et de 0,01% pour l'échantillon à C2.
Ces résultats sont également répétables : le coefficient de variation (CV = (Ecart-type/Moyenne) x 100)) est de 8% pour l'échantillon à C1 et de 5,5% pour l'échantillon à C2.

Par la suite, un autre jour, avec de nouvelles solutions, l'échantillon C2 a été préparé à nouveau et injecté plusieurs fois en GC-MS (tableau 14 ; C2bis).
On peut alors déterminer la reproductibilité du protocole de quantification en calculant le coefficient de variation (100 x (écart-type des résultats des deux expériences / moyenne des résultats des deux expériences)). Moyenne des deux expériences = 1 ,021 mg/$L_{dodécane}$ et Ecart-type = 0,091. On a donc un coefficient de variation de 8,9%. Ce protocole est donc reproductible.

Tableau 14 Concentrations calculées en extrayant les aires des pics de bisabolène et de caryophyllène obtenues pour C1, C2, C2bis. Cela permet de vérifier la justesse et la répétabilité du protocole de quantification du bisabolène par GC-MS.

	Concentration en bisabolène C1 (mg/$L_{dodécane}$)	Concentration en bisabolène C2 (mg/$L_{dodécane}$)	Concentration en bisabolène C2bis (mg/$L_{dodécane}$)
Essai 1	0,4028	0,9959	1,063
Essai 2	0,5398	1,0069	0,928
Essai 3	0,5079	0,9714	0,979
Essai 4	0,5282	0,9997	0,986
Essai 5	0,5075	1,1225	1,059
Essai 6	0,5424	1,0439	1,070
Essai 7	0,4789	1,0672	0,981
Essai 8	0,4845	1,0617	1,037
Essai 9	0,5556	1,0107	1,091
Essai 10	0,5165	0,9211	
Moyenne	**0,5064**	**1,0201**	**1,022**
Ecart-type	**0,0439**	**0,0562**	**0,055**

Des analyses similaires ont permis de vérifier la justesse, la répétabilité et la reproductibilité des protocoles permettant la quantification du limonène (vérification effectuée par Xavier Kammerscheit), du pinène, du farnésène et des santalènes.

5. Quantification de la production de terpènes par les cyanobactéries

a. Schéma général

La figure 51 ci-dessous montre les différentes étapes permettant de suivre l'évolution de la quantité de terpènes produits par nos souches de cyanobactéries exprimant un gène codant pour une terpène synthase.

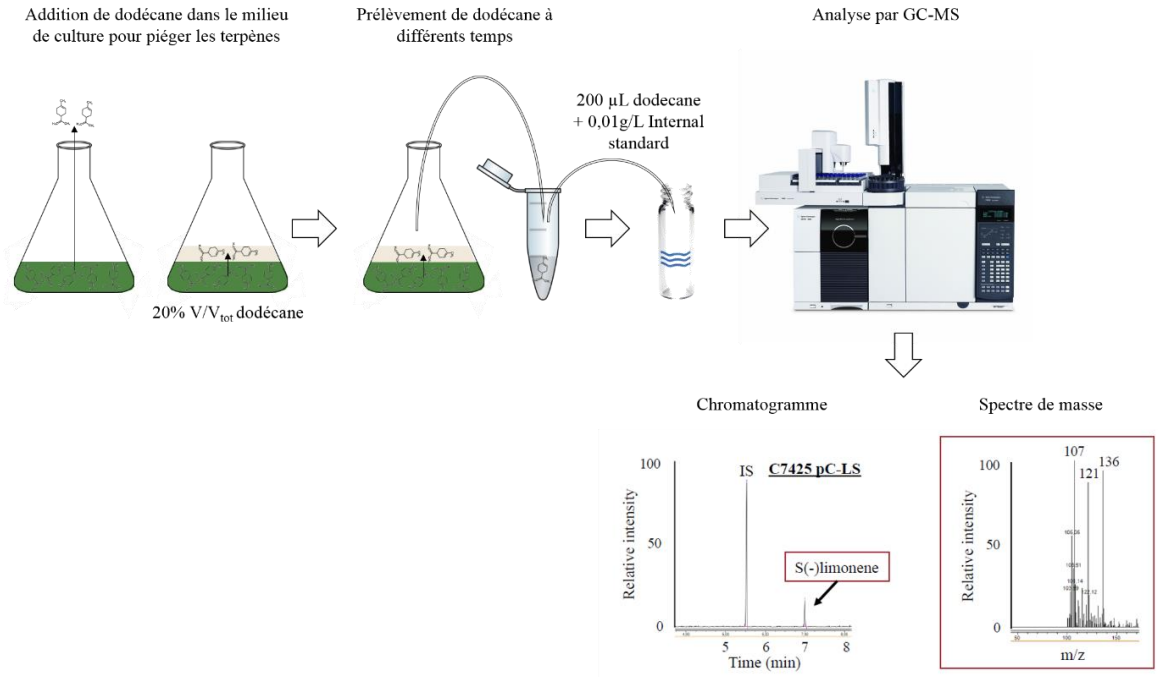


Figure 51 Schéma général du suivi de l'évolution de la quantité de terpènes produits par nos souches de cyanobactéries possédant un plasmide codant pour une terpène synthase.

b. Protocole de quantification de la production sur une longue durée

Dans un premier temps, le protocole présenté dans la Figure 52 a été utilisé afin d'évaluer la production de terpènes au cours de la croissance des cyanobactéries. Des échantillons de dodécane ont été prélevés régulièrement (tous les jours la première semaine puis un jour sur deux les deux semaines suivantes) afin de suivre l'évolution de la production.
Le premier échantillon est prélevé après 3 jours de culture car la production de terpènes avant ce jour n'est pas ou peu détectable et quantifiable par la méthode GC-MS.

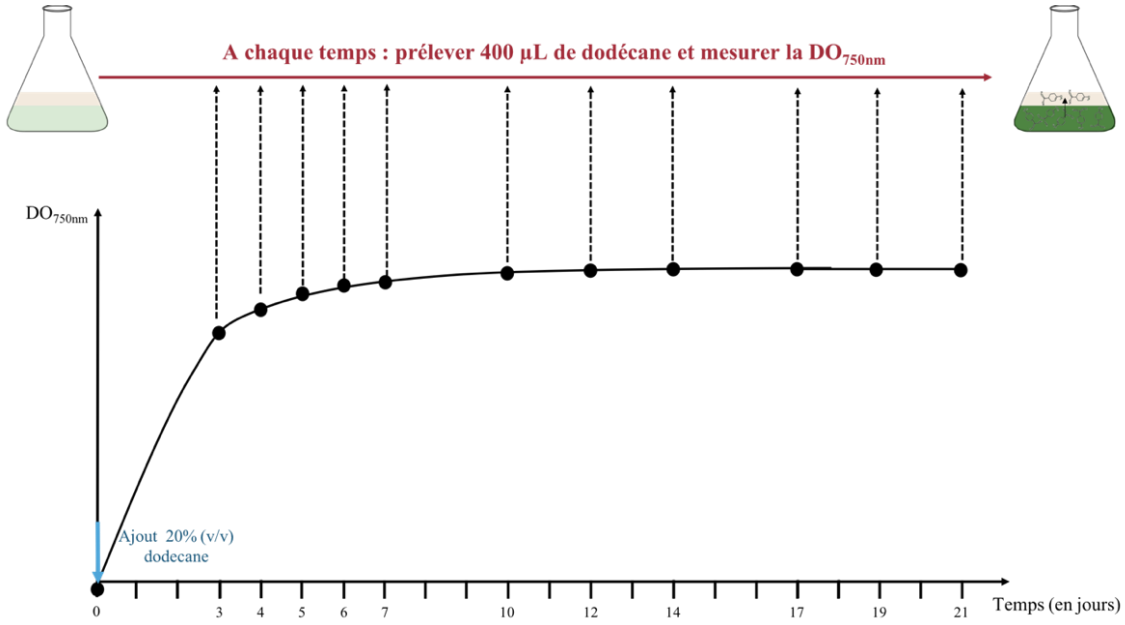


Figure 52 Protocole d'échantillonnage mis au point afin d'étudier les différentes phases de production

Ce protocole est très chronophage et ne permet pas de tester beaucoup de conditions à la fois. Il était néanmoins important de commencer par étudier les différentes phases de production d'une souche afin de développer des protocoles de criblage adéquats à la production d'un terpène dans une souche.

c. Préparation des échantillons de dodécane pour l'analyse GC-MS

Le dodécane collecté contient les terpènes produits par les différentes châssis cyanobactérien aux différents temps de prélèvement. 200 µL de ce dodécane et 10 mg/L du standard interne sont mélangés dans des chromacoles (Fisherbrand™ Flacon de 8 mm à col vissant, verre transparent de 1,65 mL avec un insert de 200 µL) et 1 µL de ce mélange est injecté en GC-MS.

d. Détermination de la quantité de terpènes produits par nos cyanobactéries en mg/$L_{culture}$

Le protocole GC-MS mis au point afin de suivre l'évolution de la production sur un temps long nécessitait de prélever régulièrement du dodécane afin de mesurer la quantité de terpènes produits par la cyanobactérie. Cela entraine une « augmentation artificielle » de la concentration en terpènes car ces derniers s'accumulent et se concentre dans le dodécane. Par conséquent, moins il y a de dodécane plus les terpènes sont concentrés dedans et donc le rapport mg/$L_{dodécane}$ = 5 x mg/$L_{culture}$ n'est plus valable. Nous avons donc dû prendre cela en compte dans nos calculs. Le tableau 15 décrit la procédure utilisée pour calculer la production en mg/$L_{culture}$ à partir des aires des pics obtenus en GC-MS.
Le coefficient est le coefficient directeur des différentes courbes étalons présentées précédemment. Le volume de dodécane varie selon que les expériences sont réalisées en erlenmeyers de 250 mL (50 mL de culture, utilisés pour des suivis sur le long terme) ou en erlenmeyers de 125 mL (25 mL de culture, utilisés pour les protocoles de criblage).

Tableau 15 Etapes permettant de déterminer la concentration en terpènes produits en mg/$L_{culture}$ à partir des aires des pics obtenus en GC-MS

Temps	Aire terpène	Aire IS	Concentration ($g/L_{dodécane}$)	$V_{dodécane}$ prelevé (mL)	$V_{dodécane}$ restant (mL)	$g_{dodécane}$= $g_{culture}$	$V_{culture}$ (mL)	Concentration ($g/L_{culture}$)
T_1	E_1	IS_1	$C_{1d} = (E_1 / IS_1)$ / coefficient	0,35	V_{d1} = 5 ou 10 mL	$g_1 = (C_{1d} \times V_{d1}) /1000$	V_{c1} = 25 ou 50 mL	$C_{c1} = g_1 \times V_{c1}$
T_2	E_2	IS_2	$C_{2d} = (E_2 / IS_2)$ / coefficient	0,35	$V_{d2} = V_{d1} - 0,35$	$g_2 = (C_{2d} \times V_{d2}) /1000$	$V_{c2} = V_{c1}$ – evaporation	$C_{C2} = g_2 \times V_{c2}$

Chapitre 2 : La production de terpènes-carburants par 5 souches de cyanobactéries ingéniérées

Comme indiqué dans l'avant-propos, j'ai fait le choix de présenter les résultats de production des 4 terpènes-carburants (limonène, pinène, farnésène et bisabolène) tout d'abord par châssis cyanobactérien car il est assez compliqué de comparer la production d'un terpène donné dans plusieurs souches poussant dans des conditions différentes. Il faut tester un grand nombre de conditions afin de définir lesquelles sont les plus adaptées à la production de chacun des terpènes pour chacune des souches. J'ai aussi fait ce choix afin de faciliter la lecture du manuscrit et car cela suit la stratégie de publications que nous avons établie. Je vais donc présenter les résultats de production des 4 terpènes successivement par *Synechocystis* PCC 6803, *Synechococcus* PCC 7942, *Synechococcus* PCC 7002 et *Cyanothece* PCC 7425. Pour finir, je présentrai la production de limonène par *Cyanothece* PCC 7822. Je discuterai les résultats et effectuerai une conclusion pour chacun des châssis.
Enfin, car c'est une étude menée à part et qui fera l'objet d'un article indépendant, je présenterai les résultats de production de santalène par plusieurs souches de cyanobactéries. Pour finir, je comparerai les résultats obtenus par les différentes souches et discuterai de l'intérêt de comparer la production par différents châssis terpènes à terpènes. J'analyserai également les stratégies qui pourraient être mises en place afin d'améliorer les productions.

I. Quantification de la production de mono et sesqui-terpènes par la souche modèle, *Synechocystis* PCC 6803

1. Intérêts de l'étude

Synechocystis PCC 6803 est la souche de cyanobactérie unicellulaire la plus étudiée et la plus utilisée pour la production de terpènes. Plusieurs études ont été réalisées sur la production de mono et sesquiterpenoides par cette cyanobactérie (Kiyota *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2017; Sebesta and Peebles, 2019; Dienst *et al.*, 2020). Les auteurs modifient généralement cette souche pour lui faire produire un terpène d'intérêt en utilisant les outils génétiques (plasmide ou insertion chromosomique) utilisés au sein de leur laboratoire. La production est souvent mesurée dans une seule condition de culture, sur quelques jours. Dans certaines publications, de nouvelles modifications génétiques sont réalisées afin de rediriger les flux métaboliques vers la synthèse des terpènes (Kiyota *et al.*, 2014; Englund *et al.*, 2015, 2018; Lin *et al.*, 2017; Sebesta and Peebles, 2019).
Les modes de production entre les laboratoires sont très variés et les rendements obtenus difficilement comparables (voir Chapitre 3. II. de l'introduction). Aucune étude réalisée jusqu'à présent ne compare la production de mono et de sesquiterpènes par *Synechocystis* PCC 6803

dans des conditions de culture similaires. Les divers paramètres de culture pour une photoproduction efficace de terpènes n'ont pas encore été identifiés. De plus, la stabilité des rendements de production, un paramètre important en biotechnologie, n'a que très peu été abordée ou mentionnée dans les articles. Les productions sont généralement présentées sur un temps court sans aucune indication sur leur évolution dans le temps.

Nous avons par conséquent décidé d'étudier (i) la production de 2 mono et de 2 sesquiterpènes par *Synechocystis* PCC 6803 ; (ii) l'influence des conditions de culture (température, lumière, source et abondance de carbone et d'azote) sur la production ainsi que (iii) la stabilité des constructions et productions au cours du temps. Enfin, après avoir sélectionner le terpène le plus intéressant à faire produire par la souche ainsi que les conditions adéquates, nous avons inactivé les voies rentrant en compétition (directe ou indirecte) avec la production de terpènes et tenté de rediriger les précurseurs vers la synthèse de nos terpènes d'intérêt.

2. Introduction des plasmides codant pour les terpènes synthases et phénotypes des souches productrices

Les plasmides pC-LS, pC-PS, pC-BS et pC-FS ainsi que le plasmide pC ont été introduits chez *Synechocystis* PCC 6803 par conjugaison (voir introduction chapitre II.V. et Matériels et Méthodes). La présence de ces plasmides a été vérifiée par PCR (Figure 53) et la séquence des gènes codant pour les terpènes synthases, ainsi que la séquence promotrice et le RBS permettant leurs expressions, ont été vérifiés par séquençage ADN.

Pour la suite de l'exposé des résultats, il a été défini que la souche de *Synechocystis* PCC 6803 productrice d'E-α-bisabolène correspond à la souche portant le plasmide pC-BS qui a été introduit par conjugaison. De même, la souche productrice de farnésène ou de limonène ou de pinène sont respectivement celles portant soit le plasmide pC-FS ou pC-LS ou pC-PS introduits par conjugaison.

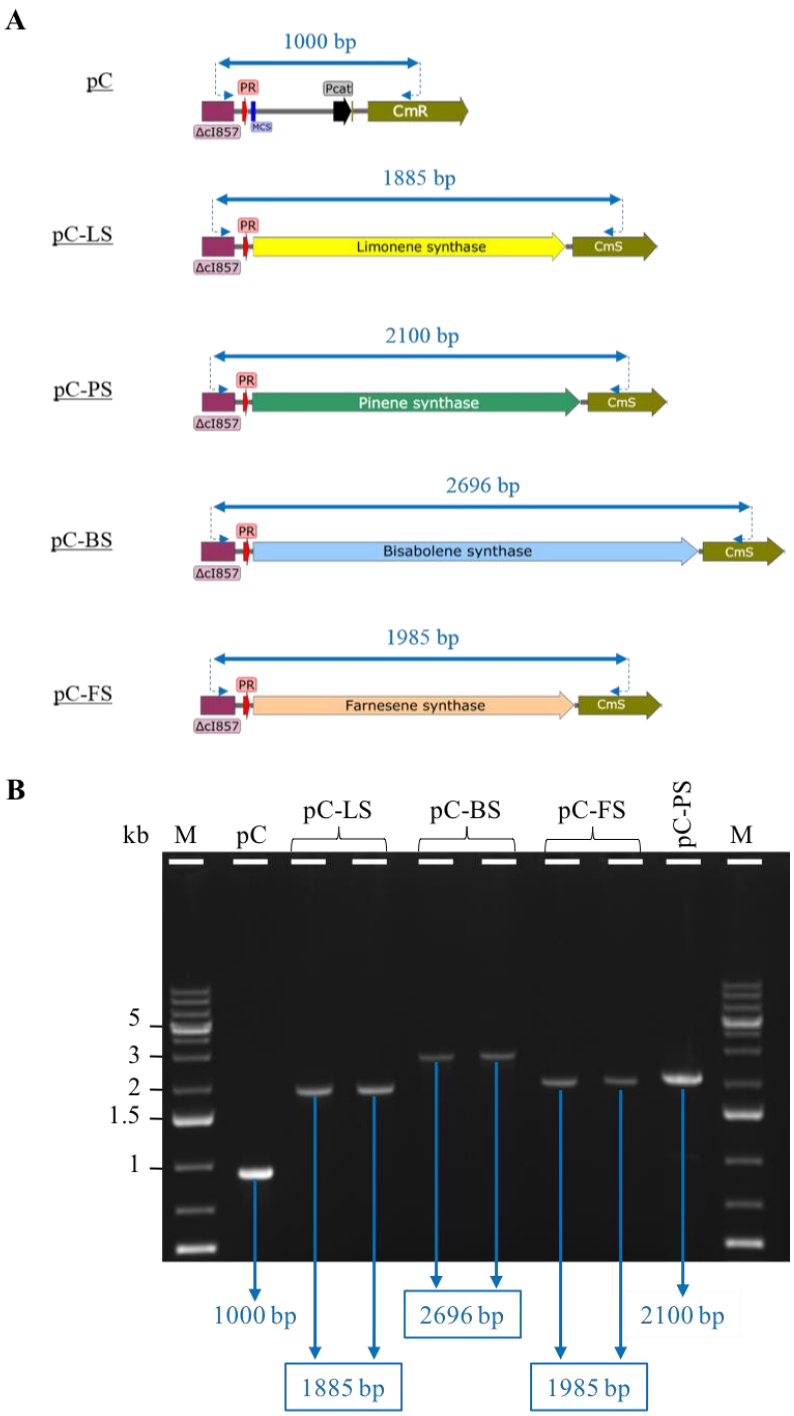


Figure 53 Représentation schématique (A) et photographie d'un gel d'agarose (B) montrant les produits d'amplification par PCR avec les amorces pFCI_Fw et pFCI_Rv (triangles bleus) du vecteur pC et de ses dérivés contenant les divers gènes codant pour les terpènes synthases chez *Synechocystis* PCC 6803. Le marqueur de point moléculaire (M) est le GeneRuler™ 1Kb plus de Thermoscientifc.

Les plasmides se répliquent de façon stable et autonome dans la souche et leur présence ne modifie pas de manière significative la croissance de la souche en photoautotrophie dans les conditions standard du laboratoire (Milieu MM, 2500 lux, 30°C, 140 rpm, Figure 54, Panel B).

Afin de collecter et quantifier les terpènes par GC-MS, du dodécane (une molécule hydrophobe) doit être ajouté au milieu de culture (voir matériels et méthodes et introduction) afin de piéger les terpènes produits. Il a été démontré précédemment (Sebesta and Peebles, 2019) que la présence de dodécane n'impactait pas la croissance de la souche *Synechocystis* PCC 6803 sauvage (WT). Les résultats obtenus dans cette étude le confirment (Figure 54, Panel A).

Il a été démontré que le dodécane protège les cultures de la toxicité des terpènes (voir Hellier et al. 2013 pour la toxicité du farnésène et les résultats non publiés du laboratoire). Avant de réaliser des mesures de production de terpènes, il était donc important de regarder si la croissance des souches productrices de terpènes en présence de dodécane était ou non modifiée. Le temps de génération de la souche sauvage et des divers mutants est d'environ 12 h avec (Figure 54, Panel C) ou sans (Figure 54, Panel B) dodécane dans le milieu, indiquant ainsi que la présence de dodécane n'affecte que peu la croissance des mutants producteurs de terpènes.

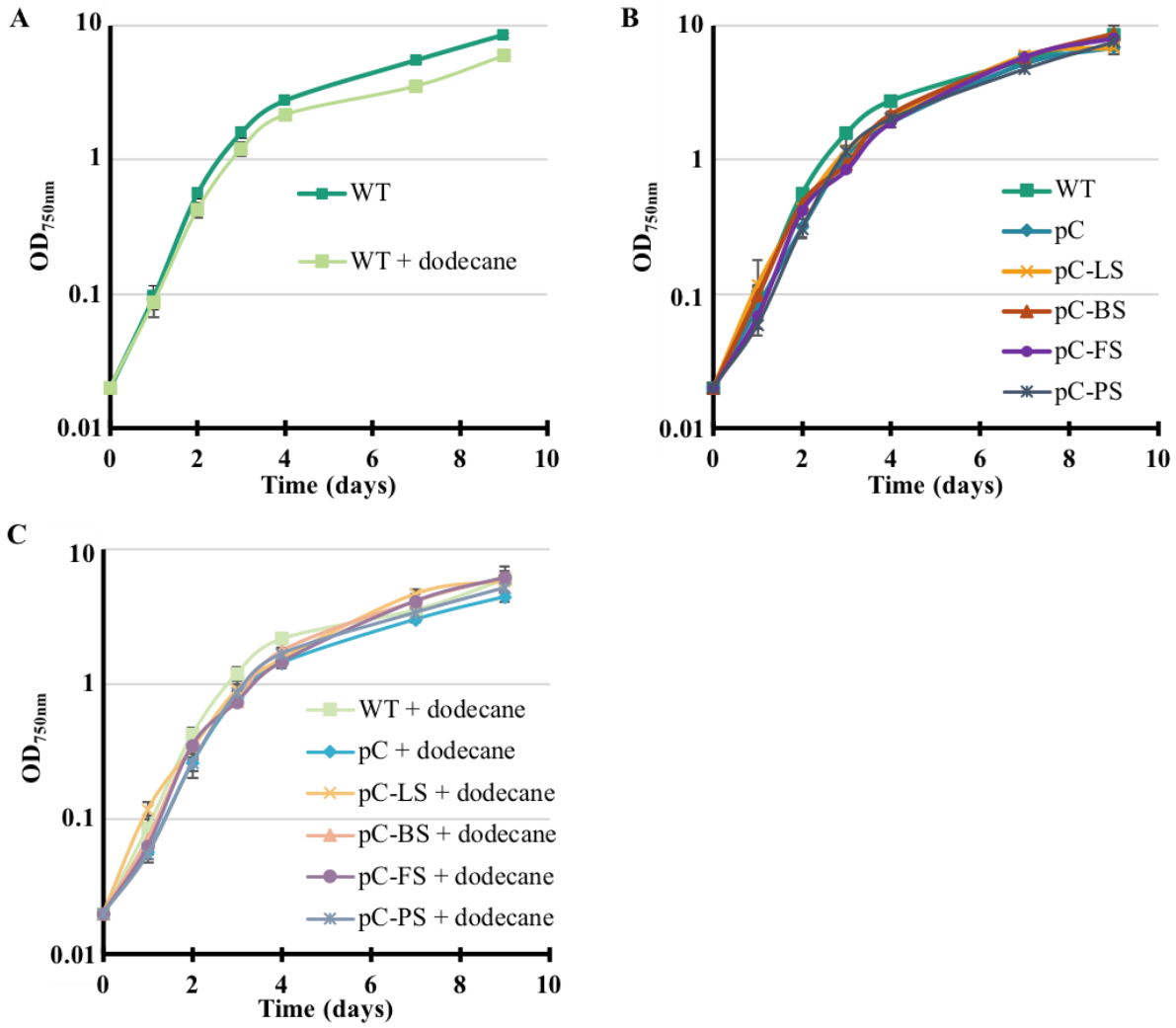


Figure 54 Courbes de croissance de la souche *Synechocystis* PCC 6803 sauvage (WT ; panel A) et des mutants exprimant les gènes codant pour les différentes terpènes synthases (panels B et C). Ces expériences ont été réalisées en triplicats dans des erlenmeyers contenant du milieu MM à 30°C sous un éclairement de 2500 lux, avec agitation (140 rpm dans un incubateur Infors) en présence ou non de 20% v/v de dodécane.

Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus par (Kiyota *et al.*, 2014) pour la production de limonène et par (Sebesta and Peebles, 2019; Dienst *et al.*, 2020) pour la production de bisabolène chez *Synechocystis* PCC 6803.

3. Synechocystis PCC 6803 est capable de produire différents mono et sesquiterpènes lorsque qu'un gène codant pour une terpène synthase spécifique est exprimé à partir du plasmide pC

En conditions standard, les diverses souches de *Synechocystis* PCC 6803 modifiées (pC-LS, pC-BS, pC-FS, pC-PS) produisent le terpène correspondant au gène codant pour la terpène synthase qu'elle exprime (Annexe 7) mais avec de grandes différences dans les rendements. La souche produit beaucoup plus d'α-farnésène (jusqu'à 30 mg/L) et d'E-α-bisabolène (jusqu'à 14 mg/L) que de S-(-)-limonène (0,8 mg/L) et d'α-pinène (0,08 mg/L ; Figure 55).

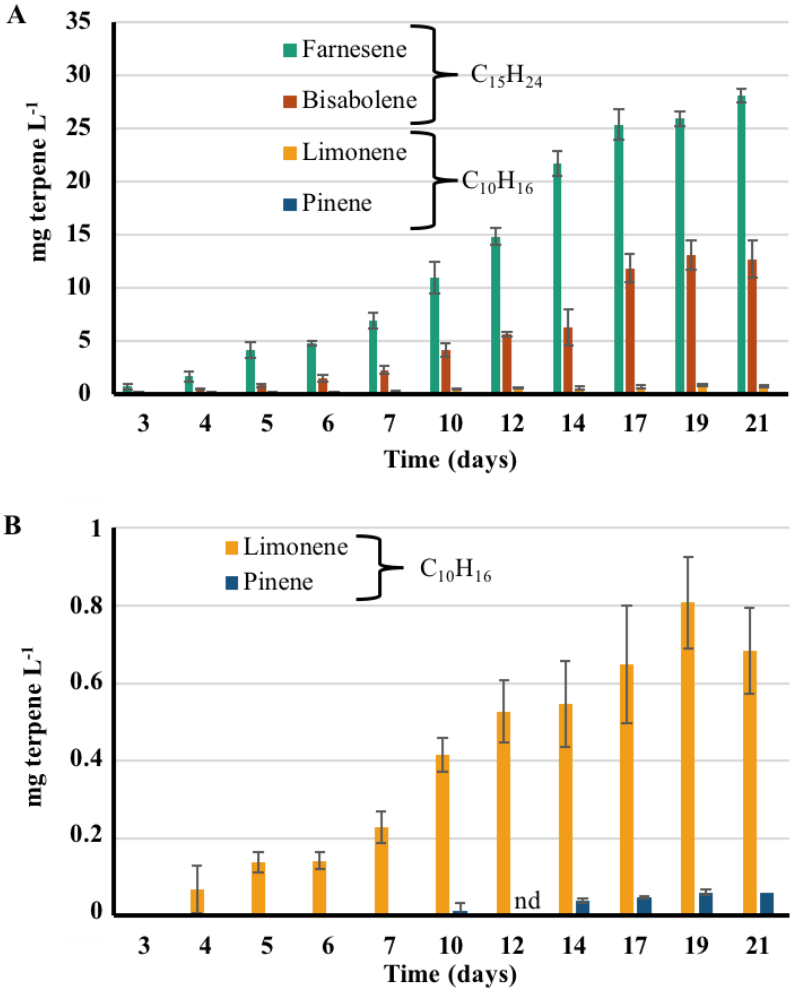


Figure 55 Production de mono et sesquiterpènes par les différentes souches de *Synechocystis* PCC 6803 (pC-LS, pC-BS, pC-FS, pC-PS) produisant le terpène correspondant au gène codant pour la terpène synthase qu'elle exprime. Ces mutants sont cultivés en conditions standard (MM, 2500 lux, 140 rpm, 30°C, DOi = 0,02). La production des mono et sesquiterpènes est détaillée dans le panel A puis seule la production des monoterpènes (limonène et pinène) est détaillée dans le panel B avec une échelle différente. nd = non déterminé.

Synechocystis PCC 6803 semble donc produire plus efficacement les sesquiterpènes que les monoterpènes. Cela peut être lié aux terpènes synthases sélectionnées : chez les plantes, les monoterpènes synthases sont codées par le noyau. Elles transitent jusqu'au chloroplaste grâce à la présence d'un peptide signal. Les monoterpènes sont synthétisés dans les chloroplastes, au contraire, des sesquiterpènes qui sont synthétisés dans le cytosol par les sesquiterpènes synthases. De ce fait, lors du design des séquences des gènes codant pour les monoterpènes synthases à exprimer dans les cyanobactéries, les acides aminés correspondants au peptide signal ont été identifiés et enlevés de la séquence. Cela a pu affecter l'activité de ces enzymes si la délimitation du peptide signal n'a pas été optimale (voir Introduction chapitre 3. III.3. et résultats Chapitre 1 I.).

Cette différence pourrait également être due à une inégalité des pools de GPP (précurseur des monoterpènes) et de FPP (précurseur des sesquiterpènes). La même enzyme (IspA) permet la production séquentielle de GPP, de FPP et de GGPP, il se pourrait donc que le pool de GPP soit très rapidement transformé en FPP ne laissant ainsi pas assez de précurseurs pour la synthèse des monoterpènes. Cette hypothèse est cohérente avec le fait qu'aucun métabolite connu n'a jamais été identifié comme étant produit chez *Synechocystis* PCC 6803 à partir du GPP.
De plus, lorsque Lin *et al.,* ont exprimé le gène (*gpps*) codant pour une prenyl transférase synthétisant spécifiquement du GPP, la production de limonène par *Synechocystis* PCC 6803 a été augmentée par 1,4 (Lin *et al.,* 2017). Ainsi, il semblerait que le pool de GPP soit modérément limitant pour la production de monoterpènes chez cette souche.

4. Synechocystis PCC 6803 produit de façon stable les terpènes d'intérêt

La production de chaque terpène (sauf le pinène) par deux clones indépendants a été analysée. L'objectif ici est de s'assurer qu'il n'y a pas de variabilité inter-clone (ce phénomène n'a jamais été documenté chez *Synechocystis* PCC 6803) mais également de s'assurer que les clones n'ont pas accumulé d'autres mutations influençant la production. Comme le montre la Figure 56 : nous n'avons pas observé de différence significative du niveau de production de bisabolène (Panel A), de farnésène (Panel C) ou de limonène (Panel E) entre deux clones de *Synechocystis* PCC 6803 possédant le même plasmide que se soit pC-BS, pC-FS ou pC-LS.
Il aurait pu être intéressant de regarder cela pour la production de pinène afin de s'assurer que ce n'est pas une mutation inconnue ailleurs dans le génome qui est la cause de la très faible production. Cette hypothèse semble cependant peu probable car le niveau de production que nous obtenons est similaire à ce qui a été obtenu précédemment (Tashiro *et al.,* 2016).

Par ailleurs, les productions de bisabolène (Panel B), de farnésène (Panel D) et de limonène (Panel F), sont stables sur le long terme (testées pendant 6 mois). En effet, il n'y a pas de différences significatives dans les rendements de production entre la première (Exp 1) et dernière expérience (Exp 2 pour le limonène, 3 pour le bisabolène ou 4 pour le farnésène) réalisées (Figure 56). Entre ces diverses expériencess, la souche a été repiquée régulièrement.

Concernant la production de farnésène et de bisabolène, les rendements obtenus pour la deuxième expérience sont légèrement supérieurs aux autres mais les productions restent dans le même ordre de grandeur.

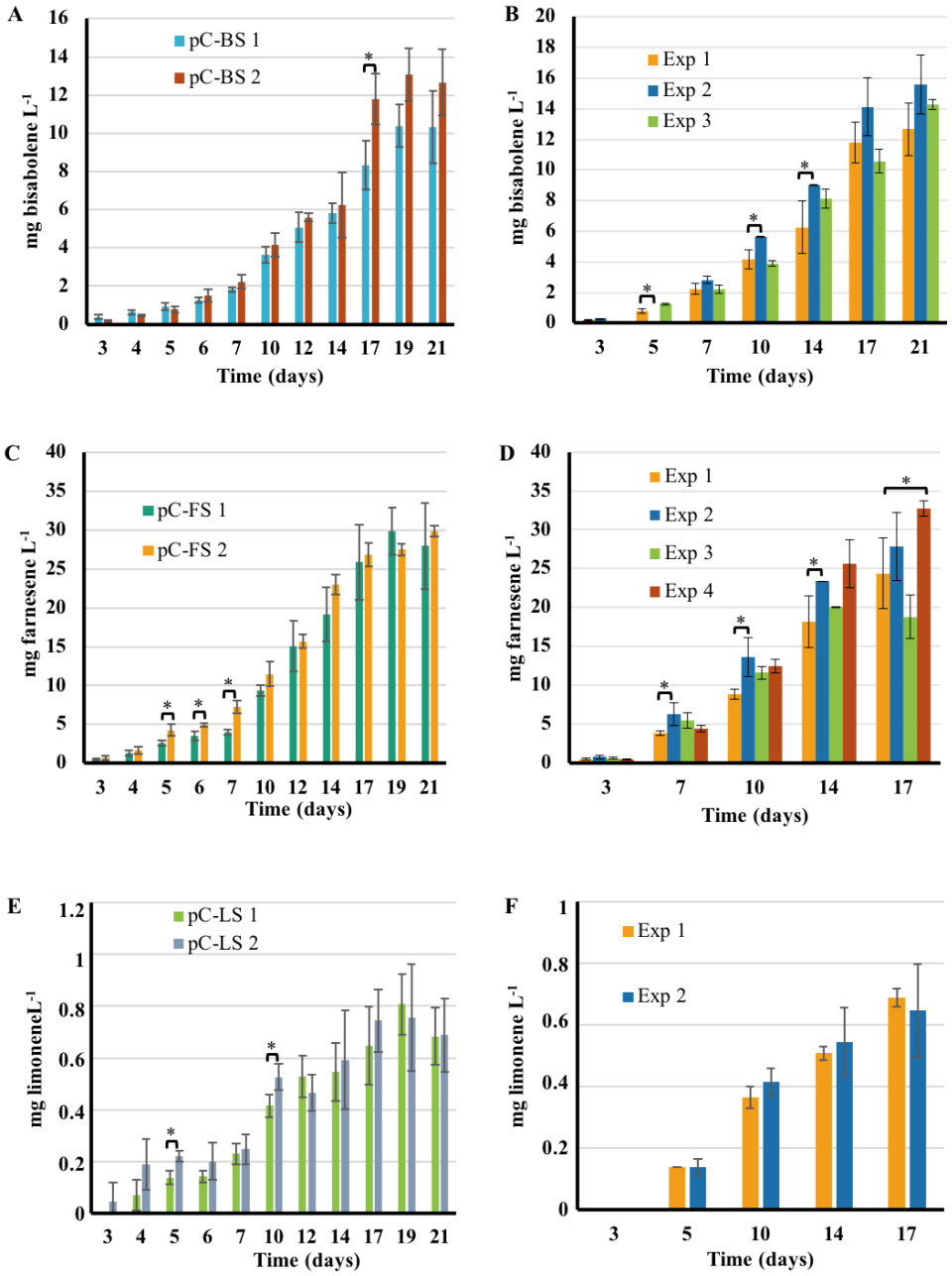


Figure 56 Stabilité de la production de bisabolène (A et B), de farnésène (C et D) et de limonène (E et F) par *Synechocystis* PCC 6803 possèdant respectivement le plasmide pC-BS, pC-FS ou pC-LS. Aucune différence significative de production n'est observée entre deux clones indépendants (A, C et E). De plus, les productions semblent stables sur le long terme (testées pendant 6 mois ; panel B, D et F). Exp 1 correspond à la première exprérience réalisée en condtions standard et Exp 2, 3 et 4 correspondent à la 2ème, 3ème et 4ème expérience réalisées dans les mêmes conditions. La souche a été repiquée régulièrement entre ces différentes expériences. Toutes les manipulations ont été réalisées en triplicats en conditions standard (MM, 2500 lux, 30°C, 140 rpm, DOi = 0,02). Les accolades indiquent une différence significative entre deux expériences (test de student avec $p < 0,05$ symbolisée par *, pour les panels B, D et F la comparaison a été réalisée entre la première expérience et les autres expériences).

5. La production de terpènes par Synechocystis PCC 6803 varie en fonction des phases de croissance

La croissance et la production de limonène, bisabolène et farnésène par *Synechocystis* PCC 6803 ont été mesurées de façon régulière afin de définir les phases de croissance où la souche produit le plus de terpènes. Cette donnée est notamment importante pour une production en photobioréacteur à DO constante.

Les valeurs de productivité ont été obtenues en calculant la différence entre deux rendements de production (en mg/L) à deux temps. On a donc :

$$\frac{\Delta \text{production } (\frac{\text{mg}}{\text{L}})}{\Delta \text{temps (jours)}}$$

Les valeurs de productivité (en mg/L/jour) ainsi obtenues sont intéressantes en biotechnologie car elles permettent de définir à quel moment les rendements de production augmentent le plus par jour (*ie*. productivité maximale).
Cependant, cette donnée ne prend pas en compte la biomasse (définie par l'DO_{750nm}). En effet, en phase exponentielle par exemple, il y a beaucoup moins de cellules qu'en phase de ralentissement et donc même si chaque cellule produit la même quantité de terpènes dans ces deux phases, le rendement va augmenter plus lentement en phase exponentielle.

Une augmentation de la production peut donc être corrélée avec l'accroissement du nombre de cellules ou avec l'accroissement de la production par cellule. Sur le plan biologique, il est donc important de connaitre la/les phase(s) de croissance où une cellule produit le plus de terpènes. On utilise alors la productivité en mg/L/ DO_{750nm} /jour :

$$\frac{\Delta \text{production } (\frac{\text{mg}}{\text{L x DO750nm}})}{\Delta \text{temps (jours)}}$$

Les deux productivités ainsi définies peuvent être négatives si les rendements de production (en mg/L) diminue au cours du temps. Cela est notamment le cas en phase stationnaire (diminution des rendements entre le 19ème et le 21ème jour de culture) et peut être dû à la dégradation d'une partie des terpènes produits ou à des variations techniques dans la quantification par la méthode GC-MS (*ie.* on devrait avoir un rendement constant entre le 17ème et le 21ème jour mais des variations techniques induisent une diminution).

Concernant la production de bisabolène (Figure 57, panels A, B et C), la productivité maximale (mg/L/jour) se situe entre le 12ème et 19ème jours de croissance. Cela signifie que c'est entre ces deux temps que les rendements augmentent le plus. Il pourrait donc être intéressant à une échelle industrielle de conserver les cellules entre une DO_{750nm} de 6 (après 12 jours de croissance) et une DO_{750nm} de 10 (après 19 jours de croissance). Il est intéressant de noter que cette productivité augmente de plus en plus entre le 1er et le 19ème jour puis devient égal à 0.

Si au contraire, on s'intéresse à la productivité en mg/L/DO750nm/jour, on note que la production par unité de biomasse (DO) par jour est constante du début de l'expérience jusqu'au 19ème jour de croissance. Les cellules produisent donc autant de bisabolène qu'elles soient en phase exponentielle ou en phase de ralentissement. En revanche, elles ne produisent plus de bisabolène en phase stationnaire après 19 jours de croissance.
L'augmentation de la productivité en mg/L/jour entre le 12ème et le 19ème jours de croissance est donc directement corrélée avec une augmentation de la biomasse et n'est pas liée à une production plus importante par cellule. Ces résultats sont très intéressants car cela semble indiquer qu'il y a autant de carbone redirigé vers la voie MEP en phase exponentielle qu'en phase de ralentissement. On pourrait s'attendre à ce que le carbone assimilé en phase exponentielle soit plutôt redirigé vers le métabolisme central et non les voies secondaires du métabolisme telles que la voie MEP. Il serait donc intéressant de vérifier cette hypothèse par une analyse fluxomique (*ie.* mesure des vitesses réelles des réactions métaboliques dans un système biologique).

Les résultats de productivité obtenus pour le farnésène et le limonène (Figure 57, panels D à I) diffèrent de ceux obtenus pour le bisabolène. Pour ces deux terpènes, la productivité en mg/L/jour est maximale entre le 3ème et le 19ème jour de culture. Cela n'est pas corrélé avec une forte productivité par unité de biomasse. En effet, cette dernière est élevée entre le premier et le 3ème jour de croissance et est maximale entre le 3ème et le 5ème jour. Cela laisse supposer que les cellules produisent plus de limonène ou de farnésène en (fin de) phase exponentielle puis, par la suite, l'augmentation importante de la biomasse permet de conserver une forte augmentation des rendements.

Ces résultats permettent de définir 3 phases de production :

- La phase exponentielle où les cellules produisent de fortes quantités de terpènes mais la faible biomasse conduit à de faibles rendements (en mg/L) ;
- La phase de ralentissement où le nombre de cellules augmente rapidement et où la productivité par unité de biomasse reste importante (bisabolène) ou diminue fortement (farnésène et limonène). Cependant, la biomasse importante permet une forte augmentation des rendements (en mg/L) ;
- La phase stationnaire où la quantité de biomasse stagne et où les cellules ne produisent plus de terpènes. Par conséquent, la quantité de terpènes produits n'augmente plus.

Ainsi, le protocole de criblage suivant a été mis au point afin d'étudier plus rapidement de nombreuses conditions expérimentales. La DO_{750nm} des cultures est mesurée et le dodécane est prélevé à 3, 7, 10, 14, 17 et parfois 21 jours de culture. Cela permet d'étudier les trois phases de production détaillées ci-dessus.
Nous avons choisi de réaliser toutes les expériences suivantes à une $DO_{750nm\ initiale}$ de 0,02 (soit 1×10^6 cellules/mL) car des résultats préliminaires ont permis de démontrer que la souche produisait des terpènes de façon plus efficace lorsqu'elle réalisait une vraie croissance exponentielle.

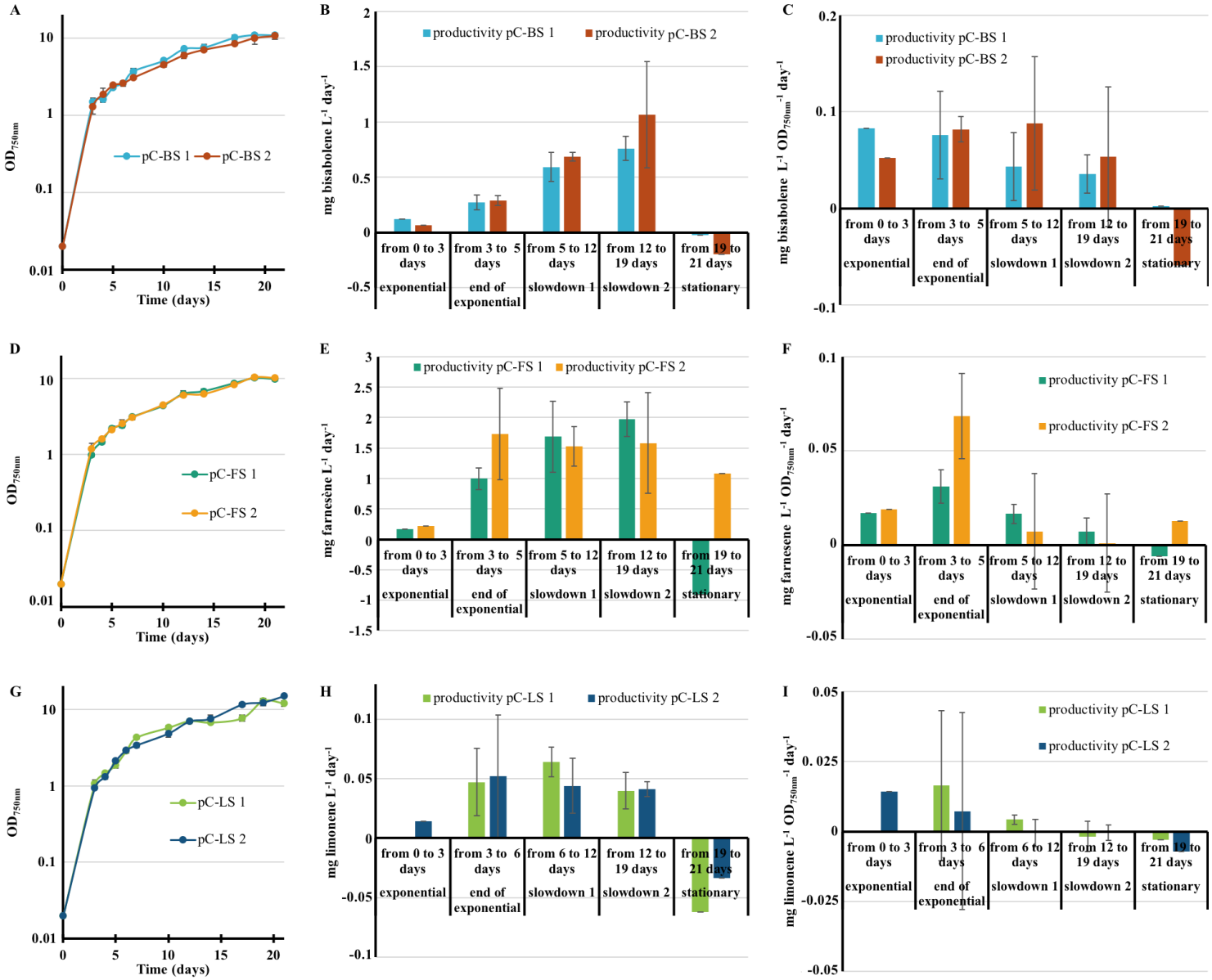


Figure 57 Croissance (A, D et G) et évolution de la production (en mg/L/jour (B, E et H) ou en mg/L/OD_{750nm}/jour (C, F, et I)) de bisabolène, farnésène et limonène par *Synechocystis* PCC 6803 (pC-BS, pC-FS ou pC-LS) en fonction des phases de croissance de la souche. Toutes les manipulations ont été réalisées en triplicats en conditions standard (MM, 2500 lux, 30°C, 140 rpm, DOi = 0,02).

Les rendements en farnésène étant supérieurs à ceux obtenus pour les autres terpènes (Figure 55 panel A) et également à ceux décrits dans la littérature (Halfmann *et al.*, 2014a; Lee *et al.*, 2017), il était intéressant d'essayer d'augmenter plus encore ces rendements. Par conséquent, l'influence des conditions de culture sur la production de farnésène a été étudiée.

6. Détermination des conditions de culture permettant une meilleure production de farnésène par Synechocystis PCC 6803

Toutes les expériences ont été réalisées en présence de dodécane afin de collecter les terpènes produits. Nous avons fait varier un seul paramètre à la fois (lumière, température, quantité de carbone dissous dans le milieu de culture). En conditions standard, les cellules sont cultivées dans des erlenmeyers en milieu MM sous un éclairement de 2500 lux à 30°C, avec une agitation de 140 rpm dans un incubateur Infors.

a. L'intensité lumineuse influence fortement la production de farnésène par *Synechocystis* PCC 6803

Bien que la souche ait un temps de génération similaire (environ 11 h) lorsqu'elle est cultivée à 2500, à 3500 ou à 5000 lux, la production de farnesène est bien plus importante à 2500 lux (facteur 3,5 – 5,5 à 17 jours de culture, Figure 58 Panel A et B). Cela peut être causé par une augmentation du stress oxydant à des intensités lumineuses plus élevées ou à la redirection du pool de GPP et de FPP vers la synthèse des caroténoïdes.

Synechocystis PCC 6803 croit plus lentement à 1500 lux qu'à 2500 lux (temps de génération de 18h au lieu de 11h) et cela influence négativement la production de farnésène qui est 2 fois moins importante à 1500 lux après 17 jours de culture. Cependant, si cet écart de biomasse permet d'expliquer la production moins importante à 3, 7 et 10 jours de culture, il ne permet pas d'expliquer l'écart à 14 et 17 jours. En effet, à ces temps, la OD_{750nm} est similaire à 1500 et 2500 lux et la production de farnésène plus faible (Figure 58 Panel A et B). L'énergie lumineuse reçue étant plus faible à 1500 lux, la production d'énergie chimique l'est peut-être aussi et donc moins de carbone est assimilé par la souche. Afin de vérifier cela, il est possible de déterminer le rapport Fv/Fm qui traduit l'efficacité du PSII à utiliser la lumière pour la conversion photochimique.

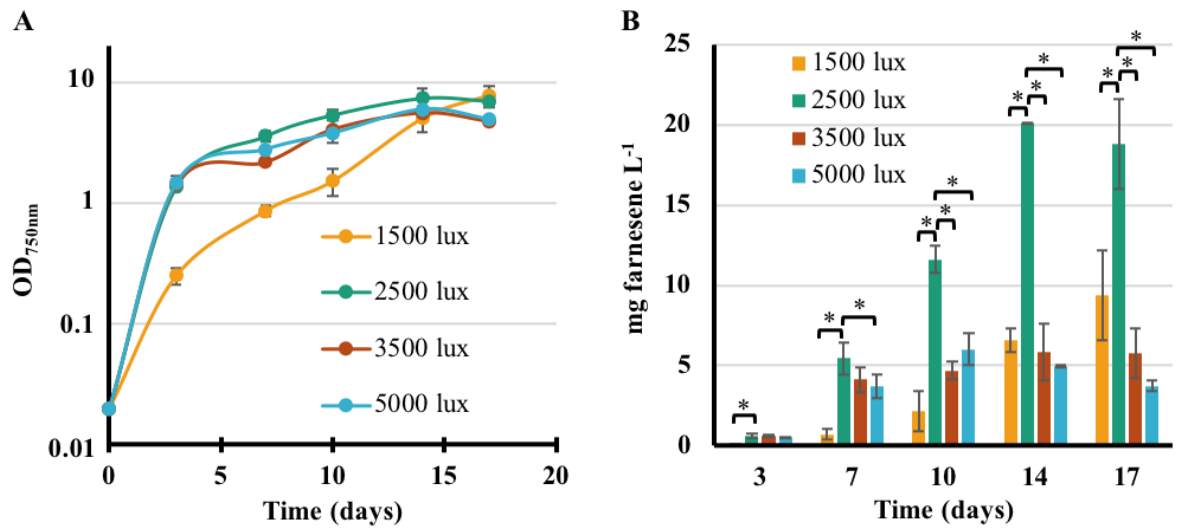


Figure 58 Effet de la lumière sur la croissance (A) et la production de farnésène (B) par *Synechocystis* PCC 6803 pC-FS. Les manipulations ont été réalisées en triplicats à 1500, 2500, 3500 ou 5000 lux, à 30°C, 140 rpm, ODi = 0,02 dans le milieu MM. Les accolades indiquent une différence significative entre deux expériences (test de student avec $p < 0,05$ symbolisée par *).

b. La température influence fortement la production de farnesène

L'augmentation de la température (34°C), à laquelle *Synechocystis* PCC 6803 pC-FS est cultivée, a très peu d'effet sur la croissance (Figure 59 Panel A), en revanche cela a un effet négatif significatif sur la production de farnésène (diminution d'un facteur 13, Figure 59 Panel B).
La production de terpènes et la présence de dodécane (molécules hydrophobes) à 34°C peuvent jouer un rôle sur la stabilité des membranes créant un stress important pour la cellule. Cela ne se traduit pas par une différence de croissance. Cependant, l'augmentation de la température pourrait modifier la synthèse du peptidoglycane qui est directement liée à la synthèse d'undécaprényl diphosphate. Cette molécule est produite, chez les cyanobactéries, à partir de FPP (le précurseur des sesquiterpènes) et donc une augmentation de la synthèse d'undécaprényl diphosphate pourrait entrainer une diminution de la synthèse de sesquiterpènes par compétition directe pour le pool de précurseur. Il est également possible que certaines enzymes de la voie MEP ou la farnésène synthase soient moins actives à cette température.
Par ailleurs, des analyses réalisées au laboratoire, par Xavier Kammerscheit, ont montré que la présence de dodécane était toxique pour *Synechocystis* PCC 6803 à 39°C.

Au contraire, la diminution de la température (25°C) augmente le temps de génération en phase exponentielle (24 h au lieu de 12 h à 30°C, Figure 59 panel A) mais a peu d'influence sur la production de farnésène (pas de différence significative à part au jour 3, Figure 59, panel B).
Par conséquent, à 25°C, la production de farnésène par cellule est un peu plus importante (mais pas significativement différente) qu'à 30°C (Figure 59, panel C). Ainsi, un ralentissement de la croissance pourrait être lié à une meilleure production.

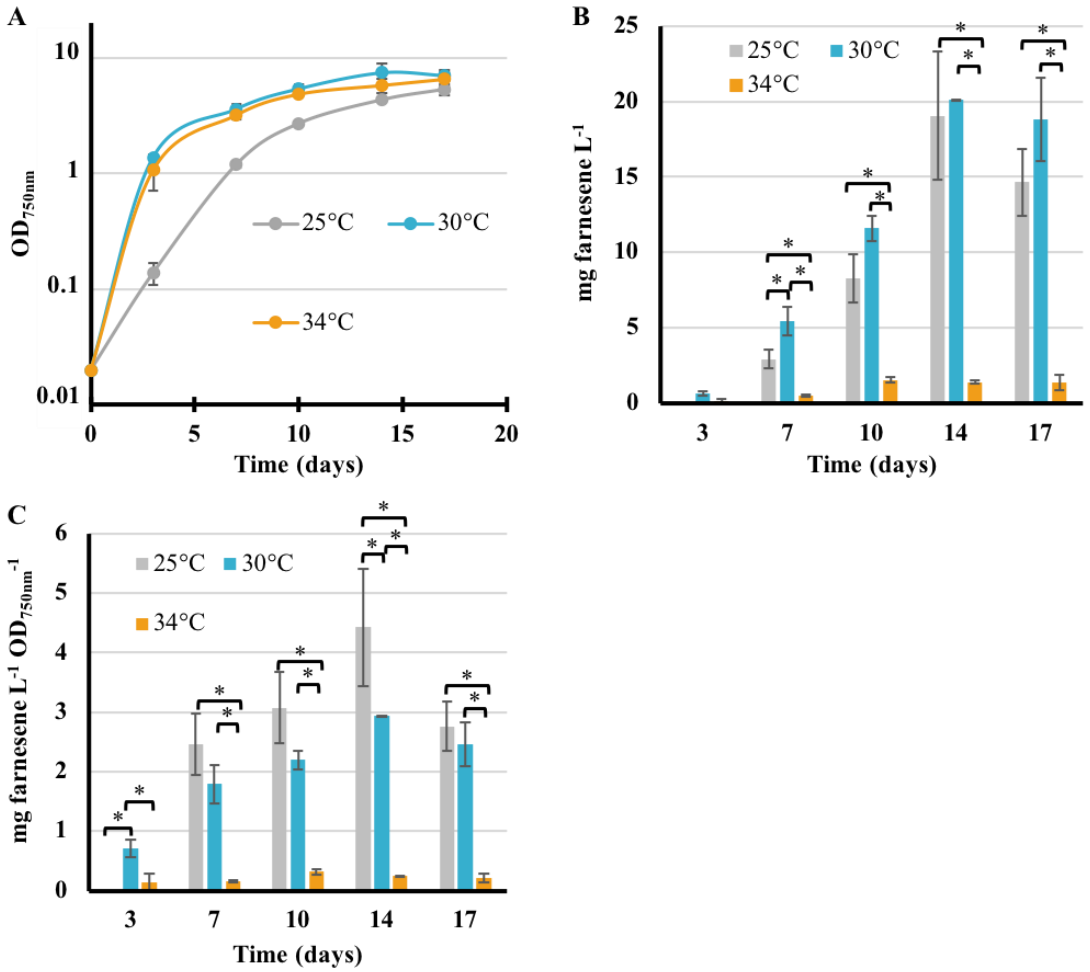


Figure 59 Effet de la température sur la croissance (A) et la production de farnésène (en mg/L (B) ou en mg/L/OD_{750nm} (C)) par *Synechocystis* PCC 6803 pC-FS. Les manipulations ont été réalisées en triplicats à 25°C, 30°C ou 34°C, à 2500 lux, 140 rpm, ODi = 0,02 dans le milieu MM. Les accolades indiquent une différence significative entre deux expériences (test de student avec $p < 0,05$ symbolisée par *).

c. L'effet de l'ajout de bicarbonate ($NaHCO_3$) dans le milieu de culture sur la production de farnésène et de bisabolène reste incertain

Il est possible que le dodécane puisse limiter les échanges gazeux entre la culture et l'air ambiant. Afin de s'assurer que la quantité de carbone disponible pour la souche ne soit pas limitante pour la production de farnésène, du $NaHCO_3$ a été ajouté au milieu de culture et la production de farnésène a été mesurée à 30°C et 34°C.

A 30°C, l'effet de l'ajout de 0,6 g/L de $NaHCO_3$ n'a pas été établi avec certitude (Figure 60, Panel A et B). La croissance en phase exponentielle est similaire (temps de génération de 12h en MM et de 13h en MM avec $NaHCO_3$) mais la DO_{750nm} atteinte par la souche après 17 jours de croissance est plus importante dans un milieu enrichi en bicarbonate (DO_{750nm} = 12,5 en MM avec $NaHCO_3$ et DO_{750nm} = 7 en MM). Il semblerait donc que la quantité de carbone devient limitante dans le milieu MM après 14 jours de croissance et la souche rentre donc en phase stationnaire alors que ce n'est pas le cas en MM enrichie en $NaHCO_3$. De ce fait, la souche continue de produire du farnésène après 14 jours en milieu MM avec

$NaHCO_3$ alors que la production reste constante entre le 14ème et 17ème jours en milieu MM. Il faudrait tester la production sur un temps plus long afin de voir les effets de l'ajout de bicarbonate, dans le milieu de culture, sur la production de farnésène. De plus, dans les manipulations effectuées précédemment, la production stagnait à partir du 17ème jour de croissance et non à partir du 14ème jour (voir Figure 56 panel C).

A 34°C, on observe des résultats similaires (Figure 60, Panel C et D). L'ajout de carbone n'a pas d'impact sur la croissance de la souche en phase exponentielle de croissance (temps de génération de 12-13 h). Cependant, la DO_{750nm} atteinte après 17 jours de croissance dans un milieu enrichi en bicarbonate est plus importante (12,5 au lieu de 7 soit un facteur 1,8) et la production l'est également (facteur 3). L'augmentation de la DO_{750nm} n'est donc pas la seule explication à l'augmentation de la production, la production par cellule est plus importante à 34°C quand du bicarbonate est ajouté au milieu de culture. Cependant, la production à 34°C reste tout de même bien inférieure à celle à 30°C même en ajoutant du bicarbonate au milieu (facteur 6).

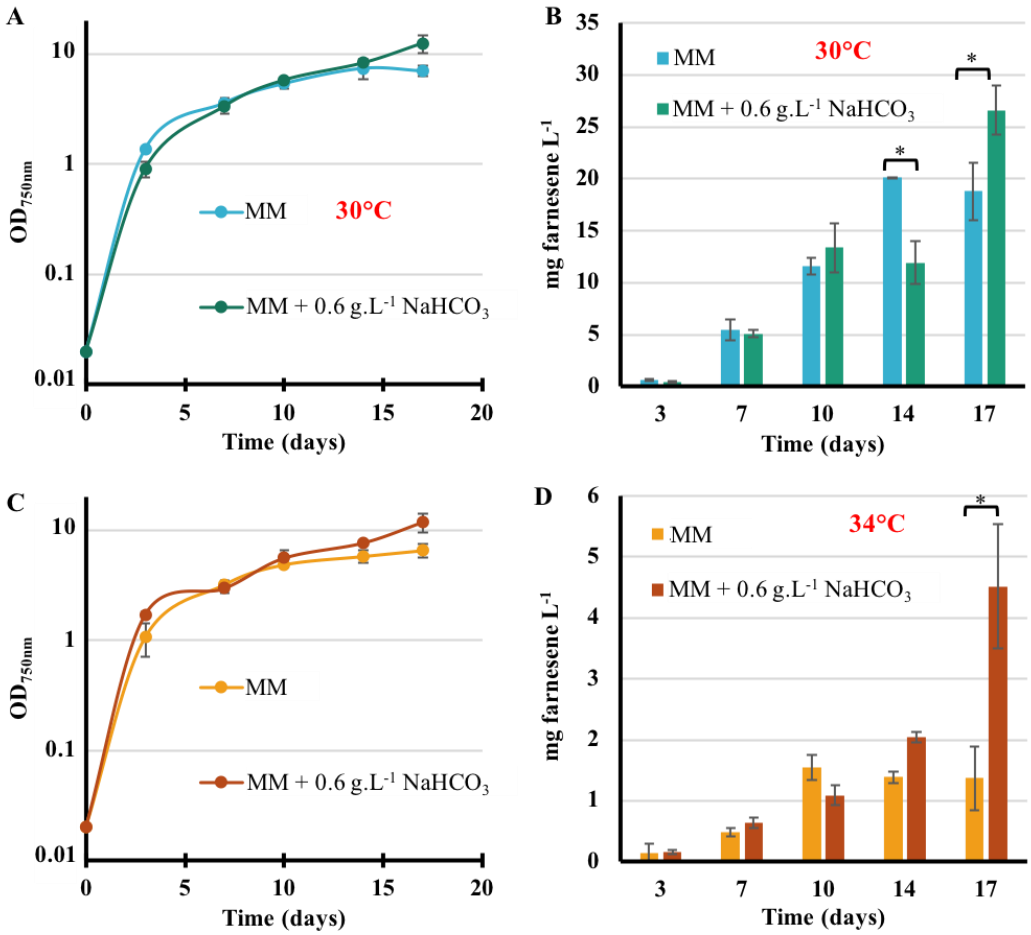


Figure 60 Effet de l'ajout de bicarbonate (0,6 g/L) à 30°C (A et B) et 34°C (C et D) sur la croissance (A et C) et la production de farnésène (B et D) par *Synechocystis* PCC 6803 pC-FS. Les manipulations ont été réalisées en triplicats à 2500 lux, 30°C ou 34°C, 140 rpm, ODi = 0,02 dans le milieu MM enrichi ou non en bicarbonate. Les accolades indiquent une différence significative entre deux expériences (test de student avec $p < 0,05$ symbolisée par *).

En revanche, pour la production de l'autre sesquiterpène, nous n'avons pas observé d'effet sur la croissance de la souche ou la production de bisabolène même après 21 jours de culture (Figure 61). Cela pourrait être dû au fait que la production de bisabolène (deux fois moins importante que celle de farnésène) a moins d'impact sur le flux de carbone assimilé par la souche.

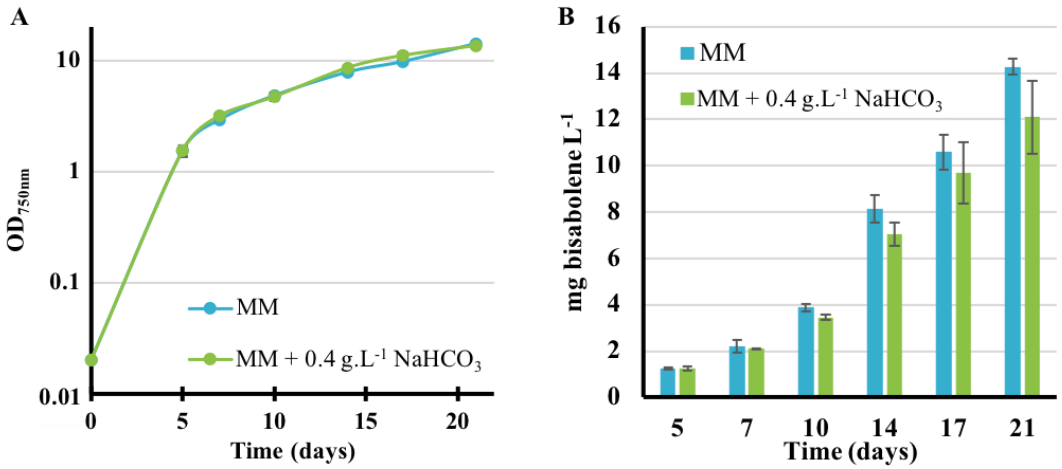


Figure 61 Effet de l'ajout de bicarbonate (0,4 g/L $NaHCO_3$) sur la croissance (A) et la production de bisabolène (B) par *Synechocystis* PCC 6803 pC-BS. Les manipulations ont été réalisées en triplicats à 2500 lux, 30°C, 140 rpm, ODi = 0,02 dans le milieu MM enrichie ou non en bicarbonate. Les accolades indiquent une différence significative entre deux expériences (test de student avec $p < 0,05$ symbolisée par *).

7. L'utilisation de l'urée comme seule source d'azote dans le milieu de culture permet la production de terpènes chez Synechocystis PCC 6803

L'urée est une source d'azote assimilable par de nombreuses cyanobactéries dont *Synechocystis* PCC 6803 (Veaudor *et al.*, 2019). Ce composé est deux fois moins couteux que le nitrate et est également un polluant fréquent et abondant. Ainsi, son utilisation comme substrat azoté permettrait de réduire le coût de production de molécules d'intérêt mais également d'améliorer l'impact écologique du procédé ((Veaudor *et al.*, 2018) et voir chapitre 2.VI.). Aucun article ne décrit la production de molécules d'intérêt par *Synechocystis* PCC 6803 en utilisant l'urée comme seule source d'azote dans le milieu de culture, notamment parce que l'urée est considérée comme toxique pour les cellules.

Il a donc fallu, dans un premier temps, développer un protocole permettant de cultiver *Synechocystis* PCC 6803 au dépend de l'urée comme source d'azote.
L'urée est toxique à de fortes concentrations (supérieure à 5 mM (Veaudor *et al.*, 2018)) alors qu'à faibles concentrations, elle est rapidement métabolisée entrainant une carence en azote. Pour faire face à ce phénomène et redistribuer les flux métaboliques, les cyanobactéries doivent synthétiser de nouvelles protéines à partir d'acides aminés dont la production est abolie par la carence d'azote. Elles contournent ce paradoxe en mobilisant deux « réserves » internes : les antennes photosynthétiques et la cyanophycine. Les antennes photosynthétiques représentent de 30 à 50%

des protéines solubles, leur protéolyse joue à la fois un rôle dans la photoprotection du PSII (diminution de l'énergie lumineuse reçue) et dans le recyclage de leurs acides aminés. La dégradation des antennes photosynthétique entraine un changement de pigmentation appelé chlorose (Baier *et al.*, 2001).

Par conséquent, j'ai testé les effets de l'ajout progressif de petites quantités d'urée sur la croissance de *Synechocystis* PCC 6803. Ce protocole est similaire à celui réalisé pour *Cyanothece* PCC 7425 (Chenebault *et al.*, 2020).

Comme attendu, l'ajout d'une forte concentration en urée (8 mM) est toxique pour *Synechocystis* PCC 6803. La croissance de la souche est fortement affectée les premiers jours, puis lorsque la croissance reprend, les cultures deviennent rapidement jaunes signe de chlorose (Figure 62). En présence d'une forte quantité d'urée, la plupart des cellules meurent (Figure 62, panel C) ; les quelques cellules survivantes consomment peu à peu l'urée. Lorsque suffisamment d'urée a été consommée, la croissance des cellules survivantes reprend (jours 4 à 9). Cependant, l'urée restante dans le milieu est consommée et après 15 jours de croissance, les cellules entrent en chlorose.

Au contraire, lorsque 2 mM d'urée sont ajoutés tous les 3 jours et demi (84 h), la souche a une croissance similaire à sa croissance lorsque le nitrate (4 mM tous les 3 jours et demi ou 17 mM au temps 0 h) est utilisé comme source d'azote (Figure 62). En phase exponentielle, le temps de génération (13 h) est similaire que la souche soit cultivée en urée ou en nitrate. Cela peut s'expliquer par le fait que cette dose d'urée n'est pas toxique pour la cellule. La quantité d'urée ajoutée tous les 3 jours et demi permet de ne pas subir une carence en azote et donc on n'observe plus le phénomène de chlorose (il y a toujours assez d'azote dans son milieu).

Par conséquent, afin que la souche ait une croissance similaire dans un milieu contenant de l'urée à celle réalisée en présence de nitrate, il est important d'ajouter de petites doses d'urée au fur et à mesure qu'il est consommé.

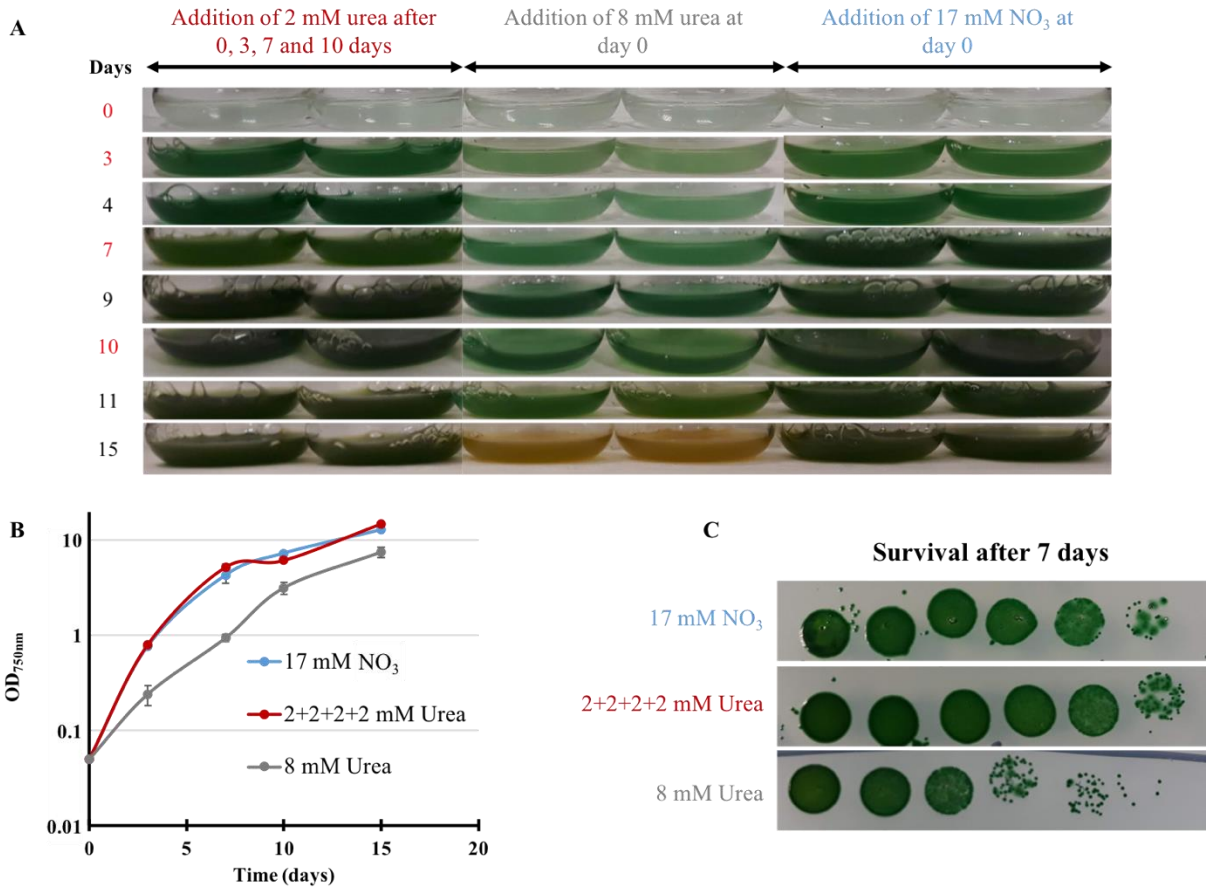


Figure 62 Croissance (A et B) et survie après 7 jours (C) de *Synechocystis* PCC 6803 WT cultivée dans un milieu contenant de l'urée ou du nitrate comme seule source d'azote. Les manipulations (A et B) ont été réalisées en duplicatas à 2500 lux, 30°C, 140 rpm, ODi = 0,05 dans le milieu MM contenant de l'urée (2+2+2+2 mM ou 8 mM) ou du nitrate (17 mM). Les tests de survie ont été réalisés par dilutions en série (de non dilué à dilution 10^{-5}) des cultures obtenues après 7 jours de croissance dans un milieu contenant de l'urée (2+2+2+2 mM ou 8 mM) ou du nitrate (17 mM) et dépôts sur des boites MM (présence de nitrate) qui ont été incubés à 30°C, 2500 lux.

La production de bisabolène par *Synechocystis* PCC 6803 (pC-BS) cultivée en présence de nitrate (4 mM tous les 3 jours et demi) ou d'urée (2 mM tous les 3 jours et demi) comme seule source d'azote a été mesurée. Dans un premier temps, afin de ne pas appliquer deux stress simultanément au démarrage des cultures, nous avons choisi d'ajouter le dodécane non pas au début de la culture comme précédemment mais après 3 jours.

Avec ce protocole, on observe que la croissance de la souche pC-BS et la production de bisabolène sont similaires dans les deux conditions (MM_{NO3} et MM_{Urea} ; Figure 63). Ceci est la première démonstration de la production d'une molécule d'intérêt par *Synechocystis* PCC 6803 dans un milieu contenant uniquement de l'urée (moins couteuse que le nitrate) comme source d'azote. Cela démontre la possibilité de coupler la production de molécules d'intérêt avec la dépollution des eaux polluées à l'urée.

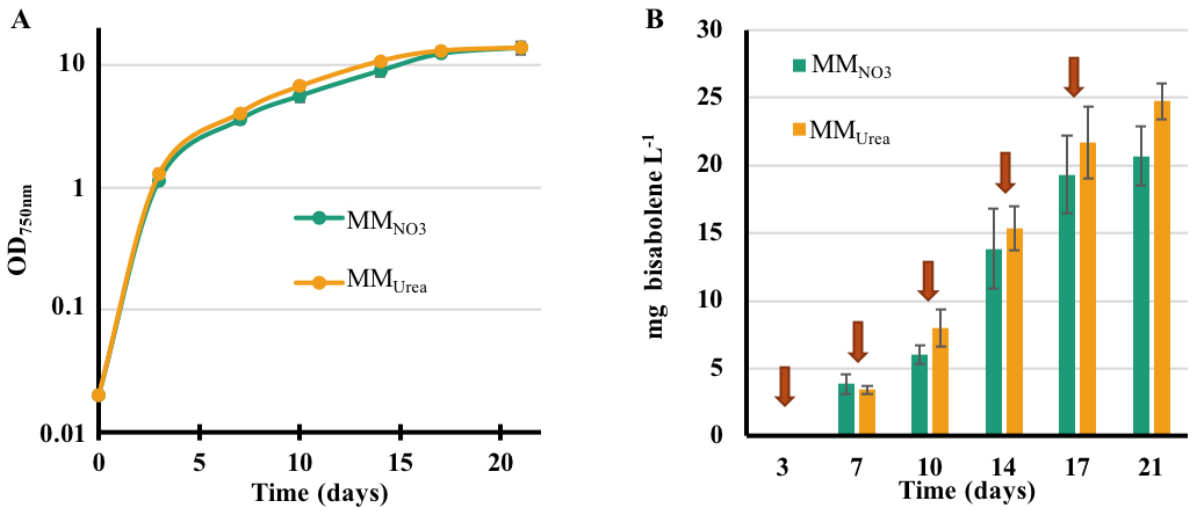


Figure 63 Croissance (A) et production de bisabolène (B) par *Synechocystis* PCC 6803 pC-BS. Ces manipulations ont été réalisées dans un milieu MM contenant du nitrate (MM_{NO3}) ou de l'urée (MM_{Urea}) comme seule source d'azote. Elles ont été réalisées en triplicats à 2500 lux, 30°C, 140 rpm, ODi = 0,02. L'urée et le nitrate ont été ajoutés au fur et à mesure de la croissance (respectivement 2 mM ou 4 mM tous les 3 jours et demi, cet ajout est symbolisé par une flèche rouge) et 20% v/v_{tot} de dodécane a été ajouté après 3 jours de croissance. Les accolades indiquent une différence significative entre deux expériences (test de student avec $p < 0,05$ symbolisée par *).

L'effet de l'ajout du dodécane, au début de la culture, sur la croissance des cellules dans un milieu contenant de l'urée, n'a pas été testé. Il sera intéressant de tester la production avec l'urée comme seule source d'azote en ajoutant le dodécane au début de la culture afin de collecter les terpènes produits les 3 premiers jours de croissance. La mesure de production de limonène ou de farnésène par *Synechocystis* PCC 6803 (pC-LS ou pCFS) cultivée dans un milieu contenant de l'urée est également en cours d'analyse.

8. Inactivation des voies de production des caroténoïdes chez Synechocystis PCC 6803

a. Intérêts de l'inactivation

La voie de biosynthèse des caroténoïdes est directement en compétition avec la synthèse des terpènes pour le pool de précurseurs. De ce fait, afin d'améliorer la production de farnesène par *Synechocystis* PCC 6803, il semblait intéressant d'inactiver certaines enzymes de cette voie. En se basant sur la littérature (voir Introduction Chapitre 2 VII.2), nous avons choisi d'inactiver *cruF* (*sll0814*) et *crtR* (*sll 1468*). L'objectif ici étant d'augmenter le pool de précurseur (FPP) disponible pour la synthèse du farnésène sans que cela ait un effet délétère sur la croissance de la souche.

D'après les diverses publications, la délétion de *crtR* n'a pas d'effet important sur la croissance bien que la souche soit plus sensible au stress oxydant et à la forte lumière (Schäfer *et al.*, 2005; Kusama *et al.*, 2015). Le mutant Δ*crtR* ne synthétise plus de myxoxantophylle, de

cryptoxanthine, de zeaxanthine et de 3'-hydroxyechinenone (Figure 64 avec l'enzyme CrtR entourée en rouge).

En revanche, l'inactivation de *cruF* n'a jamais été réalisée chez *Synechocystis.* Cette inactivation empêche la synthèse des myxoxantophylles (Figure 64 avec l'enzyme CruF entourée en vert). On peut donc faire l'hypothèse que la délétion de *cruF* n'affecte pas la croissance de *Synechocystis* PCC 6803.

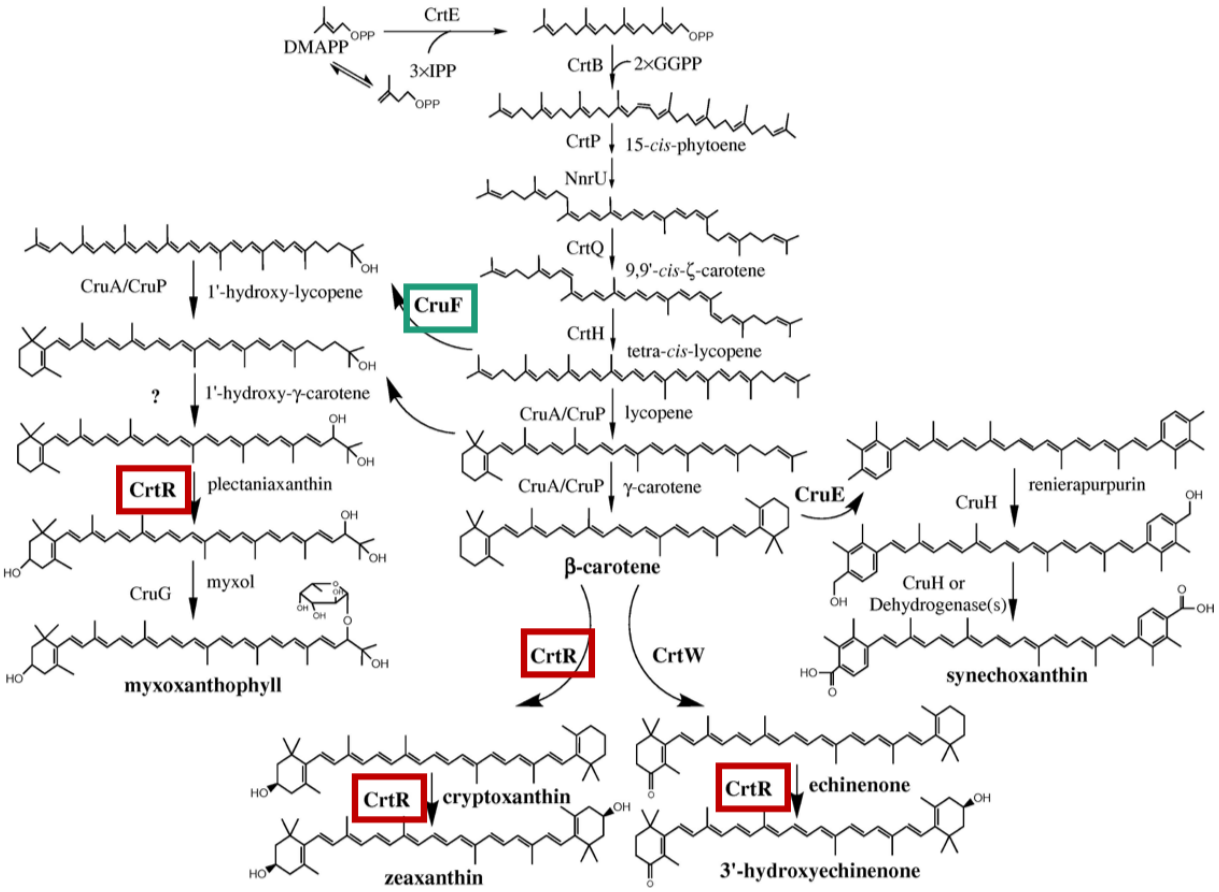


Figure 64 Voie de biosynthèse des caroténoïdes chez les cyanobactéries avec les enzymes CrtR et CruF entourées respectivement en rouge et en vert. Adaptée de (Zhu *et al.*, 2010b).

Afin d'inactiver *cruF* et *crtR*, il a tout d'abord été nécessaire de construire des cassettes de délétion qui permettent le remplacement par recombinaison homologue de ces gènes par une cassette de résistante à un antibiotique.

b. Design des séquences d'homologie amont et aval

L'inactivation de gènes ciblés chez les cyanobactéries se fait par insertion d'une cassette de résistance à un antibiotique à la place du gène à déléter. Pour se faire, il est nécessaire d'utiliser des plateformes d'homologies, c'est-à-dire des régions ADN (d'environ 300 pb) présentes en amont et en aval des gènes cibles (ici *cruF* et *crtR*) qui serviront pour la recombinaison homologue. Les cassettes de délétion doivent permettre de remplacer le gène dans sa (quasi-)

totalité sans impacter l'expression des gènes situés autour de ce dernier. Il faut donc être précautionneux dans le choix des plateformes d'homologie donc des séquences qu'on délète.

Les gènes situés en amont et en aval de *crtR* (Figure 65, Panel A) interviennent dans la tolérance aux dommages de l'ADN (*slr1543* qui code pour une protéine membranaire appelée DNA-damage-inducible protein) ou pour l'adaptation à de fortes intensités lumineuses (*ssr2595* (Funk and Vermaas, 1999; He *et al.*, 2001)).

Il y a, ici, une contrainte importante dans le choix des plateformes d'homologie, il ne faut pas que la recombinaison homologue enlève une partie du système d'expression/de régulation du gène *ssr2595*. Il ne faut pas non plus que cela enlève un potentiel terminateur de transcription du gène *slr1543* ou séquence qui stabilise l'ARNm provenant de la transcription de *slr1543*.
La région amont choisie commence à 300 pb en amont de crtR et se termine à l'ATG de *crtR*. Ainsi cela permet, après recombinaison homologue, la délétion complète du début du gène *crtR*.

La région aval chevauche la fin du gène *slr1543* et la fin du gène *crtR* ainsi, lors de la recombinaison homologue, le gène *slr1543* est conservé dans sa totalité et les 67 derniers acides aminés de *crtR* sont maintenus (Figure 65, Panel B).
Une fois les deux séquences identifiées, un site *Eco*RV a été inséré entre ces deux régions de manière à pouvoir cloner la suite la cassette de résistance à un antibiotique et en l'occurrence ici à la kanamycine. La séquence désirée a été synthétisée et clonée par Twist Bioscience dans le vecteur pTwist générant le plasmide pTwist_crtR.

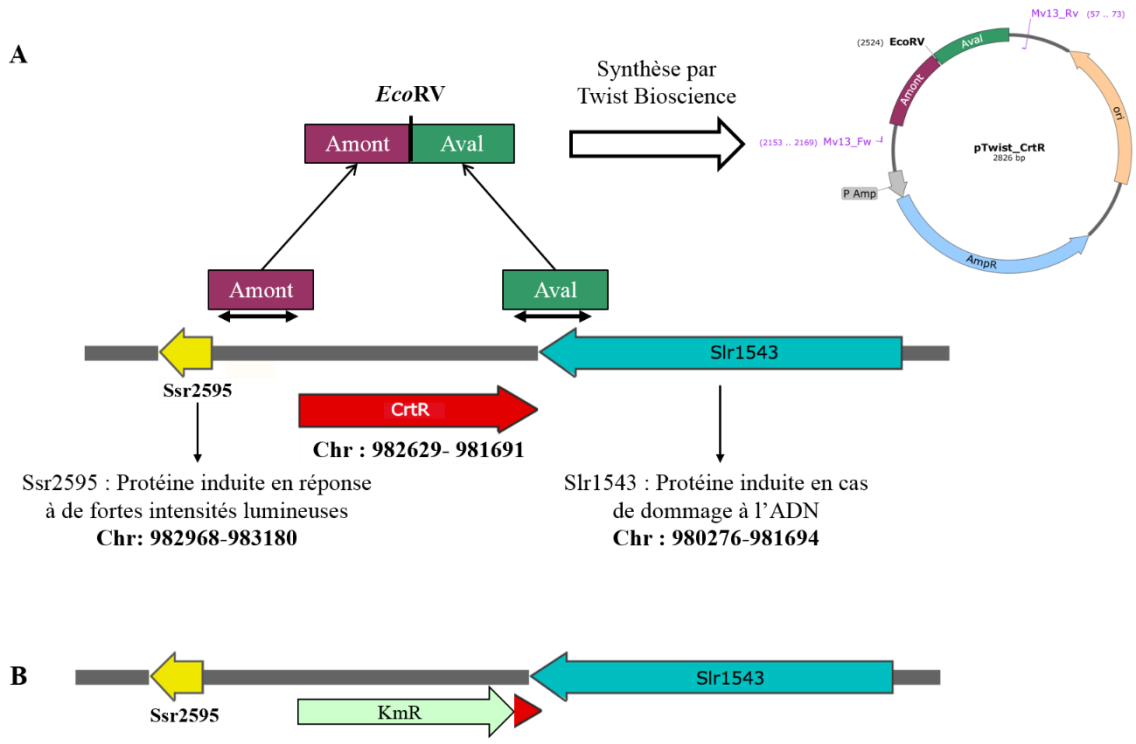


Figure 65 (A) Représentation schématique de l'environnement génétique de *crtR* permettant la sélection des plateformes d'homologie adaptées pour l'inactivation de ce gène et (B) représentation schématique du mutant Δ*crtR* obtenu avec la quasi-totalité du gène *crtR* remplacé par la cassette de résistance à la kanamycine et promoteur associé (Km^R).

Le gène situé en amont de *cruF* est important pour *Synechocystis* PCC 6803 car il code pour la sous-unité II du cytochrome c. Le gène *sll0815* situé en aval code pour une protéine de fonction inconnue, il ne faut cependant pas supprimer des éléments génétiques permettant l'expression et la régulation de ce gène (voir Figure 66, Panel A). Par conséquent, afin de ne pas interférer avec la transcription des gène *sll0813* et *sll0815*, nous avons choisi de ne pas déléter la séquence intégrale de *cruF* mais uniquement une partie de la séquence interne de *cruF* de l'acide aminé 100 à 271 (voir Figure 66, Panel B).
Une fois les deux séquences identifiées, un site *Eco*RV a été inséré entre ces deux régions de manière à cloner par la suite la cassette de résistance à la kanamycine. La construction obtenue a été synthétisée et clonée par Twist Bioscience dans le vecteur pTwist générant le plasmide pTwist_cruF.

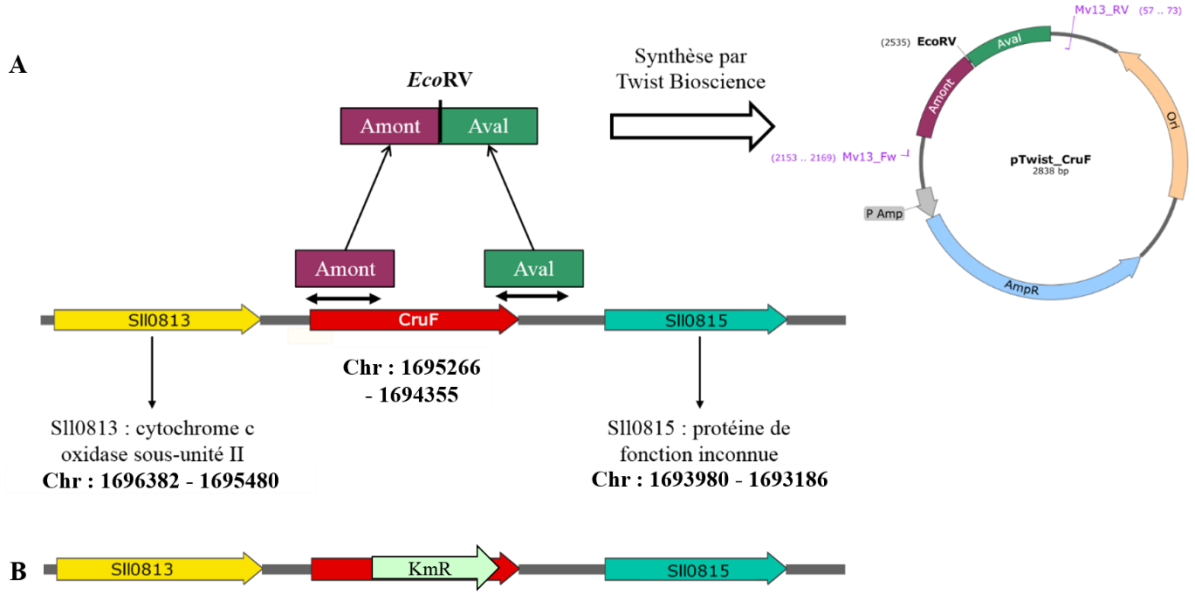


Figure 66 (A) Représentation schématique de l'environnement génétique de *cruF* permettant la sélection des plateformes d'homologie adaptées pour l'inactivation de ce gène et (B) représentation schématique du mutant Δ*cruF* obtenu en remplaçant une grande partie du gène *cruF* par la cassette de résistance à la kanamycine (Km^R).

c. Amplification de la cassette de résistance à la kanamycine et clonage

i. Génération d'une cassette de résistance à la kanamycine (Km^R) par amplification par PCR

La cassette Km^R a été obtenue par amplification PCR à partir du plasmide pUCK4 comme ADN matrice et au moyen d'un couple d'amorces spécifiques comportant le site de restriction *Hinc*II générant ainsi un fragment d'ADN Km^R::*Hinc*II (voir tableau 19 pour les amorces).

ii. Clonage de la cassette de délétion de *cruF* et *crtR*

Les plasmides Twist (pTwist_crtR et pTwist_cruF) contenant les régions d'homologie amont et aval ont ensuite été digérés par l'enzyme de restriction *EcoR*V (génération de bouts francs, NEB). Le fragment Km^R::*Hinc*II a également été digéré par *Hinc*II (génération de bouts francs, NEB) puis les produits de ligation (Figure 67 et 68) ont été utilisés pour transformer des *E. coli* TOP10. Les constructions ainsi obtenues ont été vérifiées par PCR et séquençage ADN.

La ligation se faisant entre deux ADN à bouts francs, elle peut donc donner lieu à deux constructions. En effet, le gène de résistance à la kanamycine peut être inséré en sens (c'est-à-dire dans le sens de transcription du gène à déléter ; Figure 67 et 68) ou en anti-sens (c'est-à-dire dans le sens inverse de la transcription du gène à déléter ; Figure 67 et 68). Il est préférable d'introduire la cassette Km^R dans le sens de transcription du gène à inactiver par conséquent, j'ai réalisé une PCR avec les amorces Mv13_Fw et Mv13_Rv afin de vérifier l'insertion de la cassette Km^R puis avec les amorces Mv13_Fw et Km1_Rv afin de vérifier le sens d'insertion de la cassette (Figure 69 pour crtR et Figure 70 pour cruF).

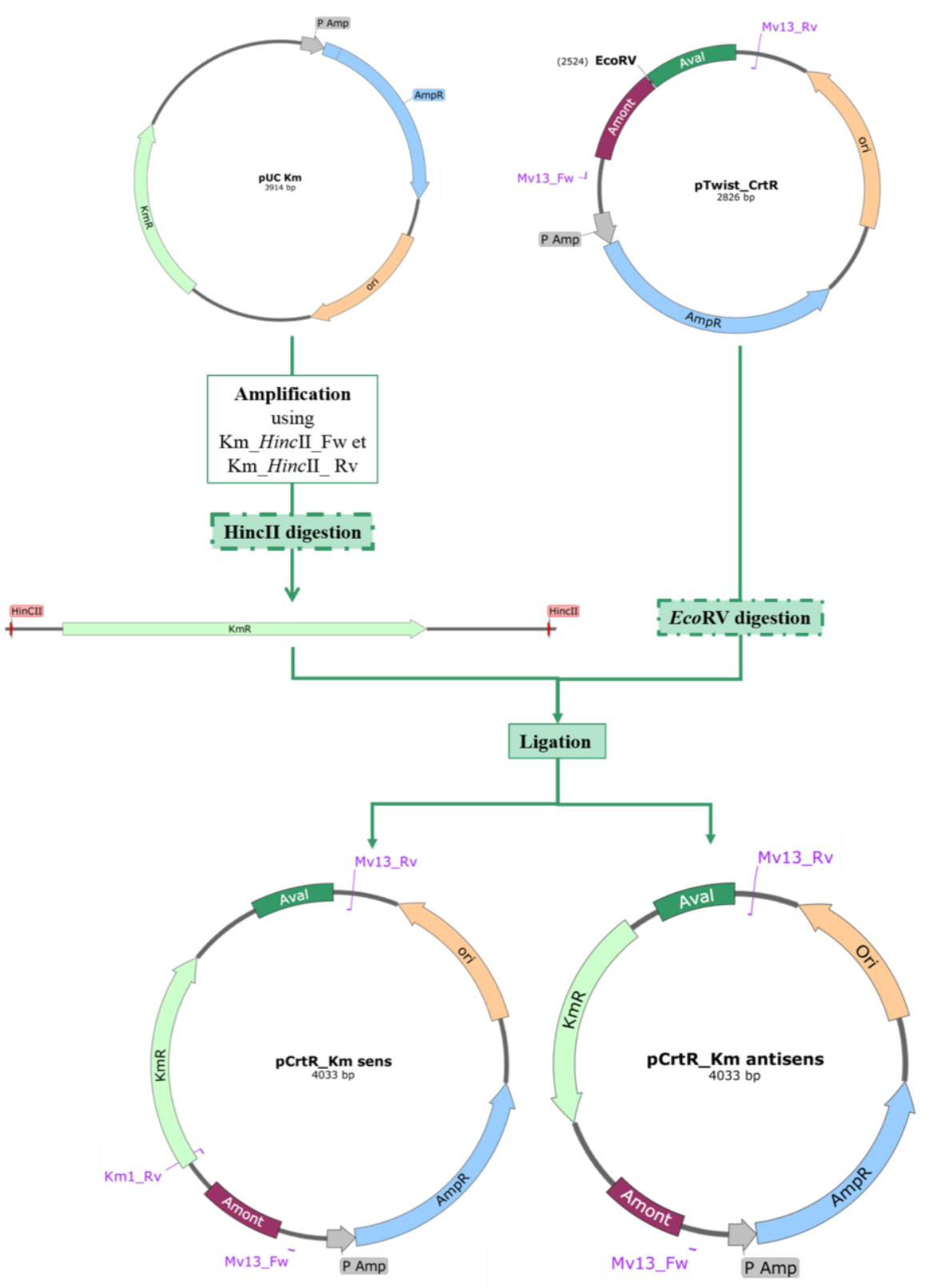


Figure 67 Construction des plasmides pCrtR_Km sens et pCrtR_Km antisens utilisés pour l'inactivation du gène *crtR*

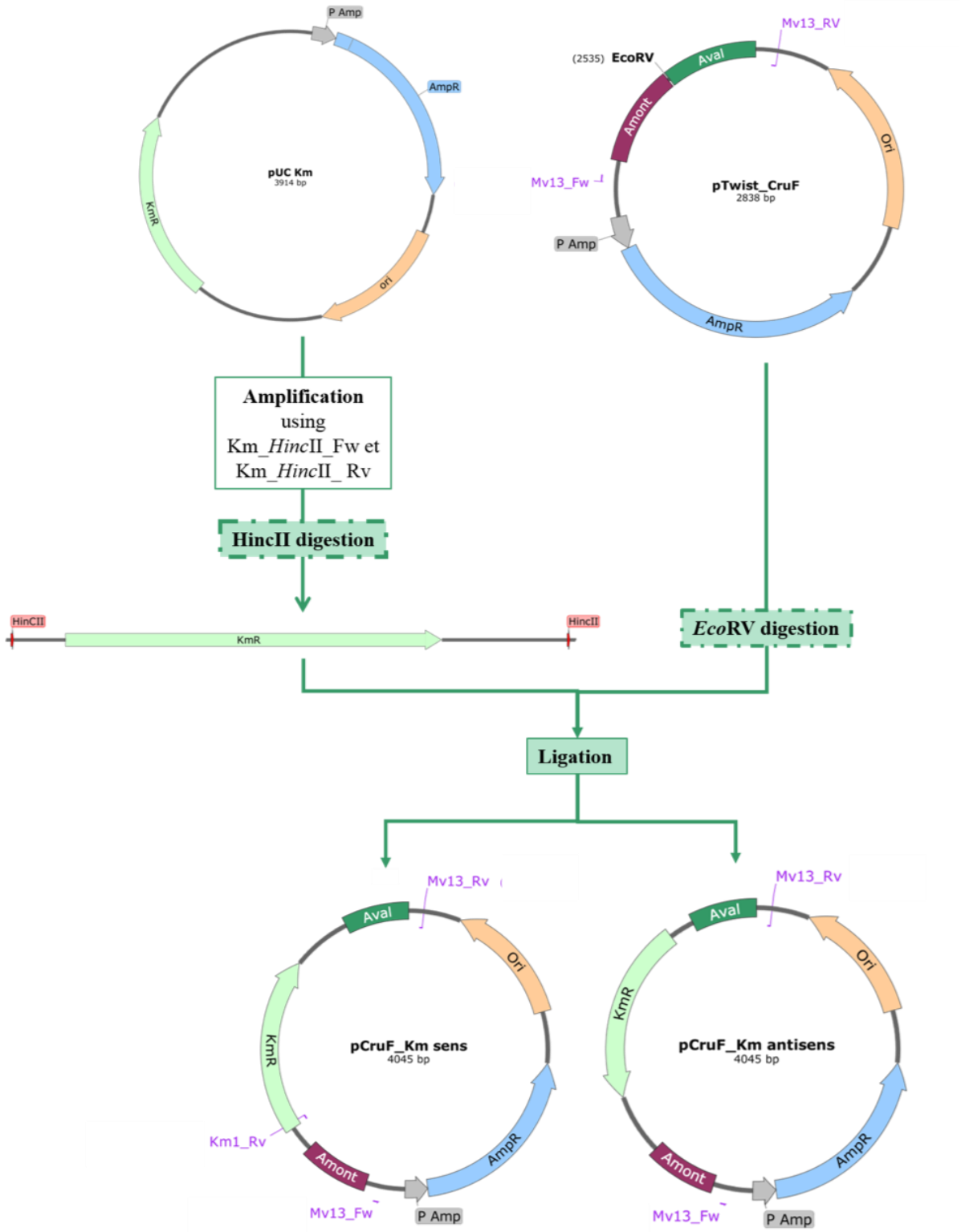


Figure 68 Construction des plasmides pCruF_Km sens et pCruF_Km antisens utilisés pour l'inactivation du gène *cruF*.

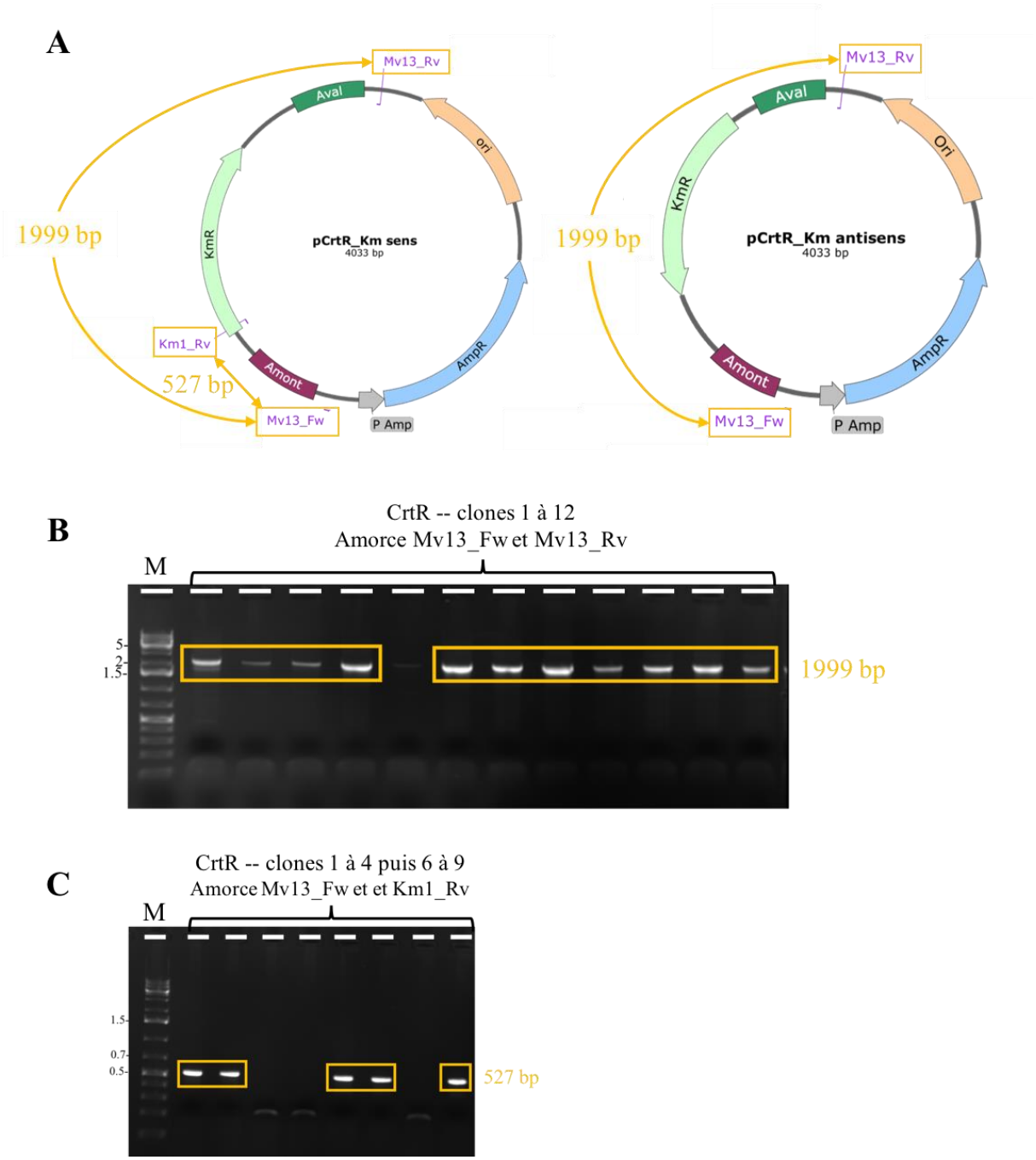


Figure 69 Représentation schématique (A) et photographie d'un gel d'agarose (B et C) montrant les produits d'amplification par PCR des *E. coli* transformées avec le plasmide pTwist_crtR dans lequel la cassette de résistance à la kanamycine a été insérée. Les PCR ont été réalisées avec les amorces Mv13_Fw et Mv13_Rv (B) qui indiquent l'insertion de la Km^R (bande à 1999 bp) ou avec les amorces Mv13_Fw et Km1_Rv (C) pour la vérification du sens d'insertion de la cassette (Km en sens si présence d'une bande à 527 bp, Km en sens inverse si pas de bande). Le marqueur de poids moléculaire (M) est le GeneRuler™ 1Kb plus de Thermoscientifc.

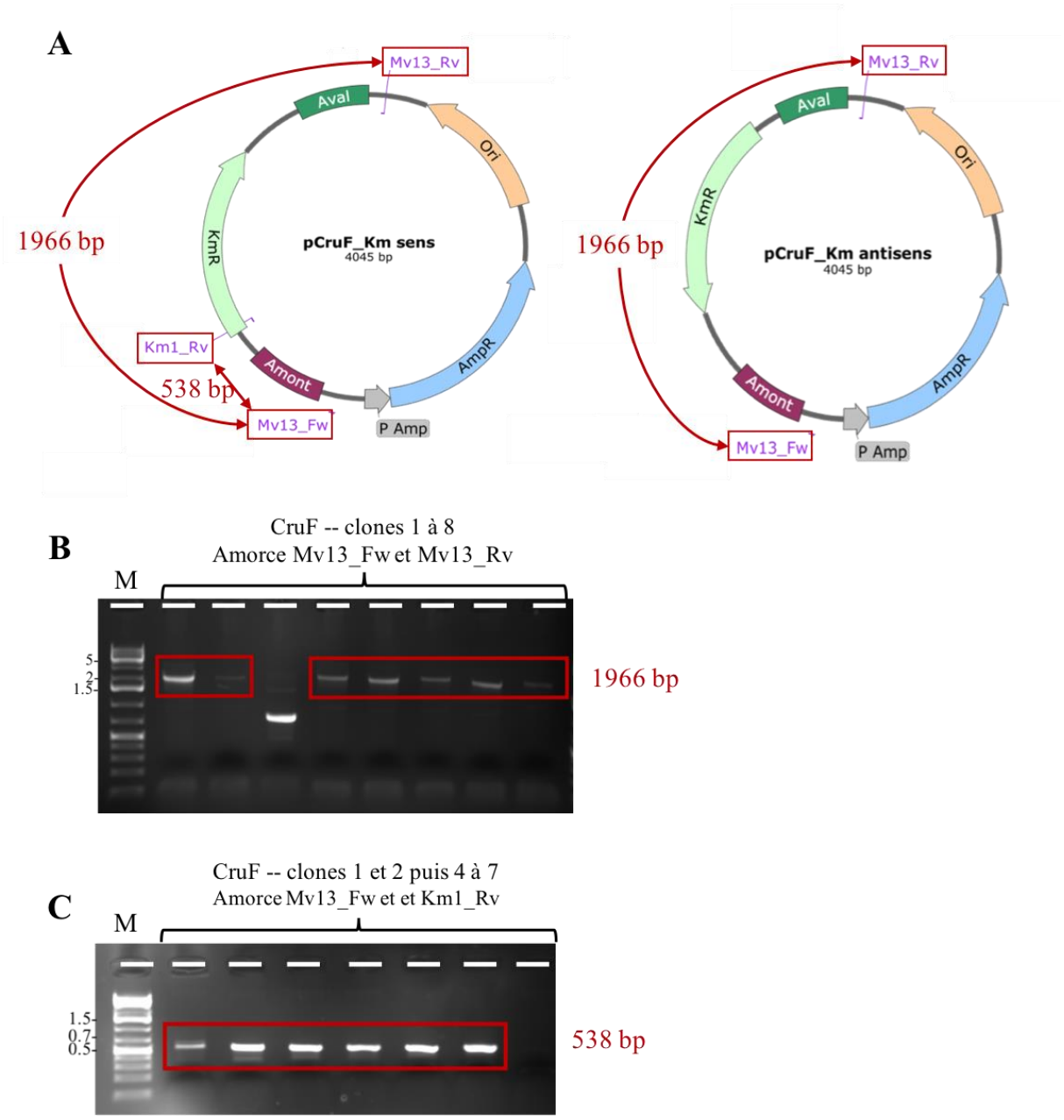


Figure 70 Représentation schématique (A) et photographie d'un gel d'agarose (B et C) montrant les produits d'amplification par PCR des *E. coli* transformées avec le plasmide pTwist_cruF dans lequel la cassette de résistance à la kanamycine a été insérée. Les PCR ont été réalisées avec les amorces Mv13_Fw et Mv13_Rv (B) qui indiquent l'insertion de la Km^R (1966 bp) ou avec les amorces Mv13_Fw et Km1_Rv (C) pour la vérification du sens d'insertion de la cassette (Km en sens si présence d'une bande à 538 bp, Km en sens inverse si pas de bande). Le marqueur de poids moléculaire (M) est le GeneRuler™ 1Kb plus de Thermoscientifc.

d. Transformation naturelle et obtention de mutants ségrégés

Les cassettes de délétions ont été introduites dans la souche sauvage (WT) de *Synechocystis* PCC 6803 et la souche productrice de farnésène (pC-FS) par transformation naturelle réalisée selon (Labarre, Chauvat and Thuriaux, 1989). Les colonies obtenues ont été cultivées en présence de doses croissantes d'antibiotique (Km = 50 – 300 µg/mL) et analysées par PCR

(Figure 71 et 72) afin de vérifier que le marqueur de sélection Km^R s'est bien intégré à la place attendue du génome dans toutes les copies du chromosome polyploïde (10 copies par cellules, (Labarre *et al.*, 1989)) de *Synechocystis* PCC 6803.

Tous les transformants Δ*crtR::Km*^{R} et Δ*cruF::Km*^{R} possèdent uniquement des chromosomes mutants (Km^R) (Figure 71 et 72, voir la présence de la bande spécifique du produit PCR de 1686 pb (*crtR*) ou 2243 pb (*cruF*) caractéristique de la présence de la cassette de résistance à la kanamycine et vérifier l'absence de la bande spécifique du produit PCR de 1566 bp (*crtR*) ou de 1541 pb (*cruF*) correspondant au chromosome sauvage).
La ségrégation a été confirmée après de multiples repiquages sur du milieu MM dépourvu d'antibiotique (pas de contre-sélection des copies sauvages *crtR* ou *cruF*). Aucune copie sauvage n'a été détectée. Ces résultats indiquent que les gènes *crtR* et *cruF* ne sont pas essentiels à la croissance en photoautotrophie dans les conditions standard du laboratoire.

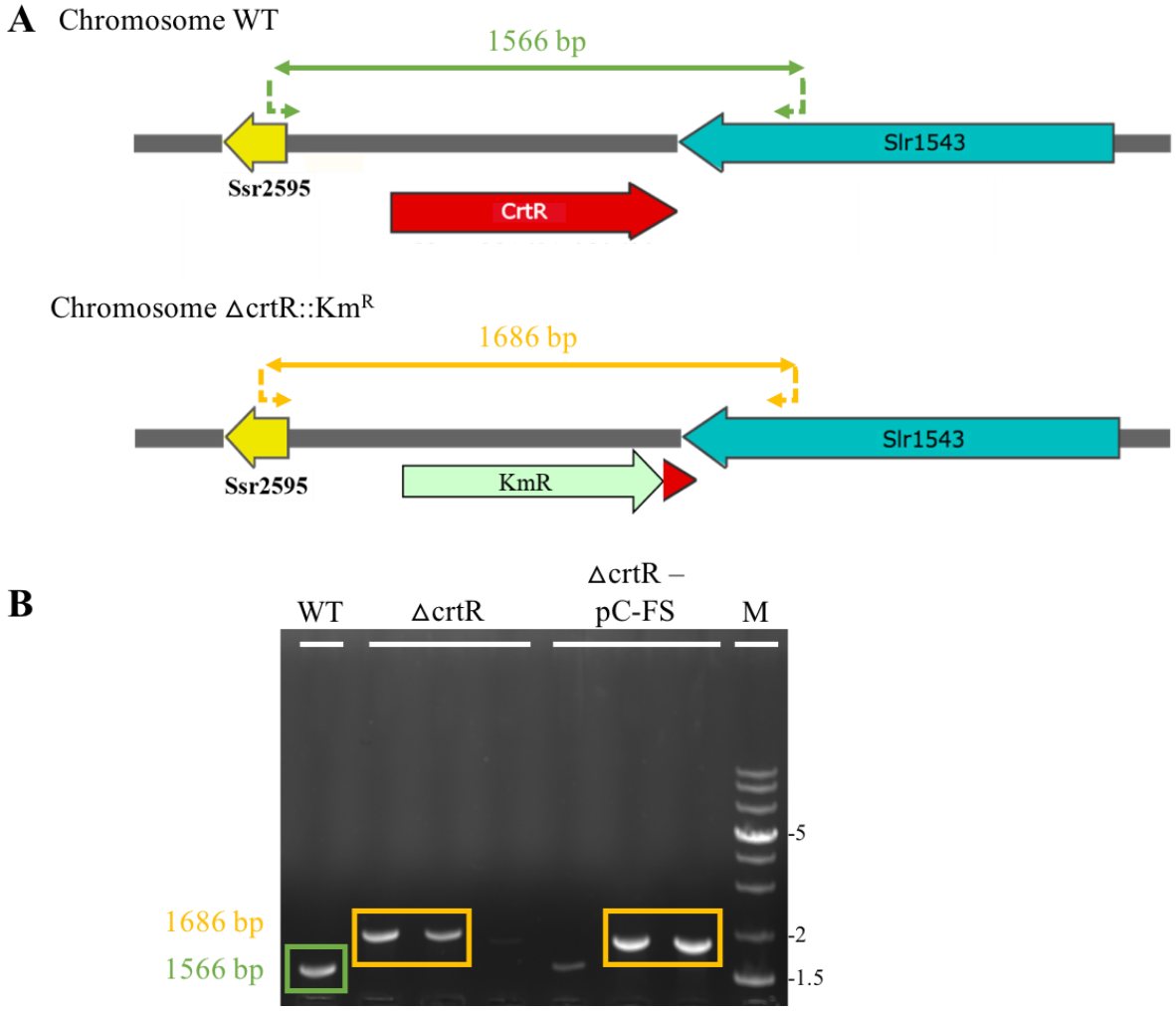


Figure 71 Analyse par PCR des transformants Δ*crtR* de *Synechocystis* PCC 6803 WT ou contenant également le plasmide pC-FS. Représentation schématique (A) du chromosome WT et du chromosome Δ*crtR*::Km^R. Les gènes sont représentés par des flèches colorées orientées en direction de leur transcription. Les mêmes couleurs sont utilisées pour représenter les amorces et leurs produits PCR. Photographie d'un gel d'agarose (B) montrant les produits PCR correspondant à l'amplification du chromosome WT (en vert) et du chromosome Δ*crtR*::Km^R (en jaune). Le puit « M » indique le marqueur de poids moléculaire (GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific)).

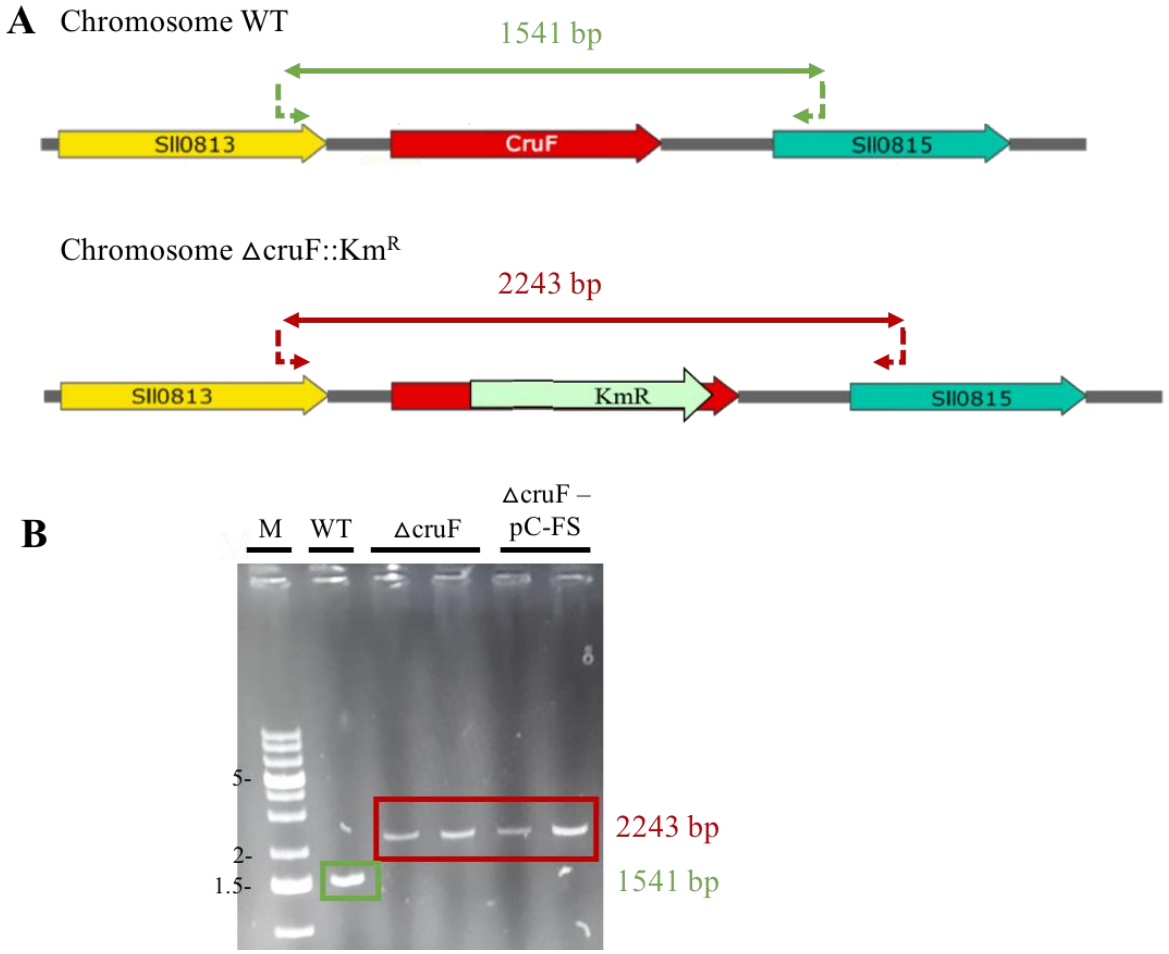


Figure 72 Analyse par PCR des transformants Δ*cruF* de *Synechocystis* PCC 6803 WT ou contenant également le plasmide pC-FS. Représentation schématique (A) du chromosome WT et du chromosome Δ*cruF*::Km ^{R}. Les gènes sont représentés par des flèches colorées orientées en direction de leur transcription. Les mêmes couleurs sont utilisées pour représenter les amorces et leurs produits PCR. Photographie d'un gel d'agarose (B) montrant les produits PCR correspondant à l'amplification du chromosome WT (en vert) et du chromosome Δ*cruF*::Km^{R} (en rouge). Le puit « M » indique le marqueur de poids moléculaire (GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific)).

La production de farnésène par les mutants Δ*crtR*-pC-FS et Δ*cruF*-pC-FS a été analysée et comparée à la production de la souche pC-FS.

e. Effet de l'inactivation des gènes impliqués dans la biosynthèse des caroténoïdes sur la production de farnésène

Les mutants dont le gène *cruF* ou le gène *crtR* a été inactivé et exprimant le gène codant pour farnésène synthase (Δ*cruF* clone 1 et 2 ; pC-FS Δ*crtR* clone 1 et 2) ont une croissance similaire au mutant exprimant le gène codant pour farnésène synthase (pC-FS, Figure 73, panel A). Cependant, la production de farnésène après 10 jours de culture est au moins deux fois moins importante pour les mutants Δ*cruF*1-pC-FS, Δ*cruF*2-pC-FS, Δ*crtR*1-pC-FS et Δ*crtR*2-pC-FS

que pour la souche pC-FS (Figure 73, panel B). Ces résultats sont l'inverses de ceux que nous attendions.

Il est possible que l'inactivation du gène *cruF* ou du gène *crtR* et donc l'inactivation de la synthèse des myxoxantophylles (Δ*cruF*) ou des myxoxantophylles, de la cryptoxanthine, de la zeaxanthine et de la 3'-hydroxyechinenone (Δ*crtR*) entraine l'accumulation d'autres caroténoïdes (β-carotène notamment). Cette accumulation peut provoquer la mise en place de boucles de rétrorégulation qui réduisent le flux au travers de la voie MEP. Il serait intéressant de regarder la production de farnésène par ces mutants sous une faible ou forte intensité lumineuse.

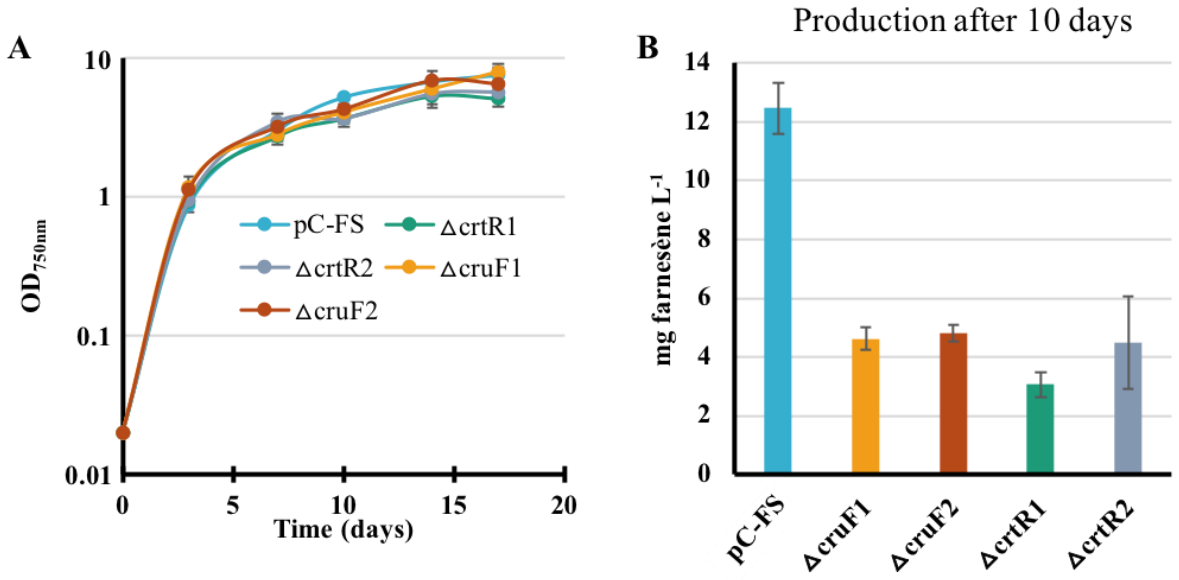


Figure 73 Impact de l'inactivation totale de *cruF* (2 clones indépendants ΔcruF1 et ΔcruF2) et *crtR* (2 clones indépendants ΔcrtR1 et ΔcrtR2) sur la croissance (A) et production de farnésène (B) par *Synechocystis* PCC 6803 pC-FS. Les expériences ont été réalisées en triplicats dans le milieu MM à 2500 lux, 30°C, 140 rpm, ODi = 0,02.

9. Délétion des voies de stockage du carbone sous forme de glycogène et de PHB chez Synechocystis PCC 6803

a. Intérêts

La stratégie est de réorienter le flux de carbone (CO_2) fixé par la photosynthèse vers la production de terpènes plutôt que vers la production de réserves carbonées (le glycogène et les polyhydroxybutyrates ou PHB).
Cette stratégie s'est montrée payante pour augmenter la production d'éthanol par *Synechocystis* PCC 6803. Les auteurs ont inactivé le gène *glgC* ou les gènes *phaC* et *phaE* ce qui a permis d'augmenter la production d'éthanol par 4,2 (Δ*glgC*) et par 5 (Δ*phaC* et Δ*phaE*) en conditions de carence en azote (Namakoshi *et al.*, 2016).

Pour cela, Nicolas Irlinger (stagiaire Master 2 au laboratoire) a construit chez *Synechocystis* PCC 6803 les mutants de délétion (Figure 74) :

- du gène *glgC* codant pour l'enzyme glucose-1-phosphate adenyl-transférase impliquée dans la synthèse du glycogène,
- des gènes *phaA* et *phaB* codant pour les enzymes PHA-specifique β-ketothiolase et PHA-specifique acetoacetyl-CoA réductase qui permettent la synthèse des PHB.

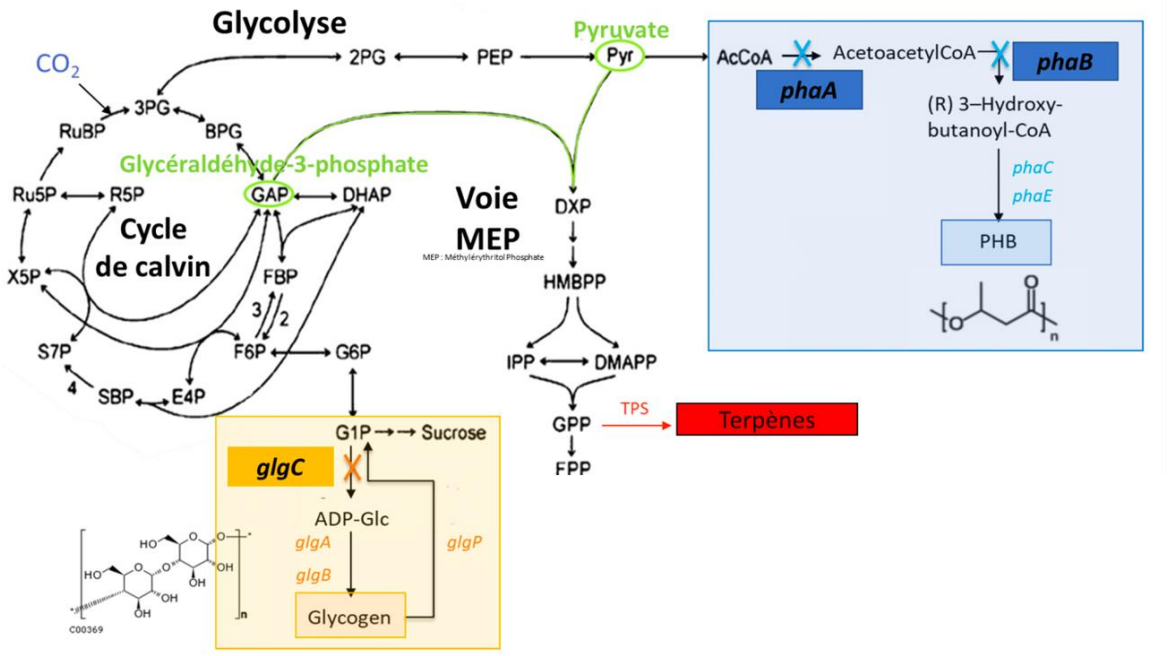


Figure 74 Stratégie de délétion des voies de stockage du carbone

Les cassettes de délétion de Δ*glgC* et de Δ*phaA* et Δ*phaB* ont été obtenues grâce à une stratégie similaire à celle utilisée pour inactiver les gènes *crtR* et *cruF*.
Ces cassettes de délétion ont été utilisées pour inactiver *glgC* et *phaA+phaB* dans la souche sauvage de *Synechocystis* PCC 6803 et les souches productrices de terpènes (pC-LS, pC-BS et pC-FS). Les transformants obtenus ont été sélectionnés et ségrégés en présence de kanamycine.

b. Le gène *glgC* est essentiel à la croissance de la souche en photoautotrophie alors que les gènes *phaA* et *phaB* ne le sont pas

Par PCR, nous avons montré que le gène *glgC* était essentiel à la croissance de la souche en photoautotrophie (mutant non ségrégé, c'est-à-dire qu'il reste des copies sauvages du gène *glgC ;* démontré par Nicolas Irlinger) alors que les gènes *phaA* et *phaB* n'étaient pas essentiels à la croissance de la souche en photoautotrophie (mutant dit ségrégé, c'est-à-dire, qu'il ne reste plus de copies sauvages des gènes). Les résultats obtenus pour le mutant Δ*glgC* sont à l'inverse de ce qui a été publié précédemment (Ducat *et al.*, 2012; Van der Woude *et al.*, 2014; Namakoshi *et al.*, 2016).

c. Résultats de production de limonène par les mutants Δ*glgC*

Nicolas Irlinger a testé l'effet de la délétion du gène *glgC* sur la production de limonène. Les mutants dont le gène *glgC* a été inactivé et exprimant le gène codant pour limonène synthase (pC-LS ΔglgC clone 1 à 4) ont une croissance et une production de limonène similaire au mutant exprimant seulement le gène codant pour limonène synthase (pC-LS, Figure 75).

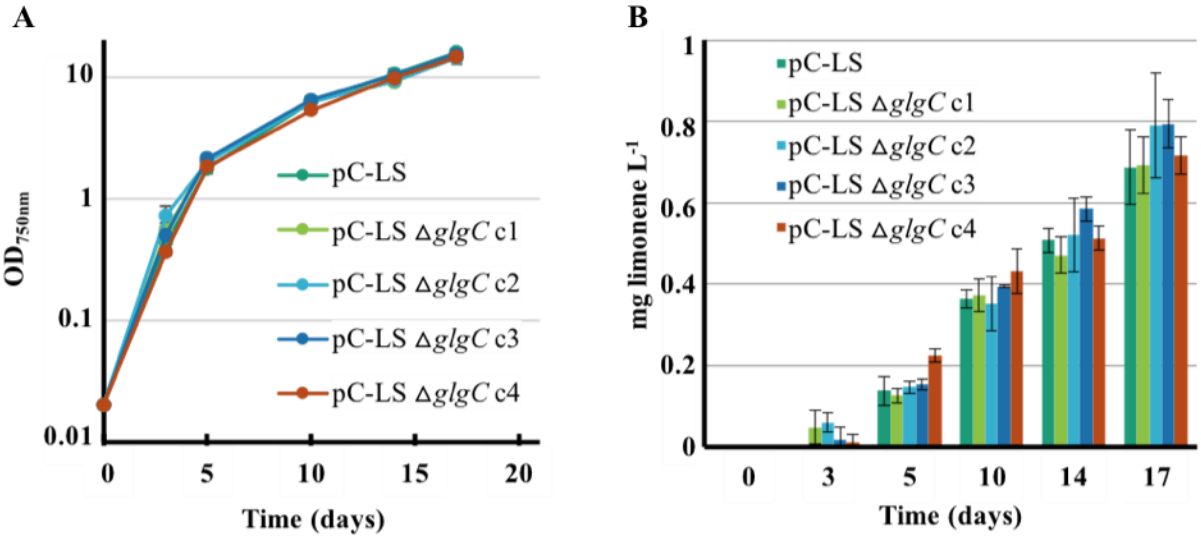


Figure 75 Impact de l'inactivation partielle de *glgC* sur la croissance (A) et la production de limonène (B) par *Synechocystis* PCC 6803 pC-LS. Les manipulations ont été réalisées en triplicats dans le milieu MM à 2500 lux, 30°C, 140 rpm, ODi = 0,02.

Par conséquence, comme démontré précédemment pour *Synechococcus* PCC 7002 (Davies *et al.*, 2014b), l'inactivation partielle de *glgC* et donc du stockage du carbone sous forme de glycogène, n'augmente pas la production de terpène. Cela est certainement dû au fait que le carbone non stocké est redirigé vers la synthèse d'autres réserves carbonées (PHB par exemple) ou bien redistribué dans tout le métabolisme. Il serait intéressant de refaire cette manipulation en condition de carence en azote car c'est dans cette condition que la souche accumule du glycogène.

Au vu de ces résultats, nous n'avons pas étudié l'effet de la délétion de *glgC* sur la production de bisabolène et farnésène.

d. Résultats de production de limonène, bisabolène et farnésène par les mutants Δ*phaAB*

Les mutants dont les gènes *phaA* et *phaB* ont été inactivés et exprimant la limonène synthase (pC-LS Δ *phaAB* clone 1 et 2) ont une croissance et une production de limonène similaire au mutant exprimant seulement le gène codant pour la limonène synthase (pC-LS, Figure 76). De même, pour la production de farnésène et de bisabolène, l'inactivation totale de *phaA* et *phaB* n'améliore pas les rendements (pC-FS et pC-BS, Figure 77).

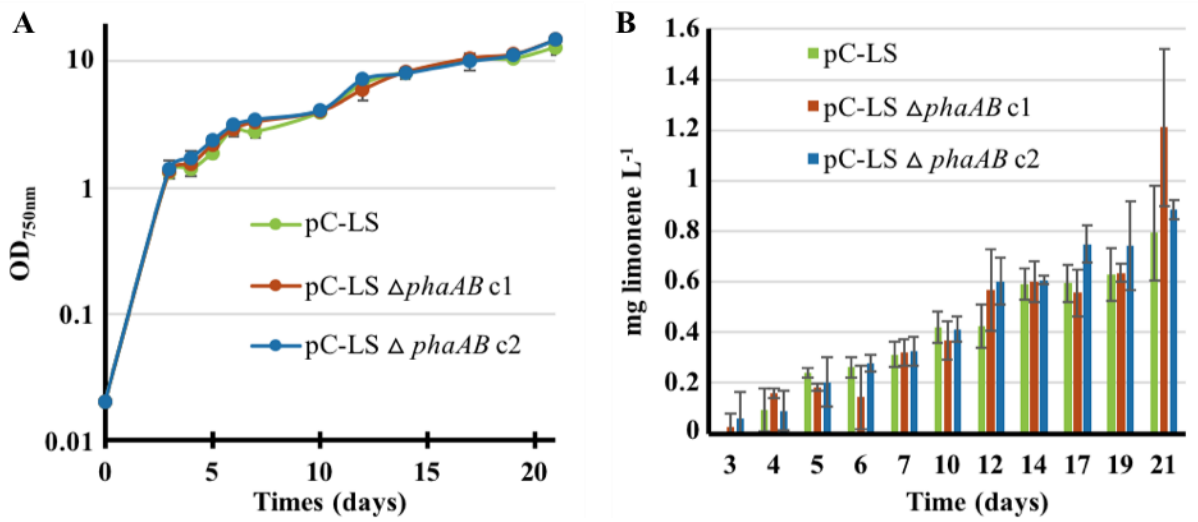


Figure 76 Impact de l'inactivation totale de *phaA* et *phaB* sur la croissance (A) et la production de limonène (B) par *Synechocystis* PCC 6803 pC-LS. Les manipulations ont été réalisées en triplicats dans le milieu MM à 2500 lux, 30°C, 140 rpm, ODi = 0,02.

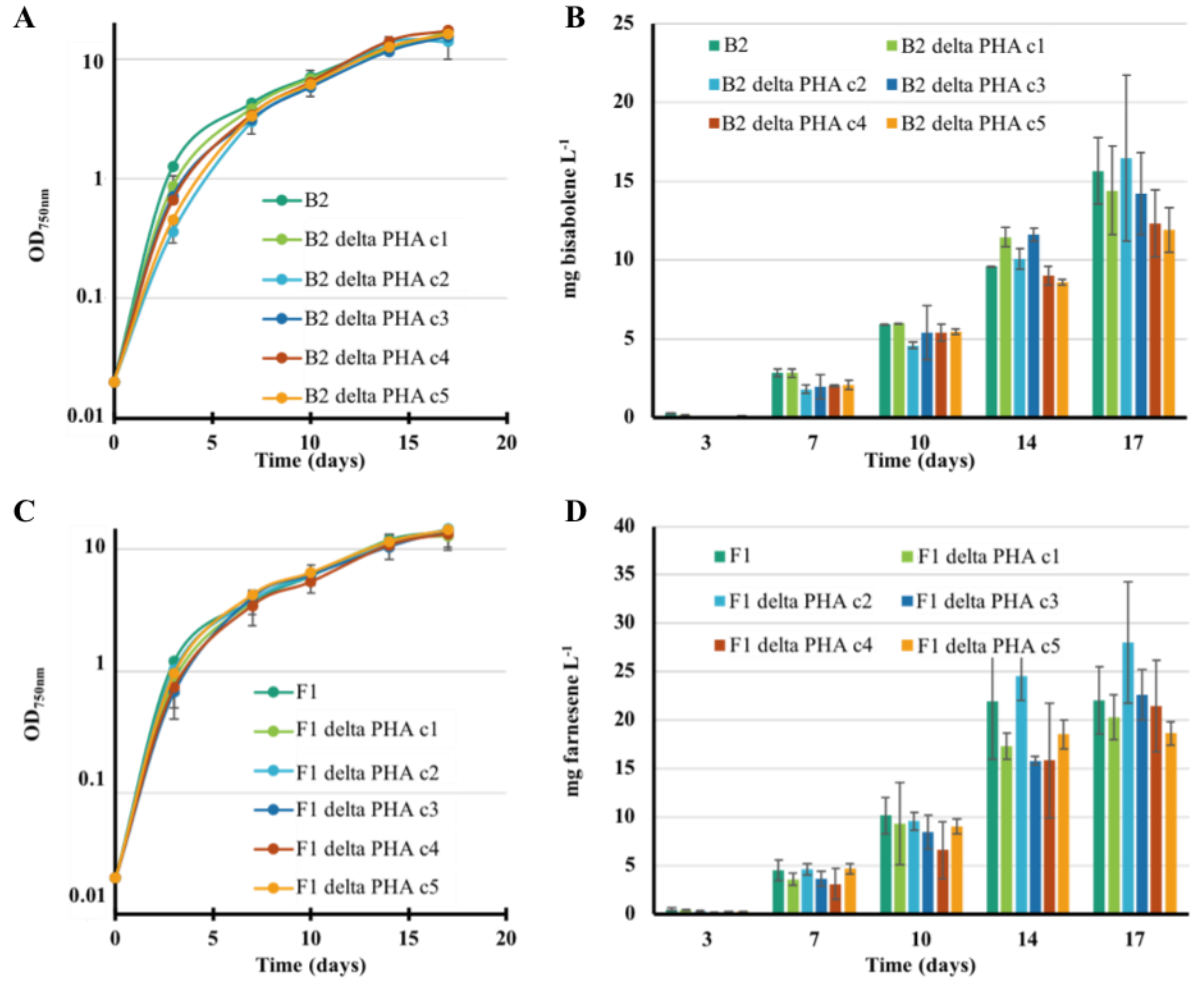


Figure 77 Impact de l'inactivation totale de *phaA* et *phaB* sur la croissance (A et C) et la production de bisabolène (B) et farnésène (D) par *Synechocystis* PCC 6803 pC-BS ou pC-FS. Les manipulations ont été réalisées en triplicats dans le milieu MM à 2500 lux, 30°C, 140 rpm, ODi = 0,02

L'inactivation de *phaA* et *phaB* et donc du stockage du carbone sous forme de PHB, n'augmente pas la production de terpènes. Cela est certainement dû au fait que le carbone non stocké est redirigé vers la synthèse d'autres réserves carbonées (glycogène par exemple) ou bien redistribué dans tout le métabolisme. Il serait intéressant de refaire cette manipulation en condition de carence en azote car c'est dans cette condition que la souche accumule des PHBs.

10. Conclusion et perspectives

Notre étude est la première étude à comparer la production de 4 terpènes (2 monoterpènes : limonène et pinène ; 2 sesquiterpènes : bisabolène et farnésène) par *Synechocystis* PCC 6803 exprimant les gènes codant pour les terpènes synthases correspondantes. Les rendements obtenus varient fortement entre les terpènes : de 0,08 mg/L pour le pinène à 30 mg/L pour le farnésène après 21 jours de culture. Avec les résultats obtenus pour ces 4 terpènes, il semblerait que *Synechocystis* PCC 6803 produise de façon beaucoup plus efficace (facteur 10 à 320) les sesquiterpènes que les monoterpènes. Ceci reste à approfondir et pourrait être dû à une différence dans le pool de GPP et de FPP. Il a, en effet, été démontré précédemment que la quantité de GPP était limitante pour la production de limonène par *Synechocystis* PCC 6803 (Lin *et al.*, 2017). Il serait donc intéressant de tester l'effet de l'augmentation du pool de GPP ou de FPP (selon le tepène à produire) en exprimant un gène d'*E.coli* ou de plantes permettant la production spécifique de ces métabolites. Le gène *gps1* d'*Arabidopsis Thaliana* code spécifiquement pour une GPP synthase alors que le gène *fps1* et *fps2* de la même plante code spécifiquement pour une FPP synthase.

Cette variation de production entre les mono et les sesquiterpènes peut également être causée par une différence d'activité catalytique des terpènes synthases. Chez les plantes, les monoterpènes synthases sont codées par le noyau puis transitent jusqu'aux chloroplastes grâce à la présence d'un peptide signal. Par conséquent, lors du design des monoterpènes synthases, les acides aminés correspondants au peptide signal ont été identifiés et enlevés ce qui a pu affecter l'activité de ces enzymes. Cependant, cette dernière hypothèse n'est pas vérifiée pour certaines autres cyanobactéries (*Synechococcus* PCC 7002 notamment) qui produisent autant de limonène que de bisabolène et farnésène (décrit dans la suite de ce manuscrit). Cela est très intéressant car cela démontre que les divers châssis cyanobactériens ne produisent pas tous les terpènes avec la même efficacité.

Les rendements en pinène et en bisabolène obtenus dans cette étude, dans les conditions standard du laboratoire (erlenmeyers), sont similaires aux rendements décrits dans la littérature pour *Synechocystis* PCC 6803 (Tashiro *et al.*, 2016; Sebesta and Peebles, 2019). Il a néanmoins été démontré qu'il était possible d'améliorer grandement la production de bisabolène par cette souche en utilisant des systèmes de culture à haute densité cellulaire (système HDC pour « high density cell culture » ; (Dienst *et al.*, 2020)). Nous venons de commander ce système et le testerons prochainement sur les meilleures souches productrices.

La production de limonène décrite ici est égale (Kiyota *et al.*, 2014) ou inférieure (Lin *et al.*, 2017) à ce qui a été décrit précédemment. Cette différence peut être expliquée par les modes opératoires utilisés et notamment par le fait que, dans les études réalisées précédemment, le gène codant pour la limonène synthase est intégré au chromosome de *Synechocystis* PCC 6803 et non exprimé à partir d'un plasmide réplicatif. Victoire Blanc-Garin (doctorante du laboratoire) est en train d'analyser l'influence de la localisation du système d'expression (les gènes codant pour les terpènes synthases exprimés à partir du plasmide pFC1, à partir du site neutre *slr0168*, à partir des petits plasmides endogènes pCA2.4 et pCC5.2 ou à partir de plusieurs de ces sites). L'objectif est non seulement d'étudier l'influence de la localisation du système d'expression sur la production de terpènes (ce qui n'a jamais été réalisé auparavant) mais aussi d'augmenter le nombre de copies des gènes codant pour les terpènes synthases afin d'améliorer la production de terpènes. Nous savons que ces enzymes ont une faible activité catalytique et sont souvent limitantes pour la production de terpènes (Gao *et al.*, 2016). Cette stratégie est donc particulièrement intéressante à poursuivre.

Par ailleurs, cette étude est la première à montrer la modification génétique de *Synechocystis* PCC 6803 pour la production d'α-farnésène. Les rendements obtenus (30 mg/L) sont bien supérieurs à ceux décrits pour *Anabaena* PCC 7120 (305,4 µg/L après 15 jours de culture ; (Halfmann *et al.*, 2014a) et pour *Synechococcus* PCC 7942 (production non quantifiable si seul le gène codant pour la farnésène synthase est exprimé (Lee *et al.*, 2017)).

Cette étude est également la première à démontrer :

- La stabilité de la production de divers terpènes pendant 6 mois ;

- L'influence de la phase de croissance sur la productivité en limonène et de farnésène : *Synechocystis* PCC 6803 produit des quantités plus importantes de terpènes par unité de biomasse lorsqu'elle est en (fin de) phase exponentielle de croissance. Cependant les faibles quantités de biomasse en phase exponentielle font que les rendements (en mg/L ou en mg/L/jour) restent faibles. Ces rendements augmentent de façon importante en phase de ralentissement quand la quantité de biomasse devient importante et cela même si la production par unité de biomasse (mg/L/OD_{750nm}/jour) diminue. Concernant les phases de production de bisabolène par *Synechocystis* PCC 6803, (Dienst *et al.*, 2020) ont montré qu'il n'y avait pas de différence de productivité entre la phase exponentielle et le début de la phase de ralentissement. Nous observons une forte augmentation de la productivité (en mg/L) entre la (fin de la) phase exponentielle (jours 1 à 6) et la phase de ralentissement. La productivité (mg/L/jour) est maximale entre le 12ème et le 19ème jour de croissance. Cela est directement corrélé avec une augmentation de la biomasse car la production par unité de biomasse reste constante que la souche soit en phase exponentielle ou en phase de ralentissement ;

- L'impact des conditions de culture (température, lumière, source et abondance de carbone) sur la production de farnésène : *Synechocystis* PCC 6803 produit plus de farnésène à 2500 lux, à 30°C dans un milieu MM enrichi en bicarbonate ($NaHCO_3$). Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus pour la production de manoyl oxyde et de β-

phéllandrène : la production était plus faible à forte lumière si PpsbA2 (promoteur inductible à la lumière) n'était pas utilisé pour contrôler l'expression du gène codant pour la terpène synthase (Formighieri and Melis, 2014a; Englund *et al.*, 2015).

- Qu'il est possible de cultiver *Synechocystis PCC* 6803 en présence d'urée comme seule source d'azote et de lui faire produire des terpènes dans ce milieu. La souche a une croissance similaire dans un milieu contenant du nitrate ou de l'urée si de petites doses d'urée sont ajoutées au fur et à mesure qu'il est consommé. La production de bisabolène est similaire quand la souche est cultivée dans un milieu contenant du nitrate ou de l'urée comme substrat azoté. Ces expériences sont en cours pour la production de farnésène et de limonène. Il sera donc intéressant de faire des comparaisons par la suite. Par ailleurs, le laboratoire a montré précédemment qu'une mutation spontanée (A85V) dans la chaperonne UreG de l'uréase réduisait l'activité de cette enzyme et permettait d'améliorer la croissance de la souche en urée (Veaudor *et al.*, 2018a). Il pourrait être intéressant de regarder la production de terpènes par ce châssis mutant.

Une fois *Synechocystis* PCC 6803 identifiée comme un châssis prometteur pour la production efficace de farnésène et les conditions de culture adéquates identifiées, nous avons essayé de rediriger les flux de carbone vers la production de cette molécule. Les voies de consommations directes (synthèse des caroténoïdes) et indirectes (synthèse de glycogène et de PHB) des précurseurs des terpènes (pyruvate, G3P, GPP et FPP) ont été inactivées.
La production de farnésène est deux fois plus faible dans les mutants de délétion des voies de biosynthèse des caroténoïdes (Δ*cruF* et Δ*crtR*). La redistribution du flux vers la synthèse d'autres caroténoïdes et la mise en place de boucles de rétrorégulation pourraient être à l'origine de cette baisse de production. Il serait intéressant de regarder l'influence de ces inactivations lorsque les mutants sont cultivés à différentes lumières.

L'inactivation partielle (Δ*glgC*) ou totale (Δ*phaAB*) des voies de stockage de carbone sous forme de glycogène ou de PHB n'a pas améliorée la production de limonène (Δ*glgC*) ni de limonène, bisabolène ou farnésène (Δ*phaAB*). Il serait intéressant de faire des comparaison de production de ces souches lorsque qu'elles sont cultivées dans un milieu carencé en azote ; condition dans laquelle *Synechocystis* PCC 6803 produit le plus de réserves carbonées. De plus, le carbone non stocké est certainement redirigé vers la synthèse d'autres réserves carbonées (synthèse de glycogène dans le mutant Δ*phaAB* et synthèse de PHB dans le mutant Δ*glgC*). Par conséquent, il serait intéressant de mesurer la quantité de glycogène et de PHB dans ces mutants et de construire un double mutant Δ*glgC* et Δ*phaAB.* La construction de ce mutant nécessiterait cependant de changer la cassette de résistance (Δ*glgC::Km*^{R} en Δ*glgC::érythromycine*^{R} par exemple) pour l'une des deux inactivations.
Enfin, afin d'augmenter la production de sesquiterpènes par *Synechocystis* PCC 6803, nous sommes actuellement en train de réaliser des modifications génétiques qui pourraient permettre d'améliorer la fixation du carbone par le cycle de Calvin-Benson-Bassham (surexpression des gènes codant pour diverses version de la ribulose bi-phosphate carboxylase/oxygénase et de la phosphoribulokinase).

II. Quantification de la production de mono (limonène) et sesquiterpènes (bisabolène et farnésène) par la cyanobactérie modèle *Synechococcus* PCC 7942

1. Intérêts de l'étude

Synechococcus PCC 7942 est une souche modèle de cyanobactérie qui a déjà été modifiée génétiquement pour la production d'amorphadiène (Choi *et al.*, 2016), de farnésène (Lee *et al.*, 2017), de limonène (Wang *et al.*, 2016), d'isoprène (Gao *et al.*, 2016) et de squalène (Choi *et al.*, 2016). Dans toutes ces études, le gène codant pour la terpène synthase d'intérêt a été cloné dans le site neutre I ou II et les rendements de production obtenus sont très faibles (non quantifiable pour la production de farnésène, 8,5 µg/L/DO/jour pour la production de limonène et jusqu'à 7,7 mg/L pour l'isoprène).
Ces faibles rendements ont pu être améliorés en modifiant le promoteur contrôlant l'expression du gène *terpène synthase* ou en (sur)exprimant les gènes (endogènes ou hétérologues) codant pour diverses enzymes de la voie MEP (DXS, IDI, IspA (Choi *et al.*, 2016; Gao *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2017)).

Cependant, aucune étude ne compare la production de plusieurs terpènes par cette souche ni ne décrit la production en exprimant le gène codant pour la terpène synthase à partir d'un plasmide réplicatif. De plus, les publications reportent des études qui ont souvent été réalisées sur un temps court (7 jours) sans aucune indication sur leur évolution dans le temps.

Nous avons par conséquent décidé d'étudier (i) la production de deux mono et de 2 sesquiterpènes par *Synechococcus* PCC 7942 ; (ii) la production lorsque le gène *terpène synthase* est exprimé à partir d'un plasmide réplicatif et (iii) la stabilité des constructions et productions au cours du temps.

2. Effet de la présence de dodécane sur la croissance de Synechococcus PCC 7942

Au contraire de *Synechocystis* PCC 6803, la présence de dodécane semble avoir un effet très néfaste sur la croissance de *Synechococcus* PCC 7942. En effet, lorsque 20% v/v_{tot} de dodécane sont ajoutés dans son milieu de culture, la souche ne pousse pas pendant les 7 premiers jours puis la croissance reprend (Figure 78, WT na + dodécane en orange). Il s'agit, ici, d'une adaptation car lorsque la souche est « adaptée » au dodécane, c'est-à-dire lorsqu'elle était repiquée en présence de dodécane à partir d'une culture préalablement cultivée avec du dodécane, alors elle n'a pas de longue phase de latence. La croissance de la souche « adaptée » (notée WTa) est similaire à la croissance de la souche dans un milieu ne contenant pas de dodécane (Figure 78, WT a + dodécane en vert clair comparé à WT en vert foncé). Il semblerait

donc que la souche ait besoin de s'adapter à cette condition pour des raisons encore inconnues. On peut parler ici d'adaptation car il n'y a pas d'accumulations de mutations dans le génome de la souche « adaptée ». En effet, si cette dernière est repiquée plusieurs fois sans dodécane alors il est nécéssaire de la réadapter.

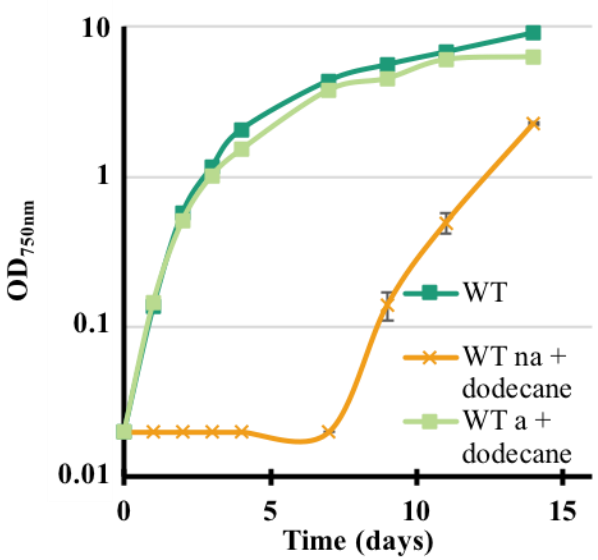


Figure 78 Courbe de croissance de la souche *Synechococcus* PCC 7942 WT en présence (+ dodécane) ou absence de 20% v/v_{tot} de dodécane. La souche a été préalablement cultivée (WT a) ou non (WT na) en présence du dodécane. Ces expériences ont été réalisées en triplicats dans des erlenmeyers contenant du milieu MM à 30°C sous un éclairement de 2500 lux, avec agitation (140 rpm dans un incubatur Infors).

Choi *et al.*, ont montré que la croissance de *Synechococcus* PCC 7942 était légèrement inhibée par la présence d'une couche de dodécane (20% v/v_{tot}) (81,3% de la biomasse de la souche sans solvant après 5 jours) mais ils n'ont pas observé le ralentissement de croissance décrit dans cette etude (Figure 78). Cependant, dans leur étude, la souche était cultivée sans agitation avec 5 % (v/v) de CO_2 ajouté par bullage (10 mL/min ; (Choi *et al.*, 2016)) tandis que nous cultivons avec agitation en présence de Na_2CO_3 ajouté dans le milieu. Leur mode opératoire réduit probablement le contact entre les cellules et la couche de dodécane diminuant de ce fait la « toxicité » de ce dernier.
De même, (Lee *et al.*, 2017) n'ont pas observé d'inhibition de la croissance due à la présence de dodécane, cependant leurs expériences étaient également réalisées sans agitation et avec bullage de CO_2.

3. Introduction des plasmides codant pour les terpènes synthases et phénotypes des souches productrices

Les plasmides pC-LS, pC-PS, pC-BS et pC-FS ainsi que le plasmide pC ont été introduits chez *Synechococcus* PCC 7942 par conjugaison (voir introduction chapitre 2.V. et Matériels et Méthodes). La présence de ces plasmides a été vérifiée par PCR (Figure 79, vérification pC effectuée par Encarnacion Diaz-Santos et donc non présentée ici) et la séquence des gènes

codant pour les terpènes synthases, ainsi que la séquence promotrice et le RBS permettant leur expression, ont été vérifiées par séquençage ADN.

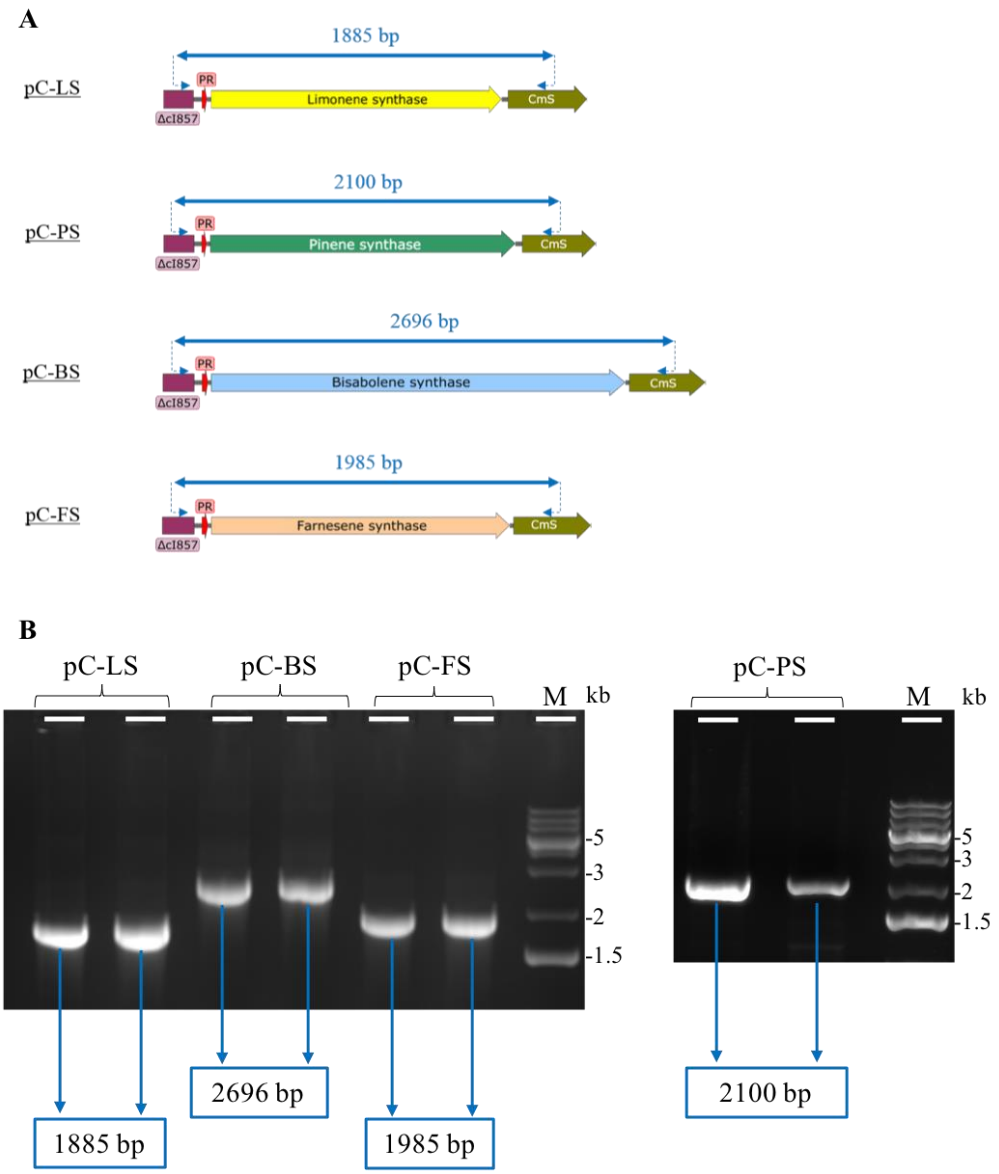


Figure 79 Représentation schématique (A) et photographie d'un gel d'agarose (B) montrant les produits d'amplification par PCR (amorces pFCI_Fw et pFCI_Rv (triangles bleus)) des différents vecteurs d'expression contenant les gènes codant pour les terpènes synthases (pC-LS, pC-BS, pC-FS et pC-PS) chez *Synechococcus* PCC 7942. Le marqueur de poids moléculaire (M) est le GeneRuler™ 1Kb plus de Thermoscientifc.

Les souches productrices de limonène (pC-LS), de pinène (pC-PS), de bisabolène (pC-BS) et de farnésène (pC-FS) ainsi que le mutant pC ont été adaptées au dodécane par 3 repicages successifs en présence de ce solvant.

Ensuite, la croissance en photoautotrophie, dans les conditions standard du laboratoire (Milieu MM, 2500 lux, 30°C, 140 rpm), a été testée pour ces différentes souches ingénierées en présence ou absence de dodécane. Comme cela a été observé pour *Synechocystis* PCC 6803, les

plasmides se répliquent de façon stable et autonome dans la souche et leur présence ne modifie pas de manière significative la croissance de la souche pC-BS (Figure 80, Panel A avec ou sans dodécane, temps de génération de 11h) ou pC-FS (Figure 80, Panel B avec ou sans dodécane, temps de génération de 11h). Encarnacion Diaz Santos a vérifié que l'expression des plasmide pC, pC-LS et pC-PS n'affectait pas la croissance de *Synechococcus* PCC 7942 en présence ou absence de dodécane.

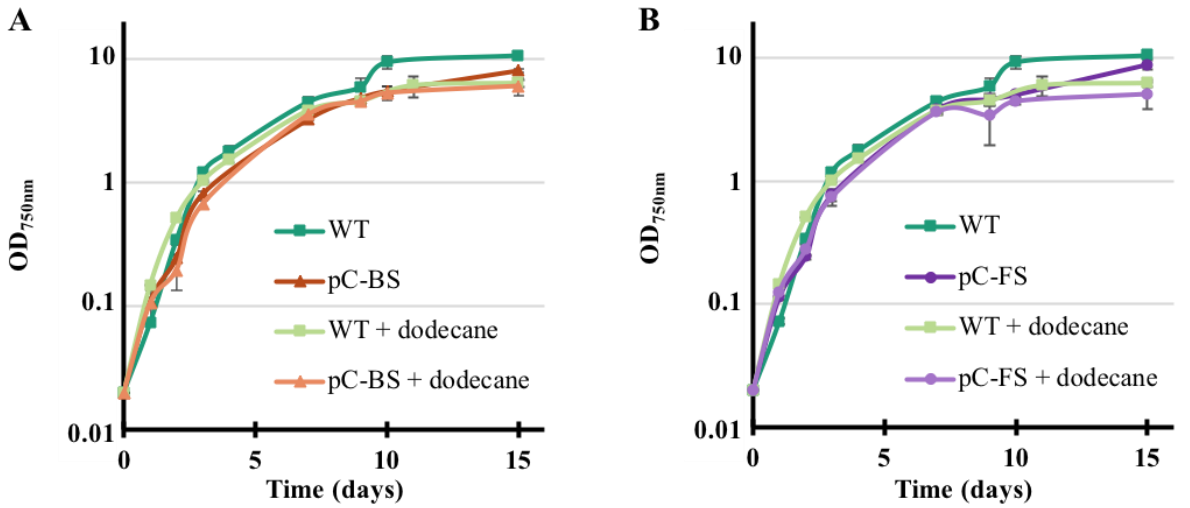


Figure 80 Courbes de croissance de la souche *Synechococcus* PCC 7942 WT (A et B) et du mutant conjugé avec le vecteur pC-BS (A) ou pC-FS (B). Les souches utilisées ont été préalablement adaptées à la présence de dodécane. Ces expériences ont été réalisées en triplicats dans des erlenmeyers contenant du milieu MM à 30°C sous un éclairement de 2500 lux, avec agitation (140 rpm dans un incubatur Inforsfors) en présence (+ dodecane) ou en absence de 20% v/v_{tot} de dodécane.

Dans les études réalisées précédemment, (Wang *et al.*, 2016) ont démontré que l'expression du gène codant pour la limonène synthase n'avait pas d'effet sur la croissance de la souche alors qu'au contraire, (Lee *et al.*, 2017) ont observé une inhibition de la croissance de *Synechococcus* PCC 7942 exprimant le gène codant pour la farnésène synthase. Cependant, dans cette dernière étude, les résultats de croissance de la souche WT et d'un mutant Δsite neutre II en présence de dodécane ne sont pas présentée, il n'est donc pas possible de savoir si cette inhibition est due à la présence de dodécane ou à l'insertion d'un gène dans le site neutre II ou à l'expression du gène codant pour la farnésène synthase.

4. Synechococcus PCC 7942 est capable de produire différents mono et sesquiterpènes lorsqu'un gène codant pour une terpène synthase spécifique est exprimé à partir du plasmide pC

En conditions standard, les diverses souches de *Synechococcus* PCC 7942 modifiées (pC-LS, pC-BS, pC-FS) et adaptées au dodécane produisent les terpènes correspondants au gène codant pour la terpène synthase qu'elle exprime (Annexe 8) mais avec de grandes différences dans les rendements. La production d'α-farnésène (jusqu'à 7 mg/L en 21 jours) et d'E-α-bisabolène

(jusqu'à 2 mg/L en 12 jours) est plus importante que la production de S-(-)-limonène (jusqu'à 0,3 mg/L en 12 jours) et d'α-pinène (non détecté, Figure 81).

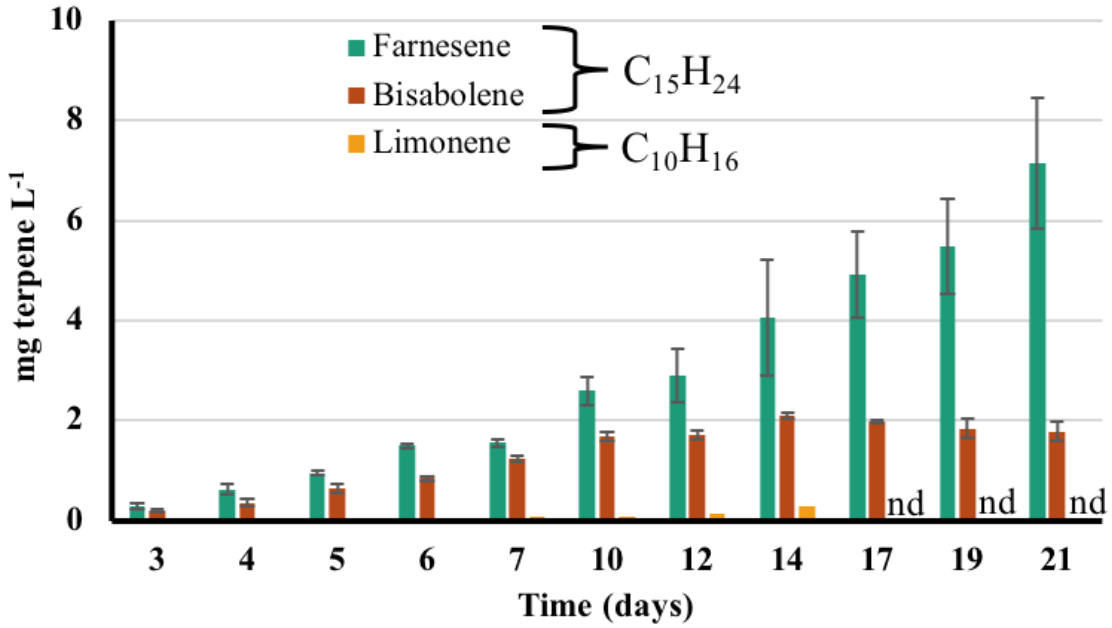


Figure 81 Quantification de la production de mono et sesquiterpènes par les différentes souches de *Synechococcus* PCC 7942 conjuguées avec les vecteurs pC-FS, pC-BS ou pC-LS. Ces mutants sont cultivés en conditions standard (MM, 2500 lux, 140 rpm, 30°C, DOi = 0,02). nd = non déterminé

La différence de production entre les mono et sesquiterpènes peut être expliquée par l'activité catalytique plus faible des monoterpènes synthases qui ont été tronquées pour retirer le peptide signal (comme cela a été expliqué pour *Synechocystis* PCC 6803).

Par ailleurs, Gao *et al.*, ont montré que le pool d'IPP (50 µM) était 5 fois supérieur à celui de DMAPP (10 µM) chez *Synechococcus* PCC 7942 ce qui favorise la production de terpènes à longue chaine carbonée (Gao *et al.*, 2016). Les concentrations en GPP (précurseur des monoterpènes) et en FPP (précurseur des sesquiterpènes) seraient alors différentes. Cette hypothèse est cohérente avec le fait qu'aucun métabolite connu n'est synthétisé chez *Synechococcus* PCC 7942 à partir du GPP. De plus, lorsque Wang *et al.*, ont exprimé le gène (*gpps*2 d'*Abies grandis*) codant pour une prenyl transférase synthétisant spécifiquement du GPP, cela a permis d'augmenter par 2 la production de limonène par *Synechococcus* PCC 7942 (Wang *et al.*, 2016). Ainsi, il semblerait que le pool de GPP soit effectivement limitant pour la production de monoterpènes mais nous savons également que le pool de FPP est aussi limitant pour la production de sesquiterpènes (Choi *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2017).

5. La production de sesquiterpènes chez Synechococcus PCC 7942 est stable

La production de chaque sesquiterpène par deux clones indépendants a été analysée. L'objectif ici est de s'assurer qu'il n'y a pas de variabilité inter-clone (ce phénomène n'a jamais été

documenté chez *Synechococcus* PCC 7942) mais également de s'assurer que les clones n'ont pas accumulé d'autres mutations influençant la production. Nous n'avons pas observé de différence significative du niveau de production de farnésène (Figure 82, Panel A) ou de bisabolène (Figure 82, Panel B) entre les clones indépendants possédant le plasmide pC-FS (clone pC-FS 1 et clone pC-FS 2) ou pC-BS (clone pC-BS 1 et clone pC-BS 2).

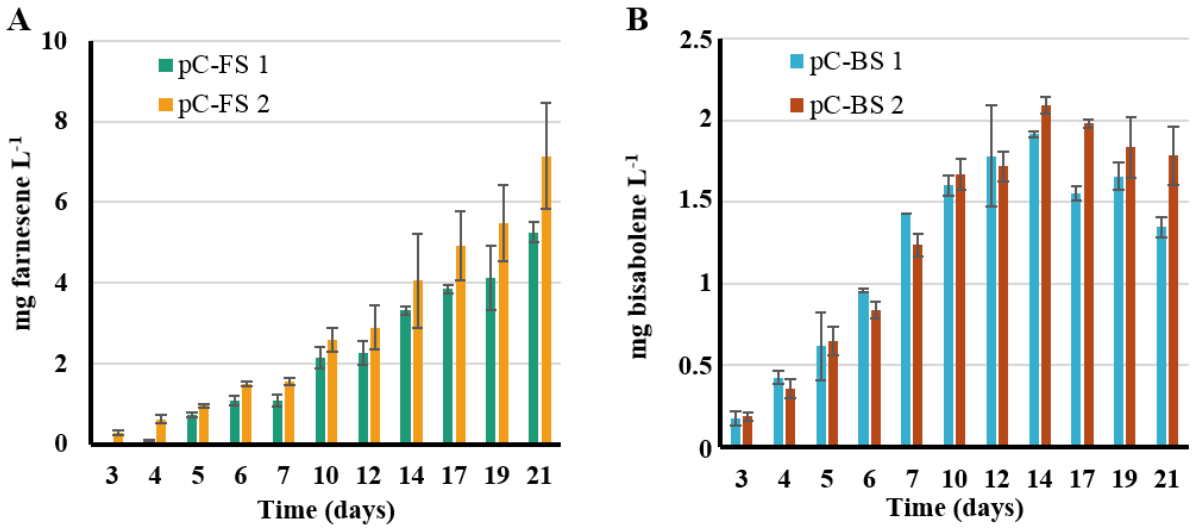


Figure 82 Production de farnésène (A) ou de bisabolène (B) par des clones indépendants de *Synechococcus* PCC 7942 pC-FS ou pC-BS. Toutes les manipulations ont été réalisées en triplicats en conditions standard (MM, 2500 lux, 30°C, 140 rpm, DOi = 0,02).

Par ailleurs, les rendements en farnésène obtenus pour la première expérience (Figure 82, pC-FS 2 en orange) et la deuxième expérience réalisées (Figure 83, Panel B, MM en orange) ne sont significativement différents. Entre ces deux expériences, la souche a été repiquée régulièrement pendant plus de 4 mois. Il semble donc que la production de farnésène dans cette souche soit stable. Il serait également intéressant de suivre l'évolution de la production de bisabolène après plusieurs repiquages de la souche productrice.

6. Impact des conditions de culture : l'ajout de bicarbonate dans le milieu de culture n'améliore pas la production de farnésène

Il est possible que le dodécane puisse limiter les échanges gazeux entre le culture et l'air ambient. Afin de s'assurer que la quantité de carbone disponible pour la souche n'était pas limitante pour la production de farnésène, du $NaHCO_3$ a été ajouté au milieu de culture et la production de farnésène a été mesurée à 30°C, 2500 lux sous agitation.
L'ajout de 0,6 g/L de $NaHCO_3$ dans le milieu de culture de la souche pC-FS n'améliore ni sa croissance ni la production de farnésène. Cet ajout semble même avoir un effet négatif après 17 jours de culture (Figure 83). La quantité de carbone présente dans le milieu MM n'est donc pas limitante.

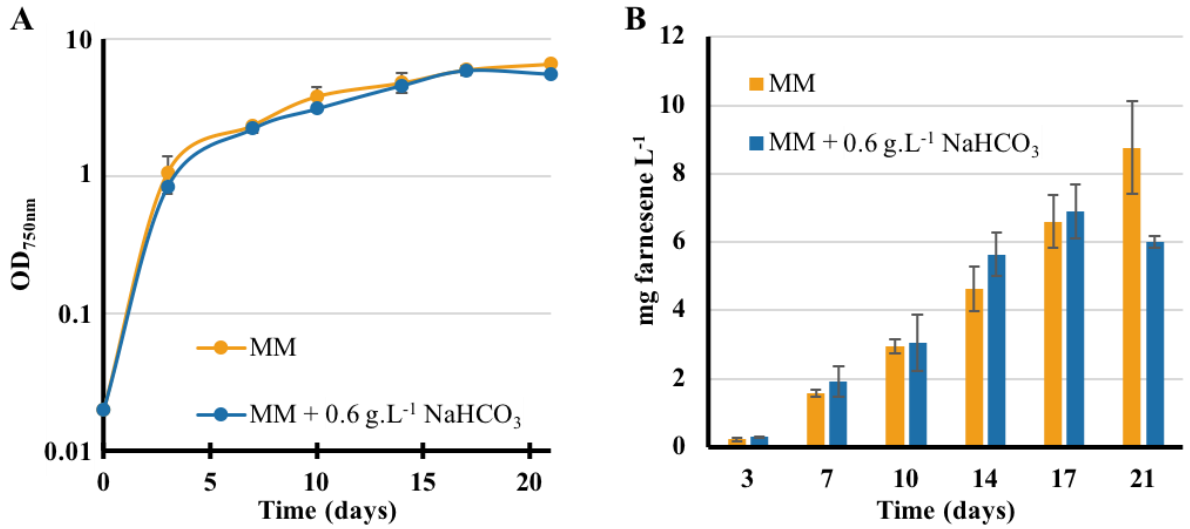


Figure 83 Effet de l'ajout de bicarbonate (0,6 g/L) sur la croissance (A) et la production de farnésène (B) par *Synechococcus* PCC 7942 pC-FS. Les manipulations ont été réalisées en triplicats à 2500 lux, 30°C, 140 rpm, ODi = 0,02 dans le milieu MM enrichi ou non en bicarbonate.

7. Conclusion et perspectives

Notre étude est la première à comparer la production de 4 terpènes (2 monoterpènes : S-(-)-limonène et α-pinène ; 2 sesquiterpènes : E-α-bisabolène et α-farnésène) par *Synechococcus* PCC 7942 exprimant les gènes codant pour les terpènes synthases correspondantes. Nous démontrons également, pour la première fois, la production de bisabolène (inférieure à ce qui a été décrit pour *Synechocystis* PCC 6803 (Sebesta and Peebles, 2019; Dienst *et al.*, 2020)) par cette souche ; et la production de farnésène et de limonène en exprimant le gène *terpène synthase* correspondant à partir d'un plasmide réplicatif (pC).

Les rendements obtenus pour les différents terpènes sont très différents : de non quantifiable pour le pinène à 7 mg/L pour le farnésène après 21 jours de culture. Les résultats indiquent que *Synechococcus* PCC 7942 est un meilleur châssis pour la production de sesquiterpènes (facteur x 6,7 – 23 entre les production de mono et sesquiterpènes). Cela peut être du à une différence dans le pool de GPP et de FPP (liée à l'activité de IspA ou à une différence dans le pool de DMAPP et d'IPP (Gao *et al.*, 2016)) ou à une différence d'activité catalytique entre les terpènes synthases (comme observé pour *Synechocystis* PCC 6803 mais pas pour *Synechococcus* PCC 7002).

Les rendements obtenus dans cette étude sont bien meilleurs (farnésène (Lee *et al.*, 2017)) ou égaux (limonène (Wang *et al.*, 2016)) à ce qui a été observé dans les études publiées par d'autres laboratoires. L'amélioration significative de la production de farnésène peut être due au clonage du gène codant pour la farnésène synthase dans un plasmide réplicatif au lieu du site neutre II ou bien au mode opératoire (adaptation de la souche au dodécane). Victoire Blanc-Garin est en train d'analyser l'influence de la localisation du système d'expression (gène codant pour la farnésène synthase exprimé à partir du plasmide pFC1 ou à partir du site neutre I ou à partir de ces deux sites) sur la production de farnésène par cette souche. L'objectif est non seulement

d'étudier l'influence de cette localisation sur la production de terpènes mais aussi d'augmenter le nombre de copies des gènes codant pour les terpènes synthases afin d'améliorer la production de terpènes.
Par ailleurs, dans l'étude de Lee *et al.*, l'expression de *dxs, idi* et *ispA* a fortement augmenté la production, cela pourrait donc être une voie d'amélioration intéressante. De plus dans leur étude, le rendement obtenu était supérieur en exprimant le gène codant pour la farnésène synthase de *Malus domestica* au lieu de celle de *Picea abies* (Lee *et al.*, 2017). Il serait intéressant de cloner le gène codant pour la farnésène synthase de *Malus domestica* dans pFC1 et de quantifier la production subséquente de farnésène dans *Synechocystis* PCC 6803 et *Synechococcus* PCC 7942.

Par ailleurs, nous avons montré que la production de farnésène était stable pendant plusieurs mois ce qui n'avait jamais été démontré auparavant. Il serait intéressant de tester la stabilité de la production de bisabolène qui cesse de s'accumuler après 12 jours de croissance (2 mg/L) ce qui peut être dû à la toxicité de cette molécule pour *Synechococcus* PCC 7942.

Enfin, d'autres conditions de culture (température, lumière, système HDC permettant d'obtenir rapidement de forte biomasse) pourraient être également testées, cependant j'ai montré précédemment que *Synechocystis* PCC 6803 semble le meilleur châssis pour la production de farnésène et bisabolène et je vais montrer par la suite que *Synechococcus* PCC 7002 est un meilleur châssis pour la production de limonène. L'intérêt de continuer à travailler sur *Synechococcus* PCC 7942 est par conséquent moindre surtout qu'il faut une étape d'adaptation au dodécane.

III. Quantification de la production de mono et sesqui-terpènes par la souche de cyanobactérie unicellulaire marine, *Synechococcus* PCC 7002

1. Intérêts de l'étude

Une seule étude a été réalisée sur la production de terpènes par *Synechococcus* PCC 7002. Les auteurs de cette étude ont exprimé les gènes codant pour la bisabolène synthase ou la limonène synthase à partir du site neutre (A0935-A0936). Dans cette étude, les auteurs présentent de forts rendements en S-(-)-limonène (4 mg/L) mais évaluent cette production que sur 4 jours. Les rendements obtenus pour la production d'E-α-bisabolène sont quant à eux assez faibles (0,5 à 0,7 mg/L en 4 jours ; (Davies *et al.*, 2014)).

Synechococcus PCC 7002 est une souche intéressante du fait de sa croissance rapide (3,5h ; (Sakamoto *et al.*,1998; Ludwig and Bryant, 2012; Bernstein *et al.*, 2014)) et de sa résistance à de nombreuses conditions de culture (forte lumière (Nomura *et al.*, 2006), forte température, concentrations variées en sel (de 0 à 100 g/L) (Batterton and Van Baalen, 1971; Ludwig and

Bryant, 2012). De plus, cette souche peut pousser aux dépens de l'urée comme seule source d'azote.

Nous avons par conséquent décidé d'étudier (i) la production de mono et sesquiterpènes par *Synechococcus* PCC 7002 ; (ii) l'influence des conditions de culture (température, lumière, source et abondance de carbone et d'azote) sur la production ainsi que (iii) la stabilité des productions au cours du temps.

2. Introduction des plasmides codant pour les terpènes synthases et phénotypes des souches productrices

Les plasmides pC-LS, pC-PS, pC-BS et pC-FS ainsi que le plasmide pC ont été introduits chez *Synechococcus* PCC 7002 par conjugaison (voir introduction chapitre 2.V. et Matériels et Méthodes). La présence et l'intégrité de ces plasmides ont été vérifiées par PCR (Figure 84) puis par séquençage ADN.

Pour la suite des résultats, il a été défini que la souche de *Synechococcu*s PCC 7002 productrice d'E-α-bisabolène correspond à la souche portant le plasmide pC-BS. De même, les souches productrices d'α-farnésène ou de S-(-)-limonène ou de α-pinène sont respectivement le mutant portant le plasmide pC-FS ou pC-LS ou pC-PS.

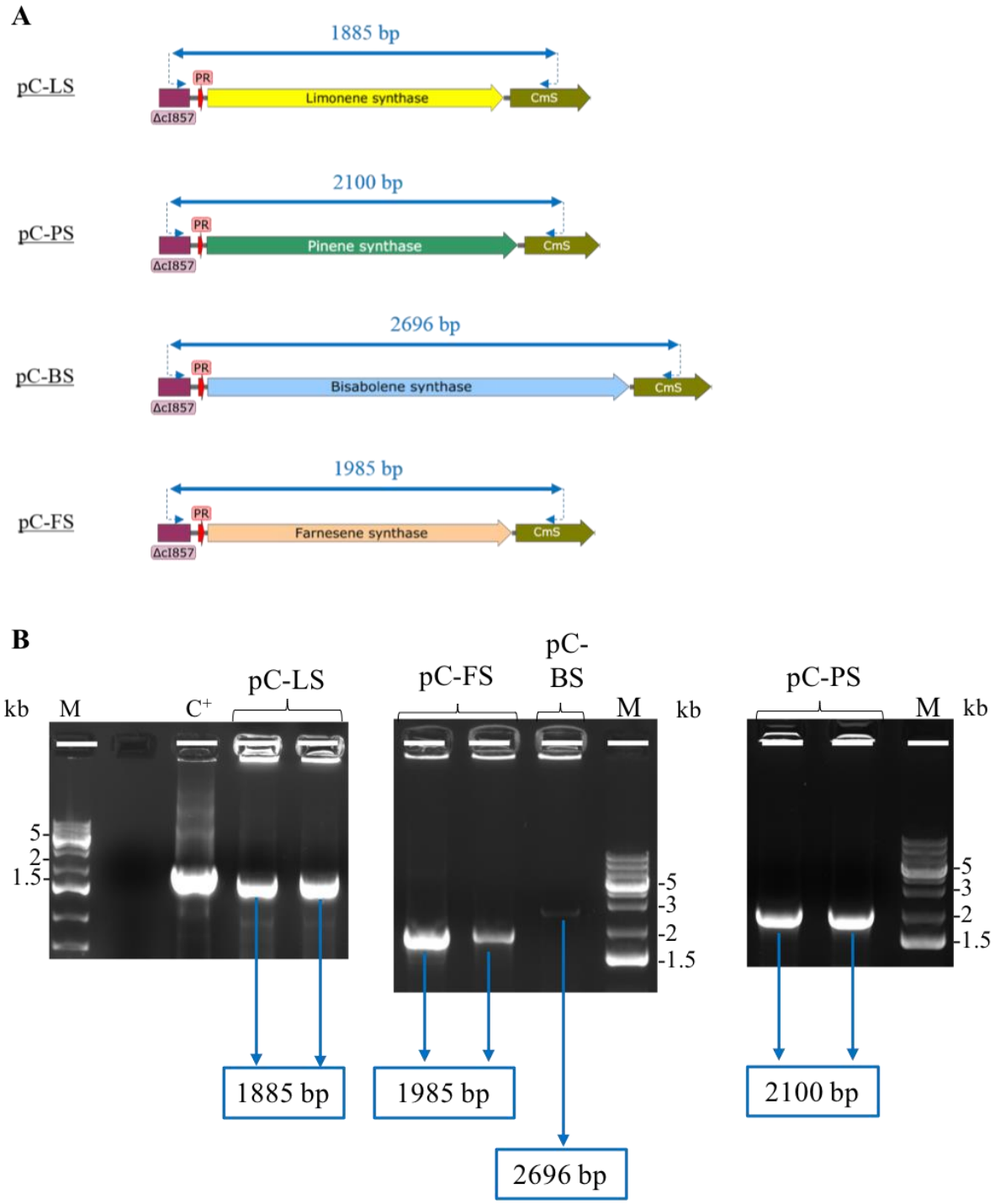


Figure 84 Représentation schématique (A) et photographie d'un gel d'agarose (B) montrant les produits d'amplification par PCR (amorces pFCI_Fw et pFCI_Rv (triangles bleus)) des différents vecteurs d'expression contenant les gènes codant pour les terpènes synthases (pC-LS, pC-BS, pC-FS et pC-PS) chez *Synechococcus* PCC 7002. Le marqueur de poids moléculaire (M) est le GeneRuler™ 1Kb plus de Thermoscientifc.

Les plasmides se répliquent de façon stable et autonome dans la souche et leur présence ne modifie pas de manière significative la croissance de la souche cultivée en photoautotrophie dans les conditions standard du laboratoire (erlenmeyers contenant du milieu A^+ avec 4 µg/L de vitamine B12, 2500 lux, 30°C, 140 rpm, Figure 85, Panel B, croissance du mutant pC-PS

étudiée par Encarnacion Diaz-Santos). Cela est en accord avec les résultats obtenus précédemment lorsque que les gènes codant pour la limonène synthase ou la bisabolène synthase sont exprimés dans *Synechococcus* PCC 7002 (Davies *et al.*, 2014).

Afin de collecter et quantifier les terpènes, du dodécane est ajouté au milieu de culture. Comme démontré précédemment (Davies *et al.*, 2014), ceci n'affecte pas la croissance de la souche sauvage de *Synechococcus* PCC 7002 (Figure 85, Panel A). De même, la croissance des mutants producteurs de terpènes n'est pas affectée par l'ajout de dodécane (Figure 85, Panel C).

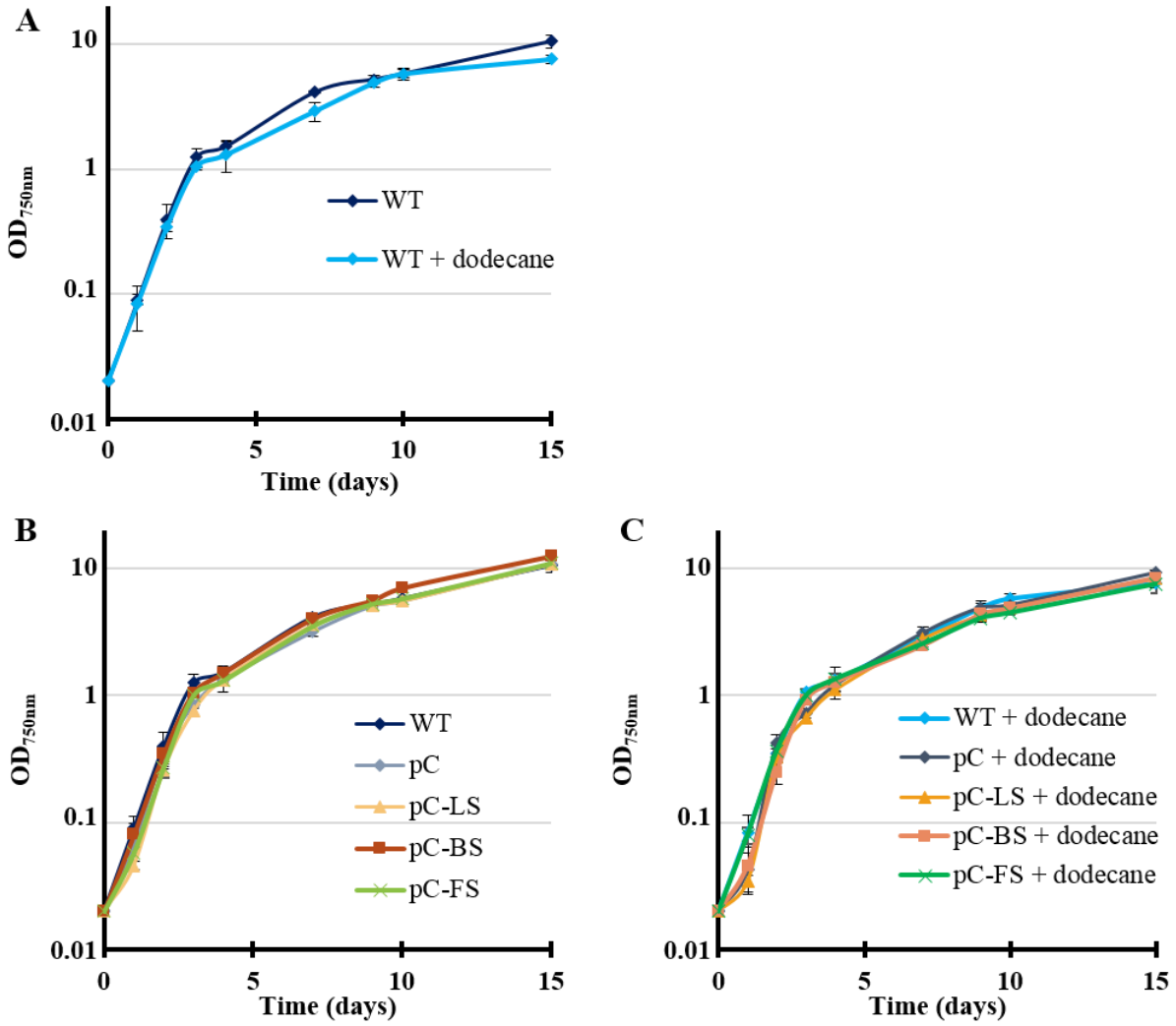


Figure 85 Courbes de croissance de la souche *Synechococcus* PCC 7002 sauvage (WT ; A) et des mutants exprimant les différentes gènes codant pour les terpènes synthases (B et C) en présence (A et C ; annoté + dodécane) ou absence (A et B) de dodécane. Cette manipulation a été réalisée en triplicats, les cellules ont été cultivées dans des erlenmeyers contenant du milieu A^+ enrichi en vitamine B12 et incubées à 2500 lux, 30°C et 140 rpm.

3. Synechococcus PCC 7002 produit différents mono et sesqui-terpènes lorsqu'un gène codant pour une terpène synthase spécifique est exprimé à partir du plasmide pC

En étudiant les différents chromatogrammes GC-MS (Annexe 9), on remarque que les différents mutants de *Synechococcus* PCC 7002 (pC-LS, pC-BS, pC-FS et pC-PS) produisent le terpène correspondant au gène codant pour la terpène synthase qu'ils expriment (Figure 86). Au contraire de *Synechocystis* PCC 6803 et *Synechococcus* PCC 7942, en conditions standard, *Synechococcus* PCC 7002 produit de l'α-farnésène (3,5 mg/L après 19 jours de culture), de l'E-α-bisabolène (0,85 mg/L après 19 jours de culture) et du S-(-)-limonène (2 mg/L après 19 jours de culture) avec le même ordre de grandeur (Figure 86, panel A). La production de pinène est en revanche très faible (0,06 mg/L après 19 jours Figure 86, panel A et panel B pour détail).

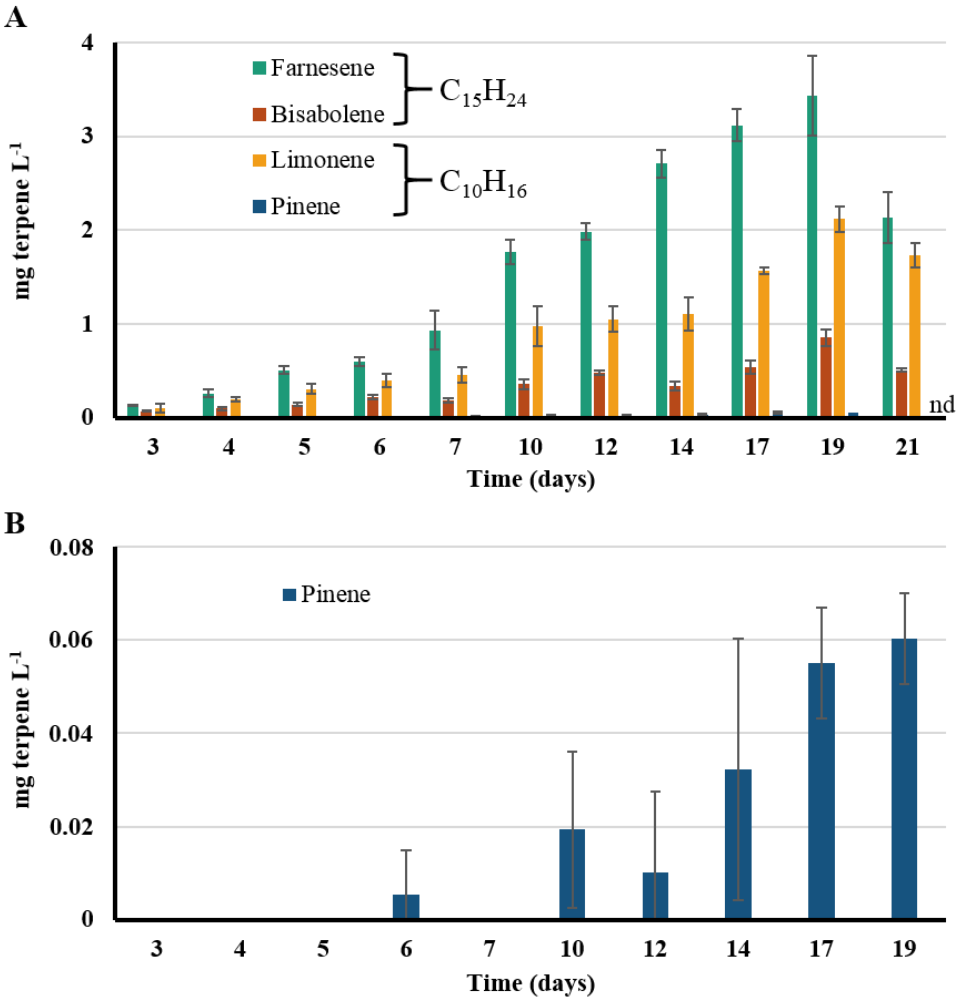


Figure 86 Production de mono et sesquiterpènes par les différentes souches de *Synechococcus* PCC 7002 (pC-LS, pC-BS, pC-FS et pC-PS) produisant les terpènes correspondants au gène codant pour la terpène synthase qu'elles expriment. Ces mutants sont cultivés en conditions standard (milieu A^+ contenant de la vitamine B12, 2500 lux, 140 rpm, 30°C, DOi = 0,02). La production des mono et sesquiterpènes est détaillée dans le panel A. Enfin, la production de pinène est détaillée dans le panel B avec une échelle différente. nd = non déterminé.

La différence de production entre les mono et sesquiterpènes n'est pas significative pour cette souche. Cela montre donc que toutes les souches ne produisent pas tous les terpènes avec la même efficacité et cela pourrait être lié à des différences dans les pools de précurseurs (GPP et FPP) entre les souches de cyanobactérie. Ces résultats viennent confirmer l'hypothèse formulée au début de mon doctorat ; c'est-à-dire qu'il est important de combiner la diversité biologique des cyanobactéries avec la diversité structurelle des terpènes pour identifier le châssis le plus adapté à la production de chaque terpène en particulier.

4. La production de terpènes par Synechococcus PCC 7002 ne semble pas être stable

La production de limonène par *Synechococcus* PCC 7002 pC-LS ne semble pas stable au cours du temps. Au fur et à mesure que la souche de *Synechococcus* PCC 7002 exprimant le gène codant pour la limonène synthase est repiquée, la production de limonène diminue passant de 2 mg/L à 0,6 mg/L après 19 jours de culture (Figure 87). Dans l'expérience présentée ici, la production a été quantifiée au même moment dans le même lot de milieu en utilisant : le clone congelé tout de suite après obtention (pC-LS) et décongelé uniquement au moment de l'expérience et ce même clone repiqué pendant plusieurs mois avant de réaliser l'expérience (pC-LS bis ; Figure 87).

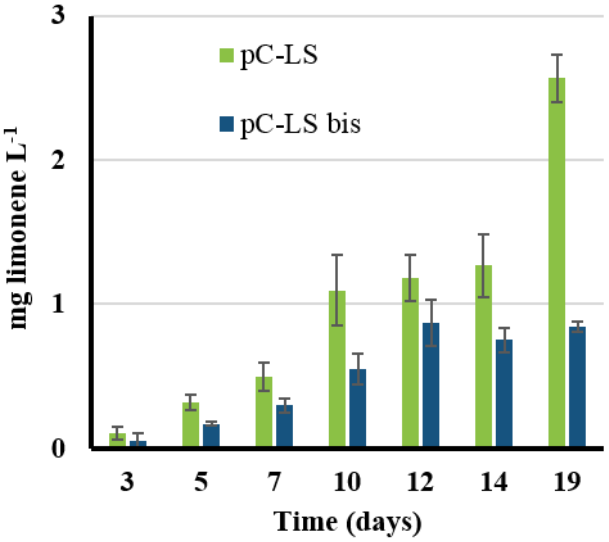


Figure 87 Stabilité de la production de limonène par *Synechococcus* PCC 7002 pC-LS. Cette manipulation a été réalisée avec le clone congelé tout de suite après obtention (pC-LS) et remis en cultureuniquement au moment de l'expérience et ce même clone repiqué pendant plusieurs mois avant de réaliser l'expérience (pC-LS bis). Cela a été réalisé en triplicats en conditions standard (milieu A^+ contenant de la vitamine B12, à 2500 lux, 30°C, 140 rpm, DOi = 0,02).

Ce type d'expérience va être à nouveau réalisé pour mieux évaluer ce phénomène. La stabilité de la production de farnésène et de bisabolène par *Synechococcus* PCC 7002 pC-FS et pC-BS sera également testée.

De plus, au contraire de *Synechocystis* PCC 6803 et de *Synechococcus* PCC 7942, nous observons une variabilité inter-clone :

- La production de bisabolène varie entre 0,4 (clone pC-BS 4) et 0,85 mg/L (clone pC-BS 2) après 19 jours de culture (Figure 88, Panel A)
- La production de farnésène varie entre 2 (clone pC-FS 2) et 3,5 mg/L (clone pC-FS 1) après 19 jours de culture (Figure 88, Panel B)

Cependant, la production par les deux clones n'a malheureusement pas été réalisée dans le même milieu de culture ni au même moment. Il sera donc important d'étudier la production d'autres clones (issus de la même conjugaison) au même moment et dans des conditions identiques afin de vérifier s'il s'agit bien d'une variabilité inter-clone. Le laboratoire testera la production de bisabolène, farnésène et limonène par d'autres clones en conditions standard. La production par différents clones avait été étudiée dans (Davies *et al.*, 2014b) et la variation inter-clone était faible.

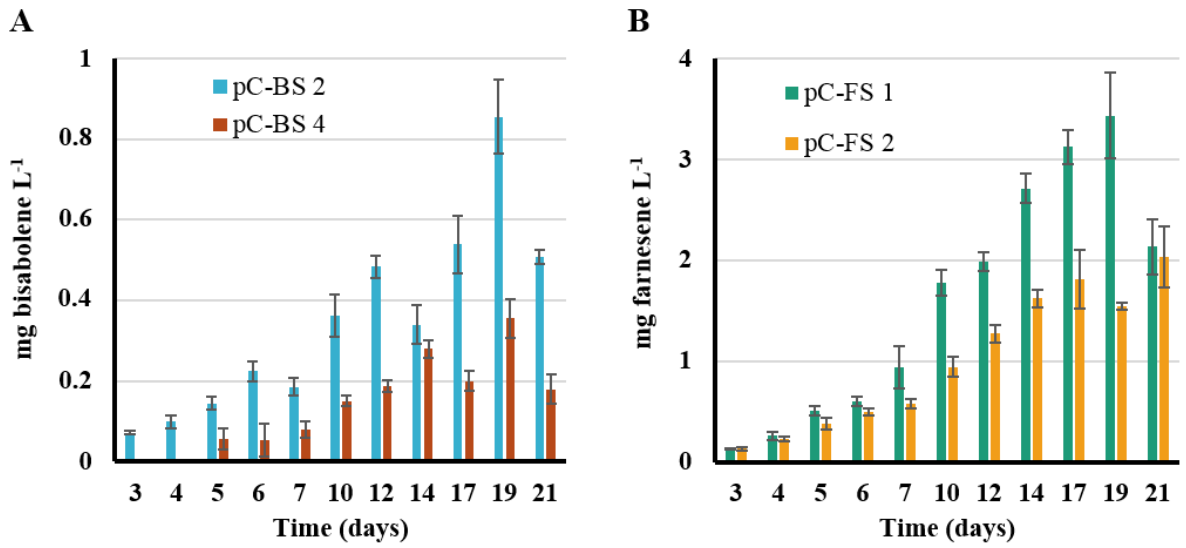


Figure 88 Production de bisabolène (A) ou de farnésène (B) par des clones indépendants de *Synechococcus* PCC 7002 pC-BS ou pC-FS. Toutes les manipulations ont été réalisées en triplicats en conditions standard (milieu A^+ contenant de la vitamine B12, 2500 lux, 30°C, 140 rpm, DOi = 0,02).

5. Variation de la production de terpènes par Synechococcus PCC 7002 en fonction de la phase de croissance

Les productivités (en mg/L/jour ou en mg/L/DO_{750nm}/jour) ont été calculées pour les productions de bisabolène (Figure 89, panel B et C), de farnésène (Figure 89, panel E et F) et de limonène (Figure 89, panels H et I) par *Synechococcus* PCC 7002

Les profils de production sont identiques pour les 3 terpènes : la productivité par unité de biomasse (mg/L/DO_{750nm}/jour) est très élevée en phase exponentielle et en fin de phase exponentielle. C'est donc lors de ces phases que chaque cellule produit le plus de terpène. En revanche, cette productivité par unité de biomasse est très faible à partir du 6ème jours de culture.

Au contraire si l'on regarde la productivité (en mg/L/jours), elle est faible en phase exponentielle (directement corrélée avec la faible biomasse) puis augmente et reste constante en fin de phase exponentielle et phase de ralentissement. A ce moment, la production par cellule n'est plus très élevée, en revanche le nombre de plus en plus important de cellules permet une augmentation rapide des rendements.

Ainsi comme pour *Synechocystis* PCC 6803, on peut définir trois phases de production :

- La phase exponentielle où les cellules produisent de fortes quantités de terpène mais la faible biomasse conduit à de faibles rendements (en mg/L) ;
- La phase de ralentissement où le nombre de cellules augmente rapidement et où la productivité par unité de biomasse diminue. Cependant, le biomasse de plus en plus importante permet une forte augmentation des rendements (en mg/L) ;
- La phase stationnaire où la quantité de biomasse stagne et où les cellules ne produisent plus de terpènes. Par conséquent, la quantité de terpène produit n'augmente plus.

Ainsi, le protocole de criblage suivant a été mis au point afin d'étudier plus rapidement de nombreuses conditions expérimentales. La DO_{750nm} des cultures est mesurée et le dodécane est prélevé à 3, 5, 7, 10, 12, 14 et 19 jours de culture. Cela permet d'étudier les trois phases de production détaillées ci-dessus.

Nous avons choisi de réaliser toutes les expériences suivantes à une $DO_{750nm\ initiale}$ de 0,02 (soit 9×10^5 cellules/mL) car des résultats préliminaires ont permis de démontrer que la souche produisait des terpènes de façon plus efficace lorsqu'elle réalisait une vraie croissance exponentielle.

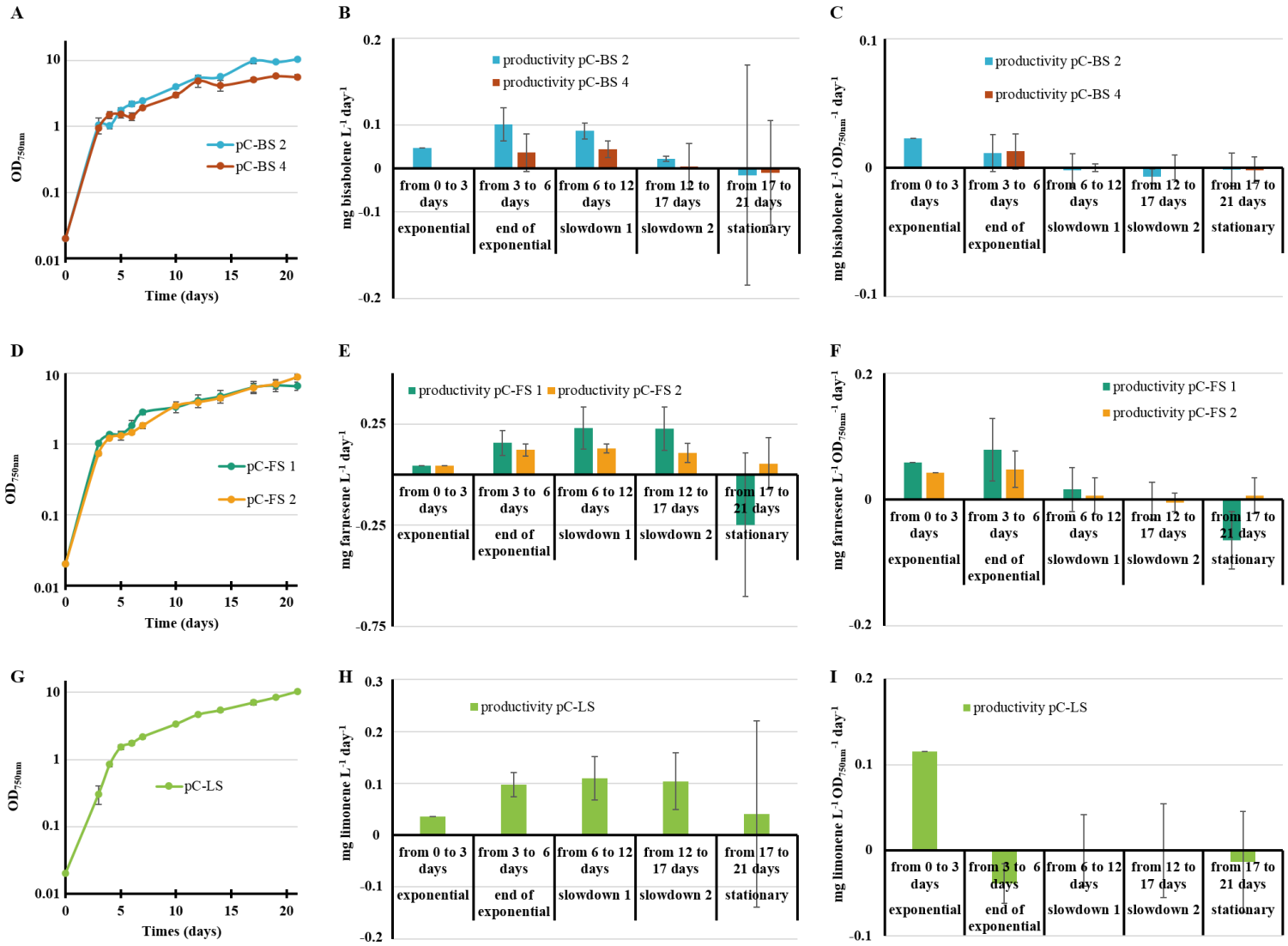


Figure 89 Croissance (A, D et G) et évolution de la production (en mg/L/jour (B, E et H) ou en mg/L/DO_{750nm}/jour (C, F, et I)) de limonène, bisabolène et farnésène par *Synechococcus* PCC 7002 (pC-BS, pC-FS ou pC-LS) en fonction des phases de croissance de la souche. Toutes les manipulations ont été réalisées en triplicats en conditions standard (milieu A^+ contenant de la vitamine B12, 2500 lux, 30°C, 140 rpm, DOi = 0,02).

6. Détermination des conditions de culture permettant une forte production de limonène par Synechococcus PCC 7002 pC-LS

Toutes les expériences ont été réalisées en présence de dodécane afin de collecter les terpènes produits. Je n'ai fait varier qu'un seul paramètre à la fois (lumière, température, quantité de carbone dissous dans le milieu de culture). En conditions standard, les cultures sont réalisées en erlenmeyers, dans le milieu A^+ contenant de la vitamine B12 à 2500 lux, 30°C, avec une agitation de 140 rpm dans un incubateur Infors.

Ces expériences ont été réalisées pour la production de limonène car *Synechococcus* PCC 7002 est la seule souche à produire des quantités importantes de ce monoterpène. Il est, par conséquent, plus intéressant d'essayer d'augmenter cette production que celle de farnésène pour laquelle *Synechocystis* PCC 6803 a un bien meilleur rendement (35 mg/L vs 3,5 mg/L).

a. L'intensité lumineuse n'a pas d'influence sur la production de limonène par *Synechococcus* PCC 7002 pC-LS

La variation de l'intensité lumineuse n'influence ni la croissance (temps de génération de 11h) ni la production de limonène par *Synechococcus* PCC 7002 pC-LS (Figure 90). Ces résultats confirment la robustesse de la souche qui est capable de pousser et de produire des molécules d'intérêt avec la même efficacité à diverses intensités lumineuses.

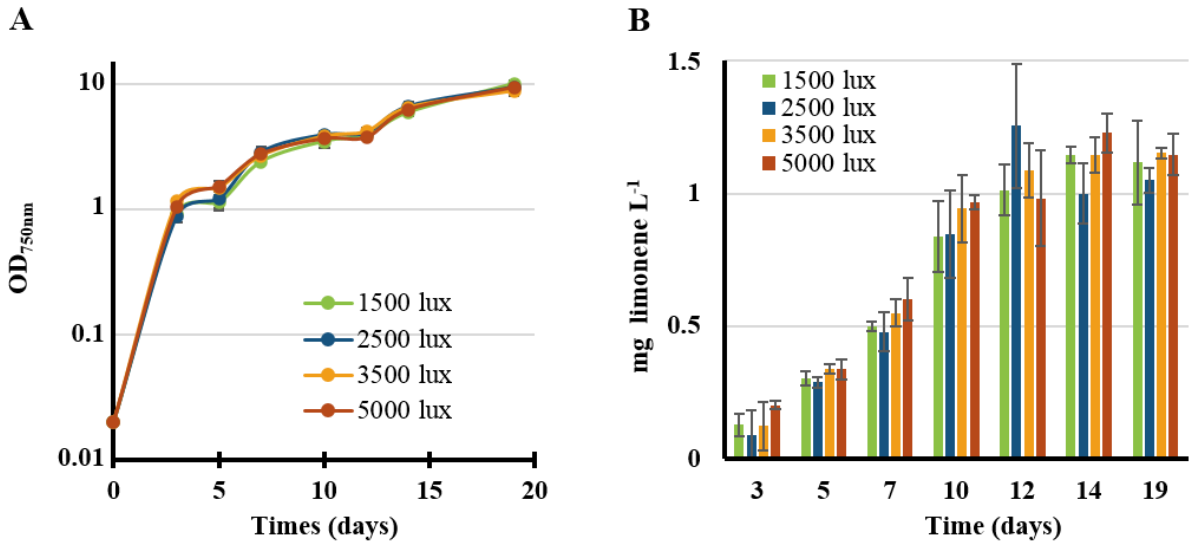


Figure 90 Effet de la lumière sur la croissance (A) et la production de limonène (B) par *Synechococcus* PCC 7002 pC-LS. Les manipulations ont été réalisées en triplicats à différentes intensités lumineuses, à 30°C, 140 rpm, ODi = 0,02 dans le milieu A+ contenant de la vitamine B12.

b. La température influence la production de limonène

Bien que la souche ait un temps de génération similaire (environ 12 h) lorsqu'elle est cultivée à 25, 30 ou 34°C, la production de limonène est plus importante à 30°C (facteur 2,4 entre la

culture à 25°C et celle à 30°C ; facteur 1,3 entre la culture à 30°C et celle à 34°C après 14 jours de culture, Figure 91).

Précédemment, il a été montré par Sakamoto et Bryant que lorsque *Synechococcus* PCC 7002 était cultivée à basse température (15°C) dans le milieu A^+ (source d'azote = nitrate), les cellules entrent en chlorose (perte de pigmentation due à la dégradation des antennes photosynthétiques). Ce phénomène n'était pas observé lorsque la souche était cultivée dans un milieu contenant de l'urée, les auteurs ont donc conclu que l'entrée en chlorose des cellules cultivées à 15°C dans un milieu enrichi en nitrate n'était pas le résultat d'une réduction de l'activité photosynthétique ou de l'altération des photosystèmes mais que cela était le résultat d'une l'altération du transport ou de l'assimilation du nitrate. L'ajout d'azote organique (l'urée) permet de rétablir la croissance (Sakamoto and Bryant, 1998).
Mes expériences de production de limonène à 25°C ont été réalisées dans un milieu contenant du nitrate. Il est donc possible que cela ait pu altérer le métabolisme de l'azote provoquant une carence en azote et donc entrainé une redistribution des flux métaboliques. Le flux de carbone au travers de la voie MEP aurait ainsi pu être réduit.

A 34°C, la production de limonène était également un peu inférieure à celle obtenue à 30°C. Comme pour *Synechocystis* PCC 6803, cela peut s'expliquer en partie par la déstabilisation des membranes et donc l'augmentation de la production de undécaprényl-diphosphate afin de modifier le peptidoglycane pour modifier la fluidité de la membrane.

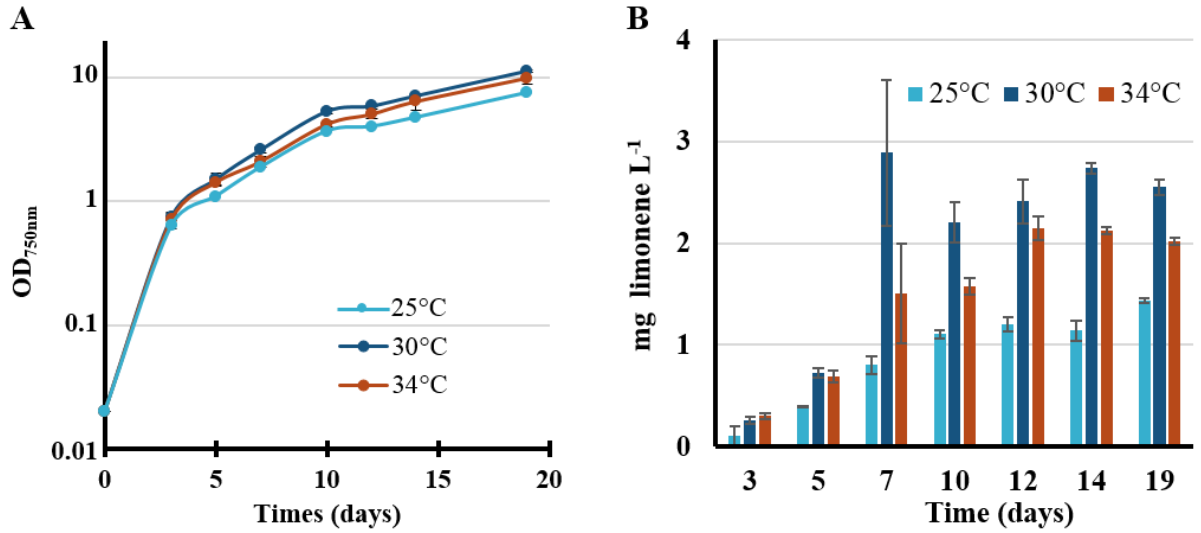


Figure 91 Effet de la température sur la croissance (A) et la production de limonène (B) par *Synechococcus* PCC 7002 pC-LS. Les manipulations ont été réalisées en triplicats à 2500 lux, à 25°C ou 30°C ou 34°C, 140 rpm, ODi = 0,02 dans le milieu A+ contenant de la vitamine B12.

c. L'ajout de bicarbonate ($NaHCO_3$) dans le milieu de culture n'améliore ni la croissance ni la production de limonène

Le milieu A^+ dans lequel *Synechococcus* PCC 7002 est cultivé ne contient pas de carbone ni sous forme Na_2CO_3 ni $NaHCO_3$. Les effets de l'ajout de carbone sur la production de limonène ont donc été étudiés.
Tout d'abord, Encarnacion Diaz-Santos a montré que l'ajout de Na_2CO_3 dans le milieu de culture avait un effet très néfaste sur la croissance de *Synechococcus* PCC 7002. Cela pourrait être dû à la modification du pH (le pH devient plus basique).

Ensuite, j'ai regardé les effets de l'ajout de 0,5 g/L de $NaHCO_3$ à 30 et 34°C (Figure 92). La croissance de la souche est similaire à 30 et à 34°C dans un milieu enrichi ou non en bicarbonate (temps de génération d'environ 12h). Cependant, la production de limonène est inférieure (facteur 1,4 à 30°C et 2,7 à 34°C après 14 jours de culture).
La quantité de carbone n'est pas limitante pour la production de molécule d'intérêt par cette souche et l'ajout de (bi)carbonate en modifiant le pH impacte négativement cette production.

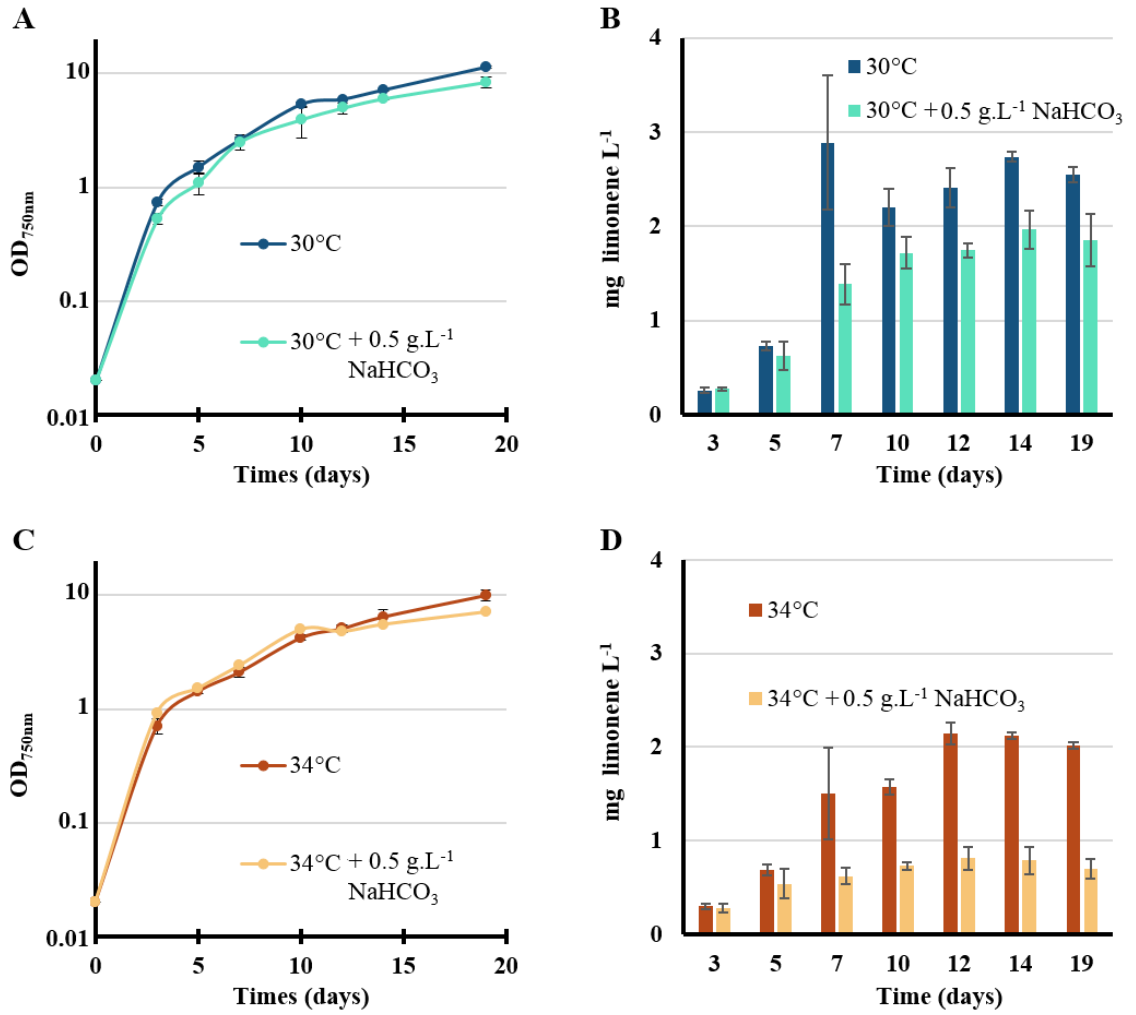


Figure 92 Effet de l'ajout de bicarbonate, à 30°C (A et B) et 34°C (C et D), sur la croissance (A et C) et la production de limonène (B et D) par *Synechococcus* PCC 7002 pC-LS. Les manipulations ont été réalisées en triplicats à 2500 lux, à 30°C ou 34°C, 140 rpm, ODi = 0,02 dans le milieu A+ contenant de la vitamine B12 et enrichi ou non en bicarbonate de sodium.

7. Synechococcus PCC 7002 peut produire du limonène en poussant sur l'urée (un polluant fréquent) comme seule source d'azote

Il a été démontré précédemment que l'ajout de forte concentration (50 mM) en urée permettait à la souche de croitre aussi bien que dans un milieu contenant du nitrate. Le temps de génération de la souche en phase exponentielle est même inférieur (Sakamoto and Bryant, 1998). Cependant, après quelques jours de croissance, l'utilisation de l'urée comme seul substrat azoté, entraine une forte peroxydation lipidique qui est la cause d'une mortalité cellulaire importante (Sakamoto *et al.*, 1998). Une forte activité de l'uréase pourrait être à l'origine de ce phénomène. Des auteurs ont d'ailleurs montré que la délétion du gène *UreC* codant pour la sous-unité catalytique de l'uréase permettait d'éviter cette mortalité cellulaire dans un milieu contenant à la fois de l'urée et du nitrate (*ie.* la souche utilise le nitrate pour sa croissance et n'assimile plus l'urée).

Dans un premier temps, il m'a donc fallu développer un protocole permettant de cultiver *Synechococcus* PCC 7002 dans un milieu contenant de l'urée comme seul substrat azoté.
Comme cela a été réalisé pour *Cyanothece* PCC 7425 (voir (Chenebault *et al.*, 2020)) et *Synechocystis* PCC 6803 (Résultats chapitre 2.I.7.), j'ai testé les effets de l'ajout progressif d'urée sur la croissance de *Synechococcus* PCC 7002. L'ajout d'urée à faible concentration (2, 3 ou 6 mM) n'est pas néfaste pour la croissance de *Synechococcus* PCC 7002 (Figure 93). Il est donc possible de cultiver cette souche avec la même efficacité en utilisant du nitrate ou de l'urée comme seule source d'azote. L'urée peut être ajoutée soit en une fois (6 mM), soit au fur et à mesure (2 + 2 + 2 ou 3 + 3 mM tous les 3 jours et demi) de la croissance.

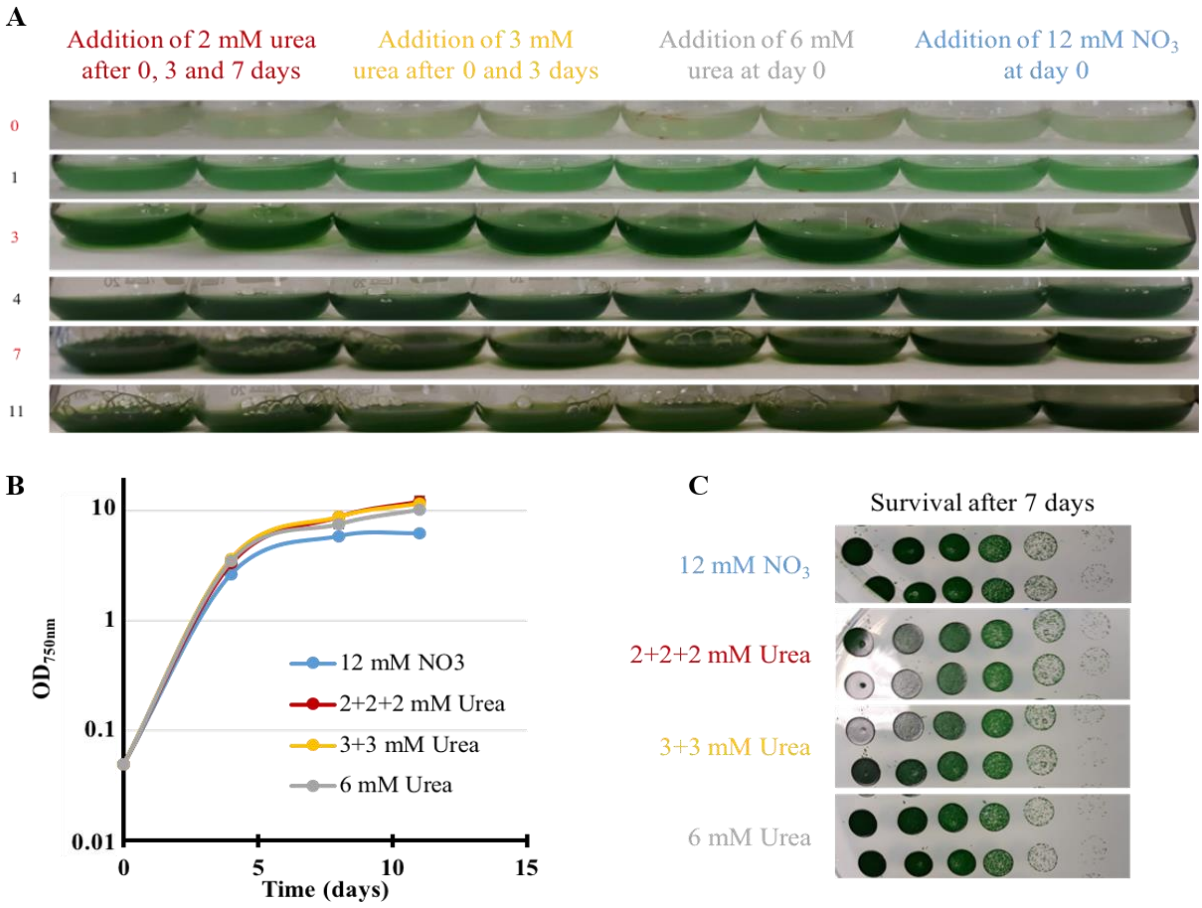


Figure 93 Croissance (A et B) et survie après 7 jours (C) de *Synechococcus* PCC 7002 WT cultivée dans un milieu contenant de l'urée ou du nitrate comme seule source d'azote. Les manipulations (A et B) ont été réalisées en duplicatas à 2500 lux, 30°C, 140 rpm, ODi = 0,05dans le milieu A enrichi en vitamine B12 et contenant de l'urée (2+2+2 mM ou 6 mM ; A_{Urea}) ou du nitrate (12 mM ; A_{NO3}) Les test de survie ont été réalisés par dilution en série (de non dilué à dilution 10^{-5}) des cultures obtenues après 7 jours de croissance dans le milieu contenant de l'urée (2+2+2 mM ou 6 mM) ou du nitrate (12 mM). Les spots ont été réalisés sur des boites A contenant du nitrate et de la vitamine B12 incubées à 30°C, 2500 lux.

La production de limonène par *Synechococcus* PCC 7002 cultivée avec du nitrate (3 fois 4 mM ajouté tous les 3 jours et demi) ou de l'urée (3 fois 2 mM ajouté tous les 3 jours et demi) comme seule source d'azote a ensuite été mesurée. Afin de ne pas appliquer d'autres stress à la cellule, le dodécane a été ajouté non pas au début de la culture comme réalisé précédemment mais après 3 jours de culture lorsque la biomasse était plus importante.

Bien que des courbes de croissance plus précises (DO_{750nm} mesurée tous les jours) doivent être refaites afin de mieux étudier la croissance en phase exponentielle, il semblerait que le temps de génération de la souche cultivée dans un milieu contenant de l'urée (G = 10h en A^{+}_{Urea}) comme seule source d'azote soit inférieur à celui de la souche cultivée dans un milieu contenant du nitrate (G = 14h en A^{+}_{NO3}). La souche atteint cependant un niveau de biomasse identique dans le milieu contenant de l'urée ou du nitrate (Figure 93).

D'après les résultats (Figure 94), il semblerait que la production de limonène soit légèrement supérieure lorsque la souche est cultivée en urée (facteur 2 après 19 jours de culture). Cela démontre pour la première fois qu'une molécule d'intérêt peut être produite par *Synechococcus* PCC 7002 cultivée dans un milieu contenant de l'urée comme seule source d'azote et donc la possibilité de coupler la production de molécule d'intérêt avec la dépollution des eaux polluées à l'urée.

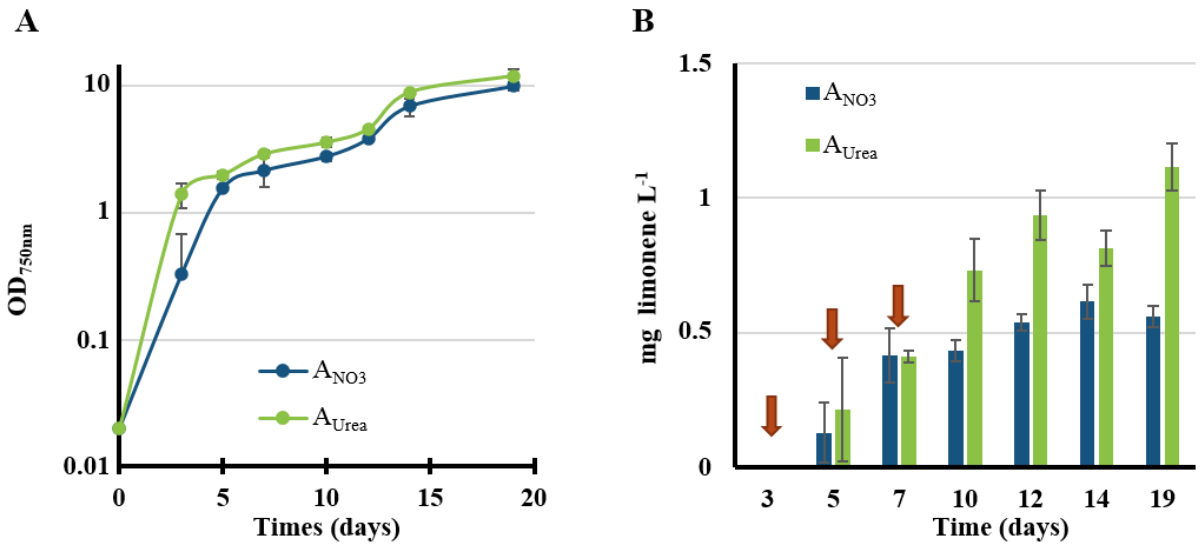


Figure 94 Croissance (A) et production de limonène (B) par *Synechococcus* PCC 7002 dans un milieu A^+ enrichi en vitamine B12 et contenant du nitrate (A_{NO3}) ou de l'urée (A_{Urea}) comme seule source d'azote. Les manipulations ont été réalisées en triplicats à 2500 lux, à 30°C ou 34°C, 140 rpm, ODi = 0,02. Le dodécane a été ajouté après 3 jours de croissances et les flèches rouges indiquent le temps auquel 2 mM d'urée ou 4 mM de nitrate ont été ajoutés au milieu.

8. Conclusions et perspectives

Notre étude est la première étude à comparer la production de 4 terpènes (2 monoterpènes : limonène et pinène ; 2 sesquiterpènes : bisabolène et farnésène) par *Synechococcus* PCC 7002 exprimant les gènes codant pour les terpènes synthases correspondantes. Au contraire de l'étude réalisée précédemment, ces gènes sont portés par un plasmide réplicatif et non insérés dans un site neutre du chromosome.

Les rendements obtenus sont variables. Si les rendements obtenus pour la production d'α-pinène sont très faibles (0,06 mg/L après 19 jours de croissance), ceux obtenus pour la production de bisabolène, farnésène et pinène sont du même ordre de grandeur (3,5 mg/L pour le farnésène, 2 mg/L de limonène et 0,9 mg/L de bisabolène après 19 jours de culture). Ces résultats sont différents de ceux obtenus pour *Synechocystis* PCC 6803 et *Synechococcus* PCC 7942 et montrent l'intérêt de comparer différents châssis cyanobactériens pour la production de divers terpènes.

Les rendements obtenus sont similaires (bisabolène) ou inférieurs (limonène) à ceux décrits précédemment par (Davies *et al.*, 2014). Cette différence peut s'expliquer par le fait que, dans cette étude, le gène codant pour la limonène synthase ou la bisabolène synthase a été intégré au

chromosome de *Synechococcus* PCC 7002 et non exprimé à partir d'un plasmide réplicatif. Victoire Blanc-Garin est en train d'analyser l'influence de la localisation du système d'expression (le gène *limonène synthase* exprimé à partir du plasmide pFC1 ou à partir du site neutre ou à partir de ces deux sites). L'objectif est non seulement d'étudier l'influence de cette localisation sur la production de terpènes (ce qui n'a jamais été réalisé auparavant) mais aussi d'augmenter le nombre de copies des gènes codant pour les terpènes synthases afin d'améliorer la production de terpène. Nous savons que ces enzymes ont une faible activité catalytique et sont souvent limitantes pour la production de terpènes (Gao *et al.*, 2016). Cette stratégie est donc particulièrement intéressante.

Par ailleurs, cette étude est la première à montrer la modification génétique de *Synechococcus* PCC 7002 pour la production d'α-farnésène et d'α-pinène. Les rendements obtenus pour le farnésène sont bien supérieurs à ceux décrits pour *Anabaena* PCC 7120 (305,4 µg/L après 15 jours de culture ; (Halfmann *et al.*, 2014a) et pour *Synechococcus* PCC 7942 (production non quantifiable si seul le gène codant pour la farnésène synthase est exprimé; (Lee *et al.*, 2017)). Ils sont cependant bien inférieurs à ceux décrits dans cette étude pour *Synechocystis* PCC 6803.

Cette étude est également la première à avoir analyser :

- la stabilité de la production de limonène. Les rendements semblent décroitre au cours du temps mais ces résultats sont à approfondir.

- l'influence de la phase de croissance sur la productivité en terpène : *Synechococcus* PCC 7002 produit des quantités plus importantes de terpènes par unité de biomasse lorsqu'elle est en (fin de) phase exponentielle de croissance. Par la suite, l'augmentation importante des rendements est directement corrélée à l'augmentation de la biomasse et non pas à l'augmentation de la production par unité de biomasse.

- l'impact des conditions de culture (température, lumière, source et abondance de carbone) sur la production de limonène : la production n'est pas influencée par l'intensité lumineuse à laquelle *Synechococcus* PCC 7002 est cultivée. La production est cependant meilleure à 30°C et dans un milieu dépourvu de bicarbonate et de carbonate.

- qu'il est possible de cultiver *Synechococcus* PCC 7002 en utilisant de l'urée comme seule source d'azote et de lui faire produire des terpènes dans ce milieu. La souche a une croissance similaire dans un milieu contenant du nitrate ou de l'urée. La production de limonène est similaire (voir même supérieure) quand la souche est cultivée dans un milieu contenant de l'urée comme substrat azoté.

IV. Quantification de la production de mono et sesquiterpènes par *Cyanothece* PCC 7425

1. Intérêts de l'étude

Bien que *Cyanothece* PCC 7425 ne puisse pas réellement être considérée comme une souche diazotrophique car elle fixe l'azote atmosphérique qu'en conditions anaérobiques, elle possède de nombreuses autres caractéristiques qui en font une souche intéressante pour les biotechnologies et notamment pour la production de terpènes. Son génome code notamment pour tous les gènes impliqués dans le transport et le catabolisme de l'urée (uréase, urea carboxylase et allophanate dehydrogenase) ce qui semble indiquer qu'elle est capable de pousser aussi bien sur l'urée que sur le nitrate comme source d'azote. Si cela s'avère vrai, cela permettra (i) de réduire les coûts de production car l'urée est deux fois moins chère que le nitrate et (ii) de coupler la production de molécule d'intérêt à la dépollution des eaux polluées à l'urée. Cette souche pourrait également servir à la dépollution des eaux calcaires du fait de sa capacité à réaliser la biominéralisation intracellulaire du carbonate de calcium (voir chapitre 2.IV.3).

Aucun travail n'a permis de mettre au point un système d'expression de gènes chez cette souche et aucune étude n'a démontré son utilisation en biotechnologies.

2. Manuscript: A genetic toolbox for the new model cyanobacterium Cyanothece PCC 7425: a case study for the photosynthetic production of limonene (Chenebault et al., 2020)

Manuscrit publié dans Frontiers in Microbiology Front. Microbiol., 18 September 2020 | https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.586601

Cette étude porte sur une cyanobactérie jusqu'alors peu étudiée : *Cyanothece* PCC 7425. Cette souche possède de nombreuses caractéristiques très intéressantes tant en recherche fondamentale (génome séquencé, large diamètre des cellules, fixation de l'azote atmosphérique en anaérobiose, capacité à former des granules intracellulaires de carbonate de calcium) qu'en recherche appliquée (production de cyanophycine, de cyanobactines et de bioplastiques biodégradables).

Bien que deux études se soient intéressées à la modification génétique des *Cyanothece* (Min and Sherman, 2010; Liberton *et al.*, 2019) aucune de ces études n'a permis de développer un système permettant la modification efficace de *Cyanothece* PCC 7425 ce qui entrave son potentiel comme hôte modèle. Par conséquent, il était important de développer un protocole permettant l'introduction d'un plasmide capable de se répliquer de façon stable et d'induire ou de moduler l'expression de gènes d'intérêt.

Afin de répondre à cet objectif, j'ai tout d'abord testé diverses conditions de culture (lumière, température) et de compositions de milieux pour trouver les meilleures conditions de croissance. Le génome de *Cyanothece* PCC 7425 possédant les gènes lui permettant de transporter et de métaboliser l'urée (Veaudor *et al.*, 2019), j'ai également déterminé les conditions lui permettant de croitre en urée comme seule source d'azote.
J'ai ensuite mis au point un protocole de conjugaison simple et rapide basé sur ceux mis en place au laboratoire (Marraccini *et al.*, 1993; Mermet-Bouvier and Chauvat, 1994; Mazouni *et al.*, 2004). Ce protocole permet le transfert de plasmides dérivés du RSF1010 (un plasmide à large spectre d'hôte) de *E. coli* vers *Cyanothece* PCC 7425 où ils se répliquent de façon stable et autonome.

Ensuite, afin de démontrer tout le potentiel de *Cyanothece* PCC 7425, j'ai utilisé les outils du laboratoire (vecteurs de tests des promoteurs, vecteurs d'expression constitutive ou thermo-controlée) pour :

- Analyser de l'efficacité de promoteurs ;
- Produire de façon contrôlée (thermocontrôle) une protéine hétérologue la β-galactosidase ;
- Réaliser une analyse de la localisation intracellulaire de protéines par fusion à la GFP.

Enfin, en utilisant ces outils génétiques, nous avons modifié génétiquement *Cyanothece* PCC 7425 afin de lui faire produire du limonène, un terpène pouvant être utilisé comme additif pour produire du bio-kérosène (Tracy *et al.*, 2009; Chuck and Donnelly, 2014) ou dans les industries cosmétiques et alimentaires (Jongedijk *et al.*, 2016). Ceci est le premier rapport de l'ingénierie d'une souche de *Cyanothece* pour la production photosynthétique d'une molécule à haute valeur ajoutée et la première démonstration qu'un terpène peut être produit par une cyanobactérie cultivée en présence d'urée comme seule source d'azote.

frontiers in Microbiology

ORIGINAL RESEARCH
published: 18 September 2020
doi: 10.3389/fmicb.2020.586601

A Genetic Toolbox for the New Model Cyanobacterium *Cyanothece* PCC 7425: A Case Study for the Photosynthetic Production of Limonene

Célia Chenebault[1], Encarnación Diaz-Santos[1], Xavier Kammerscheit[1], Sigrid Görgen[1,2], Cristian Ilioaia[1], Simona Streckaite[1], Andrew Gall[1], Bruno Robert[1], Elodie Marcon[3], David-Alexandre Buisson[3], Karim Benzerara[2], Jean-François Sassi[4], Corinne Cassier-Chauvat[1] and Franck Chauvat[1]**

[1] Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), Gif-sur-Yvette, France, [2] Sorbonne Université, Muséum National d'Histoire Naturelle, UMR CNRS 7590, Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie, IMPMC, Paris, France, [3] Université Paris-Saclay, Service de Chimie Bio-organique et Marquage (SCBM), CEA/DRF/JOLIOT, Gif-sur-Yvette, France, [4] Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives (CEA), Centre de Cadarache, Saint-Paul-lez-Durance, France

OPEN ACCESS

Edited by:
Guodong Luan,
Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology (CAS), China

Reviewed by:
Tao Sun,
Tianjin University, China
Martin Hagemann,
University of Rostock, Germany

***Correspondence:**
Corinne Cassier-Chauvat
corinne.cassier-chauvat@cea.fr
Franck Chauvat
franck.chauvat@cea.fr

Specialty section:
This article was submitted to Microbiotechnology, a section of the journal Frontiers in Microbiology

Received: 23 July 2020
Accepted: 31 August 2020
Published: 18 September 2020

Citation:
Chenebault C, Diaz-Santos E, Kammerscheit X, Görgen S, Ilioaia C, Streckaite S, Gall A, Robert B, Marcon E, Buisson D-A, Benzerara K, Sassi J-F, Cassier-Chauvat C and Chauvat F (2020) A Genetic Toolbox for the New Model Cyanobacterium Cyanothece PCC 7425: A Case Study for the Photosynthetic Production of Limonene. Front. Microbiol. 11:586601. doi: 10.3389/fmicb.2020.586601

Cyanobacteria, the largest phylum of prokaryotes, perform oxygenic photosynthesis and are regarded as the ancestors of the plant chloroplast and the purveyors of the oxygen and biomass that shaped the biosphere. Nowadays, cyanobacteria are attracting a growing interest in being able to use solar energy, H_2O, CO_2 and minerals to produce biotechnologically interesting chemicals. This often requires the introduction and expression of heterologous genes encoding the enzymes that are not present in natural cyanobacteria. However, only a handful of model strains with a well-established genetic system are being studied so far, leaving the vast biodiversity of cyanobacteria poorly understood and exploited. In this study, we focused on the robust unicellular cyanobacterium *Cyanothece* PCC 7425 that has many interesting attributes, such as large cell size; capacity to fix atmospheric nitrogen (under anaerobiosis) and to grow not only on nitrate but also on urea (a frequent pollutant) as the sole nitrogen source; capacity to form CO_2-sequestrating intracellular calcium carbonate granules and to produce various biotechnologically interesting products. We demonstrate for the first time that RSF1010-derived plasmid vectors can be used for promoter analysis, as well as constitutive or temperature-controlled overproduction of proteins and analysis of their sub-cellular localization in *Cyanothece* PCC 7425. These findings are important because no gene manipulation system had been developed for *Cyanothece* PCC 7425, yet, handicapping its potential to serve as a model host. Furthermore, using this toolbox, we engineered *Cyanothece* PCC 7425 to produce the high-value terpene, limonene which

has applications in biofuels, bioplastics, cosmetics, food and pharmaceutical industries. This is the first report of the engineering of a *Cyanothece* strain for the production of a chemical and the first demonstration that terpene can be produced by an engineered cyanobacterium growing on urea as the sole nitrogen source.

Keywords: conjugation, RSF1010 derivative plasmids, promoter probe vector, temperature-controlled expression vector, sub-cellular localization, growth on urea, terpene production

INTRODUCTION

Cyanobacteria, the oldest and largest phylum of prokaryotes that perform the plant-like photosynthesis (Schirrmeister et al., 2015), are regarded as the ancestors of the plant chloroplast (Ponce-Toledo et al., 2017) and the purveyors of the oxygen that shaped our biosphere (Hamilton et al., 2016). Contemporary cyanobacteria still capture a vast quantity of solar energy to assimilate huge amounts of CO_2 (Dai et al., 2018) and nitrogen (nitrate, ammonium or urea) (Singh et al., 2016; Veaudor et al., 2019) to produce an enormous biomass that sustain most life forms on our planet. In colonizing most waters (fresh, brackish and marine) and soils (even deserts) biotopes, cyanobacteria have developed as widely diverse organisms. Their genomes vary in size (1.44–12.07 Mb) and organization (presence/absence of plasmids and linear chromosomes in addition to their circular chromosome) (Cassier-Chauvat et al., 2016). Furthermore, cyanobacteria display different cell sizes (1–10 μm) and morphologies, ranging from unicellular (cylindrical or spherical) (Koksharova and Wolk, 2002; Mazouni et al., 2004) to complex multi-cellular (filamentous) species (Cassier-Chauvat and Chauvat, 2014; Montgomery, 2015) capable to differentiate specialized cells for nitrogen fixation (Herrero et al., 2016) or survival to harsh environments (Chauvat et al., 1982; Legrand et al., 2019). Thus, cyanobacteria are interesting models to study how cells divide and pass their morphology on to their progeny (Cassier-Chauvat and Chauvat, 2014). Collectively, the disparities of the genome size, cell morphology and metabolism of cyanobacteria should prompt us to analyze a larger number of evolutionary-distant models to better understand and distinguish the common and species-specific aspects of cyanobacteria (Cassier-Chauvat and Chauvat, 2018).

Besides their great interest for basic science (Cassier-Chauvat and Chauvat, 2018), cyanobacteria are also regarded as promising cell factories for the production of chemicals for human health (Cassier-Chauvat et al., 2017; Demay et al., 2019) and industries (Cassier-Chauvat and Chauvat, 2018; Knoot et al., 2018). They capture solar energy at high efficiencies (3–9%) (Ducat et al., 2011) to fix a huge amount of carbon from atmospheric CO_2 (about 25 gigatons annually) into a huge energy-dense biomass (Jansson and Northen, 2010), and they tolerate high CO_2-containing (≥50%) industrial gas (Ducat et al., 2011). So far, only a handful of model strains with a well-established genetic have been engineered, such as *Synechocystis* PCC 6803, *Synechococcus* PCC 7942, or *Synechococcus* PCC 7002, leading to a weak and often transient production (Knoot et al., 2018; Lin and Pakrasi, 2019). Thus, the influence of the large biodiversity of cyanobacteria on the efficiency of the photosynthetic production of chemicals, has been overlooked.

For all the above-mentioned reasons we think that the time has come to enlarge the panel of the model cyanobacteria to better study and exploit their biodiversity for basic and applied research purposes.

In this study, we focused our attention on the poorly studied unicellular cyanobacterium *Cyanothece* PCC 7425 (also designated as *Cyanothece* ATCC 29141), which was isolated in 1972 from a rice paddy in Senegal (Rippka et al., 1979), because it has numerous attractive properties. *Cyanothece* PCC 7425 has larger cells (about 3–4 μm) (Porta et al., 2000; Bandyopadhyay et al., 2011) than the well-studied models *Synechococcus* PCC 7942 (cylindrical shape, 1.5 μm × 0.5 μm, Koksharova and Wolk, 2002) and *Synechocystis* PCC 6803 (1.5 μm in diameter, Mazouni et al., 2004). This feature should facilitate the analysis of the localization of proteins involved in assembly and distribution of the CO_2-fixing carboxysomes and cell division, which are so far mainly studied in *Synechocystis* PCC 6803 and *Synechococcus* PCC 7942 (Cassier-Chauvat and Chauvat, 2014; Sommer et al., 2019; Sun et al., 2019; MacCready et al., 2020). Unlike these models, *Cyanothece* PCC 7425 can fix atmospheric nitrogen in anaerobiosis (Bandyopadhyay et al., 2011). It is also able to form intracellular CO_2-sequestrating calcium carbonate granules, an interesting but as yet poorly studied particularity (Blondeau et al., 2018). *Cyanothece* PCC 7425 can also synthesize various biotechnologically interesting products, such as: (i) cyanophycin, the nitrogen-rich polymer of arginine and aspartate (Klemke et al., 2016); (ii) cyanobactins, a family of cyclic peptides (Houssen et al., 2012); (iii) alkane, sucrose and polyhydroxyalkanoates (biodegradable bioplastics) (Porta et al., 2000; Bandyopadhyay et al., 2011).

Furthermore, the genome of *Cyanothece* PCC 7425 (5.82 Mb) in being much larger than those of the well-studied models *Synechocystis* PCC 6803 (3.95 Mb), *Synechococcus* PCC 7002 (3.40 Mb) and *Synechococcus* PCC 7942 (2.75 Mb), should teach us new lessons about cyanobacteria. For example, *Cyanothece* PCC 7425 has the genes encoding the two (anti-oxidant) super-oxide dismutases SodA (Mn-dependent) and SodB (Fe-dependent), whereas *Synechocystis* PCC 6803, *Synechococcus* PCC 7002 and *Synechococcus* PCC 7942 only have SodB (Veaudor et al., 2019). Similarly, *Cyanothece* PCC 7425 encodes the anti-oxidant glutathione reductase enzyme that is missing in both *Synechocystis* PCC 6803 (Marteyn et al., 2009) and *Synechococcus* PCC 7002 (Narainsamy et al., 2013). *Cyanothece* PCC 7425 has two *radA* DNA-repair genes whereas all three model cyanobacteria have a single-copy *radA* gene (Cassier-Chauvat et al., 2016). Also interestingly, *Cyanothece* PCC 7425 possesses the full panoply of genes coding for urea uptake and catabolism, whereas *Synechococcus* PCC 7942 has no

such genes, and *Synechocystis* PCC 6803 and *Synechococcus* PCC 7002 have no genes for the ureolytic enzymes urea carboxylase and allophanate hydrolase (Veaudor et al., 2019).

So far, only two attempts to manipulate a *Cyanothece* strain have been reported. First, a single-stranded spectinomycin resistance DNA-cassette, which could be introduced (by electro-transformation) and integrated into the genome of *Cyanothece* PCC 7822 cells, yielded no spectinomycin resistant clones when tested with *Cyanothece* PCC 7425 (Min and Sherman, 2010). More recently, Liberton et al. (2019) using DNA methylases to protect the incoming DNA from the *Cyanothece* ATCC 51142 restriction enzymes, could insert a kanamycin resistance cassette into the glycogen-catabolism gene glgX, generating a glycogen-rich mutant. However, this technique was not tested with *Cyanothece* PCC 7425. Thus, no gene manipulation system is yet available for *Cyanothece* PCC 7425, hampering its otherwise interesting potential to serve as a model host.

In this work, we first improved the classical BG-11 mineral medium cyanobacteria (Stanier et al., 1971) for better growth of *Cyanothece* PCC 7425, which appeared capable to grow not only on nitrate, the usual nitrogen source for cyanobacteria cultivated in the laboratory, but also on urea a frequent pollutant. Then, we developed a simple and efficient protocol for the conjugative transfer to *Cyanothece* PCC 7425 of the plasmid vectors derived from the broad-host-range plasmid RSF1010 that we previously constructed for gene manipulation in *Synechocystis* PCC 6803 and *Synechococcus* PCC 7942 (Marraccini et al., 1993; Mermet-Bouvier and Chauvat, 1994; Mazouni et al., 2004). We showed that these vectors replicate autonomously in *Cyanothece* PCC 7425 where they can be used for facile (i) promoter analysis, (ii) high-level, constitutive or temperature-controlled, protein productions, and (iii) analysis of sub-cellular localization of proteins. Finally, using this genetic toolbox we engineered a *Cyanothece* PCC 7425 strain for the stable photosynthetic production of limonene. This high-value terpene serves in cosmetics and food industries (Jongedijk et al., 2016), and it can be used as a fuel additive (Tracy et al., 2009; Chuck and Donnelly, 2014). This is the first report of the engineering of a *Cyanothece* strain for the photosynthetic production of a chemical, and the first demonstration that a terpene can be produced by an engineered cyanobacterium growing on urea as the sole nitrogen source. This suggests that it could be important in the future to couple chemicals productions with water treatment to reduce the costs (Veaudor et al., 2019).

RESULTS AND DISCUSSION

Identification of Effective Conditions for the Growth of *Cyanothece* PCC 7425: Positive Influence of Calcium and Bicarbonate

As *Cyanothece* PCC 7425 has been poorly studied so far, we first analyzed the influence of usually important parameters, such as light fluence, temperature and mineral availability, on its photoautotrophic growth, *Cyanothece* PCC 7425 appeared to grow well (**Figure 1A**) under the conditions defined as standard for *Synechocystis* PCC 6803, e.g., under white light 2000 lux (25.0 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$), at 30°C, in the MM mineral medium (Domain et al., 2004). As *Cyanothece* PCC 7425 possesses the full panoply of genes encoding the uptake and catabolism of urea that frequently occurs in natural waters (Veaudor et al., 2019), we have tested its capability to grow on urea as the sole nitrogen source. The results showed that cells grew well on urea up to 2 mM, whereas higher urea concentrations reduced the duration of healthy growth and production of biomass (**Supplementary Figure S1**). After 7–10 days of cultivation on urea, *Cyanothece* PCC 7425 can turn yellowish, as previously observed in the phylogenetically distant cyanobacteria *Anabaena cylindrica*, *Synechococcus* PCC 7002 (Sakamoto et al., 1998) and *Synechocystis* PCC 6803 growing on urea as the sole nitrogen source (Veaudor et al., 2019). Again as observed in *Synechocystis* PCC 6803 (Veaudor et al., 2018), once installed the chlorosis process decreased the cell viability measured by plating assays on standard growth medium (it contains nitrate, not urea). Interestingly, *Cyanothece* PCC 7425 grew up to increasing cell densities in response to increasing urea quantities, which needed to be supplied not all at once, but as small successive sub-doses along cell growth (**Supplementary Figure S1**). Also interestingly, the maximal growth (biomass production) of *Cyanothece* PCC 7425 was greatly improved by supplementing the MM with both 9.52 mM $NaHCO_3$ and 2.92 mM $CaCl_2$ (**Figure 1A**), in agreement with the previous finding that *Cyanothece* PCC 7425 forms intracellular calcium carbonate granules (De Wever et al., 2019).

Using the presently improved growth medium, hereafter designated as MM_{CaC}, we found that the growth of *Cyanothece* PCC 7425 (doubling time about 24 h) is (i) similar under light intensities ranging from 1500 to 3500 lux (18.75–43.75 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$) (**Figure 1C**); (ii) not stimulated by the addition of vitamin B12 that can be beneficial or essential to cyanobacterial life (**Figure 1B**); and (iii) slightly improved or decreased by increasing the temperature to 34 or 39°C, respectively (**Figure 1D**).

Development of an Effective Protocol for the Conjugative Transfer of RSF1010-Derived Replicative Plasmids to *Cyanothece* PCC 7425

Three decades ago, we contributed to the development of the genetics of the cyanobacteria *Synechocystis* PCC 6803 and *Synechococcus* PCC 7942, in using the broad-host-range plasmid RSF1010 for the construction of pSB2A, the first promoter-probe vector (Marraccini et al., 1993), and pFC1, the first conditional expression vector (Mermet-Bouvier and Chauvat, 1994). These vectors could be transferred by conjugation (or electroporation) from *Escherichia coli*, to these model cyanobacteria, where they stably replicate autonomously, though they contain no cyanobacterial origin of DNA replication (Mermet-Bouvier et al., 1993). Like RSF1010, pSB2A and pFC1 are not self-transmissible. They must be first introduced (by standard transformation)

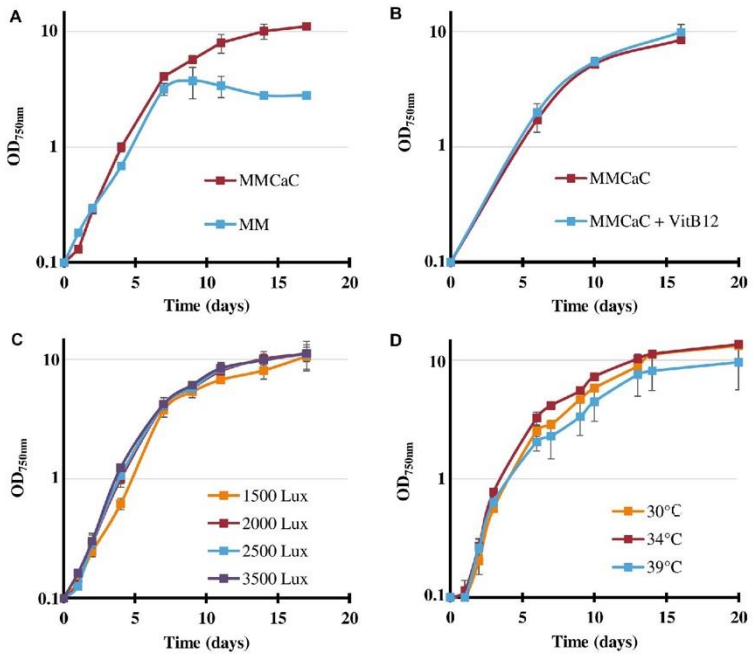


FIGURE 1 | Influence of various conditions on the growth of *Cyanothece* PCC 7425. **(A)** Typical photoautotrophic growth of *Cyanothece* PCC 7425 at 30°C, 2000 lux (25.0 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$) in liquid mineral medium (MM) or MM supplemented with 9.52 mM $NaHCO_3$ and 2.92 mM $CaCl_2$ (MM_{CaC}). **(B)** Influence of the addition of vitamin B12 (4 $\mu g.L^{-1}$). **(C)** Influence of various light intensities on cell growth at 30°C in liquid MM_{CaC}. **(D)** Influence of various temperatures on cell growth in liquid MM_{CaC} under 2000 lux. Error bars represent standard deviation from three biological replicates.

into an *E. coli* strain that already contains the self-transmissible RP4 plasmid, which cannot replicate in cyanobacteria, but encodes in *trans* the functions promoting the transfer of pSB2A or pFC1 to cyanobacteria. The resulting *E. coli* donor cells possessing both RP4 and pSB2A, or pFC1, are co-incubated with the cyanobacterial recipient cells in liquid medium. Then, the mixture is plated on solid mineral medium for selecting the cyanobacterial conjugants based on their antibiotic resistance encoded by pSB2A or pFC1 (Mermet-Bouvier et al., 1993).

In the present study, the pSB2A and pFC1 plasmids were used to test whether RSF1010-derivatives can be transferred by conjugation from *E. coli* to *Cyanothece* PCC 7425, and whether they can stably replicate autonomously in this cyanobacterium as observed in *Synechocystis* PCC 6803 and *Synechococcus* PCC 7942 (Mermet-Bouvier et al., 1993). For this purpose, a simpler and faster efficient protocol was developed that bypassed the introduction of pSB2A or pFC1 into the RP4-harboring *E. coli* strain that normally precedes and enables their conjugative transfer to cyanobacteria. Instead, the cyanobacterial recipient strain was co-incubated, on plate (not in liquid medium) in order to favor cell-cell interaction, with the two *E. coli* strains, one harboring RP4 and the other one pSB2A or pFC1. Also interestingly, similar high frequencies of conjugation, about 5.10^{-4} per cyanobacterial cell, were obtained when pSB2A or pFC1 were propagated in commonly used (*recA* KO) strains of *E. coli*, such as MC1061, TOP10 or XL1-Blue.

The RSF1010-Derived Plasmid Vector pSB2A Can Serve for Promoter Analysis in *Cyanothece* PCC 7425

In this section we used pSB2A, the first promoter-probe-vector originally developed for *Synechocystis* PCC 6803 and *Synechococcus* PCC 7942 (Marraccini et al., 1993; Dutheil et al., 2012). pSB2A possesses a multiple cloning site for cloning any studied promoter in front of the promoter-less chloramphenicol acetyl transferase (*cat*) reporter gene. When expressed, for example by the strong *E. coli tac* promoter we cloned in pSB2A, yielding pSB2T (**Supplementary Table S1**), *cat* directs the production of the CAT reporter enzyme. The activity of this enzyme can be easily monitored by a spectrophotometric assay (Ferino and Chauvat, 1989) and confers the resistance to chloramphenicol (Marraccini et al., 1993; Dutheil et al., 2012) and references therein.

The presently reported conjugation protocol was used to introduce the Sm^R/Sp^R plasmids pSB2A and pSB2T in *Cyanothece* PCC 7425. Among the large number of Sm^R/Sp^R conjugants obtained, two independent clones were collected, re-streaked on Sm^R/Sp^R plates and analyzed by PCR using relevant oligonucleotides primers (**Supplementary Table S2**). The results showed that pSB2A and pSB2T replicate stably in *Cyanothece* PCC 7425 (**Supplementary Figure S2**). Then, we measured the *cat* activities of the *Cyanothece* PCC 7425 reporter strains propagating pSB2A or pSB2T. As expected, a strong CAT activity was observed in *Cyanothece* PCC 7425 cells propagating pSB2T (**Figure 2A**). In contrast, no CAT activities were detected in *Cyanothece* PCC 7425 WT cells, which have no *cat* gene, and pSB2A-propagating cells, where the *cat* reporter gene is not expressed. Collectively, these results showed that the replicative promoter-probe vector pSB2A can be used for promoter analyses in *Cyanothece* PCC 7425.

The RSF1010-Derived Plasmid Vector pFC1 Can Be Used for Temperature-Controlled Protein Production in *Cyanothece* PCC 7425

In this section, we used pFC1, the first conditional expression vector for cyanobacteria, originally developed for *Synechocystis* PCC 6803 and *Synechococcus* PCC 7942 (Mermet-Bouvier and Chauvat, 1994). pFC1 harbors the lambda-phage cI_{857} gene encoding the temperature-sensitive repressor that tightly controls the activity of the otherwise strong p_R promoter located behind cI_{857} (in opposite direction) (Mermet-Bouvier and Chauvat, 1994). The p_R promoter is followed by a canonical ribosome-binding site (RBS, 5′-AGGA-3′) and a correctly spaced ATG initiation codon embedded within the unique *Nde*I restriction site (5′-CAT**ATG**-3′) for easy cloning and strong conditional expression of the studied protein-coding sequences (Sakr et al., 2013; Ortega-Ramos et al., 2014) and references therein.

The Sm^R/Sp^R plasmids pFC1, and its pPMB13 derivative for temperature-controlled expression of the *E. coli lacZ* gene encoding the beta-galactosidase reporter enzyme (Mermet-Bouvier and Chauvat, 1994), were introduced by conjugation (see above) in *Cyanothece* PCC 7425. Among the large number of Sm^R/Sp^R conjugant clones obtained, two independent clones were collected and re-streaked on Sm^R/Sp^R plates, prior to PCR analyses that showed that pFC1 and pPMB13 replicate stably in *Cyanothece* PCC 7425 (**Supplementary Figure S3**). Then, we measured the beta-galactosidase activities of the *Cyanothece* PCC 7425 reporter strains propagating pFC1 or pPMB13. No beta-galactosidase activities were detected in cells propagating pFC1, which lacks *lacZ*. A weak beta-galactosidase activity was observed in cells propagating pPMB13 grown at 30°C where *lacZ* expression is mostly blocked by the temperature-sensitive repressor CI_{857} produced by pPMB13. Finally, the transfer of pPMB13 reporter cells to higher temperatures increased *lacZ* expression, proportionally to the growth temperature, i.e., moderately at 34°C and massively at 39°C, as expected (**Figure 2B**). These results showed that the autonomously replicating plasmid vector pFC1 can be used for temperature-regulated protein production in *Cyanothece* PCC 7425, as was observed in *Synechocystis* PCC 6803 for many endogenous proteins (Sakr et al., 2013; Ortega-Ramos et al., 2014) and references therein. This system for tight control of (strong) gene expression is very interesting when one wants to produce chemicals that are toxic and prevent cell growth or generates mutations that decrease the production to escape cell death (Cassier-Chauvat et al., 2016). Using such a tightly controlled production system it is possible to first grow the engineered cyanobacterium up to a large cell population, before triggering the production of the toxic product which should thus be more efficient (Cassier-Chauvat et al., 2016).

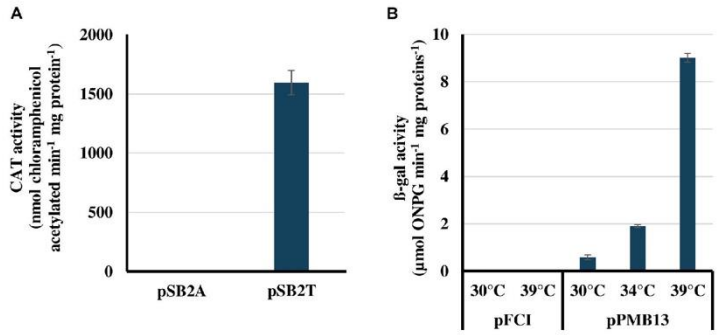


FIGURE 2 | Validation of the pSB2A and pFC1 plasmid vectors for promoter analysis and temperature-controlled protein production in *Cyanothece* PCC 7425, respectively. **(A)** Chloramphenicol acyl transferase (CAT) activities of *Cyanothece* PCC 7425 cells propagating either the promoter probe vector pSB2A, which harbors the promoter-less *cat* reporter gene, or its pSB2T derivative, which expresses the *cat* gene from the strong *E. coli tac* promoter. **(B)** β-galactosidase activities of *Cyanothece* PCC 7425 cells propagating either the temperature-controlled expression vector pFC1 or its pMB13 derivative harboring the *lacZ* protein coding sequence. All activities are the mean values of three measurements performed on two different cellular extracts.

RSF1010-Derived Plasmids and the Green-Fluorescent Reporter Protein Can Be Used to Analyze Protein Localization in *Cyanothece* PCC 7425

In a few model cyanobacteria, such as *Synechocystis* PCC 6803 and *Synechococcus* PCC 7942, translational fusion of studied proteins to the green-fluorescent reporter protein (GFP) proved useful to analyze the sub-cellular localization of proteins involved in cell division (Cassier-Chauvat and Chauvat, 2014) or the biogenesis of the CO_2-fixing carboxysome microcompartment (Cameron et al., 2013).

To test whether the GFP reporter protein can be employed to study protein localization in *Cyanothece* PCC 7425, we tried to conjugate it with our previously constructed plasmids pSB2T-ftsZ-gfp, pSB2T-gfp-ftn6 and pSB2T-gfp-sepF that produce the *Synechocystis* PCC 6803 cytokinetic proteins FtsZ, SepF, and Ftn6 translationally fused to GFP (Mazouni et al., 2004; Marbouty et al., 2009). All attempts were unsuccessful, suggesting that these fusion proteins impair the crucial cytokinetic process of *Cyanothece* PCC 7425.

Consequently, we tried to introduce in *Cyanothece* PCC 7425 the presently constructed pSB2T-derived plasmids pSB2T-ccmk1$_{tsbp1}$-gfp and pSB2T-maf$_{S6803}$-gfp which encode GFP fusions with the presumptive carboxysome protein CcmK1 (Tll0946) of the cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP1 (Cameron et al., 2013) and the *Synechocystis* PCC 6803 presumptive cytokinetic protein (Sll0905) Maf (Hamoen, 2011), respectively (**Supplementary Figure S2**). pSB2T-ccmk1$_{tsbp1}$-gfp was constructed by cloning downstream of the *tac* promoter of pSB2T opened at its unique *Hpa*I restriction site, an *Eco*RV restriction fragment containing the *ccmk1*$_{tsbp1}$-*gfp* fusion gene (synthetized by Genecust; **Supplementary Figure S4**). Similarly, pSB2T-maf$_{S6803}$-gfp harbors the *maf*$_{S6803}$-*gfp* fusion gene downstream of its *tac* promoter (**Supplementary Figures S2, S5**).

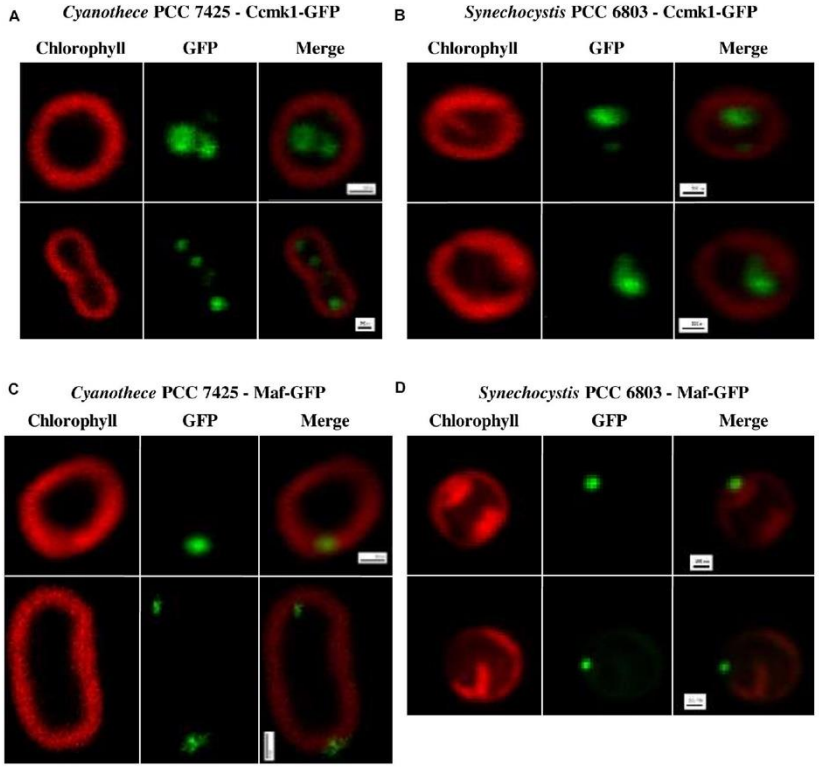


FIGURE 3 | Localization of the fusion proteins Ccmk1$_{tsbp1}$-GFP and Maf$_{S6803}$-GFP in *Cyanothece* PCC 7425 and *Synechocystis* PCC 6803. Fluorescence images (scale bars, 500 nm) of *Cyanothece* PCC 7425 and *Synechocystis* PCC 6803 reporter cells propagating the plasmids pSB2T-ccmk1$_{tsbp1}$-gfp **(A,B)** or pSB2T-maf$_{S6803}$-gfp **(C,D)**, respectively.

These plasmids, along with the previously constructed pSB2T-GFP plasmid encoding the unfused GFP (Mazouni et al., 2004), were transferred by conjugation to *Cyanothece* PCC 7425 and also to *Synechocystis* PCC 6803 as a control strain. Similar high-numbers of conjugant clones were obtained in all cases. PCR analyses showed that all three plasmids appeared to propagate stably in *Synechocystis* PCC 6803 and *Cyanothece* PCC 7425 (**Supplementary Figure S2**). In both hosts, the GFP protein alone displayed no particular localization, as previously observed in *Synechocystis* PCC 6803 (Mazouni et al., 2004). In contrast, the $CcmK1_{tsbp1}$-GFP protein appeared to localize inside the cells of both *Synechocystis* PCC 6803 and *Cyanothece* PCC 7425 (**Figures 3A,B**), likely in their carboxysome as observed with the similar $CcmK1_{S7942}$-GFP fusion protein in *Synechococcus* PCC 7942 (Cameron et al., 2013). The localization of the Maf_{S6803}-GFP fusion protein was also similar in both *Synechocystis* PCC 6803 and *Cyanothece* PCC 7425, but this protein was accumulated in one to two spots at the inner periphery of the cells (**Figures 3C,D**), unlike the $CcmK1_{tsbp1}$-GFP protein. Collectively these data show that RSF1010-derived plasmids and the fluorescent GFP reporter protein are useful tools to study protein localization in the interesting cyanobacterium *Cyanothece* PCC 7425 that has larger cells than the models *Synechocystis* PCC 6803 and *Synechococcus* PCC 7942 classically used for analyzing the sub-cellular localization of proteins.

Construction of a *Cyanothece* PCC 7425 Strain Carrying the *Mentha spicata* Limonene Synthase Encoding Transgene Expressed From the Strong Lambda-Phage p_R Promoter of a RSF1010-Derived pC Plasmid Vector

Then we tested whether *Cyanothece* PCC 7425 can be used for the photosynthetic production of high-value chemicals, such as limonene ($C_{10}H_{16}$). This volatile terpene, naturally produced by plants, has applications in biofuels (Tracy et al., 2009; Chuck and Donnelly, 2014), bioplastics, cosmetic and pharmaceutical industries (Jongedijk et al., 2016). We employed the limonene synthase from *Mentha spicata* because it efficiently transforms the geranyl diphosphate metabolite produced by the NAD(P)H-dependent MEP pathway, into limonene of high purity (Colby et al., 1993). Furthermore, this plant enzyme worked well in the model cyanobacteria *Synechococcus* PCC 7002 (Davies et al., 2014), *Synechococcus* PCC 7942 (Wang et al., 2016) and *Synechocystis* PCC 6803 (Lin et al., 2017). Like previous workers, we removed the first 168 bp encoding the chloroplast targeting sequence from the *Mentha spicata* limonene synthase gene (*ls*) and we adapted its coding sequence to the cyanobacterial usage of codon. We chose the codon usage of *Synechocystis* PCC 6803, because it is similar to that of *Cyanothece* PCC 7425 and proteins efficiently produced in *Synechocystis* PCC 6803 are also well produced in *Cyanothece* PCC 7425 (**Figures 2**, **3**). The *ls* nucleotide sequence was synthesized by the Eurofins company as a DNA segment flanked by *Nde*I and *Eco*RI restriction sites at its 5′- and 3′-ends, respectively. After cleavage with both *Nde*I and *Eco*RI, the *ls* gene was cloned downstream of the strong λp_R promoter of the pFC1-derivative pC plasmid for high-level constitutive gene expression (Veaudor et al., 2018), which was opened with the same enzymes (**Supplementary Figures S6, S7**).

The resulting pC-LS plasmid (**Supplementary Figure S6**) was transferred by conjugation to *Cyanothece* PCC 7425. Two independent Sm^R/Sp^R clones were selected and analyzed by PCR and DNA sequencing (**Supplementary Figure S3**), which showed that pC-LS replicates stably in *Cyanothece* PCC 7425. As expected, the presence of the pC-LS plasmid did not adversely affect the photoautotrophic growth of *Cyanothece* PCC 7425 (**Figures 4A,B**), irrespectively of the number of sub-cultivation (regular verifications were performed during 12 months). Because of the volatility of limonene, a dodecane overlay was applied on cultures to collect limonene in the organic layer. As observed with *Synechococcus* PCC 7002 (Davies et al., 2014) and *Synechocystis* PCC 6803 (Lin et al., 2017), the dodecane overlay had little influence on the growth of *Cyanothece* PCC

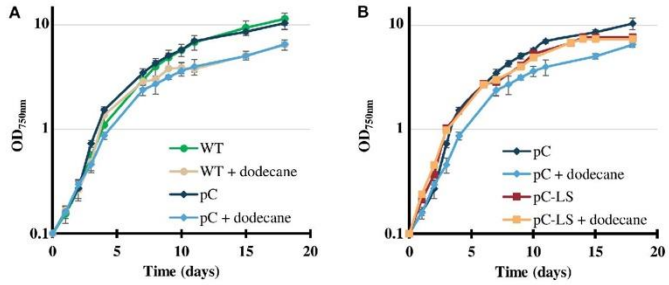


FIGURE 4 | Influence of the pC-LS plasmid expressing the limonene synthase gene on the photoautotrophic growth of *Cyanothece* PCC 7425, in absence or presence of a dodecane overlay. **(A)** Typical photoautotrophic growth of the *Cyanothece* PCC 7425 wild-type strain (WT) and its derivative propagating the pC plasmid, at 30°C, 2000 lux (25.0 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$) in liquid MM_{CaC} mineral medium, in the presence or absence of a 20% (vol/vol) dodecane overlay. **(B)** Typical photoautotrophic growth in the same conditions of *Cyanothece* PCC 7425 strains propagating pC or its pC-LS derivative for high-level constitutive expression of the limonene synthase gene. Error bars represent standard deviation from three biological replicates.

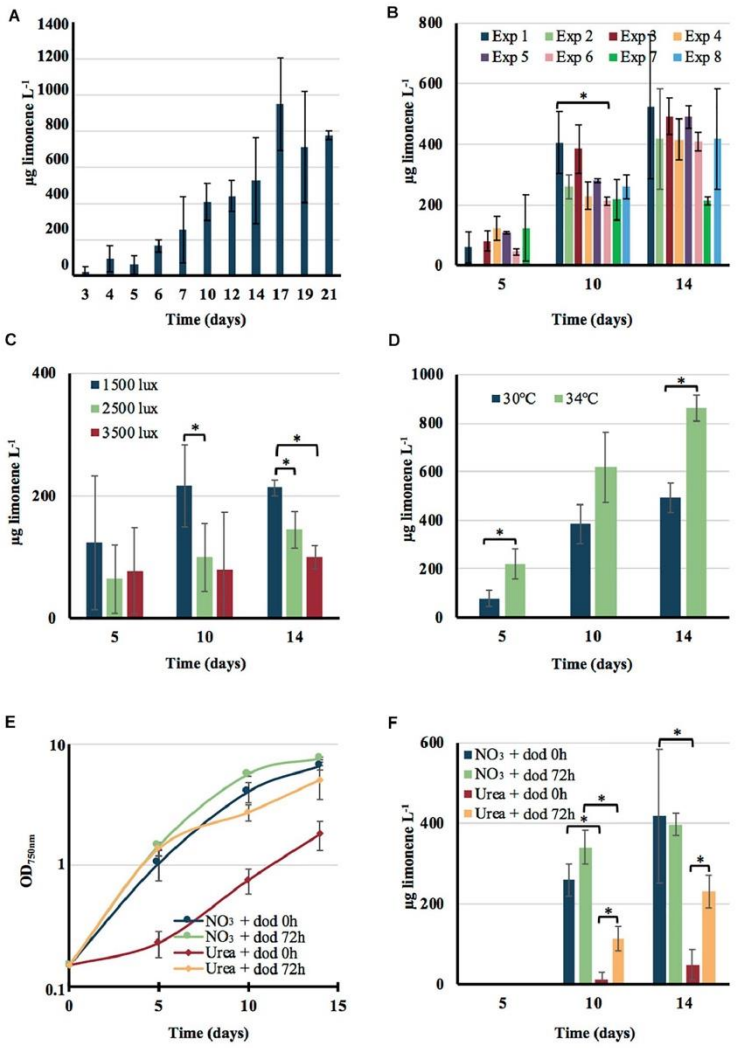


FIGURE 5 | Influence of various growth conditions on the production of limonene by the engineered strain of *Cyanothece* PCC 7425. Cells growing in MM_{CaC} at 30°C under a 1500 lux light (18.75 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$) were inoculated at the initial cell density of 4×10^6 cells mL^{-1} ($OD_{750\ nm} = 0.15$) and further grown under the indicated conditions. Limonene production was monitored at the indicated time intervals. **(A)** Cells were grown for 21 days under above indicated conditions in the presence of a 20% (vol/vol) dodecane overlay. **(B)** Cells were sub-cultured in standard conditions (absence of dodecane) for variable periods (a few weeks to 9 months) prior to assay limonene production as described above during 14 days periods. **(C)** Cells were grown for 14 days in MM_{CaC} at 30°C under the indicated light intensities: 1500 lux (18.75 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$), 2500 lux (31.25 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$) or 3500 lux (42 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$) in the presence of a 20% (vol/vol) dodecane (dod) overlay prior to test limonene production. **(D)** Cells were grown at 30°C or 34°C in MM_{CaC} under a 1500 lux light (18.75 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$) and a 20% (vol/vol) dodecane overlay. Typical growth **(E)** and limonene production **(F)** of cells incubated at 30°C under 1500 lux (18.75 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$) in a nitrogen-free MM_{CaC} medium (MM_{CaC0N}), which was supplemented at times 0, 4, and 8 days with the same amounts of nitrogen. They were provided as successive additions of either 2 mM nitrate (NO_3; up to 8 mM final) or 1 mM urea [$CO(NH_2)_2$; up to 4 mM final]. The dodecane overlay was added either at the beginning of the experiment (dodecane 0 h) or after 72 h of growth. In all cases, error bars represent standard deviation from three biological replicates. The hooks ⊏ indicate a significant difference between the two compared experiments (*t*-test, $P < 0.05$; symbolized by *).

7425 (**Figures 4A,B**), and the C12 chain length of dodecane ($C_{12}H_{26}$) allowed chromatographic separation from the C10 length of limonene ($C_{10}H_{16}$) (**Supplementary Figure S8**).

The Engineered Strain of *Cyanothece* PCC 7425 Propagating the Limonene Synthase Expression Vector pC-LS Is a Stable Limonene Producer

The rate of limonene biosynthesis during the growth phase of the *Cyanothece* PCC 7425 strains propagating the pC-LS plasmid or the (empty) pC vector, were measured over a 21-days period of cultures with a 20% (v/v) dodecane overlay (**Figure 5A**). GC-MS analysis of dodecane overlay samples from the pC-LS propagating strain showed a prominent peak with a similar retention time to pure commercial standards of *S*-(-)-limonene (6.90 min). This peak, which was not observed in the case of the negative control strain propagating the (empty) pC vector, displays a similar pattern than the *S*-(-)-limonene reference spectra from the NIST Mass Spectral Library (**Supplementary Figure S8**).

The overall limonene production, about 0.6–1.0 mg/L, was unaffected by the duration of sub-cultivation under photoautotrophic conditions (up to 9 months) of the engineered *Cyanothece* PCC 7425 strain, prior to limonene assay (**Figures 5A,B**). This test, rarely presented in articles reporting the engineering of cyanobacteria for chemical production (Knoot et al., 2018; Lin and Pakrasi, 2019), showed that the *Cyanothece* PCC 7425 limonene producer is genetically stable. This finding is interesting since it is known that cyanobacteria engineered for chemical production can be genetically unstable (for a review see Cassier-Chauvat et al., 2016). The level of limonene production by the engineered *Cyanothece* PCC 7425 strain was slightly increased by either decreasing the light down to 1500 lux or shifting the temperature up to 34°C (**Figures 5C,D**). In every cases it was similar to what was reported for *Synechococcus* PCC 7942 (Wang et al., 2016), but lower (about fivefold) than what was reported for the very-well known model cyanobacteria *Synechococcus* PCC 7002 (Davies et al., 2014) and *Synechocystis* PCC 6803 (Lin et al., 2017). However, it is very difficult to meaningfully compare limonene production from different cyanobacteria growing under various conditions in different laboratories. Future work will be required to attempt at increasing limonene production by the engineered *Cyanothece* PCC 7425. This will involve finding better conditions for cell growth and limonene collection, as well as effective metabolic engineering strategies.

The Engineered Strain of *Cyanothece* PCC 7425 Can Photosynthetically Produce Limonene, Using Either Nitrate or Urea as the Sole Nitrogen Source

As we have shown above, *Cyanothece* PCC 7425 can grow not only on nitrate, the usual nitrogen source of cyanobacteria, but also on urea, a frequent and abundant pollutant (Veaudor et al., 2019). Growth on urea occurs when it is supplied not all at once, but as small successive sub-doses along cell growth (**Supplementary Figure S1**). Consequently, we compared the level of limonene production by our engineered strain of *Cyanothece* PCC 7425 growing either on nitrate or urea added in similar small quantities along cell growth. As compared to cells growing on nitrate, cells growing on urea can be affected by the dodecane overlay used for limonene trapping (**Figure 5E**). Both cell growth and limonene production are reduced when the dodecane overlay is applied at the beginning of the culture (when the cell density is very low) (**Figures 5E,F**). The negative influence of dodecane on urea-growing cells is reduced when it is applied after 72 h of growth (when the cell density is higher). Such urea-growing cells produced limonene up to about 50% of the quantity produced by cells growing on nitrate. Future work will be required to find good conditions for the photosynthetic production of limonene by *Cyanothece* PCC 7425 growing either on urea. This objective is important in the future view of using cyanobacteria for the photosynthetic production of chemicals coupled with water treatment to reduce the costs (Veaudor et al., 2019).

CONCLUSION

We have developed a genetic toolbox for the robust unicellular cyanobacterium *Cyanothece* PCC 7425. We first showed that the addition of extra calcium and carbonate to the BG-11 mineral medium, classically used to grow cyanobacteria (Stanier et al., 1971), improved the growth of *Cyanothece* PCC 7425. Then, we showed that *Cyanothece* PCC 7425 can grow, not only on nitrate the standard nitrogen source of cyanobacteria, but also on urea a frequent and abundant pollutant (Veaudor et al., 2019). Then, we developed a simple and efficient protocol for the conjugative transfer to *Cyanothece* PCC 7425 of plasmid vectors derived from the broad-host-range plasmid RSF1010. We previously constructed these vectors for (i) promoter analysis (Marraccini et al., 1993), (ii) constitutive or temperature-controlled protein productions (Mermet-Bouvier and Chauvat, 1994), and (iii) analysis of sub-cellular localization of proteins (Mazouni et al., 2004; Marbouty et al., 2009) in the model cyanobacteria *Synechocystis* PCC 6803 and *Synechococcus* PCC 7942. As expected, these autonomously replicating plasmid vectors appeared to work well in *Cyanothece* PCC 7425.

To emphasize the interest of this genetic toolbox for gene manipulation in *Cyanothece* PCC 7425, we used it to engineer a strain for the photosynthetic production of the high-value chemical limonene. Limonene, a 10-carbons volatile terpene ($C_{10}H_{16}$) normally produced by plants, is commercially used in cosmetics and food industries (Jongedijk et al., 2016), and it can be used as an additive to diesel (Tracy et al., 2009) or jet-fuel (Chuck and Donnelly, 2014; Lin et al., 2017). Finally, we have also shown that our engineered strain of *Cyanothece* PCC 7425 is genetically stable and it can produce limonene in calcium-rich water using either nitrate or urea as the sole nitrogen source. This is the first report of the engineering of a *Cyanothece* strain for the photosynthetic production of a chemical. It is also the first demonstration that a terpene can be produced by an engineered cyanobacterium growing on urea as the sole nitrogen source. This

finding is interesting, because it could be important in the future to couple chemicals productions with wastewater treatment to reduce the costs (Veaudor et al., 2019).

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Strains and Growth Condition

Cyanothece PCC 7425 and *Synechocystis* PCC 6803 were grown at 30°C, in the MM mineral medium that corresponds to BG-11 (Stanier et al., 1971) enriched with 3.78 mM Na_2CO_3 (Domain et al., 2004), under continuous agitation (140 rpm, Infors rotary shaker) and cool white light. The intensities were, respectively 1500–2000 lux (18.75–25.00 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$) for *Cyanothece* PCC 7425 and 2500 lux (31.25 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$) for *Synechocystis* PCC 6803. Both of them were also grown on MM solidified with 10% Bacto Agar (Difco). For some experiments performed with *Cyanothece* PCC 7425, MM was supplemented with 9.52 mM $NaHCO_3$ and 2.92 mM $CaCl_2$ (hereafter designated as MM_{CaC}) and/or nitrate was replaced by urea (1–4 mM), as indicated. In these latter cases, nitrate-grown cells were washed twice with nitrate-free medium before resuspension in urea-containing medium.

Escherichia coli strains MC1061 (Casadaban and Cohen, 1980), TOP10 (Invitrogen) or XL1-Blue (Agilent) were used for gene manipulations and/or conjugative transfer (CM404, Mermet-Bouvier et al., 1993) of RSF1010-derived replicative plasmids to *Cyanothece* PCC 7425 and *Synechocystis* PCC 6803 (CM404) (**Supplementary Table S1**). They were grown on LB medium at 30°C (CM404 and all cells harboring pFC1 derivatives) or 37°C (all other strains). Antibiotic selections were as follows for *E. coli*: chloramphenicol (Cm) 34 $\mu g.mL^{-1}$, kanamycin (Km) 50 $\mu g.mL^{-1}$, streptomycin (Sm) 25 $\mu g.mL^{-1}$ and spectinomycin (Sp) 75 $\mu g.mL^{-1}$; for *Cyanothece* PCC 7425: Cm 10 $\mu g.mL^{-1}$, Km 25 $\mu g.mL^{-1}$, Sm 2 $\mu g.mL^{-1}$, and Sp 10 $\mu g.mL^{-1}$; for *Synechocystis* PCC 6803: Km 50 $\mu g.mL^{-1}$, Sp 5 $\mu g.mL^{-1}$, and Sm 5 $\mu g.mL^{-1}$.

Conjugative Transfer of RSF1010-Derived Plasmids to *Cyanothece* PCC 7425 or *Synechocystis* PCC 6803

All plasmids were transferred from *E. coli* to cyanobacterial cells by trans-conjugation (Mermet-Bouvier et al., 1993), using a simplified and more efficient procedure involving a triparental mating and the co-incubation of *E. coli* and recipient cyanobacterial cells on solid medium. Five mL overnight-grown cultures of *E. coli* CM404 harboring the self-transferable mobilization vector (pRK2013, a derivative of RP4, Mermet-Bouvier et al., 1993) and a 5 mL overnight grown culture of *E. coli* strains harboring one of the studied pSB2A- or pFC1-derivative plasmids were washed twice with LB and resuspended separately into 800 µL LB (final concentration of 1.3×10^9 cells.mL^{-1}). Hundred µL *Cyanothece* PCC 7425 mid-log phase culture (about 1.25×10^7 cells) were mixed with 30 µL of a CM404 *E. coli* culture and 30 µL of a culture of an *E. coli* strain harboring a studied plasmid. Then, 30 µL aliquots of the *E. coli* and cyanobacterial mixture were spotted onto non-selective MM agar plates that were incubated at 30°C for 72 h under light (1500 lux, 18.75 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$). Then, 4 spots were resuspended into 200 µL of fresh MM medium. One 50 µL-aliquot was serially diluted in and plated on fresh MM to calculate the number of *Cyanothece* PCC 7425 cells (colony-forming units), while the other three 50 µL-aliquots were plated onto MM containing the selective antibiotics and incubated for 10 days under standard conditions to select the conjugant clones, and calculate the frequency of trans-conjugation. A negative control was realized by spreading onto antibiotic-containing MM plates *Cyanothece* PCC 7425 cells that were not co-incubated with *E. coli* cells to detect possible spontaneous antibiotic resistant mutant cells. Antibiotics resistant conjugant clones were re-streaked onto selective plates, prior to analyzing their plasmid content through PCR and DNA sequencing (Eurofins Genomics, see **Supplementary Table S2** for sequencing primers).

Spectrophotometric Assay of Chloramphenicol Acetyl-Transferase Activity

CAT assays were done basically as described for *Synechocystis* PCC 6803 (Ferino and Chauvat, 1989; Marraccini et al., 1993). *Cyanothece* PCC 7425 strains harboring the pSB2A or pSB2T plasmids were grown in MM_{CaC} at 30°C under 2000 lux (1×10^8 cells.mL^{-1}) washed twice and resuspended into 2 mL of 50 mM Tris-HCl, pH 8.0. Approximately 2.10^9 cells were broken in a chilled Eaton press (250 Mpa). Cell extracts were centrifuged (14,000 rpm, 4°C, 10 min) to remove cell debris and were either stored at −20°C until assay or used directly. 1–40 µL of cells extracts mixed with 200 µL of reaction solution (Tris HCl 100 mM pH 8, DTNB 0.4 $mg.mL^{-1}$ and acetyl CoA 0.1 mM) were loaded into a 96-well plate (Greiner bio-one). Five µL of chloramphenicol at 5 mM was automatically added in each well by a microplate reader (ClarioStar; BMG Labtech). Immediately the absorption at 412 nm of the yellow TNB (5′-thio-2-nitrobenzoic acid) product was measured for 3 min at 30°C. Chloramphenicol acyltransferase activity was defined as the number of nanomoles of chloramphenicol acetylated per minute per mg protein that were quantified by the Bradford assay (Bio-Rad) using bovine serum albumin (0–10 µg BSA) as the standard.

Spectrophotometric Assay of Beta-Galactosidase Activity

β-galactosidase assays were done basically as described for *Synechocystis* PCC 6803 (Mermet-Bouvier and Chauvat, 1994). *Cyanothece* PCC 7425 strains harboring the pFCI or pPMB13 plasmids grown at 30°C in MM_{CaC} under 2000 lux (5×10^7 cells.mL^{-1}) were heat-induced by a fourfold dilution into prewarmed growth medium and then incubated for 168 h at the indicated temperatures (30–39°C). Roughly, 2×10^9 cells were washed, resuspended (in 2 mL Tris-HCl 50 mM pH 8.0), broken and centrifuged as described above. Immediately, 2–10 µL of cells extracts mixed with 200 µL of reaction solution (100 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 buffer pH 7.5, 50 mM β-mercaptoethanol)

were loaded into a clear 96-well plate (Greiner bio-one). Then, 40 μL of ONPG (of *o*-nitrophenol-galactoside) 4 mg.mL^{-1} in K_2HPO_4/KH_2PO_4 buffer, pH 7.5) were automatically added in each well with a microplate reader (ClarioStar; BMG Labtech). The reaction was immediately followed by measuring the absorption at 420 nm of the yellow ONP (*o*-nitrophenol) product for 3 min at 30°C. β-galactosidase activity was calculated as the number of micromoles ONPG hydrolyzed per minute per mg proteins, which were quantified by the Bradford assay.

Microscopy

Mid-log phase cultures of *Synechocystis* PCC 6803 and *Cyanothece* PCC 7425 cells harboring the pSB2TΔKm^R-gfp, pSB2T-ccmk1$_{tsbp1}$-gfp and pSB2T-maf$_{S6803}$-gfp plasmids were placed in sandwiches consisting of two glass coverslips (22 mm diameter, Paul Marienfeld GmbH & Co. KG) one of which being coated with a Poly-L-lysine (Sigma-Aldrich) monolayer. These coverslip sandwiches were sealed and placed inside a home-made sample holder, which was mounted on a Nikon Ti-U inverted microscope coupled with an iXon ULTRA 897 CCD camera (Andor Technology), equipped with a 100x oil immersion (NA 1.45) microscope objective. Epifluorescence images were recorded using an excitation provided by a plasma light source (HPLS245 Thorlabs, Inc.) and an excitation filter (MF469-35 Thorlabs, Inc.), while for super-resolution laser scanning images a 488 nm laser (OBIS, Coherent) was used as an excitation source.

Chlorophyll and GFP fluorescence were recorded using ET655LP (Chroma Technology Corporation) and MF525/39 (Thorlabs, Inc.) emission filters, respectively.

Limonene Collection and Quantification/Measurement by Gas Chromatography–Mass Spectrometry

Cyanothece PCC 7425 engineered for limonene production was grown photoautotrophically (1500–3500 lux) in 125- or 250-mL erlenmeyers respectively containing 25 or 50 mL cell suspensions overlaid with 20% (vol/vol) dodecane (analytical grade, Sigma-Aldrich) to trap limonene during the whole experimental time course. At time intervals, aliquots of 300 μL were harvested from the dodecane overlay. One μL samples were injected into a GC-MS [Trace1300 (GC) + ISQ LT (MS), ThermoScientific] equipped with a TG-5MS column (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm) and operated with H_2 carrier gas at 1.0 mL.min^{-1}; ionization voltage 70 eV, split ratio of 25:1; transfer line temperature 250°C; ion source temperature 200°C. The oven program was as followed: 50°C (held for 1 min), 50–150°C (10°C min^{-1}), 150–250°C (20°C min^{-1}), and held for 5 min, with a total program of 21 min. Analysis were carried out in the selected ion monitoring mode: m/z = 50–650.

The limonene peak was identified based on its different ion chromatogram and retention time as compared to those of the α-pinene (Supelco 80599, Sigma-Aldrich) used as an internal standard. A standard curve at m/z = 136 was constructed by GC peak integration of serial dilutions of *S*-limonene (Supelco 62128, Sigma-Aldrich) pure standard in dodecane (**Supplementary Figure S9**). The limonene concentration in every dodecane sample was determined using this ratio and by taking-into-account the decrease of the dodecane overlay volume after each sample collection.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

All datasets generated for this study are included in the article/**Supplementary Material**.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

FC, CC-C, J-FS, and KB conceived the project. FC, CC-C, CC, ED-S, AG, BR, J-FS, and KB conceived the experiments. CC, ED-S, XK, SG, CI, SS, AG, EM, and D-AB performed the experiments. All authors analyzed the data, read and approved the manuscript. FC, CC-C, and CC drafted the manuscript. FC and CC-C wrote the manuscript. FC agreed to serve as the author responsible for contact and ensures communication.

FUNDING

This work was partly supported by the CEA-DRF PTNTE Greenfuels project, the ANR Harley project (ANR-19-CE44-0017-03), and the platform of Biophysics of I2BC supported by French Infrastructure for Integrated Structural Biology (FRISBI) ANR-10-INBS-05-05. ED-S received a post-doctoral fellowship from the CEA (PTNTE project Greenfuels). CC and SG received a Ph.D. fellowship from the CEA (SL-DRF-17-0106) and the MENESR, respectively.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Amélie Goudet for help using GC-MS apparatus.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.586601/full#supplementary-material

REFERENCES

Bandyopadhyay, A., Elvitigala, T., Welsh, E., Stöckel, J., Liberton, M., Min, H., et al. (2011). Novel metabolic attributes of the genus *Cyanothece*, comprising a group of unicellular nitrogen-fixing cyanobacteria. *mBio* 2:e00214-11. doi: 10.1128/mBio.00214-11

Blondeau, M., Sachse, M., Boulogne, C., Gillet, C., Guigner, J. M., Skouri-Panet, F., et al. (2018). Amorphous calcium carbonate granules form within an

intracellular compartment in calcifying cyanobacteria. *Front. Microbiol.* 9:1768. doi: 10.3389/fmicb.2018.01768

Cameron, J. C., Wilson, S. C., Bernstein, S. L., and Kerfeld, C. A. (2013). Biogenesis of a bacterial organelle: the carboxysome assembly pathway. *Cell* 155, 1131–1140. doi: 10.1016/j.cell.2013.10.044

Casadaban, M. J., and Cohen, S. N. (1980). Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 138, 179–207. doi: 10.1016/0022-2836(80)90283-1

Cassier-Chauvat, C., and Chauvat, F. (2014). "Cell division in cyanobacteria," in *The Cell Biology of Cyanobacteria*, eds E. Flores and A. Herrero (Norfolk: Caister Academic Press).

Cassier-Chauvat, C., and Chauvat, F. (2018). *Cyanobacteria: Wonderful Microorganisms for Basic and Applied Research*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons Ltd.

Cassier-Chauvat, C., Dive, V., and Chauvat, F. (2017). Cyanobacteria: photosynthetic factories combining biodiversity, radiation resistance, and genetics to facilitate drug discovery. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101, 1359–1364. doi: 10.1007/s00253-017-8105-z

Cassier-Chauvat, C., Veaudor, T., and Chauvat, F. (2016). Comparative genomics of DNA recombination and repair in cyanobacteria: biotechnological implications. *Front. Microbiol.* 7:1809. doi: 10.3389/fmicb.2016.01809

Chauvat, F., Corre, B., Herdman, M., and Joset-Espardellier, F. (1982). Energetic and metabolic requirements for the germination of akinetes of the cyanobacterium Nostoc PCC 7524. *Arch. Microbiol.* 133, 44–49. doi: 10.1007/BF00943768

Chuck, C. J., and Donnelly, J. (2014). The compatibility of potential bioderived fuels with Jet A-1 aviation kerosene. *Appl. Energy* 118, 83–91. doi: 10.1016/j.apenergy.2013.12.019

Colby, S. M., Alonso, W. R., Katahira, E. J., McGarvey, D. J., and Croteau, R. (1993). 4S-limonene synthase from the oil glands of spearmint (*Mentha spicata*). cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of the catalytically active monoterpene cyclase. *J. Biol. Chem.* 263, 23016–23024.

Dai, W., Chen, M., Myers, C., Ludtke, S. J., Pettitt, B. M., King, J. A., et al. (2018). Visualizing individual RuBisCO and its assembly into carboxysomes in marine cyanobacteria by cryo-electron tomography. *J. Mol. Biol.* 430, 4156–4167. doi: 10.1016/j.jmb.2018.08.013

Davies, F. K., Work, V. H., Beliaev, A. S., and Posewitz, M. C. (2014). Engineering limonene and bisabolene production in wild type and a glycogen-deficient mutant of *Synechococcus* sp. PCC 7002. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2:21. doi: 10.3389/fbioe.2014.00021

De Wever, A., Benzerara, K., Coutaud, M., Caumes, G., Poinsot, M., Skouri-Panet, F., et al. (2019). Evidence of high Ca uptake by cyanobacteria forming intracellular CaCO3 and impact on their growth. *Geobiology* 17, 676–690. doi: 10.1111/gbi.12358

Demay, J., Bernard, C., Reinhardt, A., and Marie, B. (2019). Natural products from cyanobacteria: focus on beneficial activities. *Mar. Drugs* 17:320. doi: 10.3390/md17060320

Domain, F., Houot, L., Chauvat, F., and Cassier-Chauvat, C. (2004). Function and regulation of the cyanobacterial genes lexA, recA and ruvB: LexA is critical to the survival of cells facing inorganic carbon starvation. *Mol. Microbiol.* 53, 65–80. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04100.x

Ducat, D. C., Way, J. C., and Silver, P. A. (2011). Engineering cyanobacteria to generate high-value products. *Trends Biotechnol.* 29, 95–103. doi: 10.1016/j.tibtech.2010.12.003

Dutheil, J., Saenkham, P., Sakr, S., Leplat, C., Ortega-Ramos, M., Bottin, H., et al. (2012). The AbrB2 autorepressor, expressed from an atypical promoter, represses the hydrogenase operon to regulate hydrogen production in *Synechocystis* strain PCC6803. *J. Bacteriol.* 194, 5423–5433. doi: 10.1128/JB.00543-12

Ferino, F., and Chauvat, F. (1989). A promoter-probe vector-host system for the cyanobacterium, *Synechocystis* PCC6803. *Gene* 84, 257–266. doi: 10.1016/0378-1119(89)90499-X

Hamilton, T. L., Bryant, D. A., and Macalady, J. L. (2016). The role of biology in planetary evolution: cyanobacterial primary production in low-oxygen Proterozoic oceans. *Environ. Microbiol.* 18, 325–340. doi: 10.1111/1462-2920.13118

Hamoen, L. W. (2011). Cell division blockage: but this time by a surprisingly conserved protein. *Mol. Microbiol.* 81, 1–3. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07693.x

Herrero, A., Stavans, J., and Flores, E. (2016). The multicellular nature of filamentous heterocyst-forming cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 40, 831–854. doi: 10.1093/femsre/fuw029

Houssen, W. E., Koehnke, J., Zollman, D., Vendome, J., Raab, A., Smith, M. C. M., et al. (2012). The discovery of new cyanobactins from *Cyanothece* PCC 7425 defines a new signature for processing of patellamides. *ChemBioChem* 13, 2683–2689. doi: 10.1002/cbic.201200661

Jansson, C., and Northen, T. (2010). Calcifying cyanobacteria-the potential of biomineralization for carbon capture and storage. *Curr. Opin. Biotechnol.* 21, 365–371. doi: 10.1016/j.copbio.2010.03.017

Jongedijk, E., Cankar, K., Buchhaupt, M., Schrader, J., Bouwmeester, H., and Beekwilder, J. (2016). Biotechnological production of limonene in microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 2927–2938. doi: 10.1007/s00253-016-7337-7

Klemke, F., Nürnberg, D. J., Ziegler, K., Beyer, G., Kahmann, U., Lockau, W., et al. (2016). CphA2 is a novel type of cyanophycin synthetase in N2-fixing cyanobacteria. *Microbiology* 162, 526–536. doi: 10.1099/mic.0.000241

Knoot, C. J., Ungerer, J., Wangikar, P. P., and Pakrasi, H. B. (2018). Cyanobacteria: Promising biocatalysts for sustainable chemical production. *J. Biol. Chem.* 293, 5044–5052. doi: 10.1074/jbc.R117.815886

Koksharova, O. A., and Wolk, C. P. (2002). A novel gene that bears a DnaJ motif influences cyanobacterial cell division. *J. Bacteriol.* 184, 5524–5528. doi: 10.1128/JB.184.19.5524-5528.2002

Legrand, B., Miras, Y., Beauger, A., Dussauze, M., and Latour, D. (2019). Akinetes and ancient DNA reveal toxic cyanobacterial recurrences and their potential for resurrection in a 6700-year-old core from a eutrophic lake. *Sci. Total Environ.* 687, 1369–1380. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.07.100

Liberton, M., Bandyopadhyay, A., and Pakrasi, H. B. (2019). Enhanced nitrogen fixation in a glgX-deficient strain of *Cyanothece* sp. strain ATCC 51142, a unicellular nitrogen-fixing cyanobacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 85:e02887-18. doi: 10.1128/AEM.02887-18

Lin, P. C., and Pakrasi, H. B. (2019). Engineering cyanobacteria for production of terpenoids. *Planta* 249, 145–154. doi: 10.1007/s00425-018-3047-y

Lin, P.-C., Saha, R., Zhang, F., and Pakrasi, H. B. (2017). Metabolic engineering of the pentose phosphate pathway for enhanced limonene production in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Sci. Rep.* 7:17503. doi: 10.1038/s41598-017-17831-y

MacCready, J. S., Basalla, J. L., and Vecchiarelli, A. G. (2020). Origin and evolution of carboxysome positioning systems in cyanobacteria. *Mol. Biol. Evol.* 37, 1434–1451. doi: 10.1093/molbev/msz308

Marbouty, M., Saguez, C., Cassier-Chauvat, C., and Chauvat, F. (2009). Characterization of the FtsZ-interacting septal proteins SepF and Ftn6 in the spherical-celled cyanobacterium *Synechocystis* strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* 191, 6178–6185. doi: 10.1128/JB.00723-09

Marraccini, P., Bulteau, S., Cassier-Chauvat, C., Mermet-Bouvier, P., and Chauvat, F. (1993). A conjugative plasmid vector for promoter analysis in several cyanobacteria of the genera *Synechococcus* and *Synechocystis*. *Plant Mol. Biol.* 23, 905–909. doi: 10.1007/BF00021546

Marteyn, B., Domain, F., Legrain, P., Chauvat, F., and Cassier-Chauvat, C. (2009). The thioredoxin reductase-glutaredoxins-ferredoxin crossroad pathway for selenate tolerance in *Synechocystis* PCC6803. *Mol. Microbiol.* 71, 520–532. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06550.x

Mazouni, K., Domain, F., Cassier-Chauvat, C., and Chauvat, F. (2004). Molecular analysis of the key cytokinetic components of cyanobacteria: FtsZ, ZipN and MinCDE. *Mol. Microbiol.* 52, 1145–1158. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04042.x

Mermet-Bouvier, P., Cassier-Chauvat, C., Marraccini, P., and Chauvat, F. (1993). Transfer and replication of RSF1010-derived plasmids in several cyanobacteria of the genera *Synechocystis* and *Synechococcus*. *Curr. Microbiol.* 27, 323–327. doi: 10.1007/BF01568955

Mermet-Bouvier, P., and Chauvat, F. (1994). A conditional expression vector for the cyanobacteria *Synechocystis* sp. strains PCC6803 and PCC6714 or

Synechococcus sp. strains PCC7942 and PCC6301. *Curr. Microbiol.* 28, 145–148. doi: 10.1007/BF01571055

Min, H., and Sherman, L. A. (2010). Genetic transformation and mutagenesis via single-stranded DNA in the unicellular, diazotrophic cyanobacteria of the genus *Cyanothece*. *Appl. Environ. Microbiol.* 16, 7641–7645. doi: 10.1128/AEM.01456-10

Montgomery, B. L. (2015). Light-dependent governance of cell shape dimensions in cyanobacteria. *Front. Microbiol.* 6:514. doi: 10.3389/fmicb.2015.00514

Narainsamy, K., Marteyn, B., Sakr, S., Cassier-Chauvat, C., and Chauvat, F. (2013). "Genomics of the Pleïotropic Glutathione System in Cyanobacteria," in *Advances in Botanical Research*, ed. J. A. Callow (Amsterdam: Elsevier), 157–188. doi: 10.1016/b978-0-12-394313-2.00005-6

Ortega-Ramos, M., Jittawuttipoka, T., Saenkham, P., Czarnecka-Kwasiborski, A., Bottin, H., Cassier-Chauvat, C., et al. (2014). Engineering *Synechocystis* PCC6803 for hydrogen production: influence on the tolerance to oxidative and sugar stresses. *PLoS One* 9:e0089372. doi: 10.1371/journal.pone.0089372

Ponce-Toledo, R. I., Deschamps, P., López-García, P., Zivanovic, Y., Benzerara, K., and Moreira, D. (2017). An early-branching freshwater cyanobacterium at the origin of plastids. *Curr. Biol.* 27, 386–391. doi: 10.1016/j.cub.2016.11.056

Porta, D., Rippka, R., and Hernández-Mariné, M. (2000). Unusual ultrastructural features in three strains of *Cyanothece* (cyanobacteria). *Arch. Microbiol.* 173, 154–163. doi: 10.1007/s002039900126

Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M., and Stanier, R. Y. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 11, 1–61. doi: 10.1099/00221287-111-1-1

Sakamoto, T., Delgaizo, V. B., and Bryant, D. A. (1998). Growth on urea can trigger death and peroxidation of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2361–2366. doi: 10.1128/AEM.64.7.2361-2366.1998

Sakr, S., Dutheil, J., Saenkham, P., Bottin, H., Leplat, C., Ortega-Ramos, M., et al. (2013). The activity of the *Synechocystis* PCC6803 AbrB2 regulator of hydrogen production can be post-translationally controlled through glutathionylation. *Int. J. Hydrogen Energy* 38, 13547–13555. doi: 10.1016/j.ijhydene.2013.07.124

Schirrmeister, B. E., Gugger, M., and Donoghue, P. C. J. (2015). Cyanobacteria and the great oxidation event: evidence from genes and fossils. *Palaeontology* 58, 769–785. doi: 10.1111/pala.12178

Singh, J. S., Kumar, A., Rai, A. N., and Singh, D. P. (2016). Cyanobacteria: a precious bio-resource in agriculture, ecosystem, and environmental sustainability. *Front. Microbiol.* 7:529. doi: 10.3389/fmicb.2016.00529

Sommer, M., Sutter, M., Gupta, S., Kirst, H., Turmo, A., Lechno-Yossef, S., et al. (2019). Heterohexamers formed by CcmK3 and CcmK4 increase the complexity of beta carboxysome shells. *Plant Physiol.* 179, 156–167. doi: 10.1104/pp.18.01190

Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M., and Cohen-Bazire, G. (1971). Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriol. Rev.* 35, 171–205. doi: 10.1128/mmbr.35.2.171-205.1971

Sun, Y., Wollman, A. J. M., Huang, F., Leake, M. C., and Liu, L. N. (2019). Single-organelle quantification reveals stoichiometric and structural variability of carboxysomes dependent on the environment. *Plant Cell* 31, 1648–1664. doi: 10.1105/tpc.18.00787

Tracy, N. I., Chen, D., Crunkleton, D. W., and Price, G. L. (2009). Hydrogenated monoterpenes as diesel fuel additives. *Fuel* 88, 2238–2240. doi: 10.1016/j.fuel.2009.02.002

Veaudor, T., Cassier-Chauvat, C., and Chauvat, F. (2018). Overproduction of the cyanobacterial hydrogenase and selection of a mutant thriving on urea, as a possible step towards the future production of hydrogen coupled with water treatment. *PLoS One* 13:e0198836. doi: 10.1371/journal.pone.0198836

Veaudor, T., Cassier-Chauvat, C., and Chauvat, F. (2019). Genomics of urea transport and catabolism in cyanobacteria: biotechnological implications. *Front. Microbiol.* 10:2052. doi: 10.3389/fmicb.2019.02052

Wang, X., Liu, W., Xin, C., Zheng, Y., Cheng, Y., Sun, S., et al. (2016). Enhanced limonene production in cyanobacteria reveals photosynthesis limitations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, 14225–14230. doi: 10.1073/pnas.1613340113

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Chenebault, Diaz-Santos, Kammerscheit, Görgen, Ilioaia, Streckaite, Gall, Robert, Marcon, Buisson, Benzerara, Sassi, Cassier-Chauvat and Chauvat. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

frontiers

Supplementary Material

Supplementary Table S1 – Characteristics of the bacterial strains and plasmids used in this study

Strain/Plasmid	Relevant features	Reference
Escherichia coli CM404	*E. coli* strain for conjugation. It harbors the self-transmissible pRK2013 plasmid	(Marraccini et al., 1993)
Escherichia coli TOP10	*E. coli* strain for cloning and conjugation	Invitrogen
Escherichia coli MC1061	*E. coli* strain for conjugation	(Casadaban and Cohen, 1980)
Escherichia coli XL1 Blue	*E. coli* strain for cloning and conjugation	Agilent
***Synechocystis* PCC 6803**	Best-studied cyanobacterium used as a genetic model	Pasteur Institute (Paris, France)
***Cyanothece* PCC 7425**	Unicellular cyanobacterium endowed with attractive properties	Pasteur Institute (Paris, France)
pFCI	RSF1010-derived plasmid vector (Sp^R/Sm^R,Cm^R) harboring the strong p_R promoter tightly controlled by the temperature-sensitive repressor encoded by the cI_{857} gene, for temperature-controlled protein production	(Mermet-Bouvier and Chauvat, 1994)
pPMB13	pFCI derivative harboring the *E. coli lacZ* gene for temperature-controlled production of the beta-galactosidase reporter enzyme	(Mermet-Bouvier and Chauvat, 1994)
pC	pFCI derivative harboring a truncated cI_{857} repressor gene for constitutive gene expression	(Veaudor et al., 2018)
pEX-K4-LS	Km^R plasmid harboring the Mentha spicata 4S-limonene synthase encoding gene adapted to the cyanobacterial codon usage flanked by *NdeI* and *EcoRI* restriction sites	This study and Eurofins Genomics
pC-LS	pC derivative plasmid (Sp/Sm^R, Cm^S) with the 4S-limonene synthase encoding gene cloned in between the *NdeI* and *EcoRI* sites	This study
pSB2A	RSF1010-derived plasmid vector (Sp^R/Sm^R, Km^R,Cm^S) harboring the promoter-less *cat* coding sequence (CS), which, when expressed, produces the chloramphenicol-acetyl-transferase reporter enzyme	(Marraccini et al., 1993)
pSB2T	pSB2A derivative (Sp^R/Sm^R, Km^R, Cm^R) expressing the *cat* CS from the strong the *E. coli tac* promoter, yielding a strong chloramphenicol-acetyl-transferase reporter activity	(Marraccini et al., 1993)
pSB2T-gfp	Km^S derivative of pSB2T strongly expressing the GFP coding sequence for strong production of the green-fluorescent reporter protein	(Mazouni et al., 2004)
pSB2T-$maf_{slr6803}$-gfp	pSB2T-derivative (Sp/Sm^R, Km^R) for strong production of the *Synechocystis* Maf protein translationally-fused to GFP	This study
pSB2AT-$ccmk1_{tsbp1}$-gfp	pSB2T-derivative (Sp/Sm^R, Km^R) for strong production of the cyanobacterial CcmK1 carboxysome protein translationally-fused to GFP	This study and Genecust

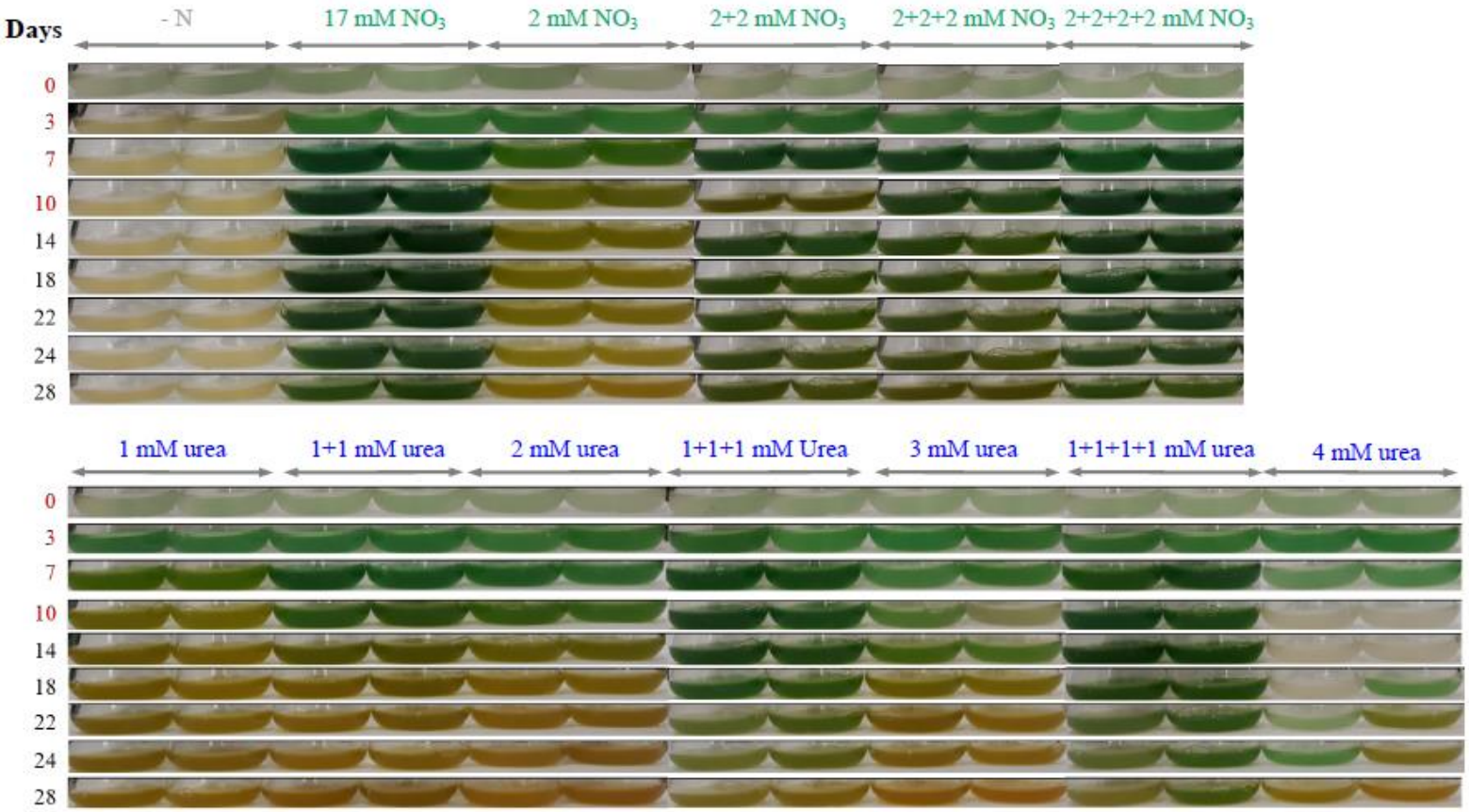
frontiers

Supplementary Table S2 – List and characteristics of the PCR primers used in this study

Name	Sequence (5'-3')	Purpose
pFC1 and pFCI derivates		
pFC1 Fw	GGCGACGTGCGTCCTCAAGC	PCR amplification and/or DNA sequencing of genes cloned in between the *Nde*I and *EcoR*I restriction sites of pFC1 and pC
pFC1 Rv	GTGTAACAAGGGTGAACAC	
pSB2A and pSB2A derivates		
pSB2A Fw	TAGCGAGGGCTTTACTAAGC	PCR amplification of the promoters or the genes cloned in pSB2A or its pSB2T derivative
pSB2A Rv	GCTCCTGAAAATCTCGTCG	
Limonene synthase gene		
LSF1	GCGGAATACCGGCTTTGTTG	DNA sequencing of the 4S-limonene synthase encoding gene propagated in pC-LS
LSR1	ACTATCGGTGACCCGGAAGA	
LSR2	TAACCGATCCCGTGCAAAAG	

Fw: forward; Rv: reverse

Supplementary Figure S1. Influence of nitrogen sources on the growth of *Cyanothece* PCC 7425.
Cells inoculated at OD_{750} = 0.1 were grown at 30°C, under light (2000 lux), in liquid nitrogen-free mineral medium (-N), which was in some cases supplemented with 2 to 17 mM nitrate ($NaNO_3$; 17 mM is the concentration of the standard medium) or with 1 to 4 mM urea ($CO(NH_2)_2$), as indicated. Urea and nitrate were added either all at once or by little additions of small doses (1 mM Urea or 2 mM $NaNO_3$) of equal nitrogen content (2 mM N) at days 0, 3, 7 and 10 (as indicated in red). Cells growing on nitrate, the usual nitrogen source for most cyanobacteria, cared only about nitrate concentration (the greater, the better) whereas cells growing on urea required successive additions of small doses, rather than a brutal addition of a high dose which could be toxic.

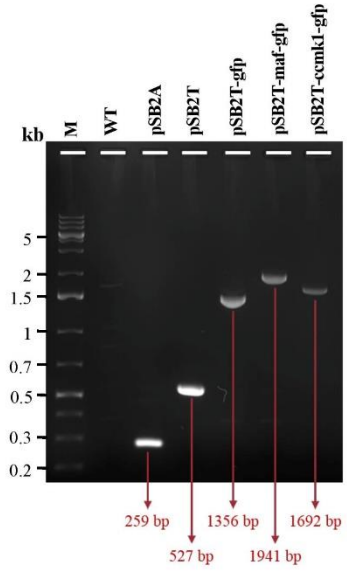


Supplementary Figure S2. Schematic representation and PCR analysis of the pSB2A-plasmid family replicating in *Cyanothece* PCC 7425

(A) Schematic representation of the pSB2A plasmid and its derivatives. The genes are represented by colored arrows pointing into the direction of their transcription. The PCR primers are colored in red and their corresponding PCR are indicated by double arrows. (B) Typical UV-light image of the agarose gel showing the relevant PCR products. M (marker DNA) indicates the GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific).

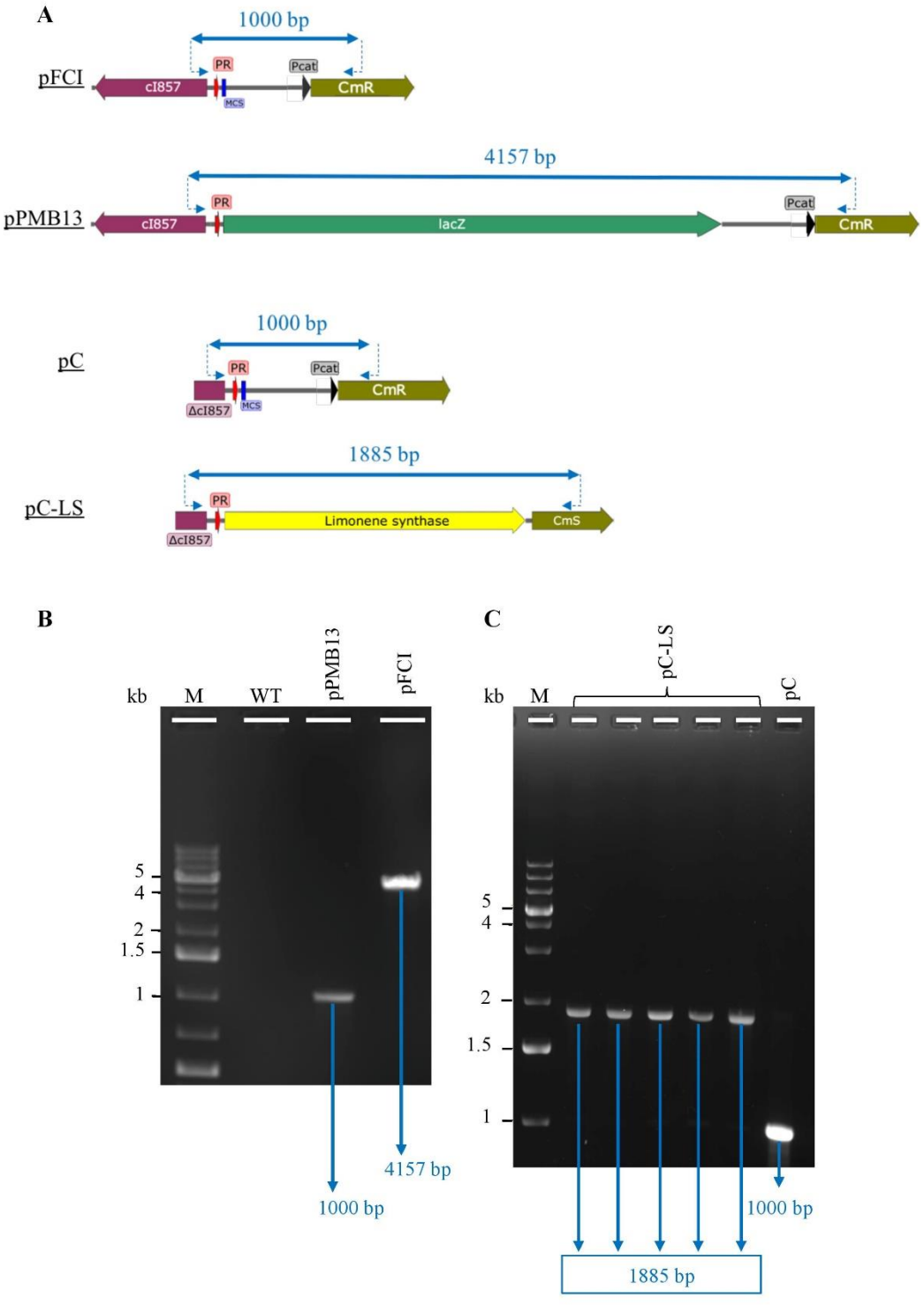
A

B



Supplementary Figure S3. Schematic representation and PCR analysis of the pFC1-plasmid family replicating in *Cyanothece* PCC 7425

(A) Schematic representation of the pFC1 plasmid and its derivatives. The genes are represented by colored arrows pointing into the direction of their transcription. The PCR primers are colored in blue and their corresponding PCR are indicated by double arrows. Typical UV-light image of the agarose gel showing the relevant PCR products from pFC1and pPMB13 (B); pC and pCLS (C). M (marker DNA) indicates the GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific).



Supplementary Material

Supplementary Figure S4 -Relevant part of the nucleotide sequence of the plasmid pSB2T-ccmk1$_{tsbp1}$-gfp. The DNA segment encompassing the *tac* promoter is written in red cases showing the so-called -35 (5'-TTGACA-3') and -10 (5'-TATAAT-3') promoter boxes, and the A transcription start site in upper cases. The Ccmk1$_{tsbp1}$ and **gfp** part of the ccmK1-fusion gene are colored in blue and green. GTTATC and GATAAC sequences are the scars corresponding to the cloning of the *Eco*RV DNA fragment harboring the Ccmk1$_{tsbp1}$-gfp fusion gene into the pSB2T plasmid opened at its unique *Hpa*I site. The cleavage site for *Hpa*I and *Eco*RV are respectively: ***Hpa*I, GTT/AAC** and ***Eco*RV, GAT/ATC**.

gatccgggcttatcgactgcacggtgcaccaatgcttctggcgtcaggcagccatcggaagctgtggtatggctgtgcaggtcgtaaatcactgcataattcgtgtcgct
caaggcgcactcccgttctggataatgtttttgcgccgacatcataacggttctggcaaatattctgaaatgagctg**TTGACA**attaatcatcggctcg**TATAAT**gtgt
gga**A**ttgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagaattcccgggatctccgcg**GTTATC**gttgtcccgatggaggcttcatgaggcaatctctctactgtttttt
tgagaAGAGGAaacatct**ATG**GCAATTGCCGTCGGTATGATTGAAACCCTTGGTTTCCCCGCAGTGGTGGAAGCCGCAGACGCAATGGTGAAAGCTGCTCGCGTTACCCT
GGTAGGCTACGAGAAAATTGGGAGCGGTCGGGTCACCGTGATTGTCCGTGGCGATGTTTCTGAAGTGCAGGCTTCGGTTGCGGCGGGGGTCGAAAATGTGAAACGGGTGA
ATGGGGGTCAGGTGCTCTCCACCCACATCATTGCTCGTCCCCACGAAAACCTTGAGTACGTATTGCCCATTCGCTACACCGAAGCGGTGGAACAATTCCGCGAAAGCGTT
AGTGGTATCCGTCCGATGGGTCGCCCATCTAAAGGTGAAGAATTATTCACTGGTGTTGTCCCAATTTTGGTTGAATTAGATGGTGATGTTAATGGTCACAAATTTTCTGT
CTCCGGTGAAGGTGAAGGTGATGCTACTTACGGTAAATTGACCTTAAAATTTATTTGTACTACTGGTAAATTGCCAGTTCCATGGCCAACCTTAGTCACTACTTTCGGTT
ATGGTGTTCAATGTTTTGCGAGATACCCAGATCATATGAAACAACATGACTTTTTCAAGTCTGCCATGCCAGAAGGTTATGTTCAAGAAAGAACTATTTTTTTCAAAGAT
GACGGTAACTACAAGACCAGAGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCTTAGTTAATAGAATCGAATTAAAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGGTAACATTTTAGGTCA
CAAATTGGAATACAACTATAACTCTCACAATGTTTACATCATGGCTGACAAACAAAAGAATGGTATCAAAGTTAACTTCAAAATTAGACACAACATTGAAGATGGTTCTG
TTCAATTAGCTGACCATTATCAACAAAATACTCCAATTGGTGATGGTCCAGTCTTGTTACCAGACAACCATTACTTATCCACTCAATCTGCCTTATCCAAAGATCCAAAC
GAAAAGAGAGACCACATGGTCTTGTTAGAATTTGTTACTGCTGCTGGTATTACCCATGGTATGGATGAATTGTACAAA**CCC**GGGGATGTAGGG**TAA**taatgctggccatg
ggctagtgagtttgatagtttcataattgtccacggcagggtttaagccctgcttttttgttgcccattggcaaactccaagacagccAAGCCGAATTCTGCA**GATAAC**

Amino-acids sequence of the Ccmk1$_{tsbp1}$-GFP fusion protein encoded by the pSB2T-ccmk1$_{tsbp1}$-gfp plasmid

MAIAVGMIETLGFPAVVEAADAMVKAARVTLVGYEKIGSGRVTVIVRGDVSEVQASVAAGVENVKRVNGGQVLSTHIIARPHENLEYVLPIRYTEAVEQFRESVSGIRPM
GRPSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTFGYGVQCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKT
RAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHM
VLLEFVTAAGITHGMDELYKPGDVG*

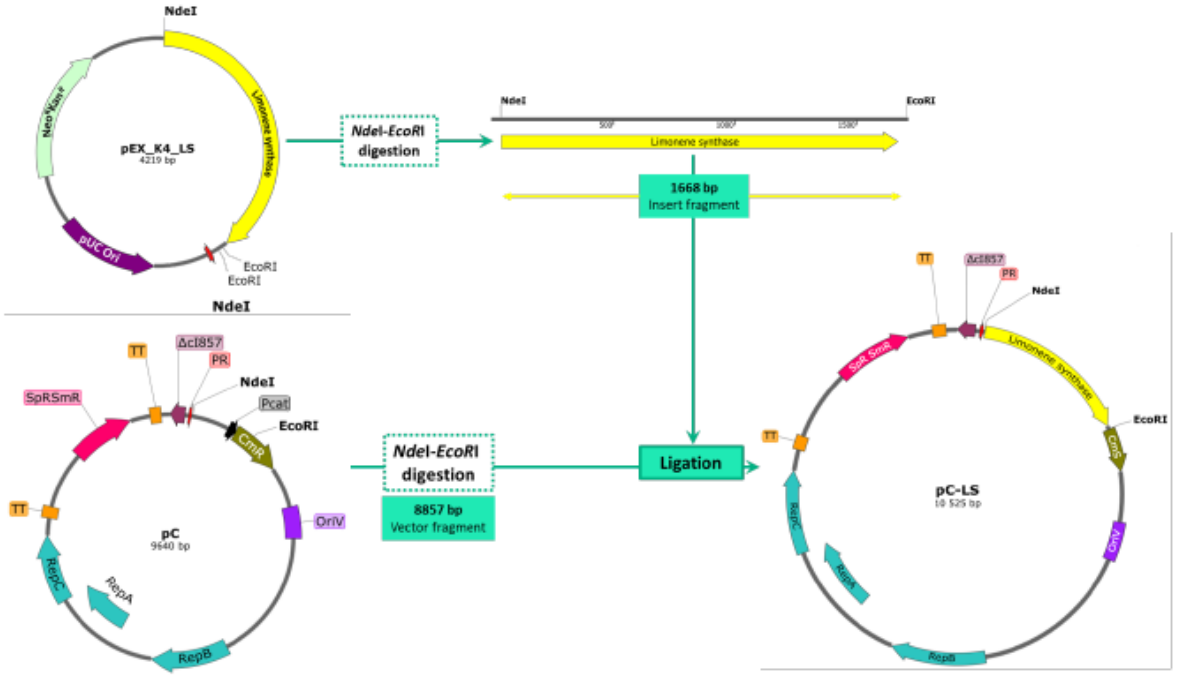
Supplementary Figure S5 -Relevant part of the nucleotide sequence of the plasmid pSB2T-maf$_{S6803}$-gfp. The DNA segment encompassing the *tac* promoter is written in red cases showing the so-called -35 (5'-TTGACA-3') and -10 (5'-TATAAT-3') promoter boxes, and the A transcription start site in upper cases. The maf$_{S6803}$ and **gfp** part of the maf-fusion gene are colored in blue and green. GTTATC and GATAAC sequences are the scars corresponding to the cloning of the *Eco*RV DNA fragment harboring the maf$_{S6803}$-gfp fusion gene into the pSB2T plasmid opened at its unique *Hpa*I site.The cleavage site for *Hpa*I and *Eco*RV are respectively: ***Hpa*I, GTT/AAC** and ***Eco*RV, GAT/ATC**.

gatccgggcttatcgactgcacggtgcaccaatgcttctggcgtcaggcagccatcggaagctgtggtatggctgtgcaggtcgtaaatcactgcataattc
gtgtcgctcaaggcgcactcccgttctggataatgttttttgcgccgacatcataacggttctggcaaatattctgaaatgagctg**TTGACA**attaatcatc
ggctcg**TATAAT**gtgtgga**A**ttgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagaattcccggggatctccgcg**GTTATC**gttgtcccgatggaggcttcat
gaggcaatctctctactgttttttgagaAGAGGAaacatctATGCCTCCAACTTTTGTTCTTGCTTCTGCTTCCCCCGCCCGCAAACGTTTGCTGGAAATG
GCCGGCATTAGCCCCCTAGTGGCCGTGAGCCATTTCGATGAATCTTCCTTAGCCGCCGACAACACAGTGGCCCTGGTGGAAGCTCTGGCCAAGGCTAAAGCA
GGAACGGTGGCCAGTAAATTCGCTGATGCCCTCGTCCTCGGCTGTGATTCCCTTTTATTGGTTAATGGTCAAACCTACGGTAAACCAGAGTCGCCCGCGGTG
GCGATCGCCCGTTGGCAAACCATGCGGGGTCAGGTGGGGGAACTGTACACGGGCCATGCCTTGATTGACCGCACCCAAAACCGTTGCCTGTGCCAAACGGGG
TTAACCAAAGTTCATTTTGCTGATGTGGATGACGACACCATCCAAGCCTACGTGGGTAGTGGGGAACCCCTCCAATGTGCTGGGGCGTTTGCCCTGGAAGGC
AAAGGGGGAATGTTAATTAATAAACTGGATGGTTGTTCCAGCAACGTGATTGGCCTGAGCTTGCCCATTCTGCGGTCATTGTTGCAACGGTTGGGTTACTCC
CTTAAAGATTTTTGGTCTAAAGGTGAAGAATTATTCACTGGTGTTGTCCCAATTTTGGTTGAATTAGATGGTGATGTTAATGGTCACAAATTTTCTGTCTCC
GGTGAAGGTGAAGGTGATGCTACTTACGGTAAATTGACCTTAAAATTTATTTGTACTACTGGTAAATTGCCAGTTCCATGGCCAACCTTAGTCACTACTTTC
GGTTATGGTGTTCAATGTTTTGCGAGATACCCAGATCATATGAAACAACATGACTTTTTCAAGTCTGCCATGCCAGAAGGTTATGTTCAAGAAAGAACTATT
TTTTTCAAAGATGACGGTAACTACAAGACCAGAGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCTTAGTTAATAGAATCGAATTAAAAGGTATTGATTTTAAAGAA
GATGGTAACATTTTAGGTCACAAATTGGAATACAACTATAACTCTCACAATGTTTACATCATGGCTGACAAACAAAAGAATGGTATCAAAGTTAACTTCAAA
ATTAGACACAACATTGAAGATGGTTCTGTTCAATTAGCTGACCATTATCAACAAAATACTCCAATTGGTGATGGTCCAGTCTTGTTACCAGACAACCATTAC
TTATCCACTCAATCTGCCTTATCCAAAGATCCAAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCTTGTTAGAATTTGTTACTGCTGCTGGTATTACCCATGGTATGGAT
GAATTGTACAAACCCGGGGATGTAGGG**TAA**taatgctggccatgggctagtgagtttgatagtttcataattgtccacggcagggtttaagccctgcttttt
tgttgcccattggcaaactccaagacagccAAGCCGAATTCTGCA**GATAAC**

Amino-acids sequence of the Maf$_{S6803}$-GFP fusion protein encoded by the pSB2T-maf$_{S6803}$-gfp plasmid

MPPTFVLASASPARKRLLEMAGISPLVAVSHFDESSLAADNTVALVEALAKAKAGTVASKFADALVLGCDSLLLVNGQTYGKPESPAVAIARWQTMRGQVGE
LYTGHALIDRTQNRCLCQTGLTKVHFADVDDDTIQAYVGSGEPLQCAGAFALEGKGGMLINKLDGCSSNVIGLSLPILRSLLQRLGYSLKDFWSKGEELFTG
VVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTFGYGVQCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEV
KFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEK
RDHMVLLEFVTAAGITHGMDELYKPGDVG*

Supplementary Figure S6 -- Construction of the pC-LS plasmid for constitutive expression of the *Mentha spicata* 4S-limonene synthase encoding gene adapted to the *Synechocystis* PCC 6803 codon usage. The *Nde*I and *EcoR*I restriction sites are used for the cloning the *limonene synthase* gene from the pEX_K4_LS (provided by Eurofins Genomics) into the pC vector, generating the pC-LS plasmid. The *limonene synthase* gene (shown in yellow) is expressed constitutively from the strong λ phage *pR* promoter (shown in red). The genes are represented by colored arrows pointing into the direction of their transcription. Note that the Cm^R gene of pC-LS is truncated and that the Sp^R/Sm^R gene (pink) is flanked by the double terminator (TT, orange) to prevent readthrough of gene expression.

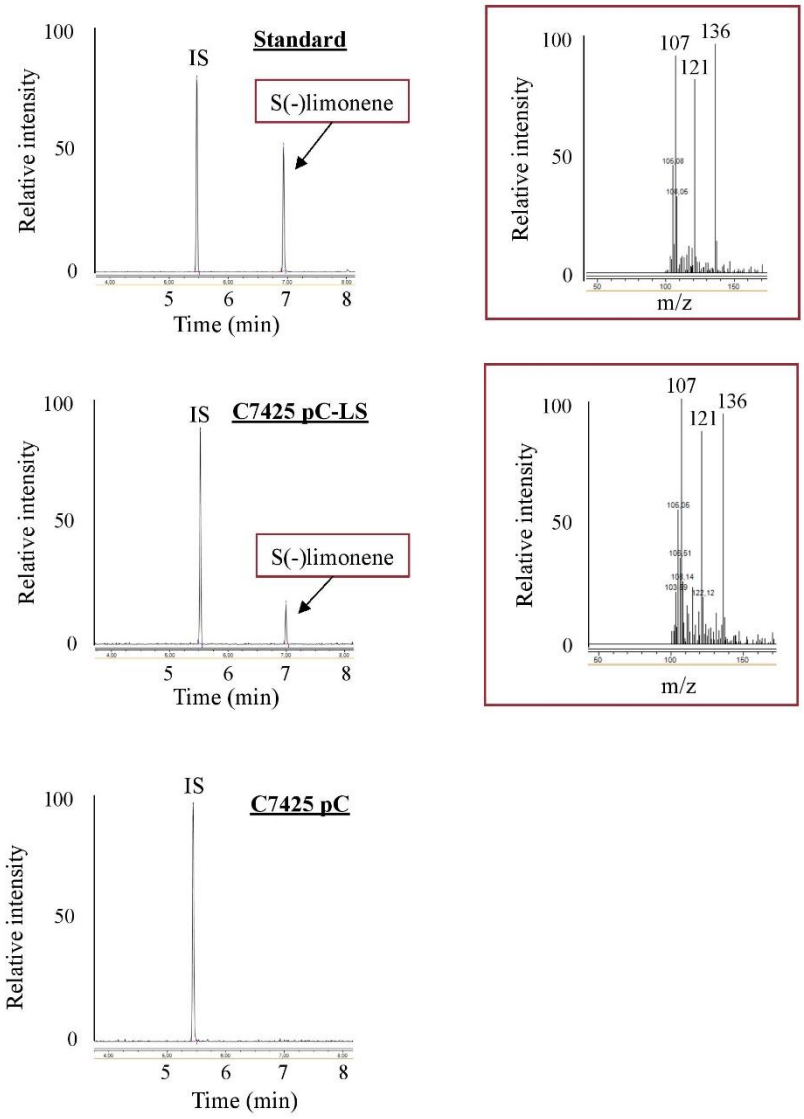


Supplementary Figure S7 -- Relevant part of the nucleotide sequence of the pC-LS plasmid expressing the limonene synthase gene from *Mentha spicata*. The lambda phage P_R promoter that comprises the -35 box (5'-**TTGACT**-**3'**), the -10 box (5'-**GATAAT**-**3'**) and the transcription start site (**A**) as well as the Shine d'Algarno sequence (ribosome bind site; **aaggagg**) sequence originating from the lambda phage *Cro* gene are shown in red (see (Mermet-Bouvier and Chauvat, 1994). The *Mentha spicata limonene synthase encoding gene* was adapted to *Synechocystis* PCC 6803 codon-usage and cloned in the *Nde*I (**catATG**) and *Eco*RI (**gaattc**) restriction thereby truncating the **chloramphenicol resistance gene** (Cm^S). This sequence can be amplified by the pFC1 Fw and pFC1 Rv primers.

5'-
GGCGACGTGCGTCCTCAAGCtgctcttgtgttaatggtttctttttgtgctcatacgttaaatctatcaccgcaagggataaatatctaacaccgtgcgtg**TTGACT**at
tttacctctggcggt**GATAAT**ggttgc**A**tgtact**aaggaggt**c**at****ATG**GAGCGAAGAAGTGGCAACTACAACCCCTCGAGATGGGATGTTAATTTTATCCAGTCATTACT
ATCTGACTATAAAGAAGACAAACATGTGATCAGAGCGAGCGAACTAGTTACTTTAGTAAAGATGGAGCTGGAGAAAGAAACGGATCAGATCCGACAGCTAGAACTGATAG
ATGATCTTCAACGCATGGGCCTATCCGACCATTTTCAGAACGAATTTAAAGAAATATTGAGCTCAATTTACCTAGATCACCATTATTATAAGAACCCGTTTCCGAAAGAA
GAACGCGACCTTTACTCCACTTCATTAGCTTTTCGTCTCCTAAGGGAACACGGATTCCAAGTTGCGCAAGAGGTATTCGACAGTTTTAAAAACGAGGAAGGTGAGTTTAA
AGAGTCTTTATCTGACGACACTCGGGGATTACTTCAATTATATGAGGCCAGCTTTCTGCTAACGGAGGGTGAAACGACATTGGAGTCTGCAAGGGAGTTCGCCACTAAGT
TCTTAGAGGAGAAAGTAAATGAAGGAGGCGTTGACGGAGATCTGTTAACTCGAATTGCCTATAGCCTCGATATCCCGCTCCATTGGAGAATCAAACGTCCAAATGCCCCC
GTTTGGATTGAATGGTACCGTAAAAGGCCTGACATGAACCCAGTTGTGTTGGAACTTGCCATCCTGGACCTTAACATTGTGCAGGCCCAATTTCAAGAAGAACTGAAGGA
ATCCTTTCGCTGGTGGCGGAATACCGGCTTTGTTGAAAAACTCCCTTTTGCACGGGATCGGTTAGTGGAGTGCTACTTTTGGAACACCGGGATCATTGAACCTCGACAGC
ATGCCTCGGCTCGCATCATGATGGGCAAGGTTAATGCGCTCATTACTGTAATTGATGATATTTATGACGTCTACGGCACATTAGAAGAACTCGAACAATTTACCGATCTC
ATTCGCCGTTGGGATATTAATTCAATTGATCAGTTGCCGGACTACATGCAACTTTGCTTTTTAGCCTTAAATAATTTTGTGGACGACACAAGCTATGATGTGATGAAAGA
AAAAGGGGTCAATGTGATTCCATACTTGCGGCAATCTTGGGTTGACTTGGCCGATAAGTACATGGTCGAAGCACGTTGGTTTTATGGGGGCCATAAACCCTCCTTAGAAG
AATATTTGGAGAATAGCTGGCAAAGTATTTCCGGTCCCTGTATGCTGACCCACATTTTCTTCCGGGTCACCGATAGTTTCACCAAGGAAACCGTCGATAGTTTGTATAAG
TATCACGATCTGGTCCGCTGGTCCTCCTTCGTGCTGCGGTTGGCCGATGATTTGGGGACCAGTGTGGAAGAAGTGAGTCGTGGGGATGTGCCCAAATCCTTGCAATGTTA
TATGTCCGATTATAATGCCTCCGAAGCGGAAGCTCGGAAACATGTGAAGTGGCTAATTGCTGAAGTGTGGAAGAAAATGAATGCTGAACGGGTGAGTAAAGATAGTCCCT
TTGGCAAAGATTTTATTGGGTGTGCCGTGGATTTGGGTCGTATGGCGCAATTGATGTATCATAATGGTGATGGTCATGGTACCCAACACCCCATTATTCACCAACAAATG
ACCCGCACCTTGTTTGAGCCCTTTGCTTAA**ggatccatggtcgcgatcggtcgacgctagc**gaattc**CGTATGGCAATGAAAGACGGTGAGCTGGTGATATGGGATAGTG
TTCACCCTTGTTACAC**-3'**

Amino acid sequence of the 4S-limonene synthase from *Mentha Spicata*

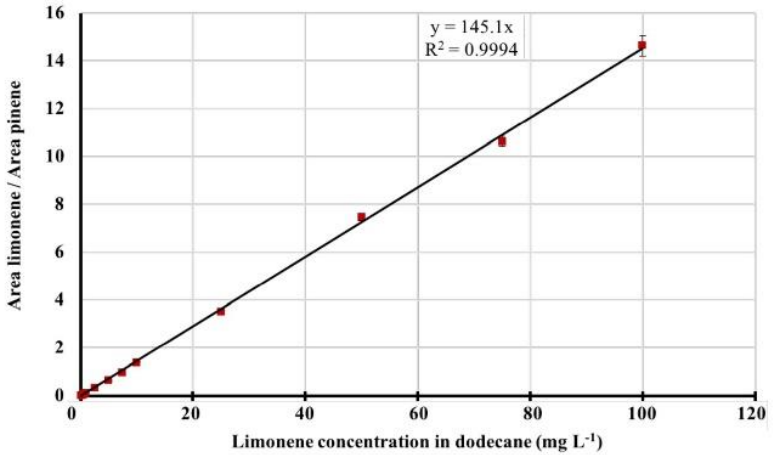
MERRSGNYNPSRWDVNFIQSLLSDYKEDKHVIRASELVTLVKMELEKETDQIRQLELIDDLQRMGLSDHFQNEFKEILSSIYLDHHYYKNPFPKEERDLYSTSLAFRLLREH
GFQVAQEVFDSFKNEEGEFKESLSDDTRGLLQLYEASFLLTEGETTLESAREFATKFLEEKVNEGGVDGDLLTRIAYSLDIPLHWRIKRPNAPVWIEWYRKRPDMNPVVLE
LAILDLNIVQAQFQEELKESFRWWRNTGFVEKLPFARDRLVECYFWNTGIIEPRQHASARIMMGKVNALITVIDDIYDVYGTLEELEQFTDLIRRWDINSIDQLPDYMQLCF
LALNNFVDDTSYDVMKEKGVNVIPYLRQSWVDLADKYMVEARWFYGGHKPSLEEYLENSWQSISGPCMLTHIFFRVTDSFTKETVDSLYKYHDLVRWSSFVLRLADDL
GTSVEEVSRGDVPKSLQCYMSDYNASEAEARKHVKWLIAEVWKKMNAERVSKDSPFGKDFIGCAVDLGRMAQLMYHNGDGHGTQHPIIHQQMTRTLFEPFA*



Supplementary Figure S8. GC–MS analyses of the dodecane overlays of the cultures of *Cyanothece* PCC 7425 strains harboring the pC or pC-LS plasmids. Ion chromatograms (left panels) and corresponding mass spectra (right panels) obtained from GC-MS analyses of an authentic S-(-)-limonene standard or dodecane samples from cultures of Cyanothece PCC 7425 harboring either the empty pC (used as a negative control) or the pC-LS plasmid for limonene production. α-pinene (RT = 5.44 min) at 0.01 g/L was used as the internal standard (IS) for quantification.

Supplementary Figure S9 -Standard curve used to calculate the concentration of limonene in the dodecane overlay of cultures of the engineered *Cyanothece* PCC 7425 strain. Limonene (increasing concentrations) and pinene (fixed concentration) were spiked in dodecane, prior to GC/MS analysis.

Concentration of S-limonene (mg.L^{-1}) in dodecane	**0.1**	**0.3**	**0.5**	**0.8**	**1.0**	**2.5**	**5.0**	**7.5**	**10.0**	**25.0**	**50.0**	**75.0**	**100.0**
Area S-limonene	519	1322	2142	3612	4826	9281	12943	30328	43585	90489	216217	266942	419115
	567	1176	2486	3479	4472	11960	22828	28412	49068	124945	173189	354735	297089
	592	1144	2232	3736	4090	12514	22758	34639	39393	88345	213968	259314	335784
Area alpha-pinene at 10 mg.L^{-1} (IS)	36668	36685	36469	36084	36191	27154	19379	32766	30867	25723	28454	24956	28869
	34471	35773	38129	36954	36972	35469	34204	28788	35473	35011	23670	32848	20797
	36976	36994	35830	36092	29555	37414	34237	34121	28192	25598	28543	24919	22240
Area S-limonene / Area alpha-pinene	0.014	0.036	0.059	0.100	0.133	0.342	0.668	0.926	1.412	3.518	7.599	10.697	14.518
	0.016	0.033	0.065	0.094	0.121	0.337	0.667	0.987	1.383	3.569	7.317	10.799	14.285
	0.016	0.031	0.062	0.104	0.138	0.334	0.665	1.015	1.397	3.451	7.496	10.406	15.098
Average	**0.016**	**0.033**	**0.062**	**0.099**	**0.131**	**0.338**	**0.667**	**0.976**	**1.398**	**3.513**	**7.471**	**10.634**	**14.634**
Standard deviation	**0.001**	**0.003**	**0.003**	**0.005**	**0.009**	**0.004**	**0.002**	**0.046**	**0.014**	**0.059**	**0.143**	**0.204**	**0.419**



3. Production de sesquiterpènes (bisabolène et farnésène) par *Cyanothece* PCC 7425

a. Introduction des plasmides codant pour les sesquiterpènes synthases et phénotypes des souches productrices

Nous avons démontré précédemment que *Cyanothece* PCC 7425 était capable de produire du limonène si l'on introduisait par conjugaison le plasmide codant pour la limonène synthase (Chenebault *et al.*, 2020).

De même, il est possible d'introduire par conjugaison les plasmides codant pour la farnésène (pC-FS), la bisabolène (pC-BS) ou la pinène (pC-PS) synthase (vérification par PCR (Figure 95) et séquençage ADN).

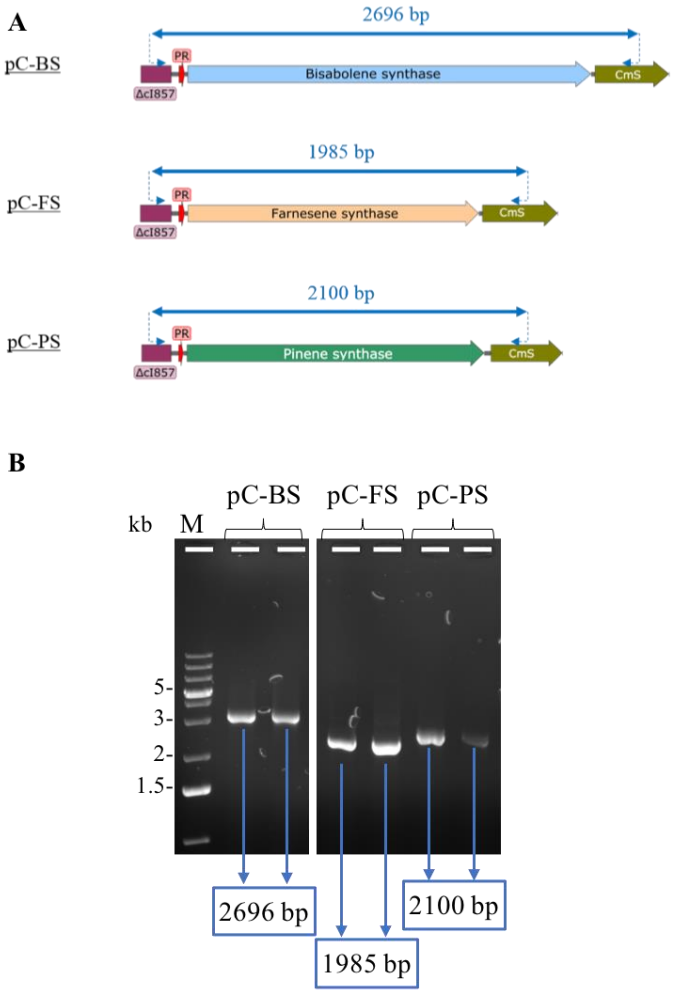


Figure 95 Représentation schématique (A) et photographie d'un gel d'agarose (B) montrant les produits d'amplification par PCR (amorces pFCI_Fw et pFCI_Rv (triangles bleus)) des vecteurs pC-BS, pC-FS et pC-PS introduits chez *Cyanothece* PCC 7425. Le marqueur de poids moléculaire (M) est le GeneRuler™ 1Kb plus de Thermoscientifc. Les différentes amplifications proviennent du même gel qui a été coupé afin d'enlever des puits non utiles dans l'étude.

Les plasmides se répliquent de façon stable et autonome dans la souche et leur présence ne modifie pas de manière significative la croissance de la souche en photoautotrophie dans les conditions standard du laboratoire (Milieu MM_{CaC}, 1500 lux, 30°C, 140 rpm, Figure 96).

Afin de collecter et quantifier les terpènes par GC-MS, du dodécane (une molécule hydrophobe) doit être ajouté au milieu de culture (voir matériels et méthodes). Nous avons montré précédemment (Chenebault, Encarnación, *et al.*, 2020) que cela impactait légèrement la croissance de la souche sauvage (WT) et du mutant pC-LS. Il en va de même pour les mutants pC-BS, pC-FS et pC-PS (temps de génération d'environ 20-24h dans les conditions pour la souches WT et tous les mutants).

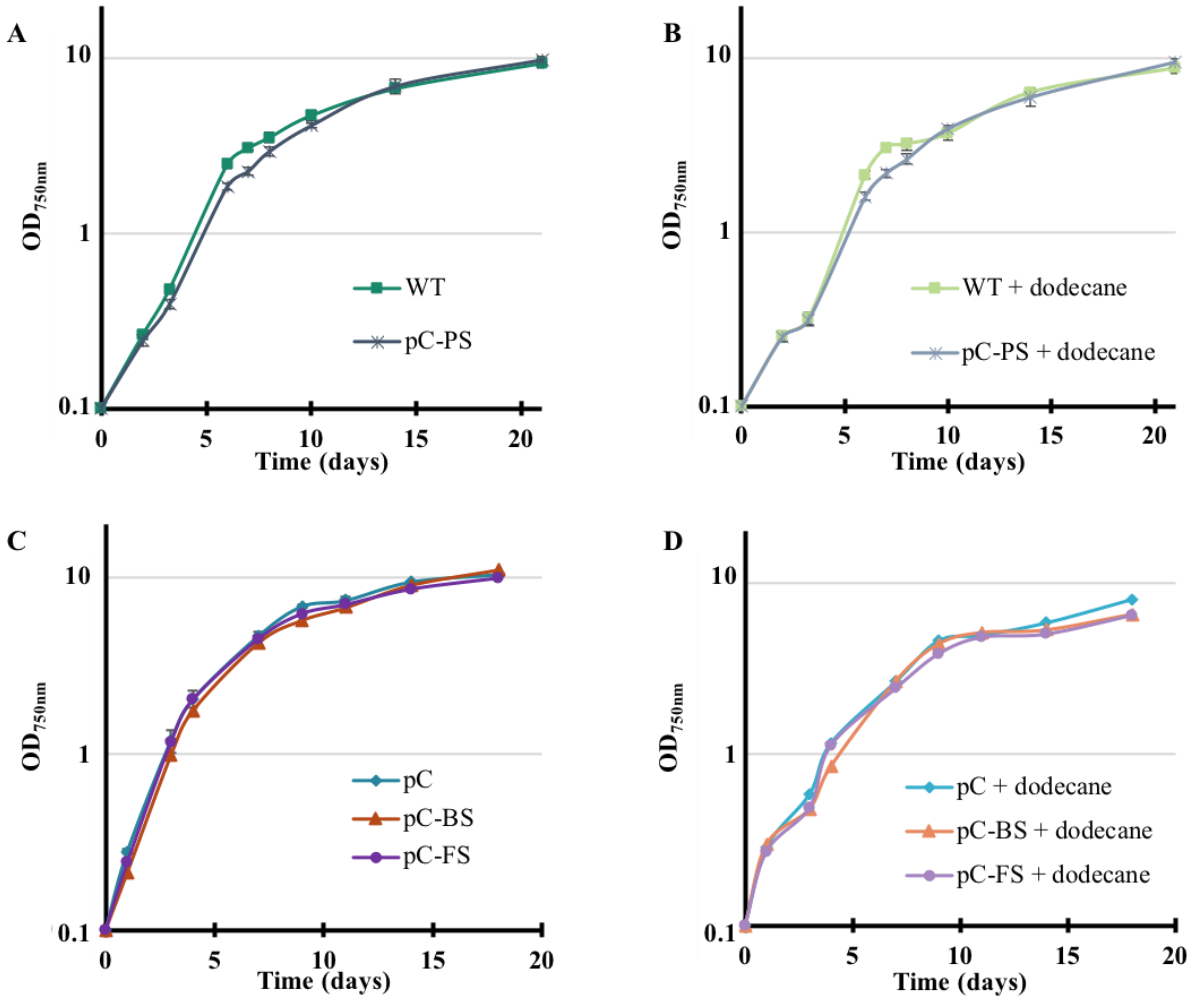


Figure 96 Courbe de croissance de la souche *Cyantohece* PCC 7425 exprimant les gènes codant pour différentes terpènes synthases (pCPS (A et B) ; pC-FS et pC-BS (C et D). Ces expériences ont été réalisées en triplicats dans des erlenmeyers contenant du milieu MM_{CaC} à 30°C sous un éclairement de 1500 lux, avec agitation (140 rpm dans un incubateur Infors) en présence ou non de 20% v/v de dodécane.

b. *Cyanothece* PCC 7425 est capable de produire différents sesquiterpènes lorsque qu'un gène codant pour une sesquiterpène synthase spécifique est exprimé à partir du plasmide pC

Le mutant pC-FS et le mutant pC-BS produisent respectivement de l'α-farnésène et de l'E-α -bisabolène (Annexe 10) alors que la production d'α-pinène par le mutant pC-PS n'est pas détectable.

Les rendements obtenus pour la production de sesquiterpènes (1,3 mg de farnésène/L après 21 jours de culture et 1,5 mg de bisabolène/L après 21 jours de culture, Figure 97) sont supérieurs à ceux obtenus précédemment pour le limonène (Chenebault *et al.*, 2020). Il semblerait donc que *Cyanothece* PCC 7425 synthétise de façon plus efficace les sesquiterpènes que les monoterpènes. Cela peut être dû à la faible activité catalytique des monoterpènes synthases ou à une quantité plus importante de FPP (précurseur des sesquiterpènes) que de GPP (précurseur des monoterpènes).
Contrairement à ce qui a été observé chez *Synechocystis* PCC 6803 et *Synechococcus* PCC 7942, la production de farnésène par *Cyanothece* PCC 7425 n'est pas supérieure à la production de bisabolène.

Deux clones indépendants portant le pC-BS (pC-BS 1 et pC-BS 2) ont une croissance semblable et produisent des quantités similaires de bisabolène (environ 1,5 mg de bisabolène/L après 21 jours de culture ; Figure 97). Cependant, la production par deux clones indépendants obtenu après conjugaison avec le plasmide pC-FS varie de 0,6 mg/L à 1,3 mg/L après 21 jours de culture (Figure 98, panel B). Cela peut être en partie expliqué par le ralentissement important de la croissance du clone 2 (pC-FS 2 ; Figure 98 panel A) après 10 jours de culture. La DO finale atteinte pour le clone 2 est inférieure à celle atteinte par le clone 1. Il est donc nécéssaire de tester la production de terpènes par de nouveaux clones pC-FS pour tirer des conclusions.

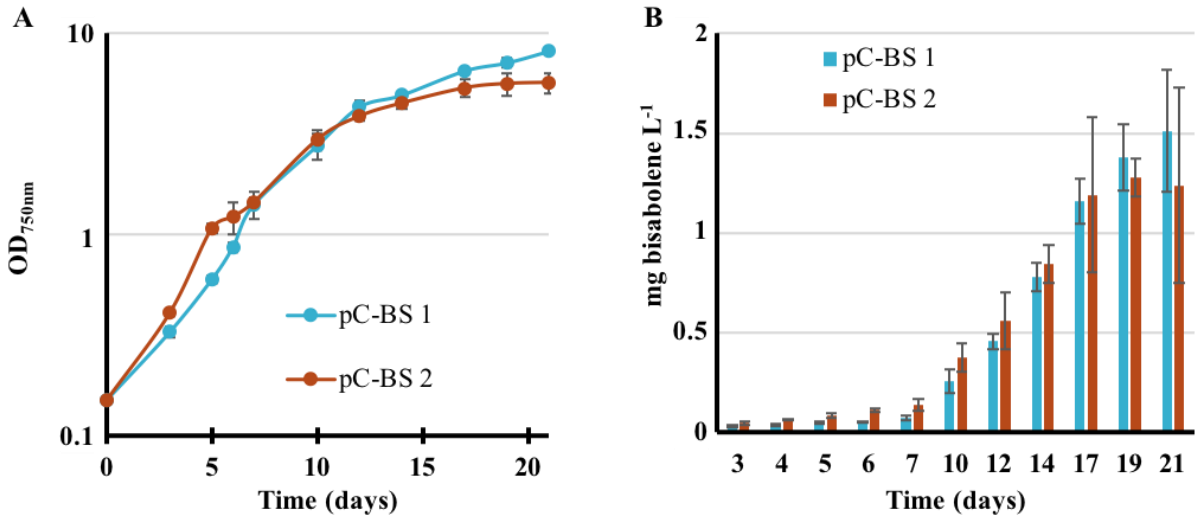


Figure 97 Croissance (A) et production de bisabolène (B) par deux clones indépendants de *Cyanothece* PCC 7425 pC-BS. Toutes les manipulations ont été réalisées en triplicats en conditions standard (MM_{CaC}, A500 lux, 30°C, 140 rpm, DOi = 0,15).

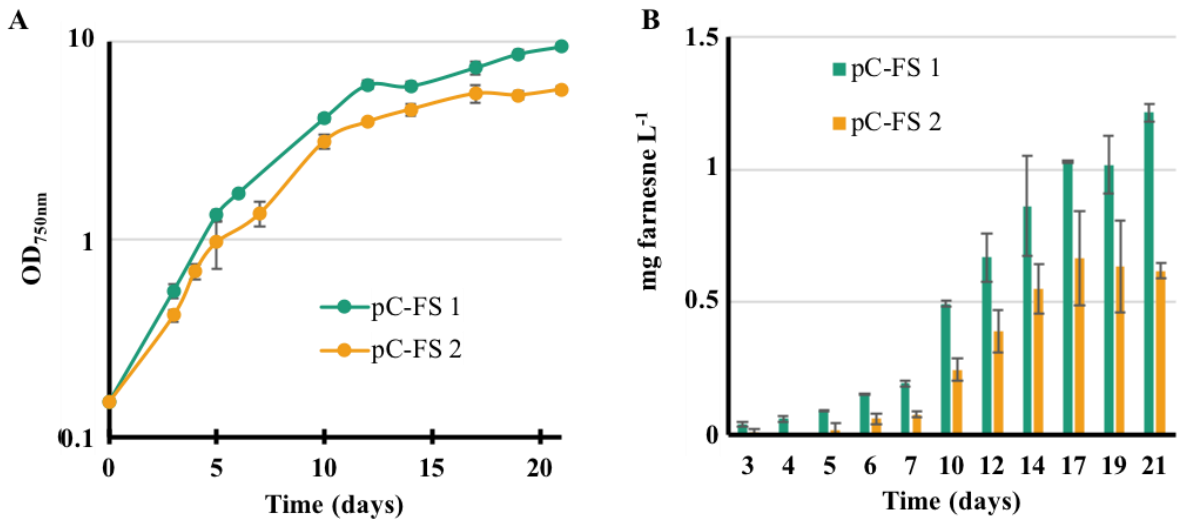


Figure 98 Croissance (A) et production de farnésène (B) par deux clones indépendants de *Cyanothece* PCC 7425 pC-FS. Toutes les manipulations ont été réalisées en triplicats en conditions standard (MM_{CaC}, A500 lux, 30°C, 140 rpm, DOi = 0,15).

4. Conclusions et perspectives

Nous avons montré que le système d'expression développé au laboratoire pour d'autres cyanobactéries (Mermet bouvier and Chauvat, 1994) est utilisable chez *Cyanothece* PCC 7425. Ce système d'expression, basé sur les signaux de transcription et traduction du phase Lambda (p_R et RBS) et porté par un dérivé du RSF1010, est stable et se réplique de façon autonome chez la cyanobactérie.

En utilisant cet outil génétique, nous avons démontré la possibilité de produire des molécules d'intérêt chez *Cyanothece* PCC 7425. Cette étude est la première à démontrer la production d'un monoterpène (limonène) et de deux sesquiterpènes (bisabolène et farnésène) par cette souche. Les rendements obtenus varient de 0,5 mg/L pour le limonène à 1,5 mg/L pour le bisabolène. Il semblerait donc que *Cyanothece* PCC 7425 produise de façon un peu plus efficace (facteur 2 à 3) les sesquiterpènes que les monoterpènes. Cependant, la production de sesquiterpènes par cette souche est bien inférieure à celle que nous avons observé pour *Synechocystis* PCC 6803 et *Synechococcus* PCC 7942. De même, la production de limonène décrite ici est inférieure à celle obtenue pour *Synechococcus* PCC 7002.

La production de limonène était stable pendant plusieurs mois : aucune différence significative dans les rendements de production n'a été observée entre la première expérience et la dernière expérience réalisée 9 mois après. Pendant ce délai, la souche était régulièrement repiquée.

Nous avons également démontré l'influence de diverses conditions de culture (lumière, température, source d'azote) sur les rendements de production : la souche produit plus de limonène à 34°C qu'à 30°C. Il serait donc intéressant de regarder la production de farnésène et de bisabolène à cette température.

Enfin, comme la souche possède la panoplie complète des gènes codant pour les protéines impliquées dans le transport et le métabolisme de l'urée, j'ai mis au point un protocole permettant de cultiver *Cyanothece* PCC 7425 en conditions aérobiques en présence d'urée comme seul substrat azoté. J'ai ensuite démontré que *Cyanothece* PCC 7425 peut produire du limonène si elle est cultivée dans un milieu contenant de l'urée comme seule source d'azote. En revanche, les rendements obtenus sont inférieurs (facteur 2) à ceux obtenus lorsque la souche est cultivée dans un milieu contenant du nitrate comme seule source d'azote. Il sera néanmoins important de regarder la production de farnésène et de bisabolène en cultivant *Cyanothece* PCC 7425 en présence d'urée.

V. Quantification de la production de limonène par *Cyanothece* PCC 7822

1. Intérêts de l'étude

Cyanothece PCC 7822 est une souche diazotrophique, c'est-à-dire qu'elle est capable de fixer l'azote atmosphérique (N_2) en conditions aérobiques grâce à une nitrogénase (voir chapitre 2 IV.3.). Comme détaillé en introduction, la fixation de l'azote atmosphérique est intéressante en biotechnologies pour deux aspects. Tout d'abord, parce que cela permet de satisfaire les besoins en azote de la souche sans avoir à ajouter du nitrate dans son milieu de culture et parce que, la fixation de l'azote est souvent couplée à la production de dihydrogène, gaz dont la combustion libère de grandes quantités d'énergie.
Par ailleurs, cette souche possède les gènes codant pour les enzymes impliquées dans le transport et le métabolisme de l'urée (source d'azote moins couteuse et moins polluante).
Enfin cette souche synthétise naturellement de nombreuses molécules d'intérêt notamment le pigment rouge appelé phycoérythrine.

A ce jour, aucune publication ne décrit la mise au point d'un système de surexpression de gènes dans cette souche et aucune étude n'a démontré son utilisation en biotechnologies pour la production de molécule d'intérêt.

2. Prise en main de la souche

a. Détermination des conditions de culture adéquates

Nous avons (avec Baptiste Odic, stagiaire 2 mois au laboratoire) étudié l'influence de l'intensité lumineuse sur la croissance de *Cyanothece* PCC 7822. D'après les expériences préliminaires réalisées au laboratoire et d'après la littérature, l'intensité lumineuse optimale pour la croissance de *Cyanothece* PCC 7822 se situerait autour de 1500 lux. Par conséquent, nous avons étudié sa croissance à trois intensités lumineuses : 700, 1500 et 2300 lux dans le milieu $BG11_{2mM\ NO3}$ conseillé par l'Institut Pasteur (Pasteur Collection of Cyanobacteria) qui nous a fourni la souche (voir matériel et méthodes pour composition du milieu).

Comme le montre la Figure 99, sous une intensité lumineuse de 700 lux *Cyanothece* PCC 7822 a une phase de latence plus longue et un temps de génération plus important (approximativement G = 45h entre temps 0 et 7 jours) qu'à 1500 et 2500 lux (G = 36 et 32h respectivement entre les temps 0 et 4 jours). Cette manipulation pourrait être refaite afin de regarder l'évolution de la DO à des temps plus rapprochés.
Cependant, il a été décidé de poursuivre toutes les expériences avec une intensité à 1500 lux.

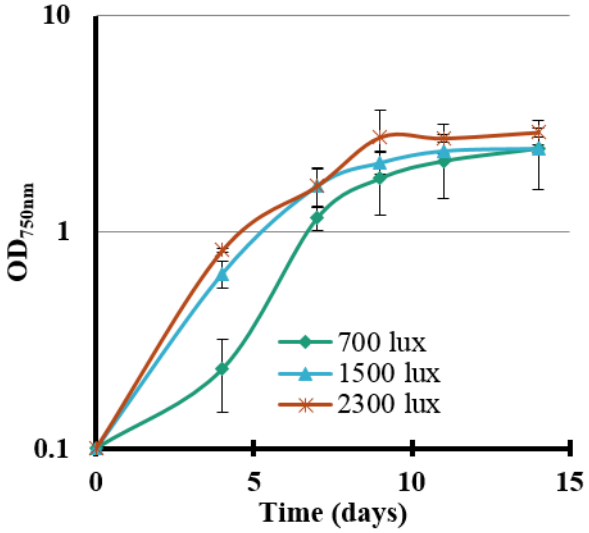


Figure 99 Courbe de croissance de la souche *Cyanothece* PCC 7822 sauvage à différentes intensités lumineuses). Ces expériences ont été réalisées en triplicat dans des erlenmeyers contenant du milieu $BG11_{2mM\ NO3}$ à 30°C, avec agitation (140 rpm dans un incubatur Infors).

Le temps de génération reste cependant important (G > 30h) et les quantités de biomasse atteintes après 15 jours de culture sont faibles (OD_{750nm} = 2,5-3). Il sera donc important de tester d'autres conditions de culture (qualité de la lumière, température ; milieux contenant diverses concentrations, et sources d'azote et de carbone ; addition de vitamine *etc*..).

b. Détermination de la concentration en antibiotique permettant de sélectionner les souches mutantes

Des étalements de *Cyanothece* PCC 7822 sauvage (WT) sur des boites contenant des doses croissantes d'antibiotiques ont permis de déterminer la concentration sélective en spectinomycine/streptomycine (Sp/Sm). La concentration définie comme sélective correspond à celle sur laquelle aucune colonie n'a poussé après plus de deux semaines d'incubation dans les conditions standard définies pour la souche.

Pour *Cyanothece* PCC 7822, j'ai déterminé que cette concentration était Sp/Sm = 25/4 µg/mL. Ainsi, il sera possible de sélectionner les souches conjuguées avec le plasmide pC et ses dérivés qui portent la cassette de résistance à la Sm/Sp.

3. La production de limonène

a. Introduction des plasmides et analyse des phénotypes des mutants

Les plasmides pC et pC-LS ont été introduits chez *Cyanothece* PCC 7822 par conjugaison en utilisant les protocoles mis en place au laboratoire (voir introduction chapitre 2.V et Matériels et Méthodes). Sur les vingt clones Sm^r/Sp^r obtenus pour les deux conjugaisons, deux clones indépendants ont été testés par PCR (Figure 100). Ensuite, la séquence du gène codant pour la limonène synthase, ainsi que la séquence du promoteur et celle du RBS ont été vérifiées par séquençage ADN.

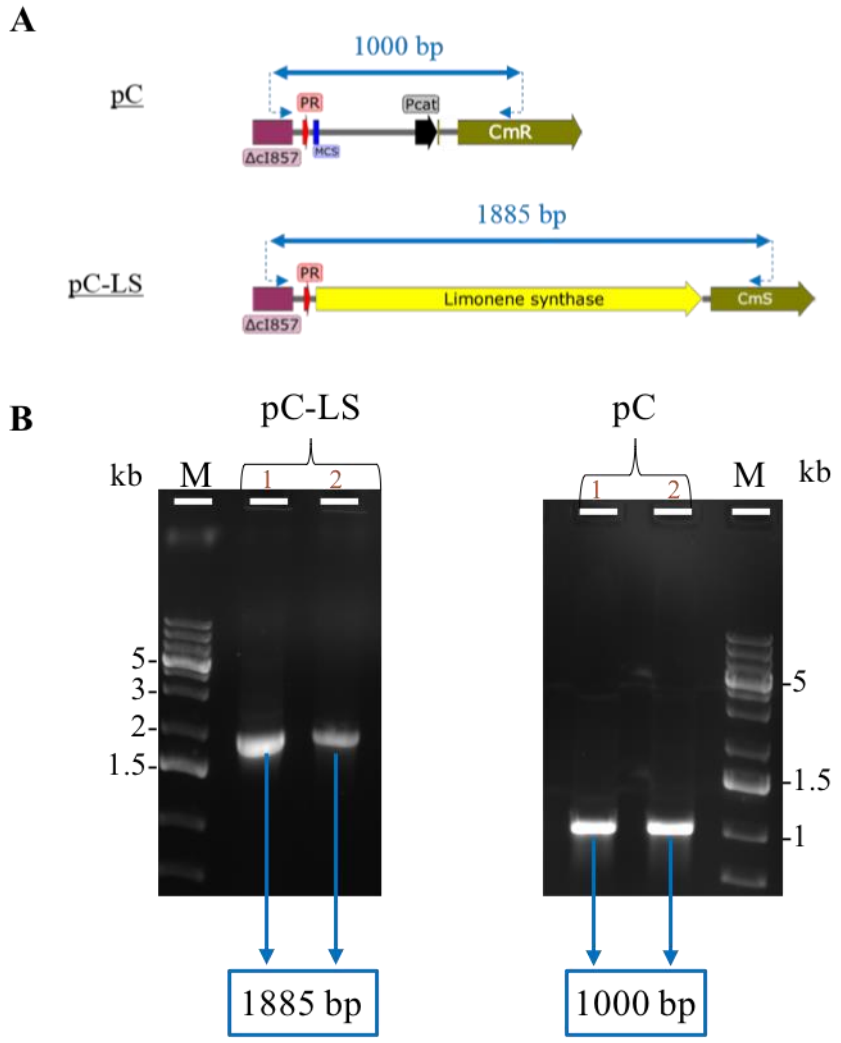


Figure 100 Représentation schématique (A) et photographie d'un gel d'agarose (B) montrant les produits d'amplification par PCR avec les amorces pFCI_Fw et pFCI_Rv (triangles bleus) des vecteurs pC et pC-LS chez *Cyanothece* PCC 7822. Deux clones indépendants identifiés comme « 1 » et « 2 » ont été testés pour chacun des vecteurs. Le marqueur de poids moléculaire (M) est le GeneRuler™ 1Kb plus de Thermoscientifc.

Pour la suite, la souche de *Cyanothece* PCC 7822 productrice de S-(-)-limonène correspond au mutant portant le plasmide pC-LS.

Les plasmides pC et pC-LS se répliquent de façon stable et autonome dans *Cyanothece* PCC 7822 (pC clone 1 et pC-LS clone 1) et leur présence ne modifie pas de manière significative la croissance de la souche en photoautotrophie dans les conditions standard du laboratoire ($BG11_{2mM\ NO3}$, 1500 lux, 30°C, 140 rpm, G= 32-35h ; Figure 101).

En revanche, l'ajout de dodécane impacte fortement la croissance de la souche sauvage et des deux mutants (Figure 101 ; G = 72h pour WT et pC-LS). Dans cette expérience, le mutant pC n'a pas poussé en présence de dodécane, il faudra donc la refaire.
Cette souche doit peut-être être adaptée à la présence de dodécane comme c'est le cas pour *Synechococcus* PCC 7942 et le protocole de production de terpènes modifié en conséquence. Il est possible que le dodécane limite les échanges gazeux et donc que la souche ne puisse plus fixer le diazote présent dans l'air. Afin de tester cette hypothèse, nous avons regardé la production de limonène dans 3 milieux contenant des concentrations croissantes en nitrate.

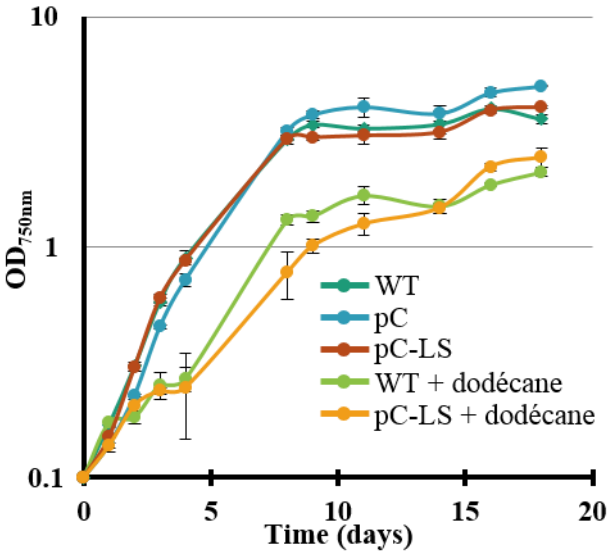


Figure 101 Courbe de croissance de la souche *Cyanothece* PCC 7822 WT et des mutants pC et pC-LS. Ces expériences ont été réalisées en triplicats dans des erlenmeyers contenant du milieu $BG11_{2mM\ NO3}$ à 30°C sous un éclairement de 1500 lux, avec agitation (140 rpm dans un incubatur Infors) en présence (+ dodécane) ou non de 20% v/v_{tot} de dodécane.

b. Évaluation de la production de limonène dans différents milieux de culture

Cyanothece PCC 7822 modifiée (pC-LS) produit du limonène (Annexe 11). Cependant, la production de limonène n'est détectable qu'après 10 jours de culture et reste très faible (0,3 mg/L après 21 jours). La présence de dodécane affecte grandement la croissance de la souche ce qui peut expliquer les faibles rendements. Il est également possible que cette souche ne soit pas un bon châssis pour la production de limonène.

La production de limonène a été testée dans 3 milieux différents contenant des concentrations croissantes en nitrate (2 mM, 10 mM et 17 mM). La croissance de la souche (Figure 102 ; panel A, G = 90h) et la production de limonène (Figure 102, panel B) sont un peu meilleures dans un milieu contenant moins de nitrate (2 mM NO_3). Ces résultats indiquent que la souche qui est

diazotrophique préfère un milieu appauvri en nitrate. Cela a déjà été observé au laboratoire pour *Gloeothece* PCC 6909, une autre souche de cyanobactérie diazotrophique. Une étude réalisée sur *Anabaena variabilis* a démontré que la souche avait respectivement un temps de génération de 12h et 13h lorsqu'elle était cultivée en mixotrophie (5 mM de fructose et intensité lumineuse à 50 µE/m^2/s^1) avec aucune source de substrat azoté dans le milieu de culture (donc fixation du N_2) ou avec 10 mM de nitrate (NO_3). En mixotrophie (10 mM de fructose et intensité lumineuse à 50 µE/m^2/s^1), le temps de génération était similaire dans les deux conditions (N_2 ou NO_3). Malheureusement cette étude n'a pas déterminé le temps de génération en présence de la souche en photoautotrophie (Jensen, 1983).

Dans la nature, l'alternance jour/nuit permet à la souche de fixer le carbone et se constituer des réserves de carbone et d'énergie le jour puis de les utiliser la nuit pour la fixation d'azote (voir introduction Chapitre 2. VI.). Il est important d'essayer de recréer ces conditions au laboratoire afin d'étudier si cela améliore sa croissance.

De plus, ces résultats indiquent que la toxicité du dodécane n'est pas due à une carence en azote provoquée par la diminution des échanges gazeux. Il faudra donc essayer d'adapter la souche à la présence de dodécane comme cela a été fait pour *Synechococcus* PCC 7942.

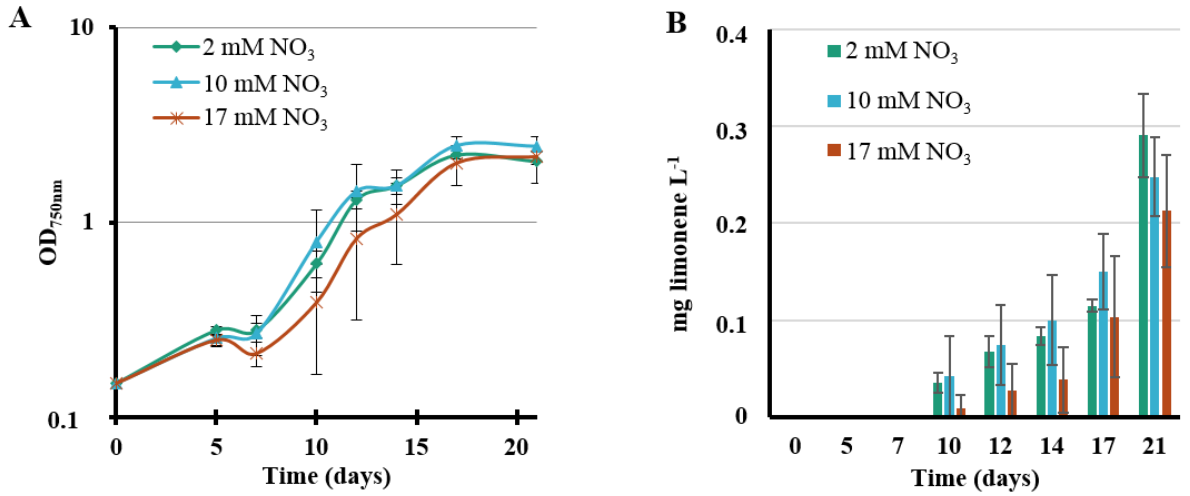


Figure 102 Effet de la quantité d'azote dans le milieu de culture sur la croissance (A) et la production de limonène (B) par *Cyanothece* PCC 7822 pC-LS. Les manipulations ont été réalisées en triplicats à 1500 lux, à 30°C, 140 rpm, ODi = 0.15 dans le milieu BG11 contenant 2 mM, 10 mM ou 17 mM de nitrate.

4.Conclusions et perspectives

En conclusion, *Cyanothece* PCC 7822 est une souche aux capacités attractives mais qui est pour l'instant difficile à cultiver dans les conditions du laboratoire. Nous n'avons certainement pas encore identifié les conditions propices à sa croissance. Le temps de génération très long (G > 30h) dans les conditions testées ne facilite pas sa manipulation.

J’ai démontré pour la première fois la possibilité d’introduire des plasmides réplicatifs dans cette souche et d’exprimer des gènes codant pour des protéines hétérologues.

Enfin, la croissance de la souche est fortement ralentie en présence de dodécane ce qui impacte fortement la production de limonène. Il sera donc possible d’essayer d’adapter la souche au dodécane ou de mettre en place de nouveau protocole d’échantillonnage des terpènes (en utilisant des résines par exemple (Halfmann *et al.*, 2014a, 2014b; Kiyota *et al.*, 2014; Tashiro *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016)).
La souche possédant le plasmide pC-LS produit du limonène mais avec un rendement très faible (0,3 mg/L après 21 jours de culture). Il faudra tester d’autres conditions de culture pour améliorer la production de terpène.

Chapitre 3. Production de santalène par diverses souches de cyanobactéries ingéniérées

1. Intérêts de l'étude

L'essence de bois de santal, produite par les plantes ligneuses de l'espèce *Santalum*, est très recherchée pour sa fragrance boisée. Elle est considérée comme une des huiles les plus précieuses et les plus chères (2 000 à 2500 $/kg (Birkbeck, 2017)).
A ce jour, le seul procédé de production viable est l'extraction de l'huile à partir du bois de *Santalum album*. Cette espèce est aujourd'hui en danger car de nombreux arbres sont abattus illégalement. Par conséquent, de nouvelles alternatives doivent être trouvées afin de produire, de manière plus durable (sans déforestation) et rentable, cette fragrance.

Plusieurs articles décrivent la production de santalène dans des plantes (*Physcomitrella patens;*(Zhan *et al.*, 2014)) et des micro-organismes hétérotrophes (*E. coli* et *S. cerevisae* (Jones *et al.*, 2011; Scalcinati *et al.*, 2012a, 2012b; Diaz-Chavez *et al.*, 2013; Tippmann *et al.*, 2016)).

Pour se faire les auteurs utilisent deux stratégies. La première consiste à exprimer le gène codant pour la santalène synthase de *S. album* qui catalyse la synthèse de nombreux composés (Figure 103). Ils observent alors la production d'α-santalène, de β-santalène, d'*epi*-β-santalène et d'α-*exo*-bergamotène (Jones *et al.*, 2011; Zhan *et al.*, 2014). Le mélange obtenu se rapproche de la composition de l'huile de bois de santal (Tableau 16) mais ne contient que des santalènes et pas de santalols. En effet, les mousses (*Physcomitrella patens*) et micro-organismes testés ne possèdent pas le cytochrome CYP76F permettant la conversion des santalènes en santols (Figure 103, étape symbolisée par [O]). L'expression du gène codant pour ce cytochrome chez *S. cerevisiae* a d'ailleurs permis la conversion des santalènes produits en santalols (Jones *et al.*, 2011).

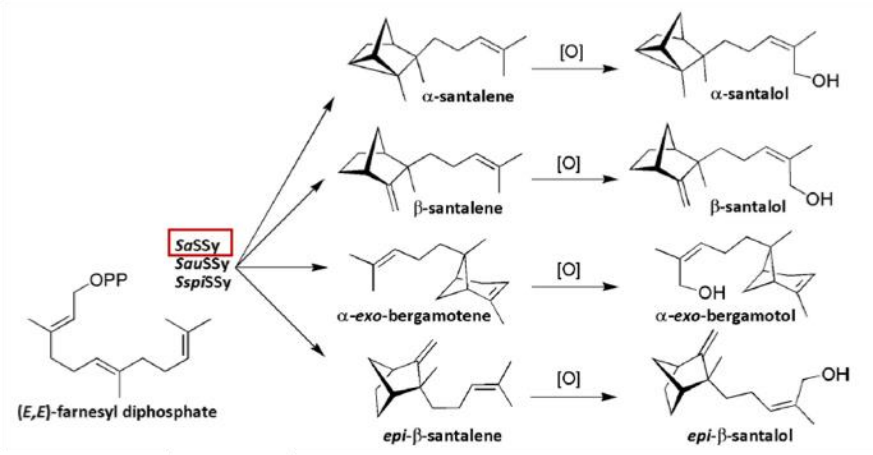


Figure 103 Les différents composés produits par la santalène synthase de *S. album* à partir du farnésyl pyrophosphate. Extraite de (Jones *et al.*, 2011).

Tableau 16 Composition de l'huile de bois de santal extraite de *Santalum album*. Les données proviennent de (Daramwar *et al.*, 2012).

Composés	Pourcentage
α-santalène	1,31%
(Z)-α-bergamotène	0,26%
epi-β-santalène	1,37%
β-santalène	1,884%
(Z)-α-santalol	49,19%
(Z)-α-*trans*-bergamotol	8,49%
(Z)-*epi*-β-santalol	3,79%
(Z)-β-santalol	25,26%
(E),(E)-farnésol	0,66%

La deuxième stratégie consiste à exprimer le gène codant pour la santalène synthase de *Clausena lansium* afin de produire uniquement du santalène (Jones *et al.*, 2011; Scalcinati *et al.*, 2012a, 2012b; Diaz-Chavez *et al.*, 2013; Tippmann *et al.*, 2016).

La production de santalène par les cyanobactéries n'a jamais été publiée. Par conséquent, nous avons fait synthétiser puis nous avons cloné le gène codant pour la santalène synthase de *Santalum album* dans le vecteur d'expression pC. Le vecteur pC-SS ainsi obtenu a été introduit chez nos cyanobactéries d'intérêt pour (i) étudier la possibilité de produire des santalènes ou des santalols par diverses souches de cyanobactéries et (ii) caractériser les différents isomères produits. Il sera ainsi possible de regarder si toutes les souches produisent les mêmes isomères dans les mêmes proportions.

2. Introduction du plasmide pC-SS codant pour la santalène synthase de Santalum album

Le plasmide pC-SS codant pour la santalène synthase de *Santalum Album* a été introduit chez *Synechocystis* PCC 6803, *Synechococcus* PCC 7942, *Synechococcus* PCC 7002 et *Cyanothece* PCC 7425 par conjugaison (voir introduction chapitre 2.V et Matériels et Méthodes). La présence de ce plasmide dans les diverses souches a été vérifiée par PCR (Figure 104, 2 clones indépendants testés) et la séquence du gène ainsi que la séquence promotrice et le RBS permettant son expression ont été vérifiés par séquençage d'ADN. Pour *Synechococcus* PCC 7002, un seul clone avait la bande attendue et il faudra donc en tester d'autres. Pour *Synechocystis* PCC 6803 les clones 4 et 5 ont la bande attendue et il en va de même pour *Synechococcus* PCC 7942 clones 1 et 3 et *Cyanothece* PCC 7425 clones 2 et 3.

Le phénotype des mutants (étude de la croissance) n'a pas encore été formellement étudié mais les premiers résultats montrent que le plasmide se réplique de façon stable et autonome dans les différentes souches et que sa présence ne perturbe pas leur croissance.

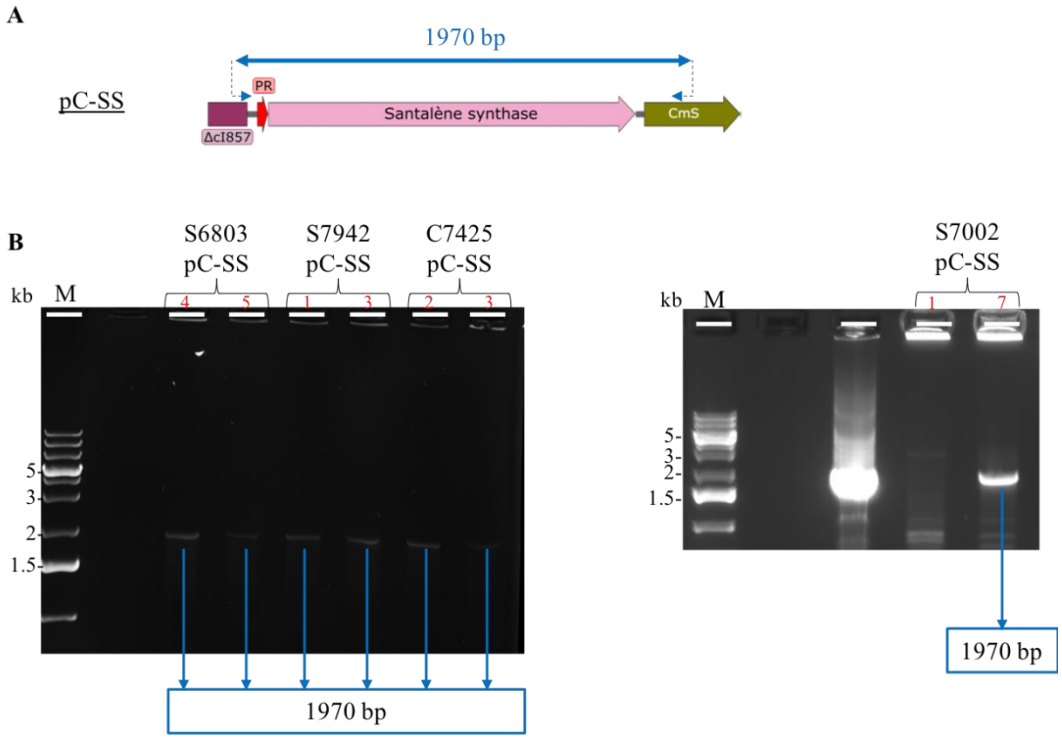


Figure 104 Représentation schématique (A) et photographie d'un gel d'agarose (B) montrant les produits d'amplification par PCR avec les amorces pFCI_Fw et pFCI_Rv (triangles bleus) du vecteur pC-SS chez *Synechocystis* PCC 6803, *Synechococcus* PCC 7942, *Synechococcus* PCC 7002 et *Cyanothece* PCC 7425. Deux clones indépendants ont été testés pour chaque cyanobactérie. Le marqueur de poids moléculaire (M) est le GeneRuler™ 1Kb plus de Thermoscientifc.

3. Plusieurs souches de cyanobactéries possédant pC-SS produisent du santalène

La production de santalènes par les clones identifiés a été testée dans les conditions standard définies pour chacune des souches. *Synechocystis* PCC 6803 et *Synechococcus* PCC 7942 ont donc été cultivés dans des erlenmeyers contenant du milieu MM, à 2500 lux, 30°C sous agitation (140 rpm dans des incubateurs Infors). *Synechococcus* PCC 7002 a été cultivé dans des erlenmeyers contenant du milieu A^+, à 2500 lux, 30°C sous agitation (140 rpm dans des incubateurs Infors) et enfin *Cyanothece* PCC 7425 a été cultivé dans des erlenmeyers contenant du milieu MM_{CaC}, à 1500 lux, 30°C sous agitation (140 rpm dans des incubateurs Infors). Les souches sont cultivées en présence de dodécane qui a été prélevé après 21 jours et injecté en GC-MS.

Le protocole de quantification des santalènes par GC-MS n'est pas encore complètement développé car les nombreux composants constituant l'huile de bois de santal (notre standard) rendent difficile la réalisation des gammes étalons. Cependant, des premières analyses démontrent que nos châssis cyanobactériens produisent (sauf *Synechococcus* PCC 7002) plusieurs isomères (α-, β- et *epi*- β-) du santalène ainsi que de l'α-*exo*-bergamotène (Figure 105, 106, 107 et 108). Concernant *Synechococcus* PCC 7942, la souche produit ces composés en très faibles quantités, ils sont donc difficiles à identifier (Figure 107). Les contrôles (souche pC incubée en présence de dodécane) utilisés pour cette étude sont les mêmes que ceux utilisés pour la production de bisabolène et de farnésène (voir Annexe 7, 8, 9 et 10).

En regardant les aires obtenues pour les différentes cyanobactéries, il semblerait que *Synechocystis* PCC 6803 (notamment le clone 5) soit le meilleur châssis pour la production de santalène. En effet, pour cette souche les aires des pics d'α-santalène et d'α-*exo*-bergamotène sont supérieurs à ceux du standard interne (nérolidol) de concentration identique pour toutes les souches (10 mg/L).

Il n'est pas possible de déterminer quel isomère est le plus produit par les souches car bien que le pic d'α-*exo*-bergamotène ait une aire bien plus importante, il est nécessaire de réaliser les gammes étalons avant de tirer des conclusions à ce sujet. En effet, cette molécule, une fois ionisée produit plus d'ions 93 que les différents isomères du santalène.

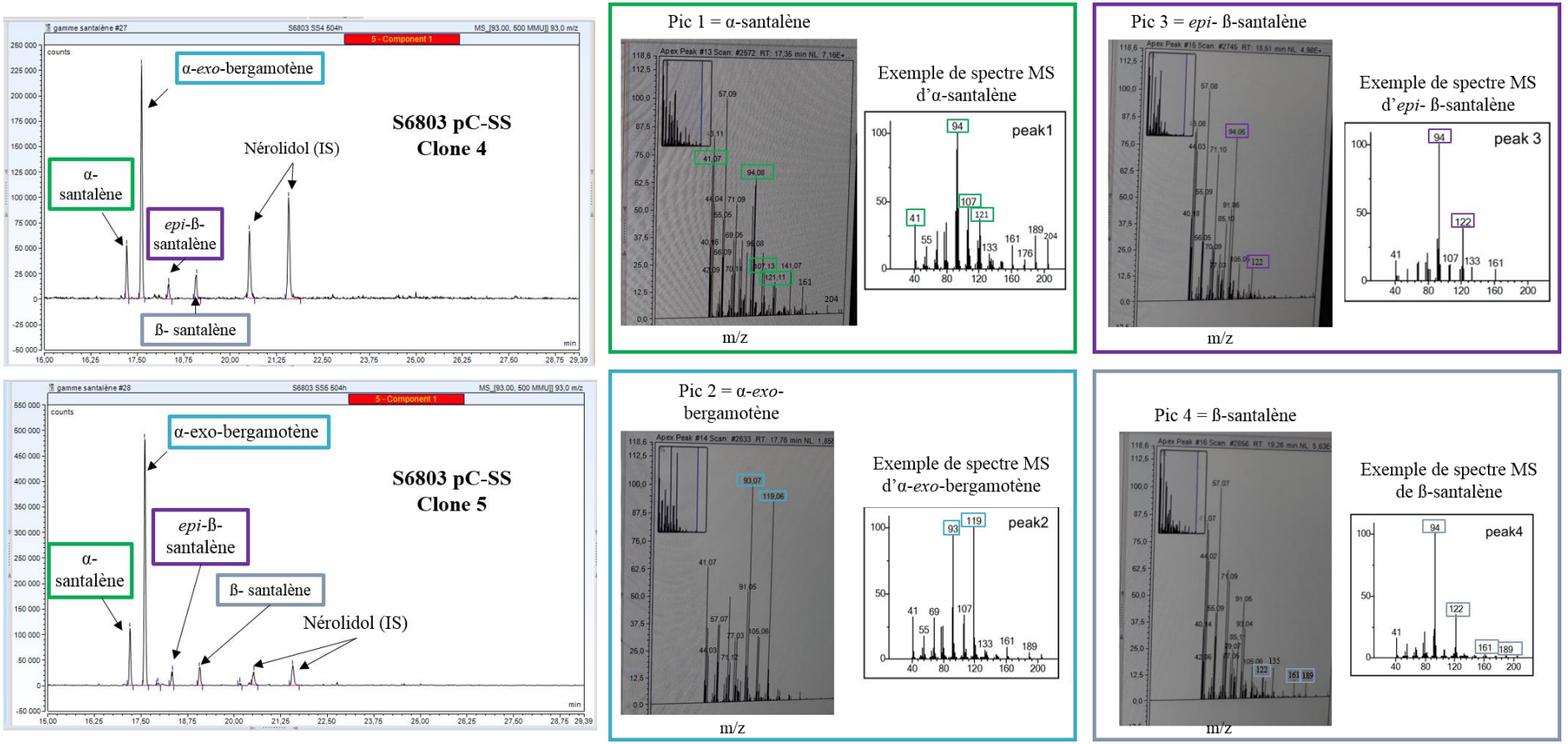


Figure 105 Chromatogrammes (m/z = 93 ; à gauche) montrant les divers pics obtenus en injectant en GC-MS le dodécane présent à la surface des cultures de deux clones (4 et 5) de *Synechocystis PCC 6803* pC-SS cultivés pendant 21 jours. 10 mg/L de nérolidol (standard interne) ont été ajoutés dans chacun des échantillons de dodécane. Les cultures ont été effectuées dans des erlenmeyers contenant du milieu MM, à 2500 lux, 30°C sous agitation (140 rpm dans des incubateurs Infors). Les spectres montrés à droite correspondent au spectre MS (intensité relative en fonction du rapport m/z ; à droite) des 4 pics (α-, β- et *epi*- β-santalène et α-exo-bergamotène) identifiés sur le chromatogramme. Ces spectres sont comparés au standard attendu et les ions majoritaires sont entourés.

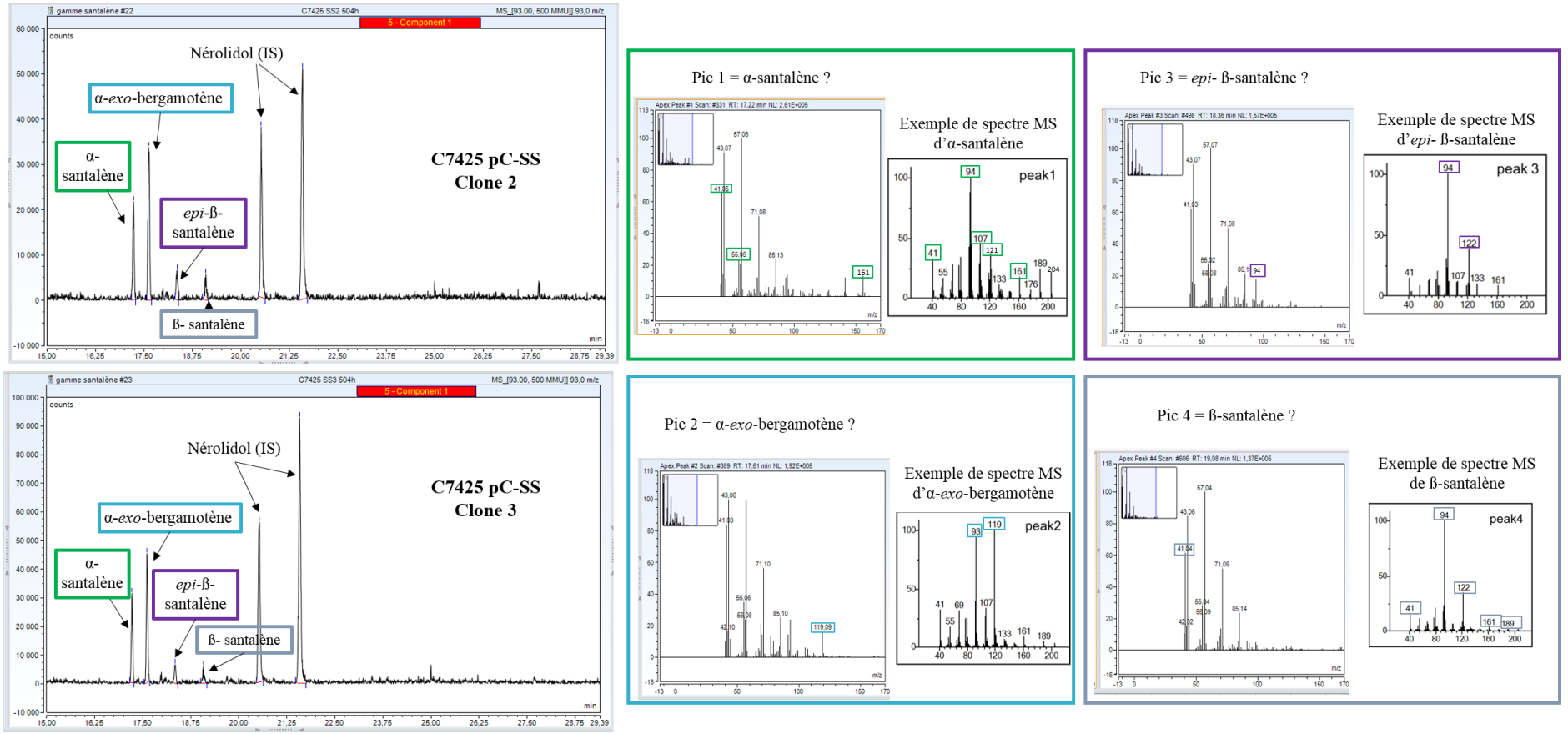


Figure 106 Chromatogrammes (m/z = 93 ; à gauche) montrant les divers pics obtenus en injectant en GC-MS le dodécane présent à la surface des cultures de deux clones (4 et 5) de *Cyanthoce* PCC 7425 pC-SS cultivés pendant 21 jours. 10 mg/L de nérolidol (standard interne) ont été ajoutés dans chacun des échantillons de dodécane. Les cultures ont été effectuées dans des erlenmeyers contenant du milieu MM_{CaC}, à 1500 lux, 30°C sous agitation (140 rpm dans des incubateurs Infors). Les spectres montrés à droite correspondent au spectre MS (intensité relative en fonction du rapport m/z ; à droite) des 4 pics (α-, β- et *epi*- β-santalène et α-exo-bergamotène) identifiés sur le chromatogramme. Ces spectres sont comparés au standard attendu et les ions majoritaires sont entourés.

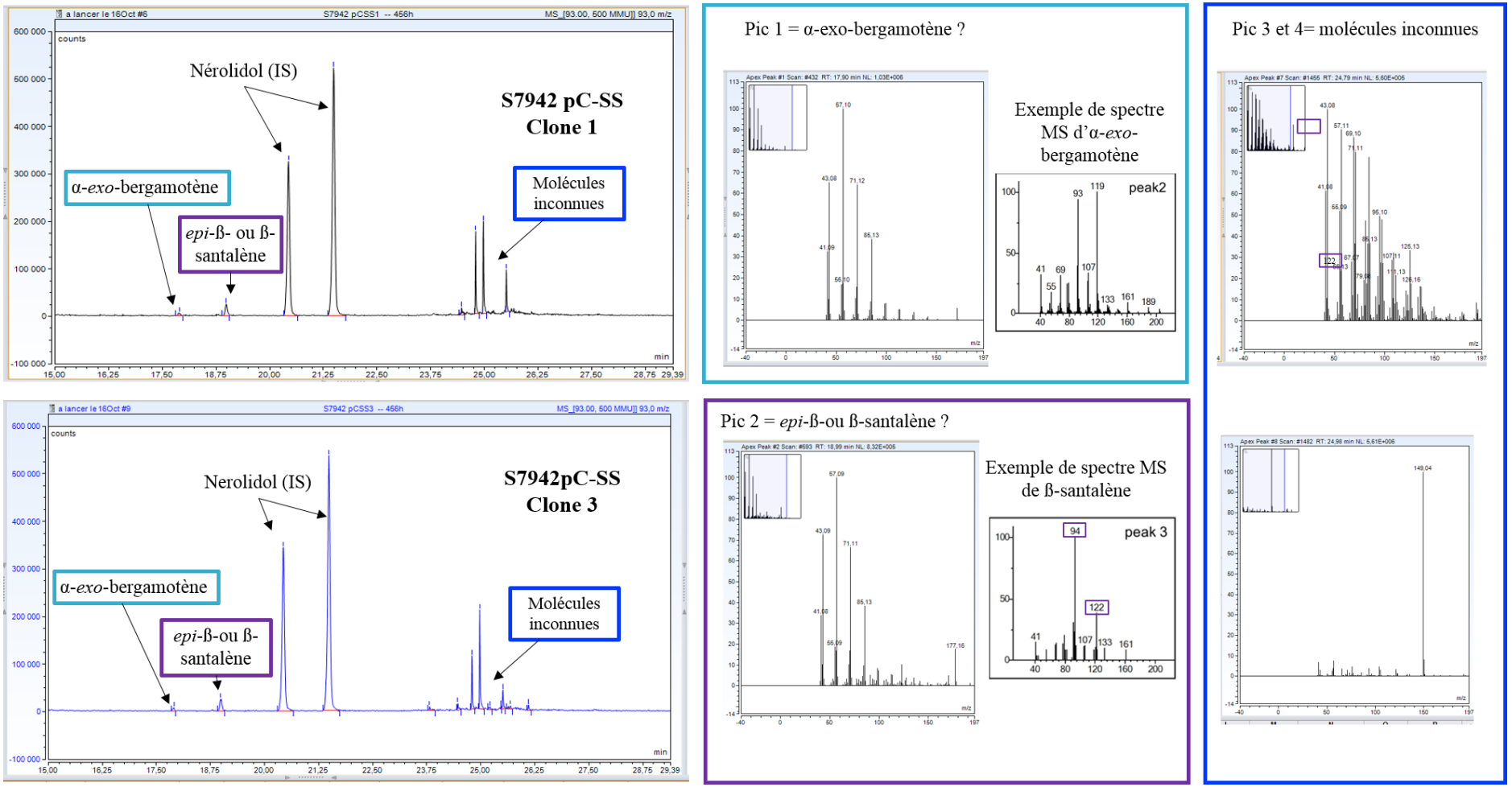


Figure 107 Chromatogrammes (m/z = 93 ; à gauche) montrant les divers pics obtenus en injectant en GC-MS le dodécane présent à la surface des cultures de deux clones (4 et 5) de *Synechococcus* PCC 7942 pC-SS cultivés pendant 21 jours. 10 mg/L de nérolidol (standard interne) ont été ajoutés dans chacun des échantillons de dodécane. Les cultures ont été effectuées dans des erlenmeyers contenant du milieu MM, à 2500 lux, 30°C sous agitation (140 rpm dans des incubateurs Infors). Les spectres montrés à droite correspondent au spectre MS (intensité relative en fonction du rapport m/z ; à droite) des pics identifiés sur le chromatogramme. Ces spectres sont comparés au standard attendu et les ions majoritaires sont entourés.

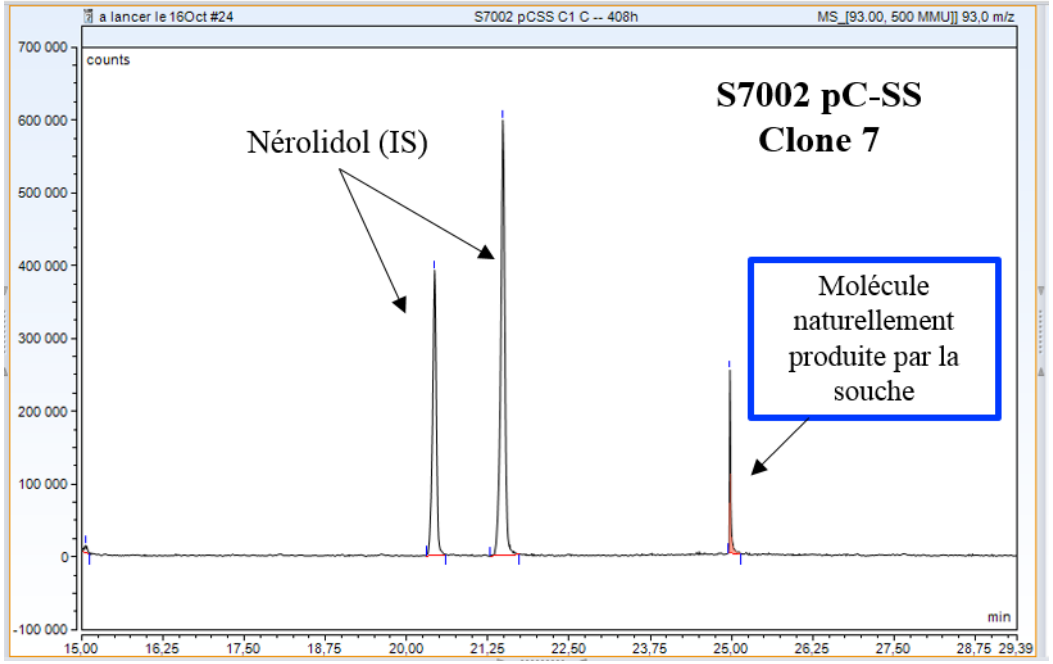


Figure 108 Chromatogramme (m/z = 93) montrant les divers pics obtenus en injectant en GC-MS le dodécane présent à la surface des cultures du clone 7 de *Synechococcus* PCC 7002 pC-SS cultivé pendant 21 jours. 10 mg/L de nérolidol (standard interne) ont été ajoutés dans chacun des échantillons de dodécane. La culture a été effectuée dans un erlenmeyer contenant du milieu A^+, à 2500 lux, 30°C sous agitation (140 rpm dans des incubateurs Infors).

Les chromatogrammes présentés dans cette étude sont similaires à ceux obtenus pour *E. coli* exprimant le gène codant pour la santalène synthase de *Santalum album* (Figure 109, (Jones *et al.*, 2011)).

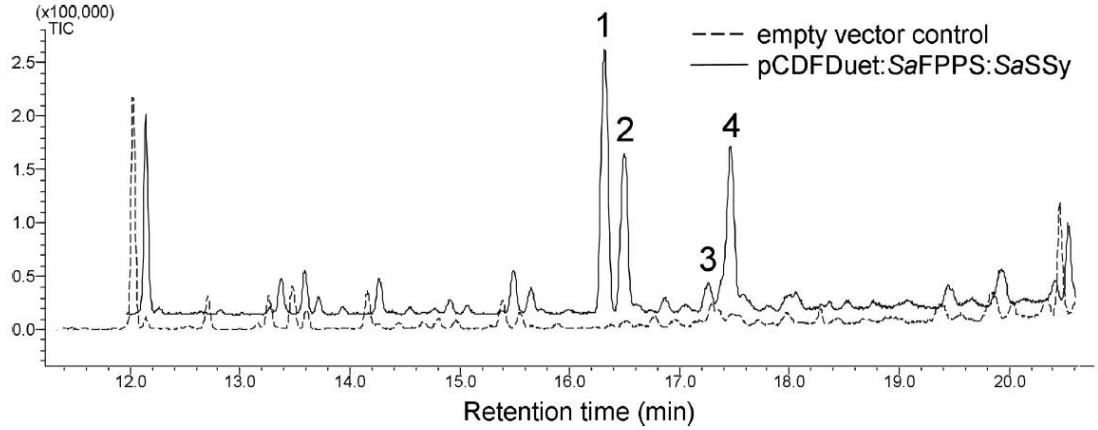


Figure 109 Exemple de chromatogramme obtenu en analysant par GC-MS le dodécane prélevé dans une culture « overnight » de *E. coli* exprimant le gène codant pour la santalène synthase de *Santalum album*. Extraite de (Jones *et al.*, 2011).

4. Conclusions et perspectives

Nous avons démontré pour la première fois la production de santalènes (α-, β- et *epi*- β-santalène) et d'α-*exo*-bergamotène par *Synechocystis* PCC 6803 et *Cyanothece* PCC 7425 génétiquement modifiées. Pour *Synechococcus* PCC 7942, les résultats montrent que la souche pC-SS produit des molécules qui ne sont pas synthétisées dans le contrôle mais ces molécules n'ont pas pu être identifiées avec certitude.

Une fois que le protocole GC-MS sera mis en place, ces productions pourront être quantifiées. Les résultats préliminaires indiquent néanmoins que *Synechocystis* PCC 6803 est la meilleure productrice de ces terpènes et que les différentes souches ne produisent pas les mêmes pourcentages de chaque isomère.

Il faudrait modifier le protocole pour *Synechococcus* PCC 7002 afin de détecter les terpènes produits (s'ils sont produits). Il serait, par exemple, judicieux de diminuer la quantité de dodécane ajoutée au milieu de culture afin de concentrer deux fois plus les terpènes produits.

Enfin, comme cela a été réalisé pour la levure (Jones *et al.*, 2011), il serait intéressant d'exprimer le gène codant pour le cytochrome CYP76F afin de produire des santalols et non des santalènes.

Conclusions

La stratégie formulée au début de mon doctorat était la suivante : il est important de combiner la diversité biologique des cyanobactéries à la diversité structurelle des terpènes afin d'identifier le(s) meilleur(s) châssis pour la production d'un terpène donné.
Les études publiées sur la production de terpènes ont utilisé des modes opératoires différents qui ne permettent pas de comparer avec certitude les rendements de production d'un terpène dans plusieurs souches de cyanobactéries ni de plusieurs terpènes.

Pour répondre à cette problématique, le laboratoire a décidé de réaliser une étude comparative de la production de plusieurs mono (limonène, pinène) et sesquiterpènes (bisabolène, farnésène, santalène) par 5 souches de cyanobactéries (*Synechocystis* PCC 6803, *Synechococcus* PCC 7942, *Synechococcus* PCC 7002, *Cyanothece* PCC 7425 et *Cyanothece* PCC 7822) possédant divers avantages et caractéristiques physiologiques (marines ou d'eaux douces, capacité à pousser sur l'urée ou à fixer le diazote, dépollution des eaux calcaires, temps de génération cours, *etc*).

Les gènes codant pour les terpènes synthases d'intérêt (BS, FS, LS, PS, SS) ont été clonés dans le plasmide d'expression constitutive (pC ; (Veaudor *et al.*, 2018)), plasmide dérivant du RSF1010) par Encarnacion Diaz-Santos et moi-même générant les plasmides pC-BS, pC-FS, pC-LS, pC-PS et pC-SS. Il était, dans un premier temps, plus intéressant d'exprimer ces gènes à partir d'un vecteur d'expression à large spectre d'hôte plutôt qu'à partir d'une construction introduite à un site neutre du chromosome car une seule construction pouvait ainsi être introduite dans toutes les cyanobactéries choisies pour ce travail de thèse. Dans le cas d'une insertion chromosomique, des constructions spécifiques auraient été nécessaires pour chacune des souches. Les différents plasmides ont ensuite été introduits dans les cyanobactéries par conjugaison grâce aux protocoles du laboratoire que j'ai dû adaptés dans le cas de *Cyanothece* PCC 7425 et *Cyanothece* PCC 7822 (Aucun plasmide réplicatif n'avait été introduit dans ces souches auparavant pour exprimer des gènes d'intérêt).

Afin de piéger les terpènes produits par nos souches modifiées génétiquement, nous avons décidé d'utiliser l'ajout de dodécane au milieu de culture. Nous avons montré pour la première fois que la présence de cette molécule était toxique pour la croissance de *Synechococcus* PCC 7942 mais qu'il était possible de diminuer cette toxicité en l'adaptant au dodécane par repiquage successif. Il s'agit bien ici d'une adaptation et cela n'est pas induit par des mutations dans le génome de la souche car cette dernière perd sa capacité à croître en dodécane si elle est cultivée pendant plusieurs semaines sans dodécane.

Des protocoles de GC-MS ont été mis au point afin de quantifier les terpènes produits par nos souches et la production par les différents mutants a été mesurée. Le protocole permettant la quantification de la production de santalène n'a pas encore été mis au point mais nous savons dès à présent que les souches conjuguées avec pC-SS produisent du santalène.

Les résultats obtenus prouvent que notre hypothèse initiale était fondée : si *Synechocystis* PCC 6803 est le meilleur châssis pour la production des sesquiterpènes (bisabolène et farnésène), *Synechococcus* PCC 7002 est le meilleur châssis pour la production des monoterpènes (limonène ; Tableau 17). La production d'un autre monoterpène (myrcène par exemple) pourrait venir valider cette hypothèse. Les rendements de production du monoterpène pinène sont très faibles dans cette étude ; cela pourrait être lié à la faible activité catalytique de la pinène synthase qui a été tronquée afin d'enlever le peptide signal.
De plus, il est intéressant de noter que si la production de farnésène est plus importante (x 2-3) que celle de bisabolène pour *Synechocystis* PCC 6803, *Synechococcus* PCC 7942 et *Synechococcus* PCC 7002, ce n'est pas le cas pour *Cyanothece* PCC 7425. Cela montre que les disparités de production s'appliquent même pour les terpènes ayant un nombre de carbone similaire et produits à partir du même précurseur.
Cette différence de production n'est pas liée au biais de codon utilisé (celui de *Synechocystis* PCC 6803) pour l'optimisation des gènes *terpènes synthases* (annexe 2).

Tableau 17 Rendements obtenus pour chaque terpène pour chacune des souches de cyanobactéries étudiées. Les rendements indiqués en vert montrent le meilleur châssis identifié pour la production du terpène étudié. Si la production d'un terpène par une souche de cyanobactérie a été réalisée pour la première fois dans cette étude alors les rendements sont écrits en rouge.

	Pinène	Limonène	Bisabolène	Farnésène
Synechocystis PCC 6803	0,08 mg/L après 21 jours	0,8 mg/L après 19 jours	15 mg/L après 21 jours	33 mg/L après 17 jours
Synechococcus PCC 7942	Production non détectable	0,3 mg/L après 14 jours	2,1 mg/L après 14 jours	7 mg/L après 21 jours
Synechococcus PCC 7002	0,06 mg/L après 19 jours	2 mg/L après 19 jours	0,9 mg/L après 19 jours	3,5 mg/L après 19 jours
Cyanothece PCC 7425	Production non détectable	0,9 mg/L après 14 jours	1,5 mg/L après 21 jours	1,3 mg/L après 21 jours
Cyanothece PCC 7822	Non mesuré	0,3 mg/L après 21 jours	Non mesuré	Non mesuré

J'ai également montré que la production de limonène, de bisabolène et de farnésène par *Synechocystis* PCC 6803 et également la production de limonène par *Cyanothece* PCC 7425 étaient stables sur plusieurs mois. Cette donnée n'avait jamais été étudiée/mentionnée auparavant pour la production de terpènes dans les cyanobactéries.

Une fois les meilleurs châssis identifiés (*Synechocystis* PCC 6803 pour la production de bisabolène et de farnésène ; *Synechococcus* PCC 7002 pour la production de limonène), l'impact des conditions de culture sur les rendements de production a été étudié.
Il en est ressorti que :

- *Synechocystis* PCC 6803 produit plus de farnésène à 2500 lux, à 30°C dans un milieu MM qui peut être enrichi en bicarbonate (0,6 g/L $NaHCO_3$) et qui peut contenir de l'urée ou du nitrate comme substrat azoté.

- *Synechococcus* PCC 7002 produit plus de limonène à 1500-5000 lux (robuste aux variations de lumière), à 30°C et dans le milieu A^+ contenant du nitrate ou de l'urée et enrichi en vitamine B12.

Enfin, la délétion des voies rentrant en compétition avec la production de terpènes pour le pool de précurseurs chez *Synechocystis* PCC 6803 a fortement diminué (Δ*cruF* et Δ*crtR*) ou n'a pas modifié (Δ*glgC* et Δ*phaAB*) la production de limonène (Δ*glgC* et Δ*phaAB*) ou de bisabolène (Δ*phaAB*) ou de farnésène (Δ*phaAB,* Δ*cruF* et Δ*crtR*).

Les résultats obtenus sur la production des divers terpènes par *Synechocystis* PCC 6803 seront complétés par ceux obtenus par Victoire Blanc-Garin, concernant l'effet de la position du système d'expression du gène codant pour la terpène synthase (expression à partir d'un plasmide réplicatif ou à partir du chromosome/plasmides endogènes) et l'augmentation du nombre de copies de ce gène, et feront prochainement l'objet d'une publication.

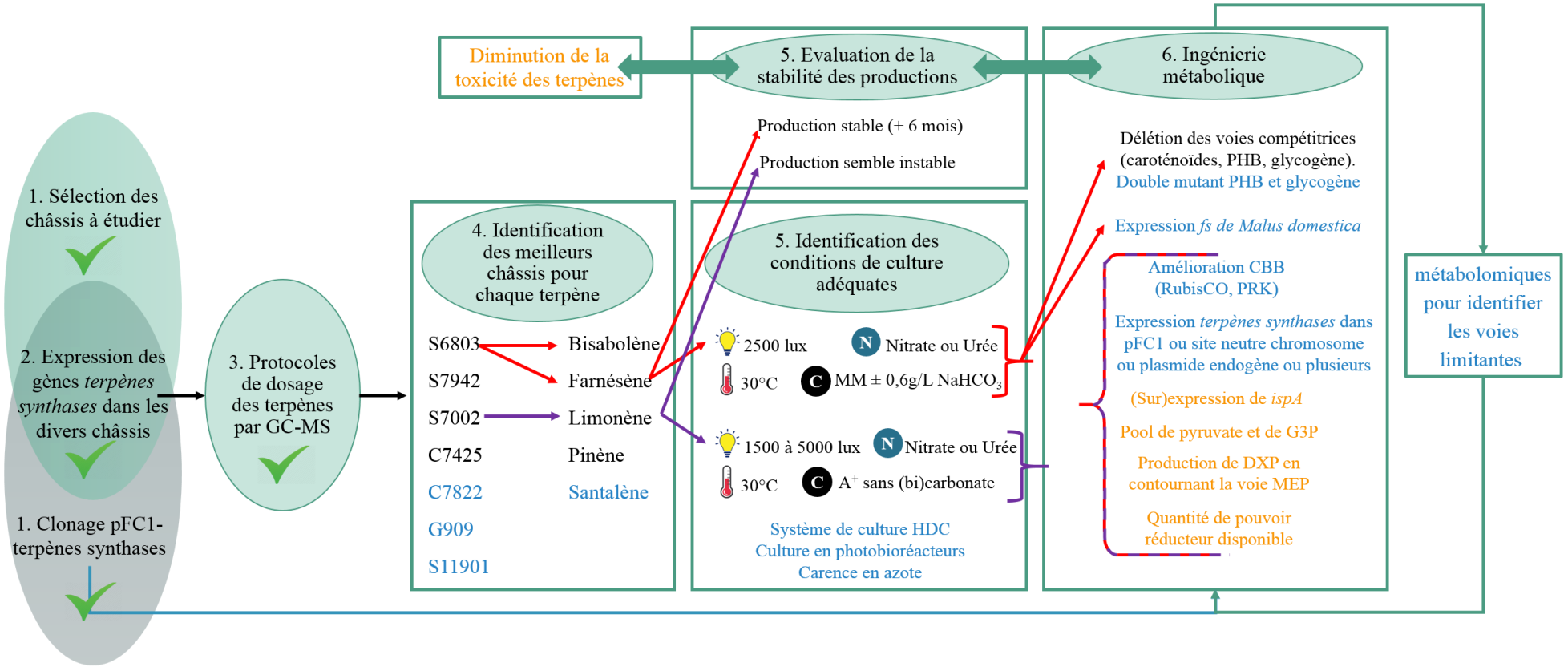


Figure 110 Représentation schématique des différentes étapes, des résultats et des perspectives de ma thèse. Les parties écrites en noir sont celles qui ont été réalisées, celles écrites en bleu représentent les perspectives à court terme et celles écrites en orange représentent les perspectives à plus long terme. S6803 = *Synechocystis* PCC 6803, S7942 = *Synechococcus* PCC 7942, S7002 = *Synechococcus* PCC 7002, C7425 = *Cyanothece* PCC 7425, C7822 = *Cyanothece* PCC 7822, G6909 = *Gloeothece* PCC 6909, S11901 = *Synechococcus* PCC 11901. CBB = Calvin-Benson-Bassham, PRK = phosphoribulokinase, G3P = glycéraldéhyde 3 phophate, DXP = 1-désoxy-D-xylulose-5-phosphate, MEP = voie du méthylérythritol phosphate.

Perspectives générales

I. Perspectives à court terme

Victoire Blanc-Garin (Doctorante ANR Calvin Design 2017-2021) et Marine Vincent (Doctorante CEA 2020-2023) travaillent au laboratoire sur le projet de production de terpènes par divers châssis de cyanobactéries et vont poursuivre et compléter mon travail.

Les différentes perspectives se découpent en deux axes : le premier est d'améliorer la production de terpènes par les meilleurs châssis identifiés dans cette étude (*ie Synechocystis* PCC 6803 pour la production de bisabolène et de farnésène ; *Synechococcus* PCC 7002 pour la production de limonène). Le deuxième axe est l'étude de la production de nouveaux terpènes par de nouveaux châssis afin d'identifier de nouveaux bons producteurs.

- **Mise en place au laboratoire d'un système de culture permettant d'atteindre de fortes densités cellulaires (système HDC)**

Le système de culture HDC (Figure 111, système commercialisé par Cell DEG) a été utilisé par (Dienst *et al.*, 2020) et a permis d'augmenter respectivement par 24, 33 et 16 les rendements en bisabolène, patchoulol et bisabolol. Grâce à ce système, les auteurs ont atteint des biomasses très importantes (DO_{750nm} = 32 après 96h de culture) avec un temps de génération en phase exponentielle de 8h.
J'ai démontré dans cette étude que l'augmentation des rendements était souvent directement corrélée avec l'accroissement de la biomasse et non pas avec l'amélioration de la production par cellule. L'utilisation de ce système est très prometteur.
Nous venons de commander le dispositif et allons le tester prochainement sur les meilleurs châssis.

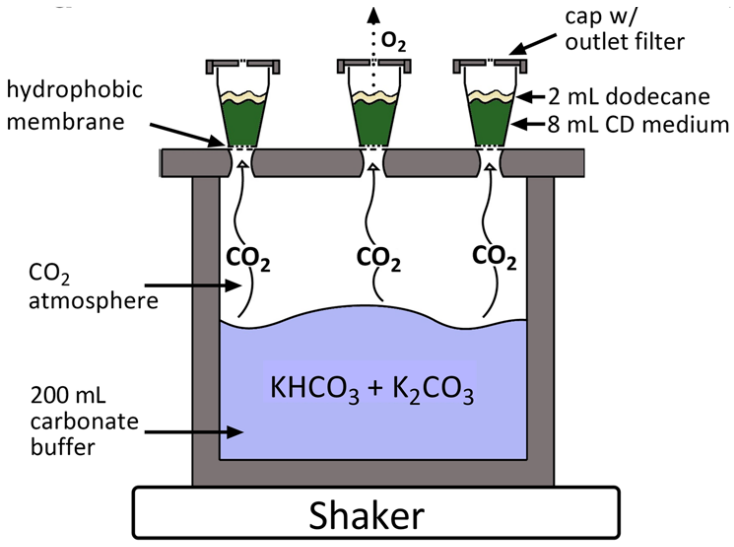


Figure 111 Représentation schématique du système HDC. Extrait de (Dienst *et al.*, 2020)

- **Production en photobioréacteurs**

Dans le cadre du projet européen Abacus qui finançait le post-doctorat d'Encarnacion Diaz Santos, des cultures en photobioréacteurs de 2 L ont été réalisées. Les rendements obtenus pour *Synechocystis* PCC 6803 possèdant le plasmide pC-LS sont très encourangeants. Ils sont, en effet, similaires à ceux obtenus en erlenmeyers (0,8 mg/L en 21 jours). Il sera intéressant de tester la production de farnésène et de bisabolène par *Synechocystis* PCC 6803 dans ces conditions plus proches des conditions « industrielles ».
Par ailleurs, nous pourrons également tester la production de terpènes par *Synechococcus* PCC 7002 dans ces conditions.

- **Expression des gènes codant pour les terpènes synthases en utilisant divers systèmes d'expression**

Les terpènes synthases ont une faible activité catalytique et sont donc souvent limitantes pour la production de terpènes (Gao *et al.*, 2016). Il s'agit donc de surproduire ces enzymes.
Pour répondre à cette problématique, Victoire Blanc-Garin a réalisé des constructions permettant l'insertion :

- au niveau du site neutre *slr0168* et des petits plasmides endogènes pCA2.4 et pCC5.2 chez *Synechocystis* PCC 6803 des gènes codant pour la farnésène synthase et la bisabolène synthase sous le contrôle du promoteur p_R.
- au niveau du site neutre I chez *Synechococcus* PCC 7942 du gène codant pour la farnésène synthase s'exprimant à partir du promoteur p_R
- au niveau du site neutre A0935-A0936 chez *Synechococcus* PCC 7002 du gène codant pour la limonène synthase s'exprimant à partir du promoteur p_R .

Ainsi, il sera possible d'étudier l'influence de la position dans le génome de la cassette d'expression sur la production de terpènes (chromosome, plasmides endogènes ou plasmide à large spectre d'hôte) : la production est-elle plus importante et/ou plus stable. De plus, le nombre de copies des gènes codant pour les terpènes synthases pourra être augmenté (une copie exprimée à partir du plasmide et une exprimée à partir du chromosome par exemple).

- **Choix de terpènes synthases avec une meilleure activité enzymatique et amélioration de cette activité**

Dans l'étude réalisée par Lee *et al*., les rendements en farnésène étaient plus importants lorsque les auteurs exprimaient le gène codant pour la farnésène synthase de *Malus domestica* au lieu de celle de *Picea abies* (Lee *et al.*, 2017). Il sera donc intéressant de cloner la *farnésène synthase* de *Malus domestica* dans le plasmide d'expression forte et constitutive (pC) afin d'exprimer ce gène dans *Synechocystis* PCC 6803 et *Synechococcus* PCC 7942 et de quantifier la production subséquente de farnésène.

Concernant les monoterpènes synthases, des études sont nécessaires afin de déterminer s'il est important d'enlever le peptide signal et d'identifier les acides aminés à enlever afin de garder l'activité catalytique intacte.
A plus long terme, je pense que l'identification de terpènes synthases avec une meilleure activité catalytique sera une étape importante dans l'amélioration de la production de terpènes par les cyanobactéries. Cela a déjà été réalisé avec succès pour la production d'isoprène par *Synechococcus* PCC 7942 (rendement x 27 (Gao *et al.*, 2016)). Ces manipulations sont cependant couteuses (synthèse des gènes) et chronophages.
La création de librairies de séquences codant pour des terpènes synthases qui auront été modifiées par mutagénèse aléatoire est également une voie d'amélioration possible mais cela nécessite la mise en place d'un crible pour identifier rapidement et efficacement les mutations qui amélioreraient l'activité de l'enzyme.

- **Amélioration de l'assimilation du carbone**

Tout d'abord, le laboratoire travaille à l'amélioration des connaissances sur les mécanismes du transport et de la concentration du carbone (CCM) au sein des carboxysomes. Ces données de recherche fondamentale permettront d'identifier de nouveaux leviers permettant d'accroitre la fixation du carbone.

Ensuite, il a été démontré que la surexpression des gènes endogènes codant pour la RubisCO chez *Synechocystis* PCC 6803 augmentait la fixation du CO_2 (Zhang *et al.*, 2017) et l'expression des gènes codant pour la RubisCO de *Synechococcus* PCC 6301 a amélioré la production d'isobutyraldehyde (x 1,5) par *Synechococcus* PCC 7942 (Atsumi *et al.*, 2009). De même, l'expression des gènes codant pour la RubisCO de *Synechococcus* PCC 7942 a amélioré la production d'acides gras par *Synechococcus* PCC 7002 (Ruffing, 2014). La (sur)expression du gène endogène ou hétérologue codant pour la phosphoribulokinase améliore également l'assimilation du CO_2 et donc l'accumulation de biomasse et de molécules d'intérêt (Liang and Lindblad, 2016; Liang *et al.*, 2018; De Porcellinis *et al.*, 2018).

Victoire Blanc-Garin a donc construit les plasmides permettant la (sur)expression des gènes codant pour la ribulose bi-phosphate carboxylase/oxygénase et pour la phosphoribulokinase de plusieurs espèces de cyanobactéries (*Synechocystis* PCC 6803, *Synechoccocus* PCC 7942, *Synechoccocus* PCC 7002 et *Cyanothece* PCC 7425). Ces plasmides ont été introduits chez *Synechocystis* PCC 6803 avec le gène codant pour la farnésène synthase cloné dans le chromosome et chez *Synechococcus* PCC 7002 avec le gène codant pour la limonène synthase cloné dans le chromosome. Nous sommes actuellement en train d'analyser la production de terpènes par ces mutants.

- **Création du double mutant Δ*glgC* et Δ*phaAB* et production en conditions de carence en azote**

L'inactivation partielle (Δ*glgC*) ou totale (Δ*phaAB*) des voies de stockage de carbone sous forme de glycogène ou de PHB n'a pas amélioré la production de terpènes par *Synechocystis*

PCC 6803. Le carbone non stocké sous forme de glycogène (Δ*glgC*) ou de PHB (Δ*phaAB*) est certainement redirigé vers la synthèse d'autres réserves carbonées (synthèse de glycogène dans le mutant Δ*phaAB* et synthèse de PHB dans le mutant Δ*glgC*). On pourrait donc construire un double mutant Δ*glgC*Δ*phaAB.* Il faudrait aussi réaliser des mesures de production de terpènes en conditions de carence en azote car la souche produit d'importante quantité de PHB ou de glycogène dans cette condition.

- **Réalisation d'une étude de métabolomique**

La métabolomique permet d'analyser les effets des conditions de culture et des modifications génétiques effectuées chez les cyanobactéries et d'identifier les métabolites dont la quantité varie. Il s'agit d'identifier les étapes limitantes pour la production et également de déterminer si des métabolites s'accumulent et peuvent devenir toxiques pour la cellule (Jazmin *et al.*, 2017; Fathima *et al.*, 2018; Cheah *et al.*, 2020). Par exemple, l'étude réalisée par Pade *et al.*, a révélé que le métabolisme central de *Synechocystis* PCC 6803 n'était que peu affecté par la production d'isoprène lorsqu'une seule copie du gène *ispS* était exprimé mais que ce n'était pas le cas lorsque deux copies de ce gène l'étaient (Pade *et al.*, 2016).

Ainsi, je pense qu'il sera intéressant d'étudier le métabolome de *Synechocystis* PCC 6803 pC-FS et de *Synechococcus* PCC 7002 pC-LS afin d'identifier les verrous biologiques à lever pour améliorer respectivement la production de farnésène ou de limonène.

- **Études de nouveaux châssis de cyanobactéries unicellulaires pour la production de terpènes**

Les études de production de terpènes par *Cyantohece* PCC 7822 seront continuées afin (i) de mesurer la production de farnésène, de bisabolène et de pinène et (ii) d'identifier les conditions propices à la croissance de la souche et donc à la production de molécules d'intérêt par cette dernière.

Ensuite la production de terpènes par de nouveaux châssis pourrait être testée. Citons par exemple, *Gloeothece* PCC 6909, une souche de cyanobactérie diazotrophique qui n'a jamais été modifiée génétiquement et *Synechococcus* PCC 11901, une souche génétiquement manipulable identifiée pour sa croissance rapide.
J'ai, déjà, développé le protocole de conjugaison pour *Gloeothece* PCC 6909 en adaptant celui utilisé au laboratoire.

- **Mise au point du protocole GC-MS de quantification du santalène**

Nous savons que les cyanobactéries conjuguées avec le plasmide pC-SS produisent de l'α-santalène, du β-santalène, de l'épi-β-santalène et de l'α-exo-bergamotème. Cependant, le protocole de quantification par GC-MS de ces molécules est délicat à mettre au point car l'huile de bois de santal utilisée comme standard contient de nombreux isomères de santalol et peu

d'isomères de santalène. Il faudra donc déterminer la quantité de chaque isomère dans l'huile et réaliser des gammes étalons afin de quantifier la production par nos cyanobactéries.

II. Perspectives à plus long terme

- **Mise en place d'un crible**

La quantification des terpènes nécessitent souvent une analyse GC-MS ce qui représentent une limitation importante dans l'analyse de nombreux mutants et combinaisons de mutants. Afin de résoudre ce problème plusieurs cribles pourraient être mis en place. Cela a déjà été réalisé pour *E. coli.* et certains cribles sont détaillés dans (Emmerstorfer-Augustin *et al.*, 2016).

Ces cribles peuvent être basés sur :

- sur la coloration (visible à l'œil nu) des bactéries produisant de grandes quantités de caroténoïdes (lycopène, canthaxanthine, zeaxanthine, asthaxanthine (Ohnuma *et al.*, 1994; Furubayashi *et al.*, 2014; Tashiro *et al.*, 2016). La voie de biosynthèse des caroténoïdes étant naturellement présentes chez les cyanobactéries et jouant un rôle dans la gestion du stress oxydatif, il peut être plus difficile d'utiliser ces cribles chez ces dernières car les résultats dépendraient plus de l'état physiologique de la cellule que de l'augmentation du flux vers la voie MEP ;

- sur la coloration Nile Red : les auteurs ont pu spécifiquement mesurer la fluorescence du farnésène lié au Nile Red (excitation à 290 nm et émission à 550 nm (Ubersax and Frenz, 2012)) Chez les cyanobactéries, il faut vérifier si les molécules liées au Nile Red n'absorbent pas et n'émettent pas au même signal. De plus, certains pigments photosynthétiques peuvent impacter la lecture du signal ;

- Sur la cyclisation du vinyl methyl ether isoprenoïde (structuralement proche du FPP) par une terpène synthase. Le produit formé va réagir avec le Purpald pour former un composé violet (Lauchli *et al.*, 2013). Ce test permet d'évaluer l'efficacité catalytique d'une terpène synthase ;

- Sur la détection du pyrophosphate (PPi) libéré par l'action de la terpène synthase (réaction avec le vert de malachite pour former un complexe turquoise (Vardakou *et al.*, 2014)). Ce test permet égalementd'évaluer l'efficacité catalytique d'une terpène synthase ;

- Sur la réaction du 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) avec la double liaison du terpène pour former un produit vert. Ce test est très intéressant car c'est le seul permettant de doser directement les terpènes mais son seuil de détection est haut et il faut vérifier qu'aucune autre molécule possédant une double liaison n'est présente dans le dodécane ;

- Sur la viabilité cellulaire : certains terpènes s'associent avec les membranes et augmentent la résistance de la cellule au détergent tel que le tween 20 (Kirby *et al.*, 2014) ;

- Sur des biosenseurs capable de quantifier des intermédiaire de la voie du MVA/MEP (Pfleger *et al.*, 2006, 2007; Tang and Cirino, 2011) ;

  - **<u>(Sur)expression du gène *ispA* codant pour les prenyl transférases qui catalysent la synthèse du GPP, du FPP et du GGPP</u>**

L'étude réalisée ici a permis de mettre en évidence la différence de production de mono et sesquiterpènes entre les diverses souches de cyanobactéries. Cette différence pourrait être liée à l'activité de l'enzyme IspA dans nos divers châssis. Cependant, la séquence en acide amines de cette enzyme est bien conservée (Figure 112, acides aminés du site catalytique entourés en noir).
Du point de vue de la recherche fondamentale, il serait intéressant d'exprimer le gène *ispA* de *Synechocystis* PCC 6803 dans *Synechococcus* PCC 7002 afin de regarder si cela améliore la synthèse des sesquiterpènes dans ce châssis. Inversement, il serait intéressant d'exprimer le gène *ispA* de *Synechococcus* PCC 7002 dans *Synechocystis* PCC 6803 et de quantifier la synthèse des monoterpènes dans ce châssis

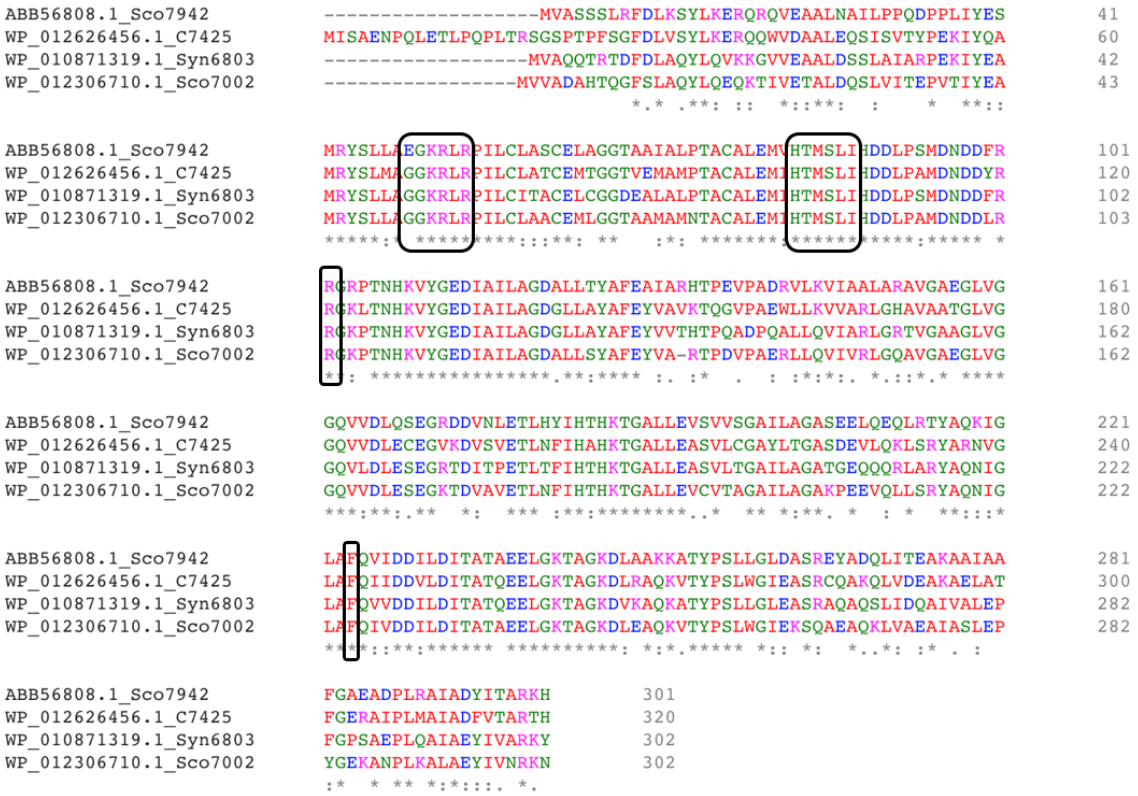


Figure 112 Alignement des séquences en acides aminés de la protéine IspA de nos diverses souches de cyanobactéries (réalisé avec Clustal Oméga).

La (sur)expression du gène *ispA* est une stratégie qui s'est avérée prometteuse pour améliorer la production de nombreux terpènes chez les cyanobactéries (Halfmann *et al.*, 2014b; Kiyota *et al.*, 2014; Choi *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2017; Pattanaik *et al.*, 2020). Notamment, l'expression

d'un gène codant pour une prényltransférase permettant la synthèse spécifique de GPP ou de FPP serait une voie d'amélioration notable.

- **Augmentation de la quantité de pouvoir réducteur disponible**

Plus de 90% de l'énergie lumineuse (photons) reçue est dissipée sous forme de chaleur ou de fluorescence. Ainsi, seul 6% de cette énergie est réellement utilisé par la photosynthèse (Work *et al.*, 2012). Afin d'améliorer l'efficacité de la photosynthèse et l'utilisation de la lumière, une stratégie qui pourrait être mise en œuvre est la troncation des antennes photosynthétiques. Cette stratégie a été utilisée chez *Chlamydomonas reinhardtii*, les mutant obtenus avaient une densité cellulaire plus importante et produisaient plus d'O_2 (Beckmann *et al.*, 2009).

Par ailleurs, le ratio ATP/NADPH n'est pas optimal pour la production de terpène et pourrait être modifié en dérégulant l'activité des voies produisant l'ATP (flux cyclique d'électrons (Shabestary and Hudson, 2016)) ou en changeant l'activité des canaux potassium des thylakoïdes (dérégulation du flux d'électrons (Checchetto *et al.*, 2012)).

- **Augmentation du pool de pyruvate et de G3P (Figure 113)**

Plusieurs gènes pourraient être (sur)exprimés pour améliorer la production de terpènes par les cyanobactéries. Il s'agit du gène codant pour :

- la PEP carboxykinase (PEPCK). Cela a multiplié par 3 la production de lycopène chez *E. coli* (Farmer and Liao, 2001) et par 1,5 la production d'aldéhyde chez *Synechococcus* PCC 7942 (Cheah *et al.*, 2020). Cependant, cela a fortement perturbé la croissance de la cyanobactérie (perturbation du métabolisme du pyruvate et des acides aminés).

- l'enzyme malate déshydrogénase (MDH) et l'enzyme Malic (ME). La production d'isobutyraldehyde a été multipliée par 1,6 chez *Synechococcus* PCC 7942 en surexprimant les gènes codant pour ces deux enzymes (Jazmin *et al.*, 2017).

- la fructose bisphosphate aldolase (fbaA), la triose phosphate isomérase (tpi), la glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2 (GAP2) et la fructose-1,6 biphosphatase (FBP). Ces enzymes sont impliquées dans le Cycle de Calvin et leur surproduction améliore non seulement la fixation du CO_2 (Kang *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2005, 2006; Liang and Lindblad, 2016) mais également la production de molécules d'intérêt par les cyanobactéries (*Synechocystis* PCC 6803, augmentation de la production d'éthanol par 1,5 ou par 1,3 en surproduisant respectivement fbaA ou FBP (Liang *et al.*, 2018)).

- la phosphoénolpyruvate synthase (PPS).

Pour améliorer la production de terpène, il est aussi possible d'inactiver :

- partiellement le gène codant pour la PEP carboxylase (PEPC). La délétion partielle de ce gène a augmenté la production de lactate (x 2) chez *Synechocystis* PCC 6803 mais le mutant obtenu a montré une croissance fortement ralentie par rapport à la souche sauvage (Angermayr *et al.*, 2014).

- partiellement le gène codant pour la pyruvate déshydrogénase (PHD). Cela a amélioré la production d'aldéhyde (x 1,4) par *Synechococcus* PCC 7942 sans impacter sa croissance (Cheah *et al.*, 2020).

- les gènes *pykF* et *pykA* codant pour la pyruvate kinase. Cela a augmenté la production de lycopène (x 3) par *E. coli* (Farmer and Liao, 2001). Les gènes *pykF* et *pykA* n'ont, à ma connaissance, jamais été inactivés chez les cyanobactéries.

- le gène codant pour la phosphoglucose isomérase (*pgi*) afin d'inactiver la glycolyse et rediriger le flux vers la voie des pentoses phosphates ou vers la voie Entner-Doudoroff. La voie Entner-Doudoroff, qui permet la production d'une molécule de pyruvate et d'une molécule de G3P, est particulièrement intéressantes pour la production de terpènes par la voie MEP (Liu *et al.*, 2014). La délétion du gène *pgi* a amélioré la croissance de *Synechococcus* UTEX 2973 (Abernathy *et al.*, 2017).

- le gène codant pour la G6P déshydrogénase (*zwf*). Cela a augmenté l'abondance des transcrits DXS et IDI ainsi que la production de lycopène (x 1 ,3) chez *E. coli* (Zhang *et al.*, 2013). La délétion de Δ*zwf* chez *Synechocystis* PCC 6803 n'empêche pas la croissance de la souche en photoautotrophie (Chen *et al.*, 2016).

Enfin, il a été démontré que les mutants de délétion et de surexpression du gène codant pour GAPDH1, chez *Synechococcus* PCC 7002, étaient capables de croitre en photoautotrophie et produisaient 2,5 fois plus de G3P. La quantité de NADPH et de pyruvate était également supérieure dans ces deux souches (Kumaraswamy *et al.*, 2013). Cela représente une stratégie intéressante pour améliorer la production de terpènes par les cyanobactéries tout comme l'inactivation du gène *cp12* codant pour une protéine régulatrice du cycle de Calvin-Benson (CP12) (nos données non publiées). L'inactivation de *cp12* dérégule complètement le Cycle de Calvin et donc le métabolisme central du carbone (nos données non publiées).

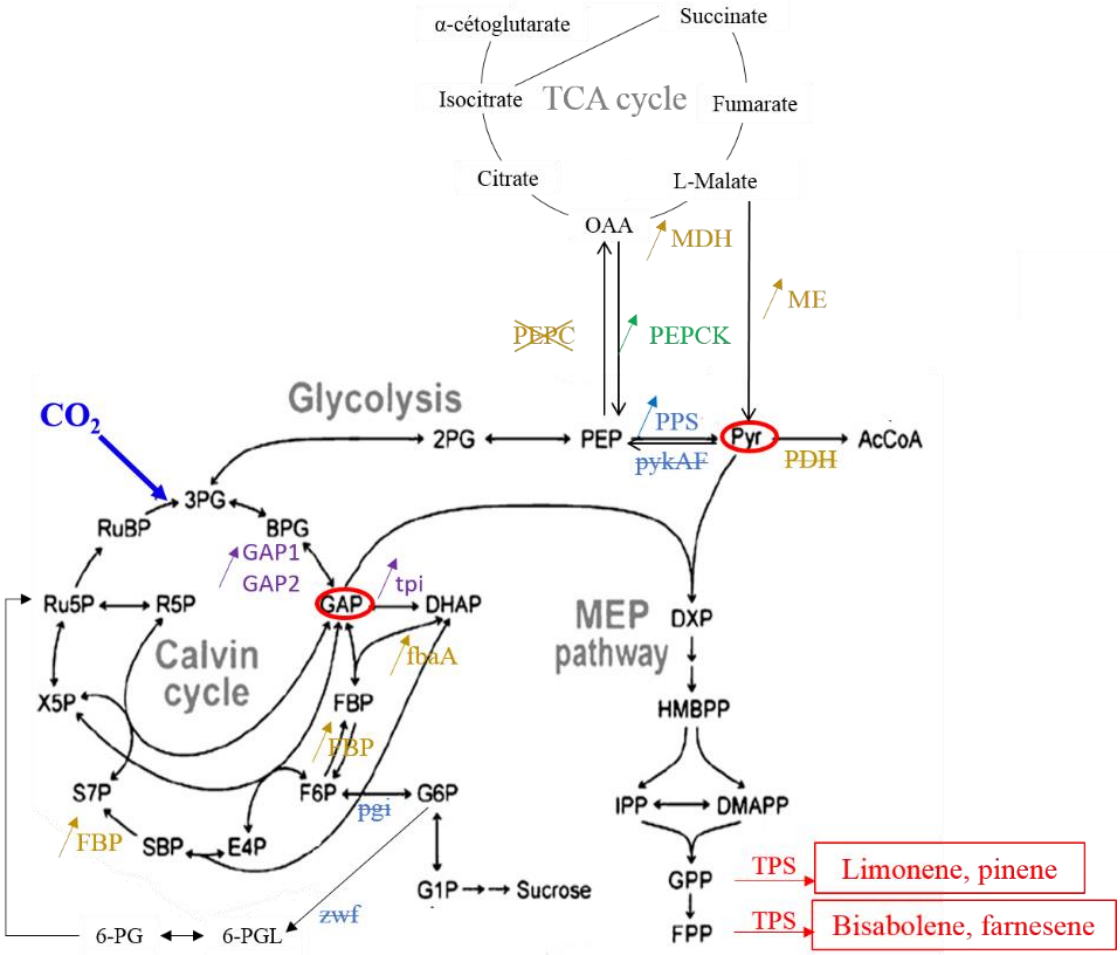


Figure 113 Représentation schématique du métabolisme central du carbone chez les cyanobactéries. Les enzymes indiquées sont les cibles potentielles dont les gènes doivent être inactivés (nom barré) ou surexprimés (flèche devant le nom) afin d'améliorer la production de terpènes. Le nom des enzymes est écrit en bleu si cette modification a déjà été réalisée chez *E. coli* dans le cadre de la production de terpènes, en dorée si cela a déjà été réalisé chez les cyanobactéries dans le cadre de la production de molécules d'intérêt, en vert si cela a déjà été fait chez *E. coli* et chez les cyanobactéries et en violet si cela n'a jamais été réalisé ni chez *E. coli*, ni chez les cyanobactéries. Les terpènes synthases et terpènes d'intérêt sont annotés en rouge.

- **Création d'une jonction entre la voie des pentoses phosphates et la voie MEP : surexpression de *sll1556* chez *Synechocystis* PCC 6803**

Les études réalisées par Poliquin *et al.*, laissent penser que l'enzyme codée par *sll1556* permet l'incorporation des composés de la PPP dans la voie MEP (Poliquin *et al.*, 2004). Par conséquent, la surexpression de *sll1556* pourrait être prometteuse pour accroitre la production de terpènes par les cyanobactéries.

- **Mutation de la sous-unité E1 de la pyruvate déshydrogénase**

Une étude a montré qu'une mutation (E636Q) de la sous-unité E1 de la pyruvate déshydrogénase conférait à cette enzyme une activité DXS synthase like. L'expression du gène *dxs* et l'activité de l'enzyme DXS étant très régulés chez les cyanobactéries, cette stratégie pourrait augmenter la quantité des intermédiaires de la voie MEP disponible.

- **<u>Expression des gènes codant pour YajO et RibB (G108S) permettant la synthèse de DXP</u>**

Une étude récente réalisée chez *E. coli* a démontré l'existence de deux enzymes, YajO et RibB (mutation G108S), capables de convertir le ribulose 5-phosphate en DXP, le premier intermédiaire de la voie MEP. L'expression des gènes codant pour ces deux enzymes a permis de multiplier par 2 (pour ribB G108S) ou 3 (YajO) la production de bisabolène (Kirby *et al.*, 2015).
En blastant ces deux enzymes (blastp) contre le génome des cyanobactéries, on obtient pour YajO :

- Des similitudes avec une aldo/keto reductase présente dans les cyanobactéries pluricellulaires (*Nostoc)* avec une identité ± 60% et une couverture > 97% ;
- Une protéine similaire à 25% et codée par *slr1503* chez *Synechocystis* PCC 6803 ;
- Aucune protéine similaire pour *Synechococcus* PCC 7942, *Synechococcus* PCC 7002, pour *Cyanothece* PCC 7425 et *Cyanothece* PCC 7822

RibB est une protéine impliquée dans la biosynthèse de riboflavine et c'est une mutation de cette enzyme qui lui confère une activité DXP synthase. Toutes les cyanobactéries possèdent cette enzyme et la glycine semble être conservée à l'emplacement 108. Cependant, on ne connait pas l'effet de la mutation G108S chez les cyanobactéries.

- **<u>Déviation de la voie de régénération de la méthionine</u>**

Chez *Rhodospirillum rubrum,* une souche produisant naturellement de grande quantités de terpènes, la voie de régénération de la méthionine est impliquée dans la synthèse de DXP, (premier intermédiaire de la voie MEP (Erb *et al.*, 2012; Warlick *et al.*, 2012)).
Synechocystis PCC 6803 ne possède pas les enzymes de la voie de recyclage de la méthionine, il est cependant possible d'exprimer les gènes codant pour les enzymes de *R. rubrum* chez nos diverses cyanobactéries afin d'augmenter le flux vers la voie MEP.

- **<u>Amélioration de la protection des cellules aux stress xénobiotiques</u>**

Le laboratoire travaille sur les mécanismes de résistance des cyanobactéries aux stress biotiques et abiotiques grâce aux Glutathion-S-Transférases (GST, (Kammerscheit *et al.*, 2019a, 2019b)) et Glutathion Réductase (GR).

Certains mutants de délétion des gènes codant pour les GST (Δ*sll0067*, Δ*sll1147*, Δ*sll1545* et Δ*slr0236*) étaient un peu plus résistants au limonène que la souche sauvage de *Synechocystis* PCC 6803. Par conséquent, des études plus approfondies sur les rôles des GST dans la gestion du stress xénobiotique sont à réaliser afin de créer des mutants plus résistants aux terpènes et à d'autres stress générés par la culture à grande échelle (Kammerscheit *et al.*, 2019a, 2019b).

Matériels et méthodes

I. Méthodes de biologie moléculaire

1. *Culture et congélation des souches de E. coli utilisées pour le clonage et la conjugaison*

Le tableau 18 ci-dessous donne le génotype des souches d'*E. coli* utilisées durant ce travail. La souche d'*E. coli* TOP10 a été utilisée pour la construction et l'amplification de nos vecteurs d'expression d'intérêt. Cette souche est cultivée à 30°C ou 37°C selon si l'expression du gène codé par le plasmide est thermorégulée ou constitutive.
La souche d'*E. coli* CM404 dérivée de la souche HB101 et possédant le plasmide mobilisateur autotransférable pRK2013 (Km^R) a été utilisée pour introduire les plasmides dérivés du RSF1010 chez les différentes cyanobactéries par conjugaison. Cette souche est cultivée à 30°C en raison de la réplication thermosensible du pRK2013.
D'autres souches d'*E. coli* (XL1 blue, MC1061) ont été utilisées afin de propager un plasmide d'intérêt.

Tableau 18 Souches d'*Escherichia coli* utilisées

Souche	Génotype	Provenance
TOP10	F-*mcr*A Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) ϕ80*lac*ZΔM15 *ΔlacX74 rec*A1 *ara*D139 Δ(*ara-leu*) 7697 *gal*U *gal*K *rps*L (Str^R)*end*A1 *nup*G λ-	Invitrogen™
CM404		Mermet-Bouvier et al., 1993
XL1 blue	*end*A1 *gyr*A96(nal^R) thi-1 *rec*A1 *rel*A1 *lac gln*V44 F'[::Tn10 *pro*AB^+ *lac*I^q Δ(*lac*Z)M15] *hsd*R17(r_K^- m_K^+)	Agilent
MC1061	str. K-12 F^- λ^- Δ*(ara-leu)7697* [*araD139*] B/r Δ*(codB-lacI)3 galK16 galE15* $e14^-$ *mcrA0 relA1 rpsL150*(Str^R) *spoT1 mcrB1 hsdR2* (r^-m^+)	Casadaban and Cohen, 1980

Toutes les souches de *E. coli* sont cultivées en milieu Luria-Bertani (LB) contenant les antibiotiques adéquats aux concentrations suivantes : ampicilline (Amp) 100 µg mL^{-1}, kanamycine (Km) 50 µg mL^{-1}, chloramphénicol (Cm) 50 µg mL^{-1} ou streptomycine (Sm) et spectinomycine (Sp) à 25 et 75 µg mL^{-1} respectivement.
Afin conserver les souches de *E. coli* contenant les plasmides d'intérêt, ces dernières sont congelées à -80 °C en présence de glycérol 20 %. Pour ce faire, 450 µL de glycérol à 80 % est ajouté à 1350 µL d'une suspension de cellules ayant été cultivées durant une nuit « culture overnight ». Ce mélange est ensuite congelé dans des cryotubes de 2 mL.

2. Extraction et purification d'ADN plasmidique

Les plasmides amplifiés chez *E. coli* ont été extraits à l'aide du *Kit NucleoSpin Plasmid Easypure* (Macherey-Nagel) en suivant les instructions du fabricant. Les cellules sont obtenues après une culture « overnight » en milieu LB (avec pression de sélection adéquate) à 37°C ou 30°C (pour les vecteurs permettant une expression thermorégulée d'un gène).

3. Méthodes d'amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La PCR a été utilisée afin d'amplifier les divers fragments d'ADN à cloner dans les plasmides d'expression (amplification du gène codant pour la bisabolène et la farnesène synthase) et également afin de vérifier la présence et la séquence des gènes hétérologues qui seront exprimés dans diverses souches de cyanobactéries.

a. Les amorces utilisées (oligonucléotides)

Tableau 19 Liste et caractéristiques des amorces utilisées dans l'étude (Fw : Forward ; Rv : Reverse)

Nom	Séquence (5'-3')	Objectif
pFC1 et dérivés de pFC1		
pFC1_Fw	GGCGACGTGCGTCCTCAAGC	Amplification PCR et/ou séquençage ADN des gènes clonés entre les sites de restrictions *Nde*I and *Eco*RI dans pFC1 et ses dérivés
pFC1_Rv	GTGTAACAAGGGTGAACAC	
pSB2A et dérivés de pSB2A		
pSB2A Fw	TAGCGAGGGCTTTACTAAGC	Amplification PCR des promoteurs ou gènes clonés dans pSB2A et ses dérivés
pSB2A Rv	GCTCCTGAAAATCTCGTCG	
Vecteur pEX		
pEX_Fw	GGAGCAGACAAGCCCGTCAGG	Amplification PCR et/ou séquençage ADN des gènes codant pour les terpènes synthases envoyées par Eurofins genomics
pEX_Rv	AGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGC	
Limonène synthase		
LS_Fw1	GCGGAATACCGGCTTTGTTG	Séquençage ADN du gène codant pour la 4S-limonene synthase
LS_Rv1	ACTATCGGTGACCCGGAAGA	
LS_Rv2	TAACCGATCCCGTGCAAAAG	
Pinène synthase		
PS_Fw1	GCGAGAAGTTGCTAGAATTGGC	Séquençage ADN du gène codant pour la (+) -α-pinene synthase
PS_Rv1	TAACCGCAAAATGGCGCAAA	
PS_Rv2	ACCAACGAGACAGAGACTGC	
Bisabolène synthase		
BS_Fw1	TGAGACCGACCAAGATAGC	Séquençage ADN du gène codant pour l'E-α-bisabolene synthase
BS_Fw2	TAGGCATTGGAACGAGCG	
BS_Fw3	TATGACACCTACGGTACC	
BS_Rv1	GCGGTGTCATAGGCTGAT	
BS_Rv2	GGGTACAAACAGGGTACGAA	
BS_Rv3	ACACACTTAGCAATCCGC	
BS_Rv4	GCTTCTTGGGACAACAATTGG	

BS_isolationΔCat	TCCATTTTAGCTTCCGAATTCTTAGCTC CCGGGTGATCTAGAA	Amorce reverse avec un site de restriction *EcoR*I en « overhang » pour amplifier le gène codant pour l'E-α-bisabolene synthase à partir du plasmide pEX-A258-BS sans la partie codante pour le gène de résistance au chloramphénicol
Farnesène synthase		
FS_Fw1	TTGCTCCGCGCGAGTTACAT	Séquençage du gène codant pour l'α-farnesene synthase
FS_Fw2	CCAAGGCCGTGATATGTTGA	
FS_Rv1	GCAGACGCAAGATACTACTGG	
FS_Rv2	TCGGAAAGTTGGTTAGCCAC	
FS_isolationΔCat	TCTCCATTTTAGCTTGAATTCCCTTAGC TCGAGCTGATCTAGA	Amorce reverse avec un site de restriction *EcoR*I en « overhang » pour amplifier le gène codant pour l'α-farnesene synthase à partir du plasmide pEX-A258-FS sans la partie codante pour le gène de résistance au chloramphénicol
Santalène synthase		
FS_Fw1	CTCGCTGGTTTATTGAGGCC	Séquençage ADN du gène codant pour la santalène synthase
FS_Rv1	TACACTGTTCCACCCAAGCT	
FS_Rv2	TGACCACATGTAGCTCTGCA	
Ségrégation des mutants Δ*glgC*		
glgC_Fw	GCCATGCAGGTGGACACCA	Amorces utilisées pour vérifier la ségrégation des mutants Δ*glgC* (inactivation de la voie de production de glycogène)
glgC_Rv	GGATGCGACATTGCTTAATCATGC	
Ségrégation des mutants Δ*phaAB*		
phaAB_Fw	GCATCCCATTGGAGCGTCG	Amorces utilisées pour vérifier la ségrégation des mutants Δ*phaAB* (inactivation de la voie de production des PHB)
phaAB_Rv	CCCAGGGCTTCAGTATTACC	
Inactivation de la synthèse des caroténoïdes		
Km_HincII_Fw	GGCGCTGAGGTCGACCTCGTGAAGAAG	Amplification de la cassette Km^R à partir du plasmide pUC et en ajoutant des sites de restrictions *Hinc*II
Km_HincII_Rv	ACCTGCAGGGGGTCGACGGAAAGCCA C	
Mv13_Fw	GTAAAACGACGGCCAGT	Séquençage ADN des régions d'homologies envoyées par Twist et vérification de l'insertion et du sens d'insertion de la cassette de résistance à la kanamycine entre la région amont et aval
Mv13_Rv	CAGGAAACAGCTATGAC	
Km1_Rv	ACGTTTCCCGTTGAATATGGCTC	
cruF_Fw	ATAGCGAGCTTGTCGTGCCA	Amorces utilisées pour vérifier la ségrégation des mutants Δ*cruF* (inactivation de la voie de biosynthèse des caroténoïdes)
cruF_Rv	CCACCTGGGACTCGCCAATA	
crtR_Fw	CGTCAATACACCATCTGGCT	Amorces utilisées pour vérifier la ségrégation des mutants Δ*crtR* (inactivation de la voie de biosynthèse des caroténoïdes)
crtR_Rw	GTGTTGATCTCCTTGATTGG	

b. *Taq* polymérase

La *Taq* polymerase sert à vérifier que les constructions génétiques ont été correctement réalisées, c'est-à-dire que l'insert a bien été introduit au bon endroit dans le plasmide. Cette polymérase sert également à vérifier la présence du plasmide d'intérêt après propagation dans les cyanobactéries. Les amplifications par PCR réalisées avec la *Taq* ADN polymerase (EP0402 ; ThermoScientific) ont été menées en respectant les instructions du fournisseur (Tableau 20 et 21).

Tableau 20 Mix à réaliser pour l'amplification d'ADN en utilisant la Taq polymérase

		Pour une réaction (50 µL) :
Eau ultra-pure		35,3 µL
Tampon 10X		5 µL (1X)
$MgCl_2$ à 50 mM		1,5 µL (1,5 mM)
Mélange de dNTP à 10 mM		1 µL (0,2 mM)
Amorce à 10 µM	FW : forward ou sens	2,5 µL (0,5 µM)
	RV : reverse ou anti-sens	2,5 µL (0,5 µM)
ADN matrice		Variable (environ 2 µL ; 1-500 ng)
Taq ADN polymérase à 5 U/µL		0,2 µL (1 U)

Tableau 21 Le programme utilisé pour l'amplification d'ADN en utilisant la Taq polymérase

Étape	Température	Temps	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	94°C	3 min	1
Dénaturation	94°C	45 s	25 à 35
Hybridation	Tm-5°C	30 s	
Élongation	72°C	1 min 30 / kb	
Élongation finale	72°C	10 min	1

c. Phusion polymérase

La Phusion polymérase a été utilisée afin d'amplifier les fragments d'ADN à cloner dans les plasmides d'expression et également afin de vérifier la séquence des gènes hétérologues qui seront exprimés dans diverses souches de cyanobactéries.

Les amplifications par PCR réalisées avec la Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (F530S ; ThermoScientific) ont été menées en respectant les instructions du fournisseur (Tableau 22 et 23) :

Tableau 22 Mix à réaliser pour l'amplification d'ADN en utilisant la Phusion polymérase

		Pour une réaction (50 µL) :
Eau ultra-pure		31,5 µL
Tampon 5X Phusion + $MgCl_2$		10 µL (1X)
Mélange de dNTP à 10 mM		1 µL (200 µM)
Amorce à 10 µM	FW : forward ou sens	2,5 µL (0,5 µM)
	RV : reverse ou anti-sens	2,5 µL (0,5 µM)
ADN matrice		Variable (environ 2 µL ; 1 pg à 10 ng)
Phusion ADN polymérase à 2 U/µL		0,5 µL (0,02 U/µL)

Tableau 23 Le programme utilisé pour l'amplification d'ADN en utilisant la Phusion polymérase

Étape	Température	Temps	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	98°C	30 s	1
Dénaturation	98°C	10 s	25 à 35
Hybridation	Déterminer en utilisant : www.thermofisher.com/tmcalculator	30 s	
Élongation	72°C	30 s / kb	
Élongation finale	72°C	10 min	1

d. PCR sur colonies *E. coli* et cyanobactéries

Les PCR peuvent être réalisées directement sur les cellules d'*E. coli* ou des cyanobactéries afin de vérifier la présence d'un plasmide et la séquence des gènes introduits, ou d'amplifier des gènes endogènes. Pour ce faire, il n'y a pas besoin d'extraire et de purifier l'ADN mais il faut tout de même préalablement lyser les cellules par choc thermiques successifs afin de libérer l'ADN.
Pour se faire, un clone d'*E. coli* ou de cyanobactéries est prélevé sur une boite et est resuspendu dans 25 µL d'eau dans un microtubes PCR. Par la suite, un cycle de lyse cellulaire (Tableau 24) est réalisé au thermocycleur. A la fin de ce cycle, les cellules sont centrifugées (6500 rpm, 2 minutes) afin d'enlever les débris cellulaires et de ne récupérer que le surnageant qui contient l'ADN.

Tableau 24 Le cycle permettant la lyse cellulaire

Température	Temps
96°C	5 min
50°C	1 min 30
96°C	1 min
45°C	1 min
96°C	1 min
40°C	1 min

e. Purification des produits PCR

Les produits PCR, obtenus sans amplification aspécifique, sont purifiés à l'aide du kit *QIAquick PCR purification* (Qiagen) en suivant les instructions du fabricant. Ce kit élimine les oligonucléotides ainsi que les fragments d'ADN de petite taille (moins de 100 pb) issus de certaines restrictions enzymatiques.

f. Analyse des produits PCR par gel d'électrophorèse

Pour l'analyse des produits PCR, un gel d'électrophorèse contenant 1 % d'agarose (Invitrogen UltraPure Agarose Ref : 16500-500) dans 100 mL de tampon TBE 0,5 X (Tris-Borate-EDTA)

est chauffé (micro-onde) afin d'homogénéiser l'agarose. 10 µL de BET (intercalant de l'ADN ; solution à 1% dans de l'eau) sont ensuite ajoutés afin de pouvoir visualiser l'ADN sous UV. Après refroidissement et solidification, les produits d'amplification PCR sont chargés dans les puits avec une quantité appropriée de tampon de charge (Gel Loading Dye, Blue, B7021S). Le marqueur de poids moléculaire utilisé est le GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific). La migration s'effectue à 120 V.

4. Dosage de l'ADN

La quantité d'ADN obtenue est dosée à l'aide du NanoDrop (ThermoFischer Scientific). Cette technique permet également de déterminer la pureté de l'échantillon d'ADN. Cette méthode repose sur l'enregistrement d'un spectre d'absorption de 220 nm à 340 nm. A partir de ce spectre, il est possible :

- D'estimer la concentration en acides nucléiques en se basant sur une équation modifiée de la Loi de Beer-Lambert, dans laquelle on remplace ε ×l par un facteur f (en ng/µL) On obtient : c = A/f où c est la concentration en ADN (en ng/µL), A l'absorbance (en unités d'absorbance) et f un facteur dont la valeur dépend de l'acide nucléique considéré : ADNdb : 50 ng/µL ; ADNsb : 33 ng/µL.

- D'estimer la pureté de l'échantillon grâce aux rapports de pureté :
  - **A260 nm/A280 nm** : pour lequel une valeur égale à 1,8 correspond normalement à un échantillon d'ADN « pur », non contaminé par des protéines
  - **A260 nm/A 280 nm** : pour lequel on admet qu'une solution d'ADN ou d'ARN est pure pour des valeurs comprises entre 1,8 et 2,2. Pur signifie ici non contaminé par du phénol, des carbohydrates, des peptides, de l'EDTA ou des polysaccharides.

5. Méthodes de clonage et de transformation bactérienne

a. Digestion d'ADN par restriction enzymatique

Les enzymes de restriction (*Nde*1, *Eco*R1, *Eco*RV, *Hinc*II) utilisées proviennent de New England Biolabs (NEB). Par définition du fournisseur, 1 unité d'enzyme est la quantité d'enzyme nécessaire pour digérer 1 µg d'ADN à 37°C en une heure dans un volume total de 50 µL. Par conséquent, une digestion est réalisée comme suit (Tableau 25).

Les réactions de digestion réalisées au cours de mon étude, ont toutes été effectuées à 37°C pendant 1h et dans le tampon de réaction optimale pour chacune des enzymes.

Tableau 25 Réalisation d'une digestion enzymatique

	Simple digestion	**Double digestion**
H_2O	Qsp 50 µL	Qsp 50 µL
Tampon adapté (10 X)	5 µL (1 X)	5 µL (1 X)
Enzyme 1	1 µL (en général = 10 ou 20 U)	1 µL (en général = 10 ou 20 U)
Enzyme 2		1 µL (en général = 10 ou 20 U)
ADN	X µL (1 µg)	X µL (1 µg)

Pour les doubles digestions, si le tampon de réaction optimale est différent pour les deux enzymes, alors une première simple digestion est réalisée avec la première enzyme dans son tampon optimal, le produit est purifié (précipitation à l'éthanol ou en utilisant le kit *QIAquick PCR purification* de Qiagen selon la taille du produit de digestion) puis une seconde digestion est réalisée avec la deuxième enzyme. Dans le cas des digestions par *Nde*I et *Eco*RI, le tampon 2.1 de NEB (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 100 µg/ml BSA et pH 7.9 à 25°C) est utilisé car les deux enzymes ont une activité optimale et pas d'activité « star » dans ce tampon.

Le volume de la solution d'enzyme ajoutée doit tenir compte du fait que les enzymes sont conservées dans du glycérol et ne doit pas dépasser 5% du volume total de réaction afin de minimiser l'activité « star » des enzymes.

b. Purification des produits de digestion par précipitation dans l'éthanol

Lorsque nécessaire (tampons optimaux différents pour les deux enzymes, présence d'impuretés, réactions sensibles à la présence de sels...), les produits de digestion sont purifiés par précipitation à l'éthanol. Après ajout de 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M, pH 5,2 (Sigma-Aldrich) et 3 µg de glycogène (Invitrogen), les extraits sont soigneusement mélangés et maintenus sur glace 5 minutes. La précipitation est initiée par ajout de 2,5 volumes d'éthanol absolu froid et les échantillons sont ensuite conservés à -20°C pendant une nuit. Ils sont ensuite centrifugés (14000 rpm, 4°C, 30 min) et lavés à 2 reprises avec de l'éthanol 70% froid. Les culots d'ADN sont laissés sous la hotte pendant 1h pour séchage puis resuspendus dans du tampon d'élution (10 mM Tris-Cl, pH 8.5).

c. Ligation

Les réactions de ligation des fragments d'ADN sont réalisées selon les instructions du fabricant en utilisant la ligase et le tampon du kit « Quick ligation » de NEB. Un ratio de 1 : 5 est utilisé pour chaque clonage dans le vecteur pFC1. Ces ratios sont calculés en utilisant l'outil NEB-biocalculator.

d. Transformation des *E. coli*

i. Préparation de cellules chimiocompétentes

Les *E. coli* sont rendus compétentes en déstabilisant leur membrane plasmique. La méthode décrite par Simanis (Simanis *et al.*, 1985) utilise le chlorure de rubidium. Cela se fait en plusieurs étapes décrites ci-dessous.

Préparation des tampons

Tampon RF1 (pour 1 litre) :

- 12 g de RbCl (chlorure de rubidium)
- 9,9 g de $MnCl_2$ $4H_2O$
- 2,94 g de potassium acétate
- 1,5 g de $CaCl_2$ $_2H_2O$
- 150 g de glycérol

Il faut ajouter 500 mL d'eau ultrapure et ajuster le pH à 5,8 avec de l'acide acétique 0,2 M ou pur puis compléter à 1 litre avec de l'eau distillée.

Tampon RF2 (pour 1 litre) :

- 2,09 g de MOPS
- 1,2 g de RbCl
- 11 g de $CaCl_2$ $2H_2O$
- 150 g de glycerol.

Il faut ajouter 500 mL d'eau distillée, ajuster le pH à 6,8 avec du NaOH puis compléter à 1 litre avec de l'eau ultrapure.
Les deux solutions RF1 et RF2 sont rendues stériles par filtration (0,22 µm).

SOB 1 (pour 1 litre) :

- Bactotryptone 20 g
- Extraits de levures 5 g
- 10 mL de NaCl 1M (10 mM final)
- 2,5 mL de Kcl 1M (2,5 mM final)

Il faut compléter à 1 litre avec de l'eau ultrapure et autoclaver.

SOB 2 :
Il faut diluer 4,07 g de $MgCl_2$, $6H_2O$ (1 M final) et 4,93 g de $MgSO_4$ $7H_2O$ (1 M final) dans 20 mL d'eau distillée puis filtrer (0,22 µm) et aliquoter. Cette solution est stockée au congélateur à -20°C.

SOC 2 :
Il faut diluer 7,2 g de glucose (2M final) dans 20 mL d'eau distillée et filtrer (0,22 µm). Cette solution est stockée au congélateur à -20°C.

On prépare ensuite :

- 1 litre de SOB = 1 litre de SOB 1 + 10 mL de SOB 2.
- 1 mL de SOC = 1 mL de SOB + 10 µL de SOC2.
- 1 mL de SOC = 1 mL de SOB 1+10 µL de SOB 2+10 µL de SOC2.

Préparation des cellules compétentes

La veille, tous les tubes Falcons et eppendorfs nécessaires à la manipulation sont placés à 4°C. 10 µL du stock de cellules conservées à -70°C est utilisé pour inoculer une préculture de 5 mL de SOB dans un Falcon 15 mL. Cette préculture est incubée toute la nuit à 37°C.

Le lendemain, à partir de 1 mL de cette préculture, une culture de 80-100 mL de SOB a été inoculé et mis en culture dans un erlenmeyer d'un litre sous agitation rapide (300 rpm) jusqu'à obtenir une DO_{600nm} comprise entre 0,4-0,5. Lorsque cette DO est atteinte, la croissance cellulaire est brutalement stoppée en transférant rapidement l'erlenmeyer dans un mélange eau + glace (température proche de 0°C) pour 10 minutes. Si cela est possible, toutes les opérations suivantes doivent être réalisées en chambre froide.
La culture est par la suite répartie dans deux tubes Falcon froids et centrifugée 1 minute à 4°C à 10 000 rpm. Le surnageant est retiré et le culot cellulaire est resuspendu dans 5 mL de milieu RF1 froid. Le contenu des deux tubes (5 mL + 5 mL) sont mélangés et ajoutés à 20 mL de RF1 froid pour avoir un volume total de 30 mL. Le tube contenant la suspension cellulaire est placé dans la glace (mélange glace + eau) pendant 30 minutes puis centrifugé 15 minutes à seulement 3000 rpm car les cellules sont fragilisées. Le surnageant est ôté et le culot est resuspendu dans 30 mL de tampon RF1 froid. Le tube est maintenu pendant 30 minutes dans la glace puis centrifugé 15 minutes à 3000 rpm. Après centrifugation, le culot est resuspendu dans 6,4 mL de tampon RF2 froid et incubé 15 minutes sur glace. Enfin les 6,4 mL de suspension de cellules dans le tampon RF2 ($6,15 \times 10^9$ cellules /mL) sont répartis en aliquots de 200 µL dans des Eppendorf stériles préalablement refroidis. Les tubes sont plongés une minute dans l'azote liquide puis conservés à -80°C.

Transformation par choc thermique

Un tube contenant 200 µL de cellules compétentes (environ $1,23 \times 10^8$ cellules) est décongelé dans la glace puis les cellules sont réparties dans des tubes Eppendorf (50 µL par tube ; un tube pour le contrôle négatif puis un par transformation). Ensuite, 3 µL du produit de ligation est ajouté à ces 50 µL. On laisse reposer 30 minutes dans la glace pour que l'ADN se fixe à la paroi des cellules puis la membrane plasmide des cellules est déstabilisée par un choc thermique de 45 secondes à 42°C. Les tubes sont ensuite remis immédiatement dans la glace pendant 5 minutes. 450 µL de SOC sont ensuite ajoutés dans les tubes Eppendorf et les cellules sont incubées à 37°C sous agitation (170 rpm) pendant 1 à 2 heures dans un milieu non sélectif. Ce temps est nécessaire à la régénération des parois cellulaires et donc à la survie des cellules. Les suspensions cellulaires sont ensuite étalées sur des boites de LB contenant les antibiotiques appropriés à la sélection des souches mutantes (ayant acquis le plasmide désiré). Les boites sont incubées toute la nuit « overnight » à 37°C ou 48 heures à 30°C (selon si l'expression du gène codé dans le plasmide est thermorégulée ou constitutive). Les colonies qui sont apparues sont

alors repiquées sur de nouvelles boites sélectives et la présence des plasmides et des inserts est testée par PCR.
Un contrôle négatif est obtenu en étalant sur des boites antibiotiques des cellules qui n'ont pas été en contact avec l'ADN plasmidique.

6. Séquençage ADN afin de vérifier l'intégrité des constructions

L'intégrité de l'insert introduit dans le plasmide ou sa stabilité dans la cyanobactérie peut être vérifiée par séquençage ADN (vérification de l'absence de mutation) au moyen du kit *Mix2Seq* (Eurofins Genomics*)* et selon le protocole de préparation des échantillons défini ci-dessous :

- Préparer 15 µL d'ADN purifié aux concentrations suivantes :
  - Pour un plasmide (jusqu'à 15 kb) : 50-100 ng/µL
  - Pour un produit PCR : 10 ng/µL (>1000 bp)
- Ajouter 2 µL de l'amorce souhaitée à 10 µM

II. Culture et caractérisation des cyanobactéries

1. Les cyanobactéries utilisées

Toutes les souches utilisées durant ma thèse sont issues de la collection de cyanobactéries de l'Institut Pasteur (PCC ; https://webext.pasteur.fr/cyanobacteria/).
Ce sont :

- *Synechocystis* PCC 6803
- *Synechococcus* PCC 7942
- *Synechococcus* PCC 7002
- *Cyanothece* PCC 7425
- *Cyanothece* PCC 7822

2. Les milieux et conditions de culture

a. Milieux et conditions de culture pour les cyanobactéries terrestres et d'eaux douces

En conditions standard, *Cyanothece* PCC 7425 et *Cyanothece* PCC 7822 ont cultivées à 30°C et à une intensité lumineuse de 1500 lux. Les deux cyanobactéries modèles d'eaux douces *Synechocystis* PCC 6803 et *Synechococcus* PCC 7942 sont cultivées à 30°C sous une intensité lumineuse de 2500 lux (≈ 33,8 µE /m^2 /s). La lumière blanche est obtenue grâce à des néons (Sylvania, coolwhite) dont l'intensité lumineuse est mesurée à l'aide d'un luxmètre (Testo 545). Les différents milieux de culture utilisés dérivent tous du BG11 défini par Ripka (Rippka *et al.*, 1979) et sont décrits dans le tableau 26. Tous les milieux sont tamponnés à pH = 7 avec 3 mM d'HEPES (acide N-2 hydroxyéthylepipérazine-N'-éthanesulfonique).

Les cultures liquides sont réalisées en erlenmeyers (avec un ratio 1 : 5 soit 25 mL de culture dans un erlenmeyer de 125 mL) et sont incubées dans un agitateur orbital à rampes lumineuses (Infors HT Mulitron II) à 140 rpm.

Le milieu solide est obtenu par ajout de Bacto Agar (Difco) à 10 $g.L^{-1}$ aux différents milieux. En conditions standard sur milieu solide, *Synechocystis* PCC 6803, *Synechococcus* PCC 7942, et *Cyanothece* PCC 7425 sont cultivés à 2500 lux et *Cyanothece* PCC 7822 à 1500 lux.

Tableau 26 Composition des milieux de culture utilisés. Les différences entre les milieux sont mises en avant par une différence de couleur des cellules du tableau.

Composé	Concentration finale (en mM)					
	$BG11_{0N}$	$BG11_{2mM\ N}$	BG11	MM_{0N}	MM	MM_{CaC}
Souches	Milieux spéciaux	*C.* 7822	*C.*7822	Milieux spéciaux	*C.*7425 *S.*6803 *S.*7942	*C.* 7425
Nitrate de sodium ($NaNO_3$)	0	2	17,6	0	17,6	17,6
Hydrogénophosphate de dipotassium (K_2HPO_4)	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
Sulfate de magnésium, heptahydraté ($MgSO_4$, 7 H_2O)	0,625	0,625	0,625	0,625	0,625	0,625
Chlorure de calcium, dihydraté ($CaCl_2$, 2 H_2O)	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	3,2
Acide citrique ($C_6H_8O_7$)	0,029	0,029	0,029	0,029	0,029	0,029
Citrate d'ammonium ferrique ($(Fe(NH_4)C_5H_5)O_7$)	0,017	0,017	0,017	0,017	0,017	0,017
EDTA ($C_{10}H_{16}N_2O_8$)	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003
Métaux (Tableau 27)	Traces	Traces	Traces	Traces	Traces	Traces
Carbonate de sodium (Na_2CO_3)	0,38	0,38	0,38	1,88	1,88	1,88
Bicarbonate de sodium ($NaHCO_3$)	0	0	0	0	0	9,52
HEPES	3	3	3	3	3	3

Tableau 27 Composition en éléments traces des différents milieux dérivant du BG11 (solution A5 (Rippka *et al.*, 1979))

Métal	Concentration finale dans le milieu 1X
Acide borique (H_3BO_3)	46 µM
Chlorure de manganèse, tétrahydraté ($MnCl_2$, 4 H_2O)	0,17 µM
Sulfate de zinc, heptahydraté ($ZnSO_4$, 7H_2O)	0,77 µM
Mobdylate de sodium, dihydraté (Na_2MoO_4, 2 H_2O)	1,60 µM
Sulfate de cuivre, pentahydraté ($CuSO_4$, 5 H_2O)	0,32 µM
Nitrate de cobalt, hexahydraté ($Co(NO_3)_2$, 6 H_2O)	0,17 µM

b. Milieux et conditions de culture pour la souche marine *Synechococcus* PCC 7002

Synechococcus PCC 7002 a été cultivée en conditions standard, à 30°C, à 2500 lux dans un milieu salin enrichi en nitrate et en vitamine B12 (4 µg/L) appelé milieu A+ (composition décrite dans le tableau 28). Le milieu est tamponné à pH = 8,2 en ajoutant 8,26 mM de Tris (Trizmabase, Sigma-Aldrich).

Tableau 28 Composition des milieux de culture utilisés pour *Synechococcus* PCC 7002. Les différences entre les milieux sont mises en avant par une différence de couleur.

Composé	Concentration en mM	
	A+	A_{0N}
Chlorure de sodium (NaCl)	310	310
Chlorure de potassium (KCl)	8	8
Nitrate de sodium ($NaNO_3$)	12	0
Hydrogénophosphatse de dipotassium (K_2HPO_4)	0,37	0,37
Sulfate de magnésium, heptahydraté ($MgSO_4$, 7 H_2O)	20	20
Chlorure de calcium ($CaCl_2$)	2,5	2,5
Chlorure de fer (III), hexahydraté ($FeCl_3$, 6 H_2O)	0,014	0,014
EDTA ($C_{10}H_{16}N_2O_8$)	0,103	0,103
Métaux (Tableau 29)	Traces	Traces
Tris pH 8,2 (Trizmabase)	8,26	8,26

Tableau 29 Composition en éléments traces dans les milieux dérivant du milieu A+

Métal	Concentration finale dans le milieu A+
Acide borique (H_3BO_3)	554 µM
Chlorure de manganèse, tétrahydraté ($MnCl_2$, 4 H_2O)	22 µM
Sulfate de zinc, heptahydraté ($ZnSO_4$, 7H_2O)	1,1 µM
Mobdylate de sodium (MoO_3)	0,02 µM
Sulfate de cuivre, pentahydraté ($CuSO_4$, 5 H_2O)	0,01 µM
Chlorure de cobalt, hexahydraté ($CoCl_2$, 6 H_2O)	0,05 µM

Le milieu solide est obtenu par ajout, dans le milieu A^+, de 15 g/L de Bacto Agar (Difco) et 3 g/L de thiosulfate de sodium ($Na_2S_2O_3$, $5H_2O$). En conditions standard en milieu solide, *Synechococcus* PCC 7002 est cultivé à 30°C, 2500 lux.

3. Les milieux avec des sources d'azote variées

Les milieux sans azote ($BG11_{0N}$, MM_{0N} et A_{0N}) sont les milieux utilisés pour faire varier la source d'azote et sa concentration et en analyser l'effet. Dans le cas de *Cyanothece* PCC 7425, du carbone (0,8 $g.L^{-1}$ $NaHCO_3$) et du calcium (0,36 $g.L^{-1}$ $CaCl_2$) sont ajoutés au MM_{0N} afin de reconstituer un milieu MM_{CaC} sans azote.
Les différentes solutions de molécules azotées (urée, ammonium, nitrate et cyanate) ainsi que le nickel nécessaire au fonctionnement de l'uréase sont ajoutées au milieu à partir des solutions mères filtrées (filtre 0,2 µm) décrites ci-dessous (Tableau 30).

Tableau 30 Composition des solutions mères utilisées pour la croissance avec différentes sources d'azote.

Composée	Concentration mère	Concentration finale
Nitrate ($NaNO_3$)	1,4 M	2 à 17 mM
Urée (CH_4N_2O)	1 M à 4 M	1 à 20 mM
Sulfate de nickel ($NiSO_4$)	10 mM	2,5 µM
Chlorure d'ammonium (NH_4Cl)	1 à 5 M	1 à 5 mM
Cyanate (NaOCN)	1 M	1 à 2 mM

4. Caractérisation des souches de cyanobactéries

a. Évaluation de la composition en pigments des différentes souches

Les spectres d'absorption permettent d'évaluer la composition en pigments des différentes souches de cyanobactéries. Ils sont réalisés par mesure du spectre d'absorbance de 350 à 800 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Secomam ou UvikonXL). Afin de réaliser ces spectres d'absorption, les échantillons sont normalisés à une densité optique DO_{750nm} = 0,1.

Pour toutes les souches de cette étude, la densité optique DO_{750nm} est proportionnelle au nombre de cellules présentes dans la culture car aucun pigment (caroténoïdes, phycoérythrine, phycocyanine, chlorophylle q), n'absorbe à 750 nm.

b. Comptage à la cellule de Malassez

La concentration cellulaire est estimée par mesure de la densité optique à 750 nm et les équivalences DO/nombre de cellules ont été déterminées par comptage au microscope optique à l'aide d'une cellule de Malassez. La taille des cellules des diverses souches varie fortement (voir chapitre 2.III. et IV.) ce qui explique les différentes équivalences DO/nombre de cellules (Tableau 31).

Tableau 31 Équivalence entre la DO_{750nm} et le nombre de cellules pour chaque souche de cyanobactéries.

Cyanobactéries	Équivalence 1 DO_{750nm} = nombre de cellules
Synechocystis PCC 6803	4,5 x 10^7 cellules
Synechococcus PCC 7942	7 x 10^7 cellules
Synechococcus PCC 7002	1 x 10^8 cellules
Cyanothece PCC 7425	2,6 x 10^7 cellules
Cyanothece PCC 7822	5 x 10^6 cellules

c. Détermination de la concentration en antibiotiques nécessaire pour la sélection des souches recombinantes

Cyanothece PCC 7425 et *Cyanothece* PCC 7822 n'avaient jamais été manipulées au laboratoire. Il était donc important de déterminer leur sensibilité aux antibiotiques qui servent à sélectionner les conjuguants.
Pour cela, la concentration minimale létale pour la souche sauvage a été établie par des tests en gouttes (dilution en série) des diverses souches sauvages de cyanobactéries. Ces tests ont été réalisés sur des boites contenant des concentrations croissantes en divers antibiotiques (Km, Sm, Sp Cm). La concentration définie comme sélective pour chaque souche correspond à celle sur laquelle aucune colonie n'a poussé après plus de deux semaines d'incubation dans les conditions standard définies pour la souche. Les concentrations en antibiotiques pour la sélection ainsi définies sont décrites dans le Tableau 32 ci-dessous.

Tableau 32 Concentrations en antibiotiques utilisées pour les différentes souches de cyanobactéries. ND = Non déterminé

	Kanamycine (Km)	Spectinomycine / Streptomycine (Sp/Sm)	Chloramphénicol (Cm)
Synechocystis PCC 6803	50 - 300 µg/mL	5/5 µg/mL	10 µg/mL
Synechococcus PCC 7942	50 µg/mL	5/5 µg/mL	ND
Synechococcus PCC 7002	50 µg/mL	50/50 µg/mL	ND
Cyanothece PCC 7425	25 µg/mL	10/2 µg/mL	10 µg/mL
Cyanothece PCC 7822	ND	25/4 µg/mL	Non sélectif

5. Congélation des cyanobactéries et mise en collection

Afin de conserver les diverses souches sauvages et mutantes des diverses cyanobactéries sur une longue durée elles sont congelées dans l'azote liquide dans des cryotubes (Nunc, Thermo scientific, ref 368632). Pour préserver l'intégrité des cellules, 90 µL de diméthyle sulfoxyde (DMSO, soit 5% v/v) sont ajoutés à 1,8 mL de culture.

III. Les plasmides d'expression de gènes utilisés dans cette étude et le protocole de conjugaison

1. Les plasmides utilisés pour étudier la modification génétique de Cyanothece PCC 7425

Afin de démontrer qu'il était possible d'introduire des plasmides réplicatifs dans diverses souches de cyanobactéries jusqu'alors peu étudiées, j'ai utilisé des plasmides développés au laboratoire (Tableau 33). Cela m'a permis de montrer que les outils génétiques créés pour *Synechocystis* PCC 6803 et *Synechococcus* PCC 7942 pouvaient être utilisés pour d'autres cyanobactéries.

Tableau 33 Les différents plasmides utilisés pour étudier la modification génétique des souches encore peu connues de cyanobactéries

Plasmide	Description et objectif	Référence
pFC1	Vecteur d'expression dérivant du RSF1010 et contenant le promoteur fort p_R controlé par le répresseur cI_{857} pour une expression thermocontrolée des gènes clonés en aval de ce promoteur (Sp^R/Sm^R,Cm^R)	(Mermet-Bouvier and Chauvat, 1994)
pMB13	Vecteur pFC1 avec le gène *lacZ* de *E. coli* cloné en *Nsi*I-*Bsp*EI Utilisé pour démontrer la possibilité de réguler, en fonction de la température, l'expression du gène hétérologue codant pour la β-galactosidase (Sp/Sm^R, Cm^R)	(Mermet-Bouvier and Chauvat, 1994)
pSB2A	Vecteur de clonage et de tests de promoteurs Il code pour le gène *cat* (chloramphenicol acetyl transferase) sous le contrôle d'aucun promoteur (Sp/Sm^R, Km^R, Cm^S)	(Marraccini *et al.*, 1993)
pSB2ATac	Vecteur d'expression contenant le gène *cat* (chloramphenicol acetyl transferase) sous le contrôle du promoteur fort Tac (Sp/Sm^R, Km^R, Cm^R)	(Marraccini *et al.*, 1993)
pSB2AtacΔKm^R	Vecteur pSB2ATac avec le segment contenant les cassettes de résistance à la Km et au Cm tronquées (Sp/Sm^R, Cm^S, Km^S)	(Marbouty *et al.*, 2009)

pSB2AtacΔKm^R/gfp	Vecteur pSB2AtacΔKm^R avec la séquence codante de la GFP cloné sous le contrôle du promoteur Tac. Utilisé comme contrôle pour la localisation intracellulaire de protéines (Sp/Sm^R, Cm^S, Km^S)	(Mazouni *et al.*, 2004)
pSB2ATacΔKm^R// Maf-gfp	pSB2AtacΔKm^R exprimant la séquence codante pour la fusion du gène *maf (sll*0905*)* de *Synechocystis* PCC 6803 et du gène codant pour la GFP Utilisé pour la localisation intracellulaire de la protéine Maf (Sp/Sm^R, Cm^S, Km^S)	(Chenebault *et al.*, 2020)
pSB2ATac/Ccmk1-gfp	pSB2ATac exprimant la séquence codante pour la fusion du gène *Ccmk1* de *Thermosynechococcus elongatus* bp-1 et du gène de la GFP Utilisé pour la localisation intracellulaire de protéine CcmK1 (Sp/Sm^R, Km^R)	(Chenebault *et al.*, 2020)

2. Les plasmides utilisés pour exprimer les gènes codant pour les terpènes synthases issues de plantes dans nos cyanobactéries d'intérêt (Tableau 34)

Tableau 34 Plasmides utilisés pour exprimer les gènes codant pour les terpènes synthases dans nos cyanobactéries d'intérêt

Plasmide	Description et objectif	Référence
pFC1	Vecteur d'expression dérivant du RSF1010 et contenant le promoteur fort p_R controlé par le répresseur cI_{857} pour une expression thermocontrolée des gènes clonés en aval de ce promoteur ($Sp^R/Sm^R,Cm^R$)	(Mermet-Bouvier and Chauvat, 1994)
pC	Plasmide dérivant de pFCI et contenant une version tronquée du gène codant pour le répresseur cI_{857} ($Sp^R/Sm^R,Cm^R$)	(Veaudor *et al.*, 2018)
pEX-BS	Plasmide commercial contenant le gène codant pour l'E-α-bisabolène synthase (Amp^R)	Eurofins génomics
pEX-FS	Plasmide commercial contenant le gène codant pour l'α-farnésène synthase (Amp^R)	Eurofins génomics
pT-BS	Dérivé de pFC1 permettant l'expression thermorégulée du gène codant pour l'E-α-bisabolène synthase (Sp/Sm^R, Cm^S)	Cette étude
pT-FS	Dérivé de pFC1 permettant l'expression thermorégulée du gène codant pour l'α-farnésène synthase (Sp/Sm^R, Cm^S)	Cette étude
pC-BS	Dérivé de pC permettant l'expression constitutive du gène codant pour l'E-α-bisabolène synthase (Sp/Sm^R, Cm^S)	Cette étude
pC-FS	Dérivé de pC permettant l'expression constitutive du gène codant pour l'α-farnésène synthase (Sp/Sm^R, Cm^S)	Cette étude
pC-LS	Dérivé de pC permettant l'expression constitutive du gène codant pour la 4S-limonene synthase (Sp/Sm^R, Cm^S)	Cette étude et (Chenebault *et al.*, 2020)
pC-PS	Dérivé de pC permettant l'expression constitutive du gène codant pour la (+)-α-pinene synthase (Sp/Sm^R, Cm^S)	Cette étude
pC-SS	Dérivé de pC permettant l'expression constitutive du gène codant pour la santalène synthase (Sp/Sm^R, Cm^S)	Cette étude

3. Introduction d'un vecteur réplicatif par conjugaison

La conjugaison se fait par l'interaction entre une cellule donneuse (*E. coli* dans notre cas qui a été transformée avec le plasmide cargo et le plasmide pRK2013) et une cellule réceptrice (les cyanobactéries dans notre cas).
La conjugaison s'effectue en mettant en contact, sur une boite de pétri non sélective, une/des souches d'*E. coli* transformées avec le plasmide conjugatif et le plasmide cargo avec des cellules cyanobactériennes réceptrices. Les micro-organismes sont ensuite transférés sur une boite de pétri contenant les antibiotiques adéquats pour la sélection des souches mutantes (Figure 114, protocole adapté de (Mermet-Bouvier *et al.*, 1993) et amélioré comme cela est décrit dans (Chenebault *et al.*, 2020)).

Les souches de cyanobactéries sont maintenues en phase exponentielle pendant plus d'une semaine par plusieurs repiquages successifs. La veille de la conjugaison, les cellules *E. coli* sont ensemencées en milieu LB et incubées à 30 ou 37°C.
Le jour J, les cultures de cyanobactéries et de *E. coli*, sont récoltées par centrifugation et lavées deux fois dans du milieu frais. Ensuite, 1,25 x 10^7 cellules cyanobactériennes sont mélangées à 4 x 10^7 cellules de *E. coli*. 30 µL de cette co-culture sont déposés sur une boîte de pétri (MM, $BG11_{2N}$ ou A^+ selon la souche) ne contenant pas d'antibiotique.

Ces boites sont ensuite incubées 24 à 72 heures à 30°C et à 1500 ou 2500 lux selon la souche de cyanobactérie. Les cellules (spot) correspondant à la co-culture sont ensuite resuspendues dans du milieu frais et étalées sur des boîtes de pétri contenant le ou les antibiotique(s) de sélection. Les clones apparaissent au bout de 5 jours (pour *Synechocystis* PCC 6803 et *Synechococcus* PCC 7002) ou deux semaines (pour *Synechococcus* PCC 7942, *Cyanothece* PCC 7425 et PCC 7822). Ces clones sont par la suite repiqués sur de nouvelles boites contenant le ou les antibiotique(s) de sélection. La présence du plasmide dans les conjuguants est confirmée par PCR et la séquence codante d'intérêt est vérifiée par séquençage ADN.

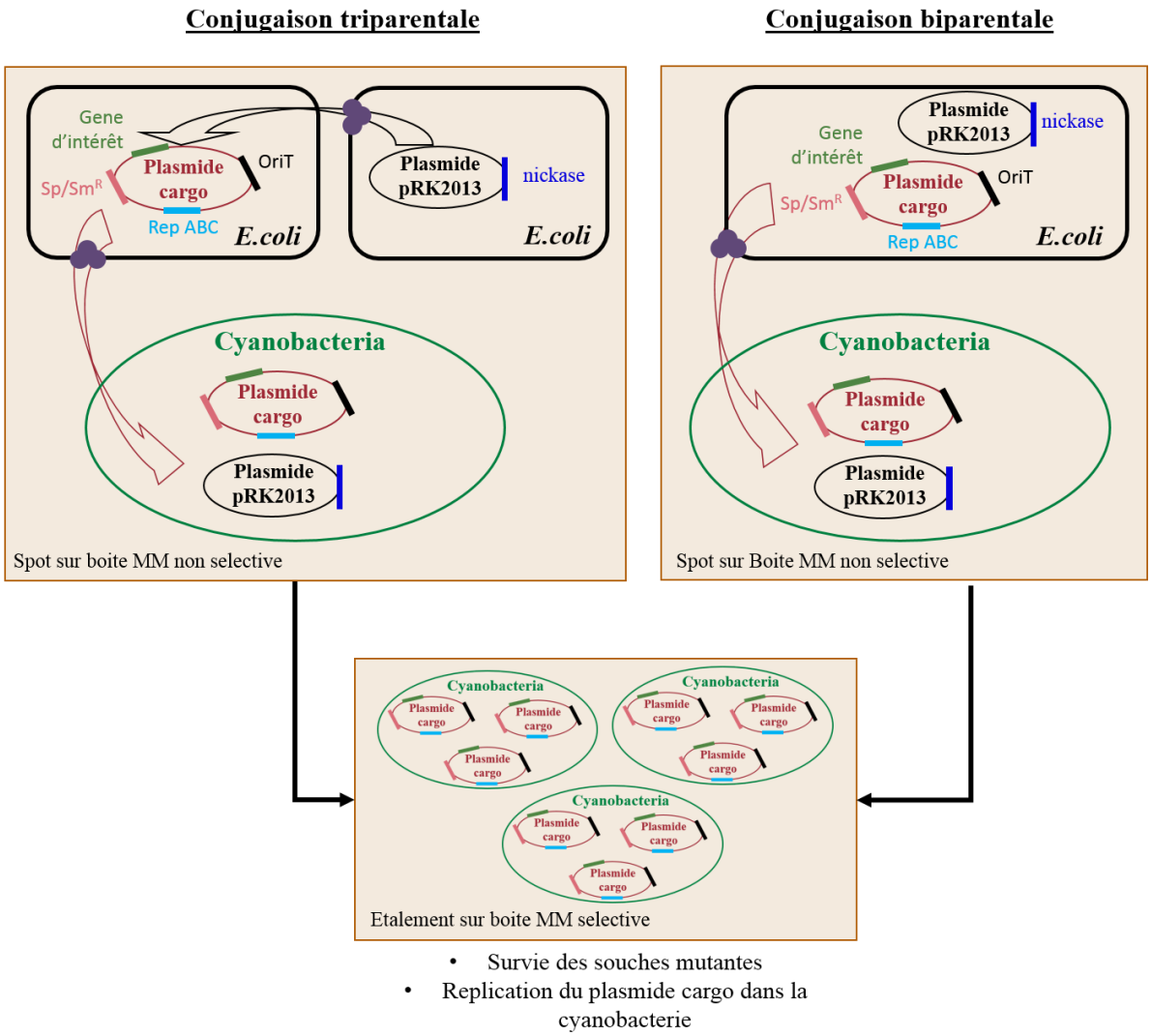


Figure 114 Protocole de conjugaison afin de transférer un vecteur d'expression de *E. coli* vers les cyanobactéries. Le principe de la conjugaison a été décrit dans le chapitre II.V. de ce manuscrit.

IV. Les plasmides de délétion utilisés dans l'étude et le protocole de transformation

1. Les plasmides utilisés pour la délétion des gènes impliqués dans la biosynthèse des caroténoïdes (cruF et crtR)

Tableau 35 Les plasmides utilisés pour inactiver les gènes cruF et crtR impliquées dans la voie de biosynthèse des caroténoïdes

Plasmide	Description	Référence
pTwist_crtR	Plasmide contenant les régions d'homologie amont et aval pour l'inactivation du gène *crtR* ainsi qu'un unique site *Eco*RV (Amp^R)	Cette étude et Twist Bioscience
pTwist_cruF	Plasmide contenant les régions d'homologie amont et aval pour l'inactivation du gène *cruF* ainsi qu'un unique site *Eco*RV (Amp^R)	Cette étude et Twist Bioscience
pUC Km	Plasmide utilisé pour amplifier la séquence codante pour la cassette de résistance à la kanamycine (Km^R)	Pharmacia
pCrtR_Km sens	Plamide pTwist_crtR avec la cassette Km^R clonée dans le sens de transcription du gène *crtR* (Amp^R, Km^R)	Cette étude
pCrtR_Km antisens	Plamide pTwist_crtR avec la cassette Km^R clonée dans le sens inverse de la transcription du gène *crtR* (Amp^R, Km^R)	Cette étude
pCruF_Km sens	Plamide pTwist_cruF avec la cassette Km^R clonée dans le sens de transcription du gène *cruF* (Amp^R, Km^R)	Cette étude
pCruF_Km antisens	Plamide pTwist_cruF avec la cassette Km^R clonée dans le sens inverse de la transcription du gène *cruF* (Amp^R, Km^R)	Cette étude

2. La transformation naturelle et ségrégation

Certaines cyanobactéries sont naturellement compétentes, cela signifie qu'elles sont capables de prélever l'ADN du milieu extracellulaire. Si cet ADN comporte des régions homologues au génome, alors des phénomènes de recombinaison homologue peuvent avoir lieu grâce aux mécanismes endogènes de recombinaison et de réparation de l'ADN (Domain *et al.*, 2004) (Cassier-Chauvat *et al.*, 2016). Cette capacité naturelle peut être utilisée afin d'inactiver ou d'introduire des gènes d'intérêt dans le génome des cyanobactéries.

Pour ce faire, la souche à transformer est maintenue en phase exponentielle de croissance pendant 7 jours avant d'être centrifugée et lavée 2 fois dans du milieu frais. Après resuspension, 1 mL de la suspension est incubé avec 1-2 µg d'ADN dilué dans du T0,1E (pH 7,5). Le mélange est déposé dans des tubes en verre stériles et placé à 3500 lux, 30°C sans agitation pendant 1h30. Les suspensions sont ensuite étalées sur boîte (sans pression de sélection) et incubées à

différentes intensités lumineuses pendant 20 heures. 0,4 mL de solution d'antibiotiques aux concentrations adéquates sont ensuite ajoutés sous la gélose (Figure 115).
Après environ 10 jours, les clones transformants obtenus sont repiqués et cultivés à des doses croissantes d'antibiotiques. Cela permet de favoriser la dissémination des copies mutantes (portant le gène de résistance à la Km^R) dans l'ensemble des copies du génome. Les mutants obtenus peuvent être « ségrégés », c'est-à-dire que l'ensemble des copies du génome sont mutantes (Km^R) et qu'il n'existe plus de copies du gène d'intérêt. Le gène est alors considéré comme non essentiel à la croissance dans les conditions du laboratoire (photoautotrophie). Les mutants peuvent également être « non ségrégés », on trouve dans ce cas encore la présence de copies du gène d'intérêt malgré plusieurs générations sur milieu sélectif. Le gène est alors qualifié d'essentiel à la croissance dans les conditions du laboratoire.
La ségrégation des mutants est testée par PCR lorsque ces derniers sont cultivés sur milieu sélectif et après plusieurs générations sur milieu non sélectif. La culture sur milieu non sélectif fera resurgir le phénotype « non ségrégé » si les mutants possèdent encore des copies du gène sauvage.

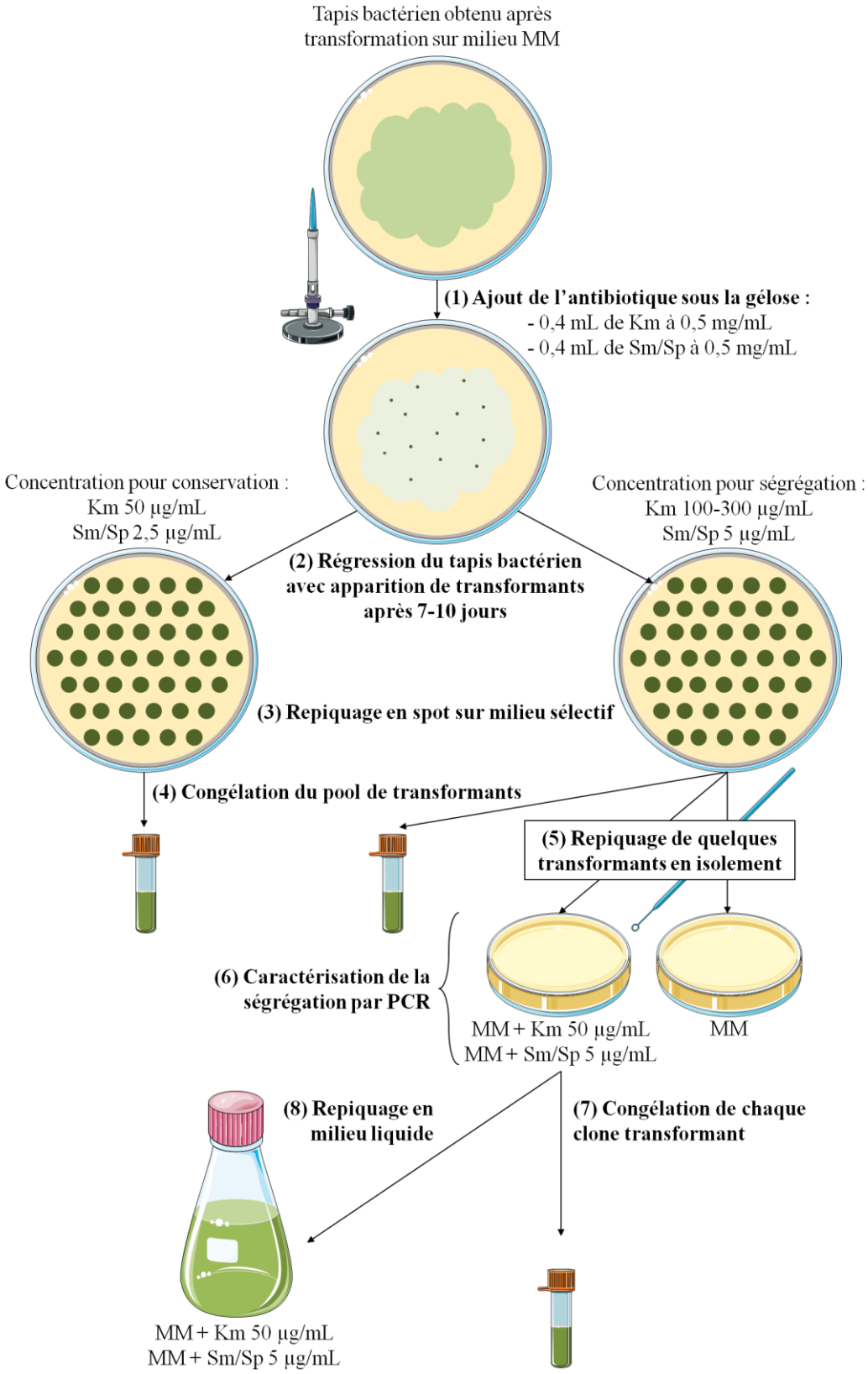


Figure 115 Représentation schématique des étapes permettant l'obtention des mutants de délétion. Extraite de (Kammerscheit, 2019).

V. Etudes des souches productrices de terpènes

1. Etude phénotypique des souches productrices de terpènes

L'introduction d'un plasmide codant pour un gène hétérologue (ici une terpène synthase) peut avoir un effet délétère sur la croissance de la cyanobactérie hôte. Afin d'évaluer l'impact de l'expression des gènes codant pour les terpènes synthases et de la production de terpènes, des courbes de croissance ont été réalisées.
Dans le même temps, l'effet du dodécane, la molécule hydrophobe utilisée pour piéger les terpènes (Davies *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2017; Lin *et al.*, 2017; Sebesta and Peebles, 2019; Chenebault *et al.*, 2020; Dienst *et al.*, 2020), a été étudié. Pour se faire, les courbes de croissance de la souche sauvage de cyanobactéries et des différents mutants ont été réalisées en présence et absence de dodécane (Sigma Aldrich, 20 % v/v_{tot}) ajouté au milieu de culture.

La croissance en milieu liquide a été réalisée avec des cultures calibrées à une DO_{750nm} initiale particulière définie dans le tableau 36 (pour suivre toutes les phases de croissance) préparées à partir de pré-cultures en milieu de phase exponentielle. Les différentes cultures obtenues ont été incubées dans les conditions standard définies pour chaque souche (en présence d'antibiotiques pour les mutants et en présence ou absence de dodécane). La $DO_{750\ nm}$ des cultures a été mesurée régulièrement et des photos ont été prises afin de suivre l'aspect macroscopique de la culture.

Tableau 36 DO_{750nm} initiale et concentration cellulaire utilisées pour chaque souche de cyanobactérie afin de suivre toutes les phases de croissance sans avoir une phase de latence trop longue

Souche de cyanobactéries	DO_{750nm} initiale	Concentration cellulaire
Synechocystis PCC 6803	DOi = 0,02	9×10^5 cellules/mL
Synechococcus PCC 7942	DOi = 0,02	$1,4 \times 10^6$ cellules/mL
Synechococcus PCC 7002	DOi = 0,02	2×10^6 cellules/mL
Cyanothece PCC 7425	DOi = 0,1	$2,6 \times 10^6$ cellules/mL
Cyanothece PCC 7822	DOi = 0,1	5×10^5 cellules/mL

Ces tests sont réalisés comme suit (Figure 116).

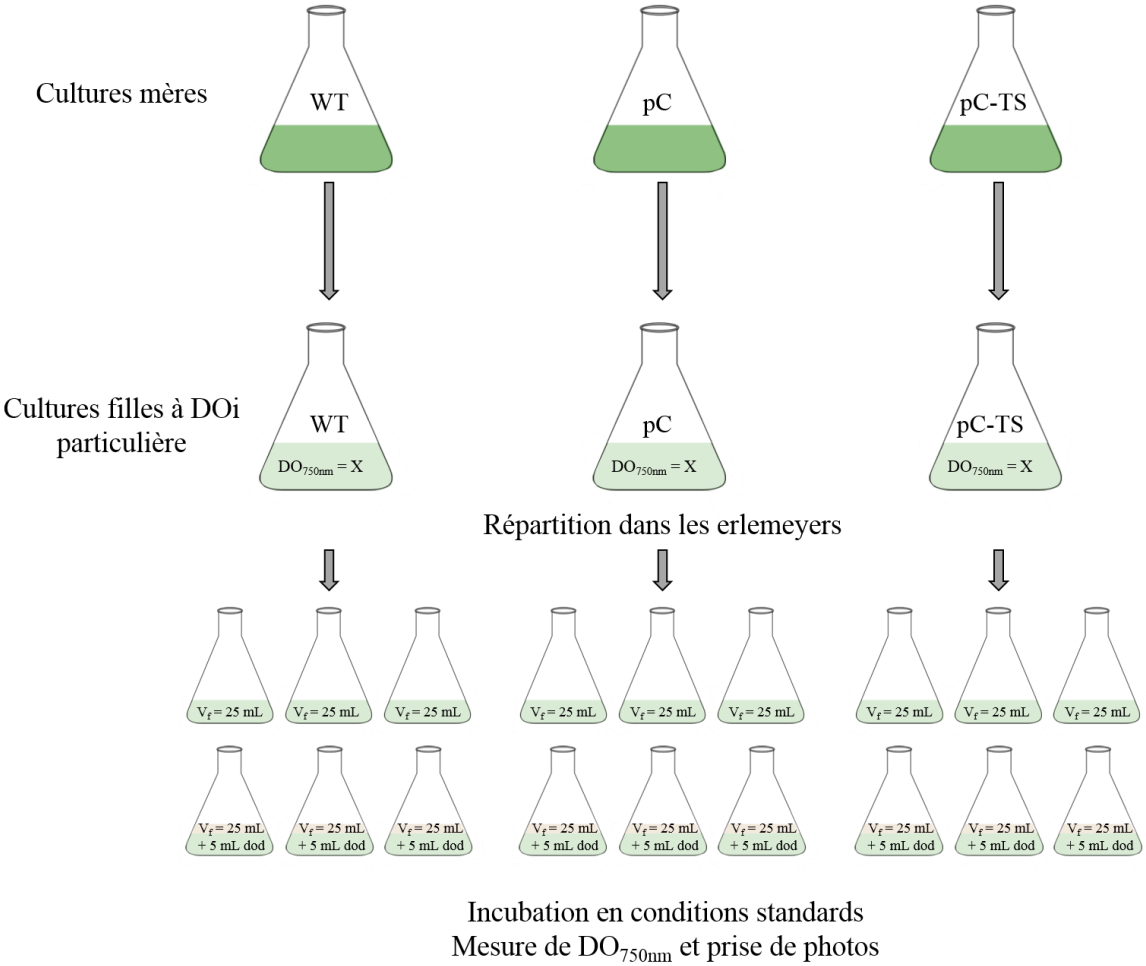


Figure 116 Dilution d'une culture de cyanobactérie pour obtenir une culture fille à la $DO_{initiale}$ voulue. Puis la culture fille est répartie dans différents erlenmeyers afin de réaliser une courbe de croissance en triplicats. Dans le cas d'une courbe de croissance d'une souche productrice de terpènes, la manipulation est réalisée avec et sans dodécane.

2. Quantification des terpènes produits par la méthode GC-MS

Le dodécane forme une couche au-dessus de la culture lorsqu'elle n'est pas agitée. Il peut ainsi être prélevé et être utilisé pour quantifier par GC-MS le terpène produit. Le principe de la méthode GC-MS et la mise au point du protocole de quantification des terpènes est détaillée dans la partie résultats et discussion. Je vais par conséquent donner uniquement ici les détails techniques.

200 µL des échantillons de dodécane prélevé sont transférés dans des chromacoles (Fisherbrand™ Flacon de 8 mm à col vissant, verre transparent de 1,65 mL, insert de 200 µL) et 10 mg/L de standard interne sont ajoutés (Tableau 37 et 38).

Tableau 37 Liste des produits utilisés pour le dosage des terpènes

Terpènes	Référence
S-(-)-limonène	62128, Supelco
α-pinène	80599, Supelco
Mix d'isomères de farnesène et de bisabolène	W383902 Sigma aldrich
Huile de bois de santal	Firmenich
β-caryophyllène	75541 Supelco
Cis/trans-nerolidol	00459 Sigma aldrich

Tableau 38 Volume de standard interne ajouté dans les 200 µL du dodécane contenant les terpènes à quantifier.

Terpènes à quantifier	Standard interne (IS)	Concentration de la solution mère d'IS (1/1000 du stock commercial)	Volume de la solution mère d'IS à ajouter dans 200 µL d'échantillon
Limonène	Pinène	0,858 g/L	2,3 µL
Pinène	Limonène	0,841 g/L	2,4 µL
Bisabolène	β-caryophyllène	0,905 g/L	2,2 µL
Farnésène	β-caryophyllène	0,905 g/L	2,2 µL
Santalène	Trans-nérolidol	0,88 g/L	2,27 µL

VI. Dosages enzymatiques

1. Cassage des cellules à la presse de Eaton

Pour effectuer les divers dosages (CAT, β-Galactosoidase), des extraits cellulaires ont été préparés à l'aide de la presse de Eaton à froid (Figure 117). Cette méthode consiste à réaliser de la cryofracture des cellules.

Les cultures sont transférées dans des tubes Falcon de 50 mL puis centrifugées (12 minutes à 5000 rpm/4500 g à 4°C). Le milieu de culture ôté, les cellules sont resuspendues dans 2 mL du tampon qui sera utilisé pour le dosage. Dans le cas du dosage CAT et β-gal, ce tampon est le Tris-HCl 50 mM à pH = 8.

Les 2 mL contenant les cellules sont ensuite transférés dans des presses préalablement refroidies dans un mélange d'éthanol et de carboglace (-70°C). Les cellules sont ainsi congelées avant d'être comprimées sous une pression de 6 tonnes à l'aide d'une presse de Eaton (photo ci-dessous). Le 'broyat' est récupéré dans un tube collecteur (Corex de 30 ml) avant d'être transféré, une fois décongelé, dans un tube Eppendorf. L'extrait cellulaire est centrifugé (4°C, 10 000 rpm pendant 20 minutes) et le surnageant contenant les protéines est réparti dans plusieurs tubes Eppendorf (cela permet de faire les dosages plusieurs fois) avant d'être congelé

à -20°C. Dans le cas du dosage β-gal l'activité enzymatique est immédiatement dosée car la congélation peut avoir un effet néfaste sur l'activité de cette enzyme.

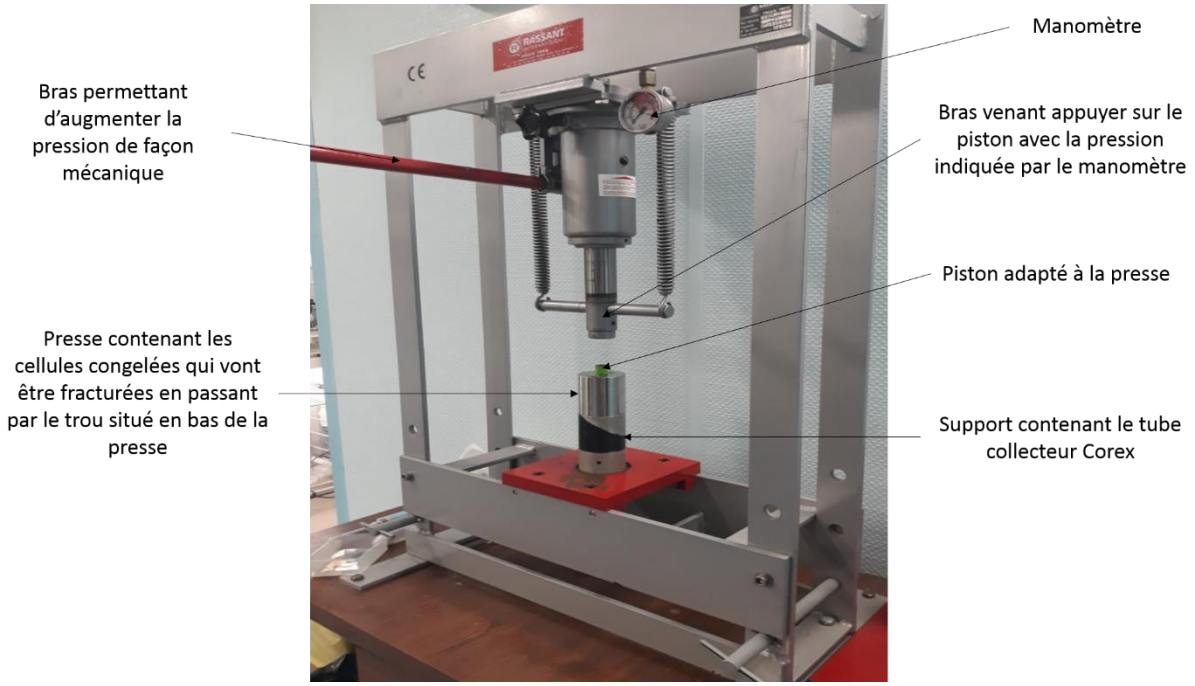


Figure 117 Photographie annotée d'une presse de Eaton

2. Dosage des protéines

Le dosage des protéines est réalisé selon Bradford (Bradford, 1976) en mesurant l'absorbance à 595 nm après addition du réactif de Bradford (Biorad protein assay reagent). Une solution de BSA à 1 mg/mL est utilisée pour réaliser la gamme étalon.

3. Dosage de l'activité chloramphénicol acyl transférase

a. Présentation de la réaction

Acétylation du chloramphénicol

Chloramphénicol + acetyl S- coA --------> 3 acétoxychloramphénicol + H-S-coA

Réduction du DTNB

DTNB + H-S-CoA ----------> TNB-S-S-coA + TNB

On enregistre la cinétique d'apparition de TNB qui absorbe à 412 nm.

b. Les différents réactifs

- Acétyl CoA 1 mM (PM acétyl coA = 881 g/mol)

Il faut resuspendre les 25 mg d'Acétyl CoA Lithium salt (A2181, Sigma-Aldrich) en ajoutant 10 mL d'eau distillée stérile dans le flacon puis mélanger et transvaser dans un Falcon stérile et recommencer l'opération avec 10 mL + 8,37 mL (volume final = 28,37 mL). La solution est ensuite aliquotée en fractions de 2 mL dans des tubes eppendorf et stocker à -20°C.

- Chloramphénicol 5 mM (PM=323,14)

Il faut dissoudre 32,30 mg dans 20 mL d'eau distillée puis stériliser par filtration au travers d'un filtre 0,2 µm et aliquoter en fractions de 250 µL dans des tubes eppendorf et stocker à -20°C.

- DTNB 5,5'- Dithiobis-2-Nitrobenzoïc acid (PM=396,4 g/mol; D-8130 Sigma-Aldrich)

Il faut préparer 40 mL de solution à 2 mg/mL dans du Tris HCl 0.5M, pH = 8 et aliquoter en fractions de 2 mL, dans des eppendorfs et stocker à -20°C à l'obscurité.

c. Mesure de l'activité

Juste avant les dosages, préparer dans un tube Falcon stérile **10 mL** de solution que l'on place dans la glace, à l'abri de la lumière :

- **2 mL** de **DTNB** (2 mg / mL) dissout dans du Tris HCl 0.5 M pH 8
- 1 mL Acétyl CoA (1 mM)
- 7 mL d'H_20 ultrapure et stérile.

200 µL de mix réactionnel (V_r, Tris HCl 100 mM pH 8, DTNB (0.4 mg/mL), Acétyl CoA (0.1 mM) est distribué dans les puits d'une plaque 96 puits (Greiner bio-one, type « Clear ») et est mélangé à des volumes variables d'extrait cellulaire (V_e variant de 0,2 à 10 µL selon l'activité attendue). La ligne de base à 412 nm à 30°C est ensuite enregistrée pendant 3 minutes en utilisant le lecteur de microplaque (ClarioStar ; BMG Labtech) puis 5 µL de chloramphénicol (V_{cm} = 5 mM) sont ajoutés afin de déclencher la réaction d'acétylation de ce dernier. L'apparition du TNB (absorbant à 412 nm) est alors proportionnelle à l'acétylation du chloramphénicol (comme décrit dans le i.) La pente initiale de la droite obtenue nous indique par conséquent l'activité CAT en nmol de chloramphénicol acétylé par minute. Chaque mesure est effectuée en triplicats techniques (3 volumes d'extraits cellulaires différents) et duplicats biologiques (2 cultures de cyanobactéries).

L'activité CAT est définie par l'équation suivante :

$$\text{Activité spécifique (nmol . min}^{-1}\ \text{mg}^{-1}\ \text{Protéines)} = \frac{\Delta P \times 10^6 \times V_{total}}{13{,}6 \times V_e \times \text{Protéines}}$$

Où Δ P = différence entre les pentes "avant addition Cm" - "après addition Cm"
Protéines = concentration en protéines (mg/L) dans l'extrait brut (voir dosage des protéines).
Vtotal (exprimé en mL) = $V_r + V_e + V_{cm}$
V_e = volume d'extrait brut cyano (0,2 à 10 µL)

4. Dosage de l'activité beta-galactosidase

a. Présentation de la réaction et principe du dosage

La beta-galactosidase est une enzyme capable d'hydrolyser des β-galactosides en oses simples. Le dosage de l'activité beta-galactosidase repose donc sur cette activité enzymatique (Figure 118). Il s'agit du clivage de la liaison beta-galactoside du 2-nitrophényl-β-D-galactopyranoside (ONPG) en 2-nitrophénol (ONP) et β-D-galactopyranose (galactose). L'ONP absorbe à 420 nm.

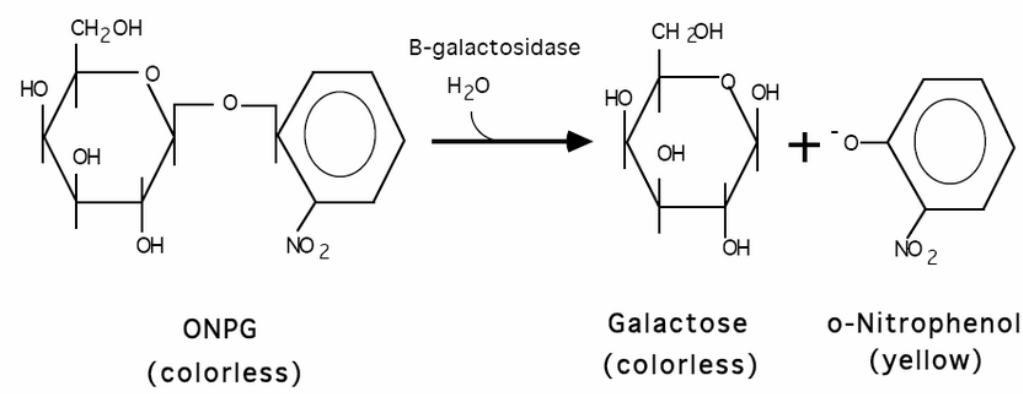


Figure 118 Réaction chimique permettant le dosage de l'activité beta-galactosidase

b. Les tampons

Tampon de réaction (Pour 1 litre à préparer au dernier moment) :

- 16,1 g de $Na_2HPO_4.7H_2O$
- 5,5 g de $NaH_2PO_4.4H_2O$
- 0,75 g de KCl
- 0,246 g de $MgSO_4.7H_2O$
- 2,7 mL de β-mercaptoethanol

Le pH est ajusté à 7.0.

Tampon A (pour 1 litre, tampon utilisé pour préparer l'ONPG) :

- 13,7 g de K_2HPO_4. $3H_2O$
- 4,5 g de KH_2PO_4
- 1 g de $(NH_4)2SO_4$
- 0,5 g de sodium citrate.$2H_2O$

c. Mesure de l'activité

L'activité a été mesurée en utilisant le lecteur de microplaque (ClarioStar ; BMG Labtech). Dans des plaques 96 puits (Greiner bio-one, type « Clear »), 200 µL de tampon de réaction (V_r) ont été mélangés à différentes quantités d'extrait cellulaire (V_e variant de 1 à 40 µL selon l'activité attendue).
La ligne de base à DO_{420nm} est mesurée pendant 3 minutes puis la réaction commence en ajoutant 40 µL d'ONPG (V_{ONPG}, 4 mg/mL dans le tampon A). La pente est alors enregistrée à DO_{420nm}. Le coefficient directeur de cette droite permet de déterminer l'activité (en nmole ONP/min/mg de protéines) à partir de l'équation :

$$\text{Activité} = \frac{\Delta P \times 10^6 \times V_{total}}{4{,}5 \times V_e \times \text{Protéines}}$$

Où ΔP = différence entre les pentes "avant addition ONPG" - "après addition ONPG "
V_{total} (en mL) = $V_r + V_e + V_{ONPG}$
Protéines = concentration en protéines (mg/L) dans l'extrait brut (voir dosage des protéines)
V_e = volume d'extrait brut cyanobactérie (1 à 40 µL)

VII. Microscopie

Les cyanobactéries recombinantes produisant la GFP ou une protéine de fusion (protéine d'intérêt-gfp) ont été récoltées et centrifugées afin d'augmenter la concentration cellulaire. Les cellules ont ensuite été immobilisées en « sandwich » par deux lamelles (22 mm de diamètre, Paul Marienfeld GmbH & Co. KG) dont l'une était recouverte d'une couche de Poly-L-lysine (Sigma-Aldrich). Ce sandwich est placé à l'intérieur d'un porte-échantillon et est placé sur un microscope inversé Nikon Ti-U équipé d'un objectif à immersion 100x (NA 1,45) et couplé à une caméra CCD iXon ULTRA 897 (Andor Technology).
Les images d'épifluorescence ont été enregistrées en utilisant une source de lumière plasma (HPLS245 Thorlabs, Inc.) et un filtre d'excitation (MF469-35 Thorlabs, Inc.). Pour les images en super-résolution à balayage laser, un laser à 488 nm (OBIS, Coherent) a été utilisé comme source d'excitation. La fluorescence de la chlorophylle et de la GFP ont été enregistrées en utilisant des filtres d'émission ET655LP (Chroma Technology Corporation) et MF525 / 39 (Thorlabs, Inc.), respectivement.

Bibliographie

Abernathy, M.H., Yu, J., Ma, F., Liberton, M., Ungerer, J., Hollinshead, W.D., Gopalakrishnan, S., He, L., Maranas, C.D., Pakrasi, H.B., Allen, D.K., Tang, Y.J., 2017. Deciphering cyanobacterial phenotypes for fast photoautotrophic growth via isotopically nonstationary metabolic flux analysis. Biotechnol. Biofuels 10, 273. https://doi.org/10.1186/s13068-017-0958-y

Adapa, L.M., Azimi, Y., Singh, S., Porcelli, D., Thompson, I.P., 2016. Comparative study of chemical and physical methods for distinguishing between passive and metabolically active mechanisms of water contaminant removal by biofilms. Water Res. 101, 574–581. https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.06.015

Aden, A., Ruth, M., Ibsen, K., Jechura, J., Neeves, K., Sheehan, J., Wallace, B., Montague, L., Slayton, A., Lukas, J., 2002. Lignocellulosic Biomass to Ethanol Process Design and Economics Utilizing Co-Current Dilute Acid Prehydrolysis and Enzymatic Hydrolysis for Corn Stover, NREL report

Adorjan, B., Buchbauer, G., 2010. Biological properties of essential oils: an updated review. Flavour Fragr. J. 25, 407–426. https://doi.org/10.1002/ffj.2024

Ajikumar, P.K., Tyo, K., Carlsen, S., Mucha, O., Phon, T.H., Stephanopoulos, G., 2008. Terpenoids: Opportunities for Biosynthesis of Natural Product Drugs Using Engineered Microorganisms. Mol. Pharm. 5, 167–190. https://doi.org/10.1021/mp700151b

Ajikumar, P.K., Xiao, W.-H., Tyo, K.E.J., Wang, Y., Simeon, F., Leonard, E., Mucha, O., Phon, T.H., Pfeifer, B., Stephanopoulos, G., 2010. Isoprenoid Pathway Optimization for Taxol Precursor Overproduction in Escherichia coli. Science 330, 70–74. https://doi.org/10.1126/science.1191652

Akutagawa, S., Taketomi, T., Kumobayashi, H., Takayama, K., Someya, T., Otsuka, S., 1978. Metal-Assisted Terpenoid Synthesis. V. The Catalytic Trimerization of Isoprene to trans-β-Farnesene and Its Synthetic Applications for Terpenoids. Bull. Chem. Soc. Jpn. 51, 1158–1162. https://doi.org/10.1246/bcsj.51.1158

Albertsen, L., Chen, Y., Bach, L.S., Rattleff, S., Maury, J., Brix, S., Nielsen, J., Mortensen, U.H., 2011. Diversion of Flux toward Sesquiterpene Production in Saccharomyces cerevisiae by Fusion of Host and Heterologous Enzymes. Appl. Environ. Microbiol. 77, 1033–1040. https://doi.org/10.1128/AEM.01361-10

Alonso, W.R., Rajaonarivony, J.I., Gershenzon, J., Croteau, R., 1992. Purification of 4S-limonene synthase, a monoterpene cyclase from the glandular trichomes of peppermint (Mentha x piperita) and spearmint (Mentha spicata). J. Biol. Chem. 267, 7582–7587.

Alper, H., Jin, Y.-S., Moxley, J.F., Stephanopoulos, G., 2005a. Identifying gene targets for the metabolic engineering of lycopene biosynthesis in Escherichia coli. Metab. Eng. 7, 155–164. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2004.12.003

Alper, H., Miyaoku, K., Stephanopoulos, G., 2005b. Construction of lycopene-overproducing E. coli strains by combining systematic and combinatorial gene knockout targets. Nat. Biotechnol. 23, 612–616. https://doi.org/10.1038/nbt1083

Amaro, H.M., Guedes, A.C., Malcata, F.X., 2011. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. Appl. Energy, Special Issue of Energy from algae: Current status and future trends 88, 3402–3410. https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.12.014

Anastas, P.T., Warner, J.C., 2000. Green chemistry: theory and practice, 1. paperback. ed. Oxford Univ. Press, Oxford.

Anfelt, J., Kaczmarzyk, D., Shabestary, K., Renberg, B., Rockberg, J., Nielsen, J., Uhlén, M., Hudson, E.P., 2015. Genetic and nutrient modulation of acetyl-CoA levels in Synechocystis for n-butanol production. Microb. Cell Factories 14, 167. https://doi.org/10.1186/s12934-015-0355-9

Angermayr, S.A., Van der Woude, A.D., Correddu, D., Vreugdenhil, A., Verrone, V., Hellingwerf, K.J., 2014. Exploring metabolic engineering design principles for the photosynthetic production of lactic acid by Synechocystis sp. PCC6803. Biotechnol. Biofuels 7, 99. https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-99

Arnison, P.G., Bibb, M.J., Bierbaum, G., Bowers, A.A., Bugni, T.S., Bulaj, G., Camarero, J.A., Campopiano, D.J., Challis, G.L., Clardy, J., Cotter, P.D., Craik, D.J., Dawson, M., Dittmann, E., Donadio, S., Dorrestein, P.C., Entian, K.-D., Fischbach, M.A., Garavelli, J.S., Göransson, U., Gruber, C.W., Haft, D.H., Hemscheidt, T.K., Hertweck, C., Hill, C., Horswill, A.R., Jaspars, M., Kelly, W.L., Klinman, J.P., Kuipers, O.P., Link, A.J., Liu, W., Marahiel, M.A., Mitchell, D.A., Moll, G.N., Moore, B.S., Müller, R., Nair, S.K., Nes, I.F., Norris, G.E., Olivera, B.M., Onaka, H., Patchett, M.L., Piel, J., Reaney, M.J.T., Rebuffat, S., Ross, R.P., Sahl, H.-G., Schmidt, E.W., Selsted, M.E., Severinov, K., Shen, B., Sivonen, K., Smith, L., Stein, T., Süssmuth, R.D., Tagg, J.R., Tang, G.-L., Truman, A.W., Vederas, J.C., Walsh, C.T., Walton, J.D., Wenzel, S.C., Willey, J.M., Van der Donk, W.A., 2013.

Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature. Nat. Prod. Rep. 30, 108–160. https://doi.org/10.1039/c2np20085f

Aryal, U.K., Callister, S.J., Mishra, S., Zhang, X., Shutthanandan, J.I., Angel, T.E., Shukla, A.K., Monroe, M.E., Moore, R.J., Koppenaal, D.W., Smith, R.D., Sherman, L., 2013. Proteome Analyses of Strains ATCC 51142 and PCC 7822 of the Diazotrophic Cyanobacterium Cyanothece sp. under Culture Conditions Resulting in Enhanced H2 Production. Appl. Environ. Microbiol. 79, 1070–1077. https://doi.org/10.1128/AEM.02864-12

Asadollahi, M.A., Maury, J., Patil, K.R., Schalk, M., Clark, A., Nielsen, J., 2009. Enhancing sesquiterpene production in Saccharomyces cerevisiae through in silico driven metabolic engineering. Metab. Eng. 11, 328–334. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2009.07.001

Atsumi, S., Higashide, W., Liao, J.C., 2009. Direct photosynthetic recycling of carbon dioxide to isobutyraldehyde. Nat. Biotechnol. 27, 1177.

Awramik, S.M., 1992. The oldest records of photosynthesis. Photosynth. Res. 33, 75–89. https://doi.org/10.1007/BF00039172

Babcock, B.A., Fabiosa, J.F., 2011. The impact of ethanol and ethanol subsidies on corn prices: revisiting history.

Badger, M.R., Price, G.D., Long, B.M., Woodger, F.J., 2006. The environmental plasticity and ecological genomics of the cyanobacterial CO2 concentrating mechanism. J. Exp. Bot. 57, 249–265. https://doi.org/10.1093/jxb/eri286

Baier, K., Nicklisch, S., Grundner, C., Reinecke, J., Lockau, W., 2001. Expression of two nblA-homologous genes is required for phycobilisome degradation in nitrogen-starved Synechocystis sp. PCC6803. FEMS Microbiol. Lett. 195, 35–39. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10494.x

Bandyopadhyay, A., Elvitigala, T., Welsh, E., Stöckel, J., Liberton, M., Min, H., Sherman, L.A., Pakrasi, H.B., 2011. Novel Metabolic Attributes of the Genus Cyanothece, Comprising a Group of Unicellular Nitrogen-Fixing Cyanobacteria. mBio 2. https://doi.org/10.1128/mBio.00214-11

Bandyopadhyay, A., Elvitigala, T., Liberton, M., Pakrasi, H.B., 2013. Variations in the rhythms of respiration and nitrogen fixation in members of the unicellular diazotrophic cyanobacterial genus Cyanothece. Plant Physiol. 161, 1334–1346. https://doi.org/10.1104/pp.112.208231

Banerjee, A., Wu, Y., Banerjee, R., Li, Y., Yan, H., Sharkey, T.D., 2013. Feedback inhibition of deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase regulates the methylerythritol 4-phosphate pathway. J. Biol. Chem. 288, 16926–16936. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.464636

Banerjee, A., Sharkey, T.D., 2014. Methylerythritol 4-phosphate (MEP) pathway metabolic regulation. Nat. Prod. Rep. 31, 1043–1055. https://doi.org/10.1039/C3NP70124G

Barkley, S.J., Desai, S.B., Poulter, C.D., 2004. Type II Isopentenyl Diphosphate Isomerase from Synechocystis sp. Strain PCC 6803. J. Bacteriol. 186, 8156–8158. https://doi.org/10.1128/JB.186.23.8156-8158.2004

Barros, M.T., Petrova, K.T., Ramos, A.M., 2007. Potentially Biodegradable Polymers Based on α- or β-Pinene and Sugar Derivatives or Styrene, Obtained under Normal Conditions and on Microwave Irradiation. Eur. J. Org. Chem. 2007, 1357–1363. https://doi.org/10.1002/ejoc.200600890

Baser, K.H., Buchbauer, G., 2015. Aromatherapy with essential oils, in: Handbook of Essential Oils. Science, Technology, and Applications.

Batterton, J.C., Van Baalen, C., 1971. Growth responses of blue-green algae to sodium chloride concentration. Arch. Für Mikrobiol. 76, 151–165. https://doi.org/10.1007/BF00411789

Beal, C.M., Stillwell, A.S., King, C.W., Cohen, S.M., Berberoglu, H., Bhattarai, R.P., Connelly, R.L., Webber, M.E., Hebner, R.E., 2012. Energy return on investment for algal biofuel production coupled with wastewater treatment. Water Environ. Res. Publ. Water Environ. Fed. 84, 692–710. https://doi.org/10.2175/106143012x13378023685718

Beckmann, J., Lehr, F., Finazzi, G., Hankamer, B., Posten, C., Wobbe, L., Kruse, O., 2009. Improvement of light to biomass conversion by de-regulation of light-harvesting protein translation in Chlamydomonas reinhardtii. J. Biotechnol., Solar Bio-Fuels 142, 70–77. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.02.015

Behr, A., Johnen, L., 2009. Myrcene as a Natural Base Chemical in Sustainable Chemistry: A Critical Review. ChemSusChem 2, 1072–1095. https://doi.org/10.1002/cssc.200900186

Benjamin, K.R., Silva, I.R., Cherubim, J.P., McPhee, D., Paddon, C.J., 2016. Developing Commercial Production of Semi-Synthetic Artemisinin, and of β-Farnesene, an Isoprenoid Produced by Fermentation of Brazilian Sugar. J. Braz. Chem. Soc. https://doi.org/10.5935/0103-5053.20160119

Bentley, F.K., García-Cerdán, J.G., Chen, H.-C., Melis, A., 2013. Paradigm of Monoterpene (β-phellandrene) Hydrocarbons Production via Photosynthesis in Cyanobacteria. BioEnergy Res. 6, 917–929. https://doi.org/10.1007/s12155-013-9325-4

Bentley, F.K., Zurbriggen, A., Melis, A., 2014. Heterologous expression of the mevalonic acid pathway in cyanobacteria enhances endogenous carbon partitioning to isoprene. Mol. Plant 7, 71–86. https://doi.org/10.1093/mp/sst134

Benzerara, K., Skouri-Panet, F., Li, J., Férard, C., Gugger, M., Laurent, T., Couradeau, E., Ragon, M., Cosmidis, J., Menguy, N., Margaret-Oliver, I., Tavera, R., López-García, P., Moreira, D., 2014. Intracellular Ca-carbonate biomineralization is widespread in cyanobacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. 111, 10933–10938. https://doi.org/10.1073/pnas.1403510111

Berla, B.M., Saha, R., Immethun, C.M., Maranas, C.D., Moon, T.S., Pakrasi, H.B., 2013. Synthetic biology of cyanobacteria: unique challenges and opportunities. Front. Microbiol. 4, 246. https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00246

Bernstein, H.C., Konopka, A., Melnicki, M.R., Hill, E.A., Kucek, L.A., Zhang, S., Shen, G., Bryant, D.A., Beliaev, A.S., 2014. Effect of mono- and dichromatic light quality on growth rates and photosynthetic performance of Synechococcus sp. PCC 7002. Front. Microbiol. 5, 488. https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00488

Bhaya, D., 2004. Light matters: phototaxis and signal transduction in unicellular cyanobacteria. Mol. Microbiol. 53, 745–754. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04160.x

Birkbeck, A.A., 2010. Challenges in the Synthesis of Natural and Non-Natural Volatiles, in: The Chemistry and Biology of Volatiles. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 173–202. https://doi.org/10.1002/9780470669532.ch7

Birkbeck, A.A., 2017. The Synthesis of Fragrant Natural Products from Santalum album L .: (+)-(*Z*)-α-Santalol and (–)-(*Z*)-β-Santalol. Chim. Int. J. Chem. 71, 823–835. https://doi.org/10.2533/chimia.2017.823

Bitok, J.K., Meyers, C.F., 2012. 2C-Methyl-d-erythritol 4-phosphate enhances and sustains cyclodiphosphate synthase IspF activity. ACS Chem. Biol. 7, 1702–1710. https://doi.org/10.1021/cb300243w

Blondeau, M., Sachse, M., Boulogne, C., Gillet, C., Guigner, J.-M., Skouri-Panet, F., Poinsot, M., Ferard, C., Miot, J., Benzerara, K., 2018. Amorphous Calcium Carbonate Granules Form Within an Intracellular Compartment in Calcifying Cyanobacteria. Front. Microbiol. 9. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01768

Bode, S., Quentmeier, C.C., Liao, P.-N., Hafi, N., Barros, T., Wilk, L., Bittner, F., Walla, P.J., 2009. On the regulation of photosynthesis by excitonic interactions between carotenoids and chlorophylls. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106, 12311–12316. https://doi.org/10.1073/pnas.0903536106

Bommareddy, A., Brozena, S., Steigerwalt, J., Landis, T., Hughes, S., Mabry, E., Knopp, A., VanWert, A.L., Dwivedi, C., 2019. Medicinal properties of alpha-santalol, a naturally occurring constituent of sandalwood oil: review. Nat. Prod. Res. 33, 527–543. https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1399387

Bott, R.R., Cervin, M.A., Jr, J.T.K., McAuliffe, J.C., Miasnikov, A., Peres, C.M., Rife, C.L., Wells, D.H., Weyler, W., Whited, G.M., 2012. Isoprene synthase variants for improved microbial production of isoprene. US8173410B2.

Bracher, A., Whitney, S.M., Hartl, F.U., Hayer-Hartl, M., 2017. Biogenesis and Metabolic Maintenance of Rubisco. Annu. Rev. Plant Biol. 68, 29–60. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-111633

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248–254. https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3

Brandon, J.A., Jones, W., Ohman, M.D., 2019. Multidecadal increase in plastic particles in coastal ocean sediments. Sci. Adv. 5, eaax0587. https://doi.org/10.1126/sciadv.aax0587

Bruns, B.U., Briggs, W.R., Grossman, A.R., 1989. Molecular characterization of phycobilisome regulatory mutants of Fremyella diplosiphon. J. Bacteriol. 171, 901–908. https://doi.org/10.1128/jb.171.2.901-908.1989

Bryant, D.A., 2006. The Molecular Biology of Cyanobacteria. Springer Science & Business Media.

Burgess, B.K., Lowe, D.J., 1996. Mechanism of Molybdenum Nitrogenase. Chem. Rev. 96, 2983–3012. https://doi.org/10.1021/cr950055x

Cam, N., Georgelin, T., Jaber, M., Lambert, J.-F., Benzerara, K., 2015. In vitro synthesis of amorphous Mg-, Ca-, Sr- and Ba-carbonates: what do we learn about intracellular calcification by cyanobacteria? Geochim. Cosmochim. Acta 161, 36–49. https://doi.org/10.1016/j.gca.2015.04.003

Cano, M., Holland, S.C., Artier, J., Burnap, R.L., Ghirardi, M., Morgan, J.A., Yu, J., 2018. Glycogen Synthesis and Metabolite Overflow Contribute to Energy Balancing in Cyanobacteria. Cell Rep. 23, 667–672. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.083

Cao, Y.-Q., Li, Q., Xia, P.-F., Wei, L.-J., Guo, N., Li, J.-W., Wang, S.-G., 2017. AraBAD Based Toolkit for Gene Expression and Metabolic Robustness Improvement in *Synechococcus elongatus*. Sci. Rep. 7, 18059. https://doi.org/10.1038/s41598-017-17035-4

Carretero-Paulet, L., Lipska, A., Pérez-Gil, J., Sangari, F.J., Albert, V.A., Rodríguez-Concepción, M., 2013. Evolutionary diversification and characterization of the eubacterial gene family encoding DXR type II, an alternative isoprenoid biosynthetic enzyme. BMC Evol. Biol. 13, 180. https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-180

Cassier-Chauvat, C., Chauvat, F., 2014. Cell division in cyanobacteria, in: The Biology of Cyanobacteria.

Cassier-Chauvat, C., Veaudor, T., Chauvat, F., 2016. Comparative Genomics of DNA Recombination and Repair in Cyanobacteria: Biotechnological Implications. Front. Microbiol. 7, 1809. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01809

Cassier-Chauvat, C., Dive, V., Chauvat, F., 2017. Cyanobacteria: photosynthetic factories combining biodiversity, radiation resistance, and genetics to facilitate drug discovery. Appl. Microbiol. Biotechnol. 101, 1359–1364. https://doi.org/10.1007/s00253-017-8105-z

Cassier-Chauvat, C., Chauvat, F., 2018. Cyanobacteria: Wonderful Microorganisms for Basic and Applied Research, in: John Wiley & Sons Ltd (Ed.), ELS. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 1–11. https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0027884

Chang, W., Song, H., Liu, H., Liu, P., 2013. Current Development in Isoprenoid Precursor Biosynthesis and Regulation. Curr. Opin. Chem. Biol. 17, 571–579. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.06.020

Chardonnet, S., Sakr, S., Cassier-Chauvat, C., Le Maréchal, P., Chauvat, F., Lemaire, S.D., Decottignies, P., 2015. First Proteomic Study of S-Glutathionylation in Cyanobacteria. J. Proteome Res. 14, 59–71. https://doi.org/10.1021/pr500625a

Chauvat, F., Astier, C., Vedel, F., Joset-Espardellier, F., 1983. Transformation in the cyanobacterium Synechococcus R2: improvement of efficiency; role of the pUH24 plasmid. Mol. Gen. Genet. MGG 191, 39–45. https://doi.org/10.1007/BF00330887

Chauvat, F., Vries, L.D., Ende, A.V. der, Arkel, G.A.V., 1986. A host-vector system for gene cloning in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. Mol. Gen. Genet. MGG 204, 185–191. https://doi.org/10.1007/BF00330208

Chaves, J., Kirst, H., Melis, A., 2014. Isoprene production in Synechocystis under alkaline and saline growth conditions. J. Appl. Phycol. 27. https://doi.org/10.1007/s10811-014-0395-2

Cheah, Y.E., Xu, Y., Sacco, S.A., Babele, P.K., Zheng, A.O., Johnson, C.H., Young, J.D., 2020. Systematic identification and elimination of flux bottlenecks in the aldehyde production pathway of Synechococcus elongatus PCC 7942. Metab. Eng. 60, 56–65. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2020.03.007

Checchetto, V., Segalla, A., Allorent, G., La Rocca, N., Leanza, L., Giacometti, G.M., Uozumi, N., Finazzi, G., Bergantino, E., Szabò, I., 2012. Thylakoid potassium channel is required for efficient photosynthesis in cyanobacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 109, 11043–11048. https://doi.org/10.1073/pnas.1205960109

Chen, L., Wu, L., Wang, J., Zhang, W., 2014. Butanol tolerance regulated by a two-component response regulator Slr1037 in photosynthetic Synechocystis sp. PCC 6803. Biotechnol. Biofuels 7, 89. https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-89

Chen, X., Schreiber, K., Appel, J., Makowka, A., Fähnrich, B., Roettger, M., Hajirezaei, M.R., Sönnichsen, F.D., Schönheit, P., Martin, W.F., Gutekunst, K., 2016a. The Entner–Doudoroff pathway is an overlooked glycolytic route in cyanobacteria and plants. Proc. Natl. Acad. Sci. 113, 5441–5446. https://doi.org/10.1073/pnas.1521916113

Chen, Y., Holtman, C.K., Magnuson, R.D., Youderian, P.A., Golden, S.S., 2008. The complete sequence and functional analysis of pANL, the large plasmid of the unicellular freshwater cyanobacterium Synechococcus elongatus PCC 7942. Plasmid 59, 176–192. https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2008.01.005

Chen, Z., Li, X., Tan, X., Zhang, Y., Wang, B., 2020. Recent Advances in Biological Functions of Thick Pili in the Cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803. Front. Plant Sci. 11, 241. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00241

Chenebault, C., Diaz-Santos, E., Kammerscheit, X., Görgen, S., Ilioaia, C., Streckaite, S., Gall, A., Robert, B., Marcon, E., Buisson, D.-A., Benzerara, K., Sassi, J.-F., Cassier-Chauvat, C., Chauvat, F., 2020. A Genetic Toolbox for the New Model Cyanobacterium Cyanothece PCC 7425: A Case Study for the Photosynthetic Production of Limonene. Front. Microbiol. 11, 586601. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.586601

Chizzola, R., 2007. Composition of the essential oil from Laser trilobum grown in the wild in Vienna. Chem. Nat. Compd. 43, 484–486. https://doi.org/10.1007/s10600-007-0171-5

Chizzola, R., 2013. Regular Monoterpenes and Sesquiterpenes (Essential Oils), in: Ramawat, K.G., Mérillon, J.-M. (Eds.), Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 2973–3008. https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_130

Choi, S.Y., Lee, H.J., Choi, J., Kim, J., Sim, S.J., Um, Y., Kim, Y., Lee, T.S., Keasling, J.D., Woo, H.M., 2016. Photosynthetic conversion of CO2 to farnesyl diphosphate-derived phytochemicals (amorpha-4,11-diene and squalene) by engineered cyanobacteria. Biotechnol. Biofuels 9, 202. https://doi.org/10.1186/s13068-016-0617-8

Christianson, D.W., 2006. Structural biology and chemistry of the terpenoid cyclases. Chem. Rev. 106, 3412–3442. https://doi.org/10.1021/cr050286w

Chuck, C.J., Donnelly, J., 2014. The compatibility of potential bioderived fuels with Jet A-1 aviation kerosene. Appl. Energy 118, 83–91. https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.12.019

Ciriminna, R., Lomeli-Rodriguez, M., Demma Carà, P., Lopez-Sanchez, J.A., Pagliaro, M., 2014. Limonene: a versatile chemical of the bioeconomy. Chem. Commun. Camb. Engl. 50, 15288–15296. https://doi.org/10.1039/c4cc06147k

Clarens, A.F., Nassau, H., Resurreccion, E.P., White, M.A., Colosi, L.M., 2011. Environmental Impacts of Algae-Derived Biodiesel and Bioelectricity for Transportation. Environ. Sci. Technol. 45, 7554–7560. https://doi.org/10.1021/es200760n

Colby, S.M., Alonso, W.R., Katahira, E.J., McGarvey, D.J., Croteau, R., 1993. 4S-limonene synthase from the oil glands of spearmint (Mentha spicata). cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of the catalytically active monoterpene cyclase. J. Biol. Chem. 268, 23016–23024.

Colica, G., Mecarozzi, P.C., De Philippis, R., 2010. Treatment of Cr(VI)-containing wastewaters with exopolysaccharide-producing cyanobacteria in pilot flow through and batch systems. Appl. Microbiol. Biotechnol. 87, 1953–1961. https://doi.org/10.1007/s00253-010-2665-5

Collier, J.L., Brahamsha, B., Palenik, B., 1999. The marine cyanobacterium Synechococcus sp. WH7805 requires urease (urea amidohydrolase, EC 3.5.1.5) to utilize urea as a nitrogen source: molecular-genetic and biochemical analysis of the enzyme. Microbiol. Read. Engl. 145 (Pt 2), 447–459. https://doi.org/10.1099/13500872-145-2-447

Conrado, R.J., Wu, G.C., Boock, J.T., Xu, H., Chen, S.Y., Lebar, T., Turnšek, J., Tomšič, N., Avbelj, M., Gaber, R., Koprivnjak, T., Mori, J., Glavnik, V., Vovk, I., Benčina, M., Hodnik, V., Anderluh, G., Dueber, J.E., Jerala, R., DeLisa, M.P., 2012. DNA-guided assembly of biosynthetic pathways promotes improved catalytic efficiency. Nucleic Acids Res. 40, 1879–1889. https://doi.org/10.1093/nar/gkr888

Cordoba, E., Salmi, M., León, P., 2009. Unravelling the regulatory mechanisms that modulate the MEP pathway in higher plants. J. Exp. Bot. 60, 2933–2943. https://doi.org/10.1093/jxb/erp190

Couradeau, E., Benzerara, K., Gérard, E., Moreira, D., Bernard, S., Brown, G.E., López-García, P., 2012. An early-branching microbialite cyanobacterium forms intracellular carbonates. Science 336, 459–462. https://doi.org/10.1126/science.1216171

Crane, E.J., 1955. System of nomenclature for terpene hydrocarbons, Copyright, foreword, in: System of nomenclature for terpene hydrocarbonS, Advances in Chemistry. American Chemical Society, pp. i–iv. https://doi.org/10.1021/ba-1955-0014.fw001

Cunningham, F.X., Lafond, T.P., Gantt, E., 2000. Evidence of a role for LytB in the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. J. Bacteriol. 182, 5841–5848. https://doi.org/10.1128/jb.182.20.5841-5848.2000

Dagan, T., Roettger, M., Stucken, K., Landan, G., Koch, R., Major, P., Gould, S.B., Goremykin, V.V., Rippka, R., Tandeau de Marsac, N., Gugger, M., Lockhart, P.J., Allen, J.F., Brune, I., Maus, I., Pühler, A., Martin, W.F., 2013. Genomes of Stigonematalean cyanobacteria (subsection V) and the evolution of oxygenic photosynthesis from prokaryotes to plastids. Genome Biol. Evol. 5, 31–44. https://doi.org/10.1093/gbe/evs117

Danyal, K., Dean, D.R., Hoffman, B.M., Seefeldt, L.C., 2011. Electron Transfer within Nitrogenase: Evidence for a Deficit-Spending Mechanism. Biochemistry 50, 9255–9263. https://doi.org/10.1021/bi201003a

Danyal, K., Shaw, S., Page, T.R., Duval, S., Horitani, M., Marts, A.R., Lukoyanov, D., Dean, D.R., Raugei, S., Hoffman, B.M., Seefeldt, L.C., Antony, E., 2016. Negative cooperativity in the nitrogenase Fe protein electron delivery cycle. Proc. Natl. Acad. Sci. 113, E5783–E5791. https://doi.org/10.1073/pnas.1613089113

Daramwar, P.P., Srivastava, P.L., Priyadarshini, B., Thulasiram, H.V., 2012. Preparative separation of α- and β-santalenes and (Z)-α- and (Z)-β-santalols using silver nitrate-impregnated silica gel medium pressure liquid chromatography and analysis of sandalwood oil. The Analyst 137, 4564. https://doi.org/10.1039/c2an35575b

Davies, F.K., Jinkerson, R.E., Posewitz, M.C., 2015. Toward a photosynthetic microbial platform for terpenoid engineering. Photosynth. Res. 123, 265–284. https://doi.org/10.1007/s11120-014-9979-6

Davies, F.K., Work, V.H., Beliaev, A.S., Posewitz, M.C., 2014. Engineering Limonene and Bisabolene Production in Wild Type and a Glycogen-Deficient Mutant of Synechococcus sp. PCC 7002. Front. Bioeng. Biotechnol. 2, 21. https://doi.org/10.3389/fbioe.2014.00021

De Philippis, R., Colica, G., Micheletti, E., 2011. Exopolysaccharide-producing cyanobacteria in heavy metal removal from water: molecular basis and practical applicability of the biosorption process. Appl. Microbiol. Biotechnol. 92, 697–708. https://doi.org/10.1007/s00253-011-3601-z

De Porcellinis, A.J., Nørgaard, H., Brey, L.M.F., Erstad, S.M., Jones, P.R., Heazlewood, J.L., Sakuragi, Y., 2018. Overexpression of bifunctional fructose-1,6-bisphosphatase/sedoheptulose-1,7-bisphosphatase leads to enhanced photosynthesis and global reprogramming of carbon metabolism in Synechococcus sp. PCC 7002. Metab. Eng. 47, 170–183. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.03.001

Dean, D.R., Bolin, J.T., Zheng, L., 1993. Nitrogenase metalloclusters: structures, organization, and synthesis. J. Bacteriol. 175, 6737–6744. https://doi.org/10.1128/jb.175.21.6737-6744.1993

Demirbas, A., 2011. Biodiesel from oilgae, biofixation of carbon dioxide by microalgae: A solution to pollution problems. Appl. Energy, Special Issue of Energy from algae: Current status and future trends 88, 3541–3547. https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.12.050

Dempo, Y., Ohta, E., Nakayama, Y., Bamba, T., Fukusaki, E., 2014. Molar-Based Targeted Metabolic Profiling of Cyanobacterial Strains with Potential for Biological Production. Metabolites 4, 499–516. https://doi.org/10.3390/metabo4020499

Deng, M.-D., Coleman, J.R., 1999. Ethanol Synthesis by Genetic Engineering in Cyanobacteria. Appl. Environ. Microbiol. 65, 523–528.

Des Marais, D.J., 1991. Microbial mats, stromatolites and the rise of oxygen in the Precambrian atmosphere. Glob. Planet. Change 97, 93–96.

Diaz-Chavez, M.L., Moniodis, J., Madilao, L.L., Jancsik, S., Keeling, C.I., Barbour, E.L., Ghisalberti, E.L., Plummer, J.A., Jones, C.G., Bohlmann, J., 2013. Biosynthesis of Sandalwood Oil: Santalum album CYP76F cytochromes P450 produce santalols and bergamotol. PloS One 8, e75053. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075053

Dienst, D., Wichmann, J., Mantovani, O., Rodrigues, J.S., Lindberg, P., 2020. High density cultivation for efficient sesquiterpenoid biosynthesis in Synechocystis sp. PCC 6803. Sci. Rep. 10. https://doi.org/10.1038/s41598-020-62681-w

Disch, A., Schwender, J., Müller, C., Lichtenthaler, H.K., Rohmer, M., 1998. Distribution of the mevalonate and glyceraldehyde phosphate/pyruvate pathways for isoprenoid biosynthesis in unicellular algae and the cyanobacterium Synechocystis PCC 6714. Biochem. J. 333 (Pt 2), 381–388. https://doi.org/10.1042/bj3330381

Dismukes, G.C., Carrieri, D., Bennette, N., Ananyev, G.M., Posewitz, M.C., 2008. Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. Curr. Opin. Biotechnol. 19, 235–240. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.05.007

Dittmann, E., Gugger, M., Sivonen, K., Fewer, D.P., 2015. Natural Product Biosynthetic Diversity and Comparative Genomics of the Cyanobacteria. Trends Microbiol. 23, 642–652. https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.07.008

Doello, S., Klotz, A., Makowka, A., Gutekunst, K., Forchhammer, K., 2018. A Specific Glycogen Mobilization Strategy Enables Rapid Awakening of Dormant Cyanobacteria from Chlorosis. Plant Physiol. 177, 594–603. https://doi.org/10.1104/pp.18.00297

Domain, F., Houot, L., Chauvat, F., Cassier-Chauvat, C., 2004. Function and regulation of the cyanobacterial genes lexA, recA and ruvB: LexA is critical to the survival of cells facing inorganic carbon starvation. Mol. Microbiol. 53, 65–80. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04100.x

Domonkos, I., Kis, M., Gombos, Z., Ughy, B., 2013. Carotenoids, versatile components of oxygenic photosynthesis. Prog. Lipid Res. 52, 539–561. https://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.07.001

Donia, M.S., Ravel, J., Schmidt, E.W., 2008. A global assembly line for cyanobactins. Nat. Chem. Biol. 4, 341–343. https://doi.org/10.1038/nchembio.84

Doughty, D.M., Hunter, R.C., Summons, R.E., Newman, D.K., 2009. 2-Methylhopanoids are maximally produced in akinetes of Nostoc punctiforme: geobiological implications. Geobiology 7, 524–532. https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2009.00217.x

Ducat, D.C., Avelar-Rivas, J.A., Way, J.C., Silver, P.A., 2012. Rerouting Carbon Flux To Enhance Photosynthetic Productivity. Appl. Environ. Microbiol. 78, 2660–2668. https://doi.org/10.1128/AEM.07901-11

Dugar, D., Stephanopoulos, G., 2011. Relative potential of biosynthetic pathways for biofuels and bio-based products. Nat. Biotechnol. 29, 1074–1078. https://doi.org/10.1038/nbt.2055

Dvořák, P., Poulíčková, A., Hašler, P., Belli, M., Casamatta, D.A., Papini, A., 2015. Species concepts and speciation factors in cyanobacteria, with connection to the problems of diversity and classification. Biodivers. Conserv. 24, 739–757. https://doi.org/10.1007/s10531-015-0888-6

Dvorakova, M., Valterová, I., Vanek, T., 2007. Biotransformation of a Monoterpene Mixture by in vitro Cultures of Selected Conifer Species. Nat. Prod. Commun. 2, 233.

Einsle, O., Tezcan, F.A., Andrade, S.L.A., Schmid, B., Yoshida, M., Howard, J.B., Rees, D.C., 2002. Nitrogenase MoFe-Protein at 1.16 Å Resolution: A Central Ligand in the FeMo-Cofactor. Science 297, 1696–1700. https://doi.org/10.1126/science.1073877

Elhai, J., Wolk, C.P., 1988. Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria. Methods Enzymol. 167, 747–754.

Emanuelsson, O., Nielsen, H., von Heijne, G., 1999. ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. Protein Sci. Publ. Protein Soc. 8, 978–984. https://doi.org/10.1110/ps.8.5.978

Emmerstorfer-Augustin, A., Moser, S., Pichler, H., 2016. Screening for improved isoprenoid biosynthesis in microorganisms. J. Biotechnol., Special Issue on ACIB, Dedicated to the Occasion of Prof. Dr. Helmut Schwab's 65th Birthday 235, 112–120. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.03.051

Englund, E., Andersen-Ranberg, J., Miao, R., Hamberger, B., Lindberg, P., 2015. Metabolic Engineering of Synechocystis sp. PCC 6803 for Production of the Plant Diterpenoid Manoyl Oxide. ACS Synth. Biol. 4, 1270–1278. https://doi.org/10.1021/acssynbio.5b00070

Englund, E., Liang, F., Lindberg, P., 2016. Evaluation of promoters and ribosome binding sites for biotechnological applications in the unicellular cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803. Sci. Rep. 6, 36640. https://doi.org/10.1038/srep36640

Englund, E., Shabestary, K., Hudson, E.P., Lindberg, P., 2018. Systematic overexpression study to find target enzymes enhancing production of terpenes in Synechocystis PCC 6803, using isoprene as a model compound. Metab. Eng. 49, 164–177. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.07.004

Erb, T.J., Evans, B.S., Cho, K., Warlick, B.P., Sriram, J., Wood, B.M., Imker, H.J., Sweedler, J.V., Tabita, F.R., Gerlt, J.A., 2012. A RubisCO-like protein links SAM metabolism with isoprenoid biosynthesis. Nat. Chem. Biol. 8, 926–932. https://doi.org/10.1038/nchembio.1087

Ershov, Y.V., Gantt, R.R., Cunningham, F.X., Gantt, E., 2002. Isoprenoid biosynthesis in Synechocystis sp. strain PCC6803 is stimulated by compounds of the pentose phosphate cycle but not by pyruvate or deoxyxylulose-5-phosphate. J. Bacteriol. 184, 5045–5051. https://doi.org/10.1128/jb.184.18.5045-5051.2002

Esteves-Ferreira, A.A., Inaba, M., Fort, A., Araújo, W.L., Sulpice, R., 2018. Nitrogen metabolism in cyanobacteria: metabolic and molecular control, growth consequences and biotechnological applications. Crit. Rev. Microbiol. 44, 541–560. https://doi.org/10.1080/1040841X.2018.1446902

Farmer, W.R., Liao, J.C., 2001. Precursor Balancing for Metabolic Engineering of Lycopene Production in Escherichia coli. Biotechnol. Prog. 17, 57–61. https://doi.org/10.1021/bp000137t

Fathima, A.M., Chuang, D., Laviña, W.A., Liao, J., Putri, S.P., Fukusaki, E., 2018. Iterative cycle of widely targeted metabolic profiling for the improvement of 1-butanol titer and productivity in Synechococcus elongatus. Biotechnol. Biofuels 11. https://doi.org/10.1186/s13068-018-1187-8

Fay, P., 1992. Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. Microbiol. Rev. 56, 340–373.

Fehr, C., Magpantay, I., Arpagaus, J., Marquet, X., Vuagnoux, M., 2009. Enantioselective Synthesis of (−)-β-Santalol by a Copper-Catalyzed Enynol Cyclization–Fragmentation Reaction. Angew. Chem. Int. Ed. 48, 7221–7223. https://doi.org/10.1002/anie.200903449

Ferino, F., Chauvat, F., 1989. A promoter-probe vector-host system for the cyanobacterium, Synechocystis PCC6803. Gene 84, 257–266. https://doi.org/10.1016/0378-1119(89)90499-X

Fernández-González, B., Sandmann, G., Vioque, A., 1997. A new type of asymmetrically acting beta-carotene ketolase is required for the synthesis of echinenone in the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803. J. Biol. Chem. 272, 9728–9733. https://doi.org/10.1074/jbc.272.15.9728

Fidor, A., Konkel, R., Mazur-Marzec, H., 2019. Bioactive Peptides Produced by Cyanobacteria of the Genus Nostoc: A Review. Mar. Drugs 17. https://doi.org/10.3390/md17100561

Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G., Scheffer, J.J.C., 2008. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. Flavour Fragr. J. 23, 213–226. https://doi.org/10.1002/ffj.1875

Firdaus, M., Montero de Espinosa, L., Meier, M.A.R., 2011. Terpene-Based Renewable Monomers and Polymers via Thiol–Ene Additions. Macromolecules 44, 7253–7262. https://doi.org/10.1021/ma201544e

Fischer, M.J.C., Meyer, S., Claudel, P., Bergdoll, M., Karst, F., 2011. Metabolic engineering of monoterpene synthesis in yeast. Biotechnol. Bioeng. 108, 1883–1892. https://doi.org/10.1002/bit.23129

Forchhammer, K., 2004. Global carbon/nitrogen control by PII signal transduction in cyanobacteria: from signals to targets. FEMS Microbiol. Rev. 28, 319–333. https://doi.org/10.1016/j.femsre.2003.11.001

Forchhammer, K., Selim, K.A., 2019. Carbon/nitrogen homeostasis control in cyanobacteria. FEMS Microbiol. Rev. 44, 33–53. https://doi.org/10.1093/femsre/fuz025

Formighieri, C., Melis, A., 2014a. Regulation of β-phellandrene synthase gene expression, recombinant protein accumulation, and monoterpene hydrocarbons production in Synechocystis transformants. Planta 240, 309–324. https://doi.org/10.1007/s00425-014-2080-8

Formighieri, C., Melis, A., 2014b. Carbon partitioning to the terpenoid biosynthetic pathway enables heterologous β-phellandrene production in Escherichia coli cultures. Arch. Microbiol. 196, 853–861. https://doi.org/10.1007/s00203-014-1024-9

Formighieri, C., Melis, A., 2015. A phycocyanin·phellandrene synthase fusion enhances recombinant protein expression and β-phellandrene (monoterpene) hydrocarbons production in Synechocystis (cyanobacteria). Metab. Eng. 32, 116–124. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2015.09.010

Formighieri, C., Melis, A., 2016. Sustainable heterologous production of terpene hydrocarbons in cyanobacteria. Photosynth. Res. 130, 123–135. https://doi.org/10.1007/s11120-016-0233-2

Formighieri, C., Melis, A., 2018. Cyanobacterial production of plant essential oils. Planta 248, 933–946. https://doi.org/10.1007/s00425-018-2948-0

Frank, A., Groll, M., 2017. The Methylerythritol Phosphate Pathway to Isoprenoids. Chem. Rev. 117, 5675–5703. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00537

Franz, C., Baser, K.H.C., Windisch, W., 2010. Essential oils and aromatic plants in animal feeding – a European perspective. A review. Flavour Fragr. J. 25, 327–340. https://doi.org/10.1002/ffj.1967

Fu, J., Xu, X., 2006. The functional divergence of two glgP homologues in Synechocystis sp. PCC 6803. FEMS Microbiol. Lett. 260, 201–209. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00312.x

Fujisaki, S., Ohnuma, S., Horiuchi, T., Takahashi, I., Tsukui, S., Nishimura, Y., Nishino, T., Kitabatake, M., Inokuchi, H., 1996. Cloning of a gene from Escherichia coli that confers resistance to fosmidomycin as a consequence of amplification. Gene 175, 83–87. https://doi.org/10.1016/0378-1119(96)00128-X

Funk, C., Vermaas, W., 1999. A cyanobacterial gene family coding for single-helix proteins resembling part of the light-harvesting proteins from higher plants. Biochemistry 38, 9397–9404. https://doi.org/10.1021/bi990545+

Furubayashi, M., Ikezumi, M., Kajiwara, J., Iwasaki, M., Fujii, A., Li, L., Saito, K., Umeno, D., 2014. A High-Throughput Colorimetric Screening Assay for Terpene Synthase Activity Based on Substrate Consumption. PLoS ONE 9. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093317

Gabrielsen, M., Rohdich, F., Eisenreich, W., Gräwert, T., Hecht, S., Bacher, A., Hunter, W.N., 2004. Biosynthesis of isoprenoids. Eur. J. Biochem. 271, 3028–3035. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04234.x

Gallon, J.R., 1981. The oxygen sensitivity of nitrogenase: a problem for biochemists and micro-organisms. Trends Biochem. Sci. 6, 19–23. https://doi.org/10.1016/0968-0004(81)90008-6

Gao, X., Gao, F., Liu, D., Zhang, H., Nie, X., Yang, C., 2016. Engineering the methylerythritol phosphate pathway in cyanobacteria for photosynthetic isoprene production from CO2. Energy Environ. Sci. 9, 1400–1411. https://doi.org/10.1039/C5EE03102H

Gao, Z., Zhao, H., Li, Z., Tan, X., Lu, X., 2012. Photosynthetic production of ethanol from carbon dioxide in genetically engineered cyanobacteria. Energy Environ. Sci. 5, 9857–9865. https://doi.org/10.1039/C2EE22675H

Garcia-Pichel, F., Pringault, O., 2001 Microbiology. Cyanobacteria track water in desert soils. Nature 413, 380–381. https://doi.org/10.1038/35096640

George, K.W., Alonso-Gutierrez, J., Keasling, J.D., Lee, T.S., 2015. Isoprenoid drugs, biofuels, and chemicals--artemisinin, farnesene, and beyond. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 148, 355–389. https://doi.org/10.1007/10_2014_288

Getino, M., Cruz, F. de la, 2018. Natural and Artificial Strategies To Control the Conjugative Transmission of Plasmids. Microbiol. Spectr. 6. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MTBP-0015-2016

Giner-Lamia, J., Robles-Rengel, R., Hernández-Prieto, M.A., Isabel Muro-Pastor, M., Florencio, F.J., Futschik, M.E., 2017. Identification of the direct regulon of NtcA during early acclimation to nitrogen starvation in the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803. Nucleic Acids Res. 45, 11800–11820. https://doi.org/10.1093/nar/gkx860

Gray, M.W., 1993. Origin and evolution of organelle genomes. Curr. Opin. Genet. Dev. 3, 884–890.

Gressel, J., 2008. Transgenics are imperative for biofuel crops. Plant Sci. 174, 246–263. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2007.11.009

Griese, M., Lange, C., Soppa, J., 2011. Ploidy in cyanobacteria. FEMS Microbiol. Lett. 323, 124–131. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02368.x

Grigorieva, G., Shestakov, S., 1982. Transformation in the cyanobacterium Synechocystis sp. 6803. FEMS Microbiol. Lett. 13, 367–370. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1982.tb08289.x

Grizeau, D., Bui, L.A., Dupré, C., Legrand, J., 2016. Ammonium photo-production by heterocytous cyanobacteria: potentials and constraints. Crit. Rev. Biotechnol. 36, 607–618. https://doi.org/10.3109/07388551.2014.1002380

Gustafson, K.R., Cardellina, J.H., McMahon, J.B., Gulakowski, R.J., Ishitoya, J., Szallasi, Z., Lewin, N.E., Blumberg, P.M., Weislow, O.S., 1992. A nonpromoting phorbol from the Samoan medicinal plant Homalanthus nutans inhibits cell killing by HIV-1. J. Med. Chem. 35, 1978–1986. https://doi.org/10.1021/jm00089a006

Habib, A., Parvin, M., Huntington, T., Hasan, M., 2008. A review on culture, production and use of Spirulina as food for humans and feeds for domestic animals and fish (No. 1034), FAO Fisheries ans Aquaculture.

Halfmann, C., Gu, L., Gibbons, W., Zhou, R., 2014a. Genetically engineering cyanobacteria to convert CO2, water, and light into the long-chain hydrocarbon farnesene. Appl. Microbiol. Biotechnol. 98, 9869–9877. https://doi.org/10.1007/s00253-014-6118-4

Halfmann, C., Gu, L., Zhou, R., 2014b. Engineering cyanobacteria for the production of a cyclic hydrocarbon fuel from CO2 and H2O. Green Chem. 16, 3175–3185. https://doi.org/10.1039/C3GC42591F

Harker, M., Bramley, P.M., 1999. Expression of prokaryotic 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphatases in Escherichia coli increases carotenoid and ubiquinone biosynthesis. FEBS Lett. 448, 115–119. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00360-9

Harvey, B.G., 2018. Fuels and lubricants from bisaboline. US10053643B1.

Harvey, B.G., Wright, M.E., Quintana, R.L., 2010. High-Density Renewable Fuels Based on the Selective Dimerization of Pinenes. Energy Fuels 24, 267–273. https://doi.org/10.1021/ef900799c

He, Q., Dolganov, N., Bjorkman, O., Grossman, A.R., 2001. The high light-inducible polypeptides in Synechocystis PCC6803. Expression and function in high light. J. Biol. Chem. 276, 306–314. https://doi.org/10.1074/jbc.M008686200

Hein, S., Tran, H., Steinbüchel, A., 1998. Synechocystis sp. PCC6803 possesses a two-component polyhydroxyalkanoic acid synthase similar to that of anoxygenic purple sulfur bacteria. Arch. Microbiol. 170, 162–170.

Hellier, P., Al-Haj, L., Talibi, M., Purton, S., Ladommatos, N., 2013. Combustion and emissions characterization of terpenes with a view to their biological production in cyanobacteria. Fuel 111, 670–688. https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.04.042

Hemmerlin, A., 2013. Post-translational events and modifications regulating plant enzymes involved in isoprenoid precursor biosynthesis. Plant Sci. 203–204, 41–54. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.12.008

Henley, W.J., Litaker, R.W., Novoveská, L., Duke, C.S., Quemada, H.D., Sayre, R.T., 2013. Initial risk assessment of genetically modified (GM) microalgae for commodity-scale biofuel cultivation. Algal Res. 2, 66–77. https://doi.org/10.1016/j.algal.2012.11.001

Herrero, A., Muro-Pastor, A.M., Flores, E., 2001. Nitrogen control in cyanobacteria. J. Bacteriol. 183, 411–425. https://doi.org/10.1128/jb.183.2.411-425.2001

Hoffman, B.M., Lukoyanov, D., Yang, Z.-Y., Dean, D.R., Seefeldt, L.C., 2014. Mechanism of Nitrogen Fixation by Nitrogenase: The Next Stage. Chem. Rev. 114, 4041–4062. https://doi.org/10.1021/cr400641x

Hongratanaworakit, T., Heuberger, E., Buchbauer, G., 2004. Evaluation of the effects of East Indian sandalwood oil and alpha-santalol on humans after transdermal absorption. Planta Med. 70, 3–7. https://doi.org/10.1055/s-2004-815446

Horwitz, S.B., 1994. How to make taxol from scratch. Nature 367, 593–594. https://doi.org/10.1038/367593a0

Houssen, W.E., Koehnke, J., Zollman, D., Vendome, J., Raab, A., Smith, M.C.M., Naismith, J.H., Jaspars, M., 2012. The discovery of new cyanobactins from Cyanothece PCC 7425 defines a new signature for processing of patellamides. Chembiochem Eur. J. Chem. Biol. 13, 2683–2689. https://doi.org/10.1002/cbic.201200661

Howes, M.-J.R., Simmonds, M.S.J., Kite, G.C., 2004. Evaluation of the quality of sandalwood essential oils by gas chromatography-mass spectrometry. J. Chromatogr. A 1028, 307–312. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.11.093

Hu, P., Xu, S., Yan, R., 2019. Synthesis method of bisabolene. CN109438183A.

Huang, H.-H., Camsund, D., Lindblad, P., Heidorn, T., 2010. Design and characterization of molecular tools for a Synthetic Biology approach towards developing cyanobacterial biotechnology. Nucleic Acids Res. 38, 2577–2593. https://doi.org/10.1093/nar/gkq164

Huang, Q., Roessner, C.A., Croteau, R., Scott, A.I., 2001. Engineering Escherichia coli for the synthesis of taxadiene, a key intermediate in the biosynthesis of taxol. Bioorg. Med. Chem. 9, 2237–2242. https://doi.org/10.1016/S0968-0896(01)00072-4

Huo, Y.-X., Wernick, D.G., Liao, J.C., 2012. Toward nitrogen neutral biofuel production. Curr. Opin. Biotechnol., Energy biotechnology • Environmental biotechnology 23, 406–413. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.10.005

Iwai, M., Katoh, H., Katayama, M., Ikeuchi, M., 2004. Improved genetic transformation of the thermophilic cyanobacterium, Thermosynechococcus elongatus BP-1. Plant Cell Physiol. 45, 171–175. https://doi.org/10.1093/pcp/pch015

Jacobsen, J.H., Frigaard, N.-U., 2014. Engineering of photosynthetic mannitol biosynthesis from CO2 in a cyanobacterium. Metab. Eng. 21, 60–70. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2013.11.004

Jaki, B., Orjala, J., Sticher, O., 1999. A Novel Extracellular Diterpenoid with Antibacterial Activity from the Cyanobacterium Nostoc commune. J. Nat. Prod. 62, 502–503. https://doi.org/10.1021/np980444x

Jawaid, S., Seidle, H., Zhou, W., Abdirahman, H., Abadeer, M., Hix, J.H., van Hoek, M.L., Couch, R.D., 2009. Kinetic characterization and phosphoregulation of the Francisella tularensis 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (MEP synthase). PloS One 4, e8288. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008288

Jazmin, L.J., Xu, Y., Cheah, Y.E., Adebiyi, A.O., Johnson, C.H., Young, J.D., 2017. Isotopically nonstationary 13C flux analysis of cyanobacterial isobutyraldehyde production. Metab. Eng. 42, 9–18. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2017.05.001

Jennewein, S., Croteau, R., 2001. Taxol: biosynthesis, molecular genetics, and biotechnological applications. Appl. Microbiol. Biotechnol. 57, 13–19. https://doi.org/10.1007/s002530100757

Jensen, B.B., 1983. Energy Requirement for Diazotrophic Growth of the Cyanobacterium Anabaena variabilis Determined from Growth Yields in the Dark. Microbiology, 129, 2633–2640. https://doi.org/10.1099/00221287-129-8-2633

Jiang, Y.L., Wang, X.P., Sun, H., Han, S.J., Li, W.F., Cui, N., Lin, G.M., Zhang, J.Y., Cheng, W., Cao, D.D., Zhang, Z.Y., Zhang, C.C., Chen, Y., Zhou, C.Z., 2017. Coordinating carbon and nitrogen metabolic signaling through the cyanobacterial global repressor NdhR. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 115, 403–408. https://doi.org/10.1073/pnas.1716062115

Jin, Y.-S., Stephanopoulos, G., 2007. Multi-dimensional gene target search for improving lycopene biosynthesis in *Escherichia coli*. Metab. Eng. 9, 337–347. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2007.03.003

Jinkerson, R.E., Radakovits, R., Posewitz, M.C., 2013. Genomic insights from the oleaginous model alga Nannochloropsis gaditana. Bioengineered 4, 37–43. https://doi.org/10.4161/bioe.21880

Jittawuttipoka, T., Planchon, M., Spalla, O., Benzerara, K., Guyot, F., Cassier-Chauvat, C., Chauvat, F., 2013. Multidisciplinary evidences that Synechocystis PCC6803 exopolysaccharides operate in cell sedimentation and protection against salt and metal stresses. PloS One 8, e55564. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055564

Jones, C.G., Moniodis, J., Zulak, K.G., Scaffidi, A., Plummer, J.A., Ghisalberti, E.L., Barbour, E.L., Bohlmann, J., 2011. Sandalwood Fragrance Biosynthesis Involves Sesquiterpene Synthases of Both the Terpene Synthase (TPS)-a and TPS-b Subfamilies, including Santalene Synthases. J. Biol. Chem. 286, 17445–17454. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.231787

Jones, P.R., 2014. Genetic instability in cyanobacteria - an elephant in the room? Front. Bioeng. Biotechnol. 2, 12. https://doi.org/10.3389/fbioe.2014.00012

Jongedijk, E., Cankar, K., Buchhaupt, M., Schrader, J., Bouwmeester, H., Beekwilder, J., 2016. Biotechnological production of limonene in microorganisms. Appl. Microbiol. Biotechnol. 100, 2927–2938. https://doi.org/10.1007/s00253-016-7337-7

Kabir Kazi, F., Fortman, J., Anex, R., Kothandaraman, G., Hsu, D., Aden, A., Dutta, A., 2010. Techno-Economic Analysis of Biochemical Scenarios for Production of Cellulosic Ethanol.

Kaczmarzyk, D., Anfelt, J., Särnegrim, A., Hudson, E.P., 2014. Overexpression of sigma factor SigB improves temperature and butanol tolerance of Synechocystis sp. PCC6803. J. Biotechnol. 182–183, 54–60. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.04.017

Kammerscheit, X., 2019. Rôles des glutathion S-transférases chez la cyanobactérie modèle Synechocstis PCC 6803. Thèse de l'Université Paris-Saclay.

Kammerscheit, X., Chauvat, F., Cassier-Chauvat, C., 2019a. First in vivo Evidence That Glutathione-S-Transferase Operates in Photo-Oxidative Stress in Cyanobacteria. Front. Microbiol. 10, 1899. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01899

Kammerscheit, X., Chauvat, F., Cassier-Chauvat, C., 2019b. From Cyanobacteria to Human, MAPEG-Type Glutathione-S-Transferases Operate in Cell Tolerance to Heat, Cold, and Lipid Peroxidation. Front. Microbiol. 10, 2248. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02248

Kanamori, T., Kanou, N., Kusakabe, S., Atomi, H., Imanaka, T., 2005. Allophanate hydrolase of Oleomonas sagaranensis involved in an ATP-dependent degradation pathway specific to urea. FEMS Microbiol. Lett. 245, 61–65. https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.02.023

Kaneda, K., Kuzuyama, T., Takagi, M., Hayakawa, Y., Seto, H., 2001. An unusual isopentenyl diphosphate isomerase found in the mevalonate pathway gene cluster from Streptomyces sp. strain CL190. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98, 932–937.

Kaneko, T., Nakamura, Y., Sasamoto, S., Watanabe, A., Kohara, M., Matsumoto, M., Shimpo, S., Yamada, M., Tabata, S., 2003. Structural Analysis of Four Large Plasmids Harboring in a Unicellular Cyanobacterium, Synechocystis sp. PCC 6803. DNA Res. 10, 221–228. https://doi.org/10.1093/dnares/10.5.221

Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirosawa, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M., Tabata, S., 1996. Sequence Analysis of the Genome of the Unicellular Cyanobacterium Synechocystis sp. Strain PCC6803. II. Sequence Determination of the Entire Genome and Assignment of Potential Protein-coding Regions. DNA Res. 3, 109–136. https://doi.org/10.1093/dnares/3.3.109

Kang, R.-J., Shi, D.-J., Cong, W., Ma, W.-M., Cai, Z.-L., Ouyang, F., 2005. Effects of co-expression of two higher plants genes ALD and TPI in Anabaena sp. PCC7120 on photosynthetic CO2 fixation. Enzyme Microb. Technol. 36, 600–604. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.12.017

Keasling, J.D., Diagana, T.T., Hale, V., Renninger, N., 2007. Microbially Derived Artemisinin: A Biotechnology Solution to the Global Problem of Access to Affordable Antimalarial Drugs. Am. J. Trop. Med. Hyg. 77, 198–202. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2007.77.198

Keeling, C.I., Weisshaar, S., Lin, R.P.C., Bohlmann, J., 2008. Functional plasticity of paralogous diterpene synthases involved in conifer defense. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105, 1085–1090. https://doi.org/10.1073/pnas.0709466105

Kemp, L.E., Alphey, M.S., Bond, C.S., Ferguson, M.A.J., Hecht, S., Bacher, A., Eisenreich, W., Rohdich, F., Hunter, W.N., 2005. The identification of isoprenoids that bind in the intersubunit cavity of Escherichia coli 2C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphate synthase by complementary biophysical methods. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 61, 45–52. https://doi.org/10.1107/S0907444904025971

Kemp, L.E., Bond, C.S., Hunter, W.N., 2002. Structure of 2C-methyl-d-erythritol 2,4- cyclodiphosphate synthase: An essential enzyme for isoprenoid biosynthesis and target for antimicrobial drug development. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99, 6591–6596. https://doi.org/10.1073/pnas.102679799

Kim, S.-W., Keasling, J.D., 2001. Metabolic engineering of the nonmevalonate isopentenyl diphosphate synthesis pathway in Escherichia coli enhances lycopene production. Biotechnol. Bioeng. 72, 408–415. https://doi.org/10.1002/1097-0290(20000220)72:4<408::AID-BIT1003>3.0.CO;2-H

Kirby, J., Nishimoto, M., Chow, R.W.N., Baidoo, E.E.K., Wang, G., Martin, J., Schackwitz, W., Chan, R., Fortman, J.L., Keasling, J.D., 2015. Enhancing Terpene yield from sugars via novel routes to 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate. Appl. Environ. Microbiol. 81, 130–138. https://doi.org/10.1128/AEM.02920-14

Kirby, J., Nishimoto, M., Chow, R.W.N., Pasumarthi, V.N., Chan, R., Chan, L.J.G., Petzold, C.J., Keasling, J.D., 2014. Use of Nonionic Surfactants for Improvement of Terpene Production in Saccharomyces cerevisiae. Appl. Environ. Microbiol. 80, 6685–6693. https://doi.org/10.1128/AEM.02155-14

Kirilovsky, D., Kerfeld, C.A., 2013. The Orange Carotenoid Protein: a blue-green light photoactive protein. Photochem. Photobiol. Sci. Off. J. Eur. Photochem. Assoc. Eur. Soc. Photobiol. 12, 1135–1143. https://doi.org/10.1039/c3pp25406b

Kiyota, H., Okuda, Y., Ito, M., Hirai, M.Y., Ikeuchi, M., 2014. Engineering of cyanobacteria for the photosynthetic production of limonene from CO2. J. Biotechnol. 185, 1–7. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.05.025

Kizawa, A., Kawahara, A., Takashima, K., Takimura, Y., Nishiyama, Y., Hihara, Y., 2017. The LexA transcription factor regulates fatty acid biosynthetic genes in the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803. Plant J. 92, 89–98. https://doi.org/10.1111/tpj.13644

Klemke, F., Nürnberg, D.J., Ziegler, K., Beyer, G., Kahmann, U., Lockau, W., Volkmer, T., 2016. CphA2 is a novel type of cyanophycin synthetase in N2-fixing cyanobacteria. Microbiol. Read. Engl. 162, 526–536. https://doi.org/10.1099/mic.0.000241

Komàrek, J., 1976. Taxonomic review of the genera Synechocystis sauv. 1892, Synechococcus Näg. 1849, and Cyanothece gen. nov. (Cyanophyceae). Arch Protistenkd 119–179.

Kudoh, K., Hotta, S., Sekine, M., Fujii, R., Uchida, A., Kubota, G., Kawano, Y., Ihara, M., 2017a. Overexpression of endogenous 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate synthase (DXS) in cyanobacterium Synechocystis sp. PCC6803 accelerates protein aggregation. J. Biosci. Bioeng. 123, 590–596. https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.01.001

Kudoh, K., Kawano, Y., Hotta, S., Sekine, M., Watanabe, T., Ihara, M., 2014. Prerequisite for highly efficient isoprenoid production by cyanobacteria discovered through the over-expression of 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate synthase and carbon allocation analysis. J. Biosci. Bioeng. 118, 20–28. https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.12.018

Kudoh, K., Kubota, G., Fujii, R., Kawano, Y., Ihara, M., 2017b. Exploration of the 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate synthases suitable for the creation of a robust isoprenoid biosynthesis system. J. Biosci. Bioeng. 123, 300–307. https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.10.005

Kumaraswamy, G.K., Guerra, T., Qian, X., Zhang, S., Bryant, D.A., Dismukes, G.C., 2013. Reprogramming the glycolytic pathway for increased hydrogen production in cyanobacteria: metabolic engineering of NAD+-dependent GAPDH. Energy Environ. Sci. 6, 3722–3731. https://doi.org/10.1039/C3EE42206B

Kumari, A., 2018. Chapter 7 - Cholesterol Synthesis, in: Kumari, A. (Ed.), Sweet Biochemistry. Academic Press, pp. 27–31. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814453-4.00007-8

Kurnikov, I., Charnley, A., Beratan, D., 2001. From ATP to Electron Transfer: Electrostatics and Free-Energy Transduction in Nitrogenase. J. Phys. Chem. B - J PHYS CHEM B 105. https://doi.org/10.1021/jp002540o

Kusama, Y., Inoue, S., Jimbo, H., Takaichi, S., Sonoike, K., Hihara, Y., Nishiyama, Y., 2015. Zeaxanthin and Echinenone Protect the Repair of Photosystem II from Inhibition by Singlet Oxygen in Synechocystis sp. PCC 6803. Plant Cell Physiol. 56, 906–916. https://doi.org/10.1093/pcp/pcv018

Labarre, J., Chauvat, F., Thuriaux, P., 1989. Insertional mutagenesis by random cloning of antibiotic resistance genes into the genome of the cyanobacterium Synechocystis strain PCC 6803. J. Bacteriol. 171, 3449–3457. https://doi.org/10.1128/jb.171.6.3449-3457.1989

Lambert, D.H., Stevens, S.E., 1986. Photoheterotrophic growth of Agmenellum quadruplicatum PR-6. J. Bacteriol. 165, 654–656. https://doi.org/10.1128/jb.165.2.654-656.1986

Lan, E.I., Liao, J.C., 2012. ATP drives direct photosynthetic production of 1-butanol in cyanobacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 109, 6018–6023. https://doi.org/10.1073/pnas.1200074109

Lardon, L., Hélias, A., Sialve, B., Steyer, J.-P., Bernard, O., 2009. Life-Cycle Assessment of Biodiesel Production from Microalgae. Environ. Sci. Technol. 43, 6475–6481. https://doi.org/10.1021/es900705j

Lauchli, R., Rabe, K.S., Kalbarczyk, K.Z., Tata, A., Heel, T., Kitto, R.Z., Arnold, F.H., 2013. High-throughput screening and directed evolution of terpene synthase-catalyzed cylization. Angew. Chem. Int. Ed Engl. 52. https://doi.org/10.1002/anie.201301362

Lee, H.J., Lee, J., Lee, S.-M., Um, Y., Kim, Y., Sim, S.J., Choi, J.-I., Woo, H.M., 2017. Direct Conversion of CO2 to α-Farnesene Using Metabolically Engineered Synechococcus elongatus PCC 7942. J. Agric. Food Chem. 65, 10424–10428. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b03625

Leikoski, N., Liu, L., Jokela, J., Wahlsten, M., Gugger, M., Calteau, A., Permi, P., Kerfeld, C.A., Sivonen, K., Fewer, D.P., 2013. Genome Mining Expands the Chemical Diversity of the Cyanobactin Family to Include Highly Modified Linear Peptides. Chem. Biol. 20, 1033–1043. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.06.015

Lherbet, C., Pojer, F., Richard, S.B., Noel, J.P., Poulter, C.D., 2006. Absence of Substrate Channeling between Active Sites in the Agrobacterium tumefaciens IspDF and IspE Enzymes of the Methyl Erythritol Phosphate Pathway. Biochemistry 45, 3548–3553. https://doi.org/10.1021/bi0520075

Li, H., Liao, J.C., 2013. Engineering a cyanobacterium as the catalyst for the photosynthetic conversion of CO2 to 1,2-propanediol. Microb. Cell Factories 12, 4. https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-4

Li, J., Margaret Oliver, I., Cam, N., Boudier, T., Blondeau, M., Leroy, E., Cosmidis, J., Skouri-Panet, F., Guigner, J.-M., Férard, C., Poinsot, M., Moreira, D., Lopez-Garcia, P., Cassier-Chauvat, C., Chauvat, F., Benzerara, K., 2016. Biomineralization Patterns of Intracellular Carbonatogenesis in Cyanobacteria: Molecular Hypotheses. Minerals 6, 10. https://doi.org/10.3390/min6010010

Li, X., Shen, C.R., Liao, J.C., 2014. Isobutanol production as an alternative metabolic sink to rescue the growth deficiency of the glycogen mutant of Synechococcus elongatus PCC 7942. Photosynth. Res. 120, 301–310. https://doi.org/10.1007/s11120-014-9987-6

Li, Y., Zhang, G., Pfeifer, B.A., 2015. Current and emerging options for taxol production. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 148, 405–425. https://doi.org/10.1007/10_2014_292

Liang, F., Englund, E., Lindberg, P., Lindblad, P., 2018. Engineered cyanobacteria with enhanced growth show increased ethanol production and higher biofuel to biomass ratio. Metab. Eng. 46, 51–59. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.02.006

Liang, F., Lindblad, P., 2016. Effects of overexpressing photosynthetic carbon flux control enzymes in the cyanobacterium Synechocystis PCC 6803. Metab. Eng. 38, 56–64. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2016.06.005

Liang, R., Harvey, B.G., Quintana, R.L., Suflita, J.M., 2015. Assessing the Biological Stability of a Terpene-Based Advanced Biofuel and Its Relationship to the Corrosion of Carbon Steel. Energy Fuels 29, 5164–5170. https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.5b01094

Liberton, M., Bandyopadhyay, A., Pakrasi, H.B., 2019. Enhanced Nitrogen Fixation in a glgX-Deficient Strain of Cyanothece sp. Strain ATCC 51142, a Unicellular Nitrogen-Fixing Cyanobacterium. Appl. Environ. Microbiol. 85. https://doi.org/10.1128/AEM.02887-18

Lichtenthaler, H.K., 1999. The 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 50, 47–65. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.47

Lin, P.-C., Saha, R., Zhang, F., Pakrasi, H.B., 2017. Metabolic engineering of the pentose phosphate pathway for enhanced limonene production in the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803. Sci. Rep. 7. https://doi.org/10.1038/s41598-017-17831-y

Lindberg, P., Park, S., Melis, A., 2010. Engineering a platform for photosynthetic isoprene production in cyanobacteria, using Synechocystis as the model organism. Metab. Eng. 12, 70–79. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2009.10.001

Little, D.B., Croteau, R.B., 2002. Alteration of product formation by directed mutagenesis and truncation of the multiple-product sesquiterpene synthases delta-selinene synthase and gamma-humulene synthase. Arch. Biochem. Biophys. 402, 120–135. https://doi.org/10.1016/S0003-9861(02)00068-1

Liu, H., Wang, Y., Tang, Q., Kong, W., Chung, W.-J., Lu, T., 2014. MEP pathway-mediated isopentenol production in metabolically engineered Escherichia coli. Microb. Cell Factories 13. https://doi.org/10.1186/s12934-014-0135-y

Liu, X., Miao, R., Lindberg, P., Lindblad, P., 2019. Modular engineering for efficient photosynthetic biosynthesis of 1-butanol from CO2 in cyanobacteria. Energy Environ. Sci. 12, 2765–2777. https://doi.org/10.1039/C9EE01214A

Lohrasbi, M., Pourbafrani, M., Niklasson, C., Taherzadeh, M.J., 2010. Process design and economic analysis of a citrus waste biorefinery with biofuels and limonene as products. Bioresour. Technol. 101, 7382–7388. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.078

Lois, L.M., Rodríguez-Concepción, M., Gallego, F., Campos, N., Boronat, A., 2000. Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase. Plant J. Cell Mol. Biol. 22, 503–513. https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00764.x

Ludwig, M., Bryant, D.A., 2012. Synechococcus sp. Strain PCC 7002 Transcriptome: Acclimation to Temperature, Salinity, Oxidative Stress, and Mixotrophic Growth Conditions. Front. Microbiol. 3, 354. https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00354

Luinenburg, I., Coleman, J.R., 1990. A requirement for phosphoenolpyruvate carboxylase in the cyanobacterium Synechococcus PCC 7942. Arch. Microbiol. 154, 471–474. https://doi.org/10.1007/BF00245230

Luque, I., Flores, E., Herrero, A., 1994. Molecular mechanism for the operation of nitrogen control in cyanobacteria. EMBO J. 13, 2862–2869.

Ma, W., Shi, D., Wang, Q., Wei, L., Chen, H., 2005. Exogenous expression of the wheat chloroplastic fructose-1,6-bisphosphatase gene enhances photosynthesis in the transgenic cyanobacterium, Anabaena PCC7120. J. Appl. Phycol. 17, 273–280. https://doi.org/10.1007/s10811-005-4850-y

Ma, W., Wei, L., Wang, Q., Shi, D., Chen, H., 2006. Increased activity of the non-regulated enzymes fructose-1,6-bisphosphate aldolase and triosephosphate isomerase in Anabaena sp. strain PCC 7120 increases photosynthetic yield. J. Appl. Phycol. 19, 207. https://doi.org/10.1007/s10811-006-9125-8

Mac Sweeney, A., Lange, R., Fernandes, R.P.M., Schulz, H., Dale, G.E., Douangamath, A., Proteau, P.J., Oefner, C., 2005. The crystal structure of E.coli 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase in a ternary complex with the antimalarial compound fosmidomycin and NADPH reveals a tight-binding closed enzyme conformation. J. Mol. Biol. 345, 115–127. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.10.030

Marbouty, M., Saguez, C., Cassier-Chauvat, C., Chauvat, F., 2009. ZipN, an FtsA-like orchestrator of divisome assembly in the model cyanobacterium Synechocystis PCC6803. Mol. Microbiol. 74, 409–420. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06873.x

Marraccini, P., Bulteau, S., Cassier-Chauvat, C., Mermet-Bouvier, P., Chauvat, F., 1993. A conjugative plasmid vector for promoter analysis in several cyanobacteria of the genera Synechococcus and Synechocystis. Plant Mol. Biol. 23, 905–909. https://doi.org/10.1007/bf00021546

Marteyn, B., Domain, F., Legrain, P., Chauvat, F., Cassier-Chauvat, C., 2009. The thioredoxin reductase-glutaredoxins-ferredoxin crossroad pathway for selenate tolerance in Synechocystis PCC6803. Mol. Microbiol. 71, 520–532. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06550.x

Martin, V.J.J., Pitera, D.J., Withers, S.T., Newman, J.D., Keasling, J.D., 2003. Engineering a mevalonate pathway in Escherichia coli for production of terpenoids. Nat. Biotechnol. 21, 796–802. https://doi.org/10.1038/nbt833

Matsushima, D., Jenke-Kodama, H., Sato, Y., Fukunaga, Y., Sumimoto, K., Kuzuyama, T., Matsunaga, S., Okada, S., 2012. The single cellular green microalga Botryococcus braunii, race B possesses three distinct 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthases. Plant Sci. Int. J. Exp. Plant Biol. 185–186, 309–320. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.01.002

Matthews, P.D., Wurtzel, E.T., 2000. Metabolic engineering of carotenoid accumulation in Escherichia coli by modulation of the isoprenoid precursor pool with expression of deoxyxylulose phosphate synthase. Appl. Microbiol. Biotechnol. 53, 396–400. https://doi.org/10.1007/s002530051632

Mazouni, K., Domain, F., Cassier-Chauvat, C., Chauvat, F., 2004. Molecular analysis of the key cytokinetic components of cyanobacteria: FtsZ, ZipN and MinCDE. Mol. Microbiol. 52, 1145–1158. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04042.x

McAndrew, R.P., Peralta-Yahya, P.P., DeGiovanni, A., Pereira, J.H., Hadi, M.Z., Keasling, J.D., Adams, P.D., 2011. Structure of a Three-Domain Sesquiterpene Synthase: A Prospective Target for Advanced Biofuels Production. Structure 19, 1876–1884. https://doi.org/10.1016/j.str.2011.09.013

McPhee, D., 2013. The Development of Catalytic Processes from Terpenes to Chemicals, in: Catalytic Process Development for Renewable Materials. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 51–79. https://doi.org/10.1002/9783527656639.ch3

Melis, A., 2013. Carbon partitioning in photosynthesis. Curr. Opin. Chem. Biol. 17, 453–456. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.03.010

Melnicki, M.R., Pinchuk, G.E., Hill, E.A., Kucek, L.A., Fredrickson, J.K., Konopka, A., Beliaev, A.S., 2012. Sustained H2 Production Driven by Photosynthetic Water Splitting in a Unicellular Cyanobacterium. mBio 3. https://doi.org/10.1128/mBio.00197-12

Mendez-Perez, D., Alonso-Gutierrez, J., Hu, Q., Molinas, M., Baidoo, E.E.K., Wang, G., Chan, L.J.G., Adams, P.D., Petzold, C.J., Keasling, J.D., Lee, T.S., 2017. Production of jet fuel precursor monoterpenoids from engineered Escherichia coli. Biotechnol. Bioeng. 114, 1703–1712. https://doi.org/10.1002/bit.26296

Mermet-Bouvier, P., Cassier-Chauvat, C., Marraccini, P., Chauvat, F., 1993. Transfer and replication of RSF1010-derived plasmids in several cyanobacteria of the generaSynechocystis andSynechococcus. Curr. Microbiol. 27, 323–327. https://doi.org/10.1007/BF01568955

Mermet-Bouvier, P., Chauvat, F., 1994. A conditional expression vector for the cyanobacteria Synechocystis sp. strains PCC6803 and PCC6714 or Synechococcus sp. strains PCC7942 and PCC6301. Curr. Microbiol. 28, 145–148. https://doi.org/10.1007/BF01571055

Meylemans, H.A., Quintana, R.L., Harvey, B.G., 2012. Efficient conversion of pure and mixed terpene feedstocks to high density fuels. Fuel 97, 560–568. https://doi.org/10.1016/j.fuel.2012.01.062

Micheletti, E., Colica, G., Viti, C., Tamagnini, P., De Philippis, R., 2008. Selectivity in the heavy metal removal by exopolysaccharide-producing cyanobacteria. J. Appl. Microbiol. 105, 88–94. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03728.x

Miller, B., Heuser, T., Zimmer, W., 1999. A Synechococcus leopoliensis SAUG 1402-1 operon harboring the 1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase gene and two additional open reading frames is functionally involved in the dimethylallyl diphosphate synthesis. FEBS Lett. 460, 485–490. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01397-6

Miller, B., Heuser, T., Zimmer, W., 2000. Functional involvement of a deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase gene harboring locus of Synechococcus leopoliensis in isoprenoid biosynthesis. FEBS Lett. 481, 221–226. https://doi.org/10.1016/s0014-5793(00)02014-7

Millo, F., Bensaid, S., Fino, D., Castillo Marcano, S.J., Vlachos, T., Debnath, B.K., 2014. Influence on the performance and emissions of an automotive Euro 5 diesel engine fueled with F30 from Farnesane. Fuel 138, 134–142. https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.07.060

Mills, L.A., McCormick, A.J., Lea-Smith, D.J., 2020. Current knowledge and recent advances in understanding metabolism of the model cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803. Biosci. Rep. 40. https://doi.org/10.1042/BSR20193325

Min, H., Sherman, L.A., 2010. Hydrogen Production by the Unicellular, Diazotrophic Cyanobacterium Cyanothece sp. Strain ATCC 51142 under Conditions of Continuous Light. Appl. Environ. Microbiol. 76, 4293–4301. https://doi.org/10.1128/AEM.00146-10

Misra, B.B., Dey, S., 2013. Evaluation of in vivo anti-hyperglycemic and antioxidant potentials of α-santalol and sandalwood oil. Phytomedicine 20, 409–416. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2012.12.017

Miyagishima, S.-Y., Wolk, C.P., Osteryoung, K.W., 2005. Identification of cyanobacterial cell division genes by comparative and mutational analyses. Mol. Microbiol. 56, 126–143. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04548.x

Miyazawa, M., Kawauchi, Y., Matsuda, N., 2010. Character impact odorants from wild mushroom (Lactarius hatsudake) used in Japanese traditional food. Flavour Fragr. J. 25, 197–201. https://doi.org/10.1002/ffj.1977

Morey, S., 1826. First internal combustion engine, which ran on ethanol and turpentine.

Ms, C.-L., H, T., Dl, T., La, S., 1999. Analysis of the nifHDK operon and structure of the NifH protein from the unicellular, diazotrophic cyanobacterium, Cyanothece strain sp. ATCC 51142(1). Biochim. Biophys. Acta 1473, 363–375. https://doi.org/10.1016/s0304-4165(99)00196-8

Muro-Pastor, A.M., Hess, W.R., 2020. Regulatory RNA at the crossroads of carbon and nitrogen metabolism in photosynthetic cyanobacteria. Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech. 1863, 194477. https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2019.194477

Nagarajan, A., Winter, R., Eaton-Rye, J., Burnap, R., 2011. A synthetic DNA and fusion PCR approach to the ectopic expression of high levels of the D1 protein of photosystem II in Synechocystis sp. PCC 6803. J. Photochem. Photobiol. B 104, 212–9. https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2011.02.009

Nam, S.-Y., Chung, C., Seo, J.-H., Rah, S.-Y., Kim, H.-M., Jeong, H.-J., 2014. The therapeutic efficacy of α-pinene in an experimental mouse model of allergic rhinitis. Int. Immunopharmacol. 23, 273–282. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.09.010

Namakoshi, K., Nakajima, T., Yoshikawa, K., Toya, Y., Shimizu, H., 2016. Combinatorial deletions of glgC and phaCE enhance ethanol production in Synechocystis sp. PCC 6803. J. Biotechnol. 239, 13–19. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.09.016

Narainsamy, K., Farci, S., Braun, E., Junot, C., Cassier-Chauvat, C., Chauvat, F., 2016. Oxidative-stress detoxification and signalling in cyanobacteria: the crucial glutathione synthesis pathway supports the production of ergothioneine and ophthalmate. Mol. Microbiol. 100, 15–24. https://doi.org/10.1111/mmi.13296

Narainsamy, K., Marteyn, B., Sakr, S., Cassier-Chauvat, C., Chauvat, F., 2013. Chapter Five - Genomics of the Pleïotropic Glutathione System in Cyanobacteria, in: Chauvat, F., Cassier-Chauvat, C. (Eds.), Advances in Botanical Research, Genomics of Cyanobacteria. Academic Press, pp. 157–188. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394313-2.00005-6

Narita, K., Ohnuma, S., Nishino, T., 1999. Protein design of geranyl diphosphate synthase. Structural features that define the product specificities of prenyltransferases. J. Biochem. (Tokyo) 126, 566–571. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022487

Nascimento, A.M.A., Brandão, M.G.L., Oliveira, G.B., Fortes, I.C.P., Chartone-Souza, E., 2007. Synergistic bactericidal activity of Eremanthus erythropappus oil or beta-bisabolene with ampicillin against Staphylococcus aureus. Antonie Van Leeuwenhoek 92, 95–100. https://doi.org/10.1007/s10482-006-9139-x

Newman, J., Paddon, C.J., Regentin, R., Reiling, K.K., Renninger, N.S., 2018. Production of isoprenoids. US10106822B2.

Ng, A.H., Berla, B.M., Pakrasi, H.B., 2015. Fine-Tuning of Photoautotrophic Protein Production by Combining Promoters and Neutral Sites in the Cyanobacterium Synechocystis sp. Strain PCC 6803. Appl. Environ. Microbiol. 81, 6857–6863. https://doi.org/10.1128/AEM.01349-15

Nomura, C.T., Sakamoto, T., Bryant, D.A., 2006. Roles for heme-copper oxidases in extreme high-light and oxidative stress response in the cyanobacterium Synechococcus sp. PCC 7002. Arch. Microbiol. 185, 471–479. https://doi.org/10.1007/s00203-006-0107-7

Nosten, F., White, N.J., 2007. Artemisinin-based combination treatment of falciparum malaria. Am. J. Trop. Med. Hyg. 77, 181–192.

Ochi, T., Shibata, H., Higuti, T., Kodama, K., Kusumi, T., Takaishi, Y., 2005. Anti-Helicobacter pylori compounds from Santalum album. J. Nat. Prod. 68, 819–824. https://doi.org/10.1021/np040188q

Ohnuma, S., Suzuki, M., Nishino, T., 1994. Archaebacterial ether-linked lipid biosynthetic gene. Expression cloning, sequencing, and characterization of geranylgeranyl-diphosphate synthase. J. Biol. Chem. 269, 14792–14797.

Okada, K., Hase, T., 2005. Cyanobacterial non-mevalonate pathway: (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase interacts with ferredoxin in Thermosynechococcus elongatus BP-1. J. Biol. Chem. 280, 20672–20679. https://doi.org/10.1074/jbc.M500865200

Oliver, J.W.K., Atsumi, S., 2014. Metabolic design for cyanobacterial chemical synthesis. Photosynth. Res. 120, 249–261. https://doi.org/10.1007/s11120-014-9997-4

Oliver, J.W.K., Machado, I.M.P., Yoneda, H., Atsumi, S., 2013. Cyanobacterial conversion of carbon dioxide to 2,3-butanediol. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 110, 1249–1254. https://doi.org/10.1073/pnas.1213024110

Oliver, J.W.K., Machado, I.M.P., Yoneda, H., Atsumi, S., 2014. Combinatorial optimization of cyanobacterial 2,3-butanediol production. Metab. Eng. 22, 76–82. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2014.01.001

Onai, K., Morishita, M., Kaneko, T., Tabata, S., Ishiura, M., 2004. Natural transformation of the thermophilic cyanobacterium Thermosynechococcus elongatus BP-1: a simple and efficient method for gene transfer. Mol. Genet. Genomics MGG 271, 50–59. https://doi.org/10.1007/s00438-003-0953-9

Oost, J. Van der, Bulthuis, B.A., Feitz, S., Krab, K., Kraayenhof, R., 1989. Fermentation metabolism of the unicellular cyanobacterium <Emphasis Type="Italic">Cyanothece</Emphasis> PCC 7822. Arch. Microbiol. 152, 415–419. https://doi.org/10.1007/BF00446921

Pade, N., Erdmann, S., Enke, H., Dethloff, F., Dühring, U., Georg, J., Wambutt, J., Kopka, J., Hess, W.R., Zimmermann, R., Kramer, D., Hagemann, M., 2016. Insights into isoprene production using the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803. Biotechnol. Biofuels 9. https://doi.org/10.1186/s13068-016-0503-4

Pade, N., Hagemann, M., 2014. Salt acclimation of cyanobacteria and their application in biotechnology. Life Basel Switz. 5, 25–49. https://doi.org/10.3390/life5010025

Pakrasi, H.B., Williams, J.G., Arntzen, C.J., 1988. Targeted mutagenesis of the psbE and psbF genes blocks photosynthetic electron transport: evidence for a functional role of cytochrome b559 in photosystem II. EMBO J. 7, 325–332.

Park, J., Zielinski, M., Magder, A., Tsantrizos, Y.S., Berghuis, A.M., 2017. Human farnesyl pyrophosphate synthase is allosterically inhibited by its own product. Nat. Commun. 8. https://doi.org/10.1038/ncomms14132

Partensky, F., Hess, W.R., Vaulot, D., 1999. Prochlorococcus, a marine photosynthetic prokaryote of global significance. Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR 63, 106–127.

Pate, R., Klise, G., Wu, B., 2011. Resource demand implications for US algae biofuels production scale-up. Appl. Energy, Special Issue of Energy from algae: Current status and future trends 88, 3377–3388. https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2011.04.023

Pattanaik, B., Englund, E., Nolte, N., Lindberg, P., 2020. Introduction of a green algal squalene synthase enhances squalene accumulation in a strain of Synechocystis sp. PCC 6803. Metab. Eng. Commun. 10, e00125. https://doi.org/10.1016/j.mec.2020.e00125

Pattanaik, B., Lindberg, P., 2015. Terpenoids and their biosynthesis in cyanobacteria. Life Basel Switz. 5, 269–293. https://doi.org/10.3390/life5010269

Paulpandi, M., Kannan, S., Thangam, R., Kaveri, K., Gunasekaran, P., Rejeeth, C., 2012. In vitro anti-viral effect of β-santalol against influenza viral replication. Phytomedicine 19, 231–235. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.11.006

Peralta-Yahya, P.P., Ouellet, M., Chan, R., Mukhopadhyay, A., Keasling, J.D., Lee, T.S., 2011. Identification and microbial production of a terpene-based advanced biofuel. Nat. Commun. 2, 483. https://doi.org/10.1038/ncomms1494

Pérez Gutiérrez, R.M., Martínez Flores, A., Vargas Solís, R., Carmona Jimenez, J., 2008. Two new antibacterial norabietane diterpenoids from cyanobacteria, Microcoleous lacustris. J. Nat. Med. 62, 328–331. https://doi.org/10.1007/s11418-008-0238-z

Pérez-Gil, J., Bergua, M., Boronat, A., Imperial, S., 2010. Cloning and functional characterization of an enzyme from Helicobacter pylori that catalyzes two steps of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis. Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj. 1800, 919–928. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2010.06.008

Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G., Nielsen, H., 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. Nat. Methods 8, 785–786. https://doi.org/10.1038/nmeth.1701

Pfleger, B.F., Pitera, D.J., Newman, J.D., Martin, V.J.J., Keasling, J.D., 2007. Microbial sensors for small molecules: Development of a mevalonate biosensor. Metab. Eng. 9, 30–38. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2006.08.002

Pfleger, B.F., Pitera, D.J., Smolke, C.D., Keasling, J.D., 2006. Combinatorial engineering of intergenic regions in operons tunes expression of multiple genes. Nat. Biotechnol. 24, 1027–1032. https://doi.org/10.1038/nbt1226

Pianowski, Z., Rupnicki, L., Cmoch, P., Staliński, K., 2005. Radical Cyclizations Leading to the Bicyclo[2.2.1]heptane Framework: A New Radical Approach to (±)-(Z)-β-Santalol. Synlett 2005, 900–904. https://doi.org/10.1055/s-2005-864825

Planchon, M., Jittawuttipoka, T., Cassier-Chauvat, C., Guyot, F., Chauvat, F., Spalla, O., 2013. Influence of exopolysaccharides on the electrophoretic properties of the model cyanobacterium Synechocystis. Colloids Surf. B Biointerfaces 110, 171–177. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.03.057

Poliquin, K., Cunningham, F.X., MacDonald, I., Gantt, R.R., Gantt, E., 2008. Impaired Isoprenoid Biosynthesis: A Competitive Disadvantage Under Light Stress in Synechocystis PCC 6803, in: Allen, J.F., Gantt, Elisabeth, Golbeck, J.H., Osmond, B. (Eds.), Photosynthesis. Energy from the Sun. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 763–766. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6709-9_170

Poliquin, K., Cunningham Jr, F., Gantt, R., Gantt, E., 2012. Interactions of Isoprenoid Pathway Enzymes and Indirect Stimulation of Isoprenoid Biosynthesis by Pentose Phosphate Cycle Substrates in Synechocystis PCC 6803, in: Isoprenoid Synthesis in Plants and Microorganisms: New Concepts and Experimental Approaches. pp. 51–63. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4063-5_4

Poliquin, K., Ershov, Y.V., Cunningham, F.X., Woreta, T.T., Gantt, R.R., Gantt, E., 2004. Inactivation of sll1556 in Synechocystis Strain PCC 6803 Impairs Isoprenoid Biosynthesis from Pentose Phosphate Cycle Substrates In Vitro. J. Bacteriol. 186, 4685–4693. https://doi.org/10.1128/JB.186.14.4685-4693.2004

Ponce-Toledo, R.I., Deschamps, P., López-García, P., Zivanovic, Y., Benzerara, K., Moreira, D., 2017. An Early-Branching Freshwater Cyanobacterium at the Origin of Plastids. Curr. Biol. CB 27, 386–391. https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.11.056

Porta, D., Rippka, R., Hernández-Mariné, M., 2000. Unusual ultrastructural features in three strains of Cyanothece (cyanobacteria). Arch. Microbiol. 173, 154–163.

Pourbafrani, M., Forgács, G., Horváth, I.S., Niklasson, C., Taherzadeh, M.J., 2010. Production of biofuels, limonene and pectin from citrus wastes. Bioresour. Technol. 101, 4246–4250. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.077

Preiss, J., 1984. Bacterial glycogen synthesis and its regulation. Annu. Rev. Microbiol. 38, 419–458. https://doi.org/10.1146/annurev.mi.38.100184.002223

Pulido, P., Toledo-Ortiz, G., Phillips, M.A., Wright, L.P., Rodríguez-Concepción, M., 2013. Arabidopsis J-Protein J20 Delivers the First Enzyme of the Plastidial Isoprenoid Pathway to Protein Quality Control. Plant Cell 25, 4183–4194. https://doi.org/10.1105/tpc.113.113001

Quintero, M.J., Muro-Pastor, A.M., Herrero, A., Flores, E., 2000. Arginine catabolism in the cyanobacterium Synechocystis sp. Strain PCC 6803 involves the urea cycle and arginase pathway. J. Bacteriol. 182, 1008–1015. https://doi.org/10.1128/jb.182.4.1008-1015.2000

Rajaonarivony, J.I., Gershenzon, J., Croteau, R., 1992. Characterization and mechanism of (4S)-limonene synthase, a monoterpene cyclase from the glandular trichomes of peppermint (Mentha x piperita). Arch. Biochem. Biophys. 296, 49–57. https://doi.org/10.1016/0003-9861(92)90543-6

Rapport WTW, 2007. Well to Wheel analysis of future automobile fuels and powertrains in the European context.

Raymond, J., Siefert, J.L., Staples, C.R., Blankenship, R.E., 2004. The natural history of nitrogen fixation. Mol. Biol. Evol. 21, 541–554. https://doi.org/10.1093/molbev/msh047

Reddy, K.J., Haskell, J.B., Sherman, D.M., Sherman, L.A., 1993. Unicellular, aerobic nitrogen-fixing cyanobacteria of the genus Cyanothece. J. Bacteriol. 175, 1284–1292.

Reiling, K.K., Yoshikuni, Y., Martin, V.J.J., Newman, J., Bohlmann, J., Keasling, J.D., 2004. Mono and diterpene production in Escherichia coli. Biotechnol. Bioeng. 87, 200–212. https://doi.org/10.1002/bit.20128

Reinsvold, R.E., Jinkerson, R.E., Radakovits, R., Posewitz, M.C., Basu, C., 2011. The production of the sesquiterpene β-caryophyllene in a transgenic strain of the cyanobacterium Synechocystis. J. Plant Physiol. 168, 848–852. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.11.006

Richard, S.B., Bowman, M.E., Kwiatkowski, W., Kang, I., Chow, C., Lillo, A.M., Cane, D.E., Noel, J.P., 2001. Structure of 4-diphosphocytidyl-2-C- methylerythritol synthetase involved in mevalonate- independent isoprenoid biosynthesis. Nat. Struct. Biol. 8, 641–648. https://doi.org/10.1038/89691

Richard, S.B., Ferrer, J.-L., Bowman, M.E., Lillo, A.M., Tetzlaff, C.N., Cane, D.E., Noel, J.P., 2002. Structure and Mechanism of 2-C-Methyl-d-erythritol 2,4-Cyclodiphosphate Synthase An enzyme in the mevalonate-independent isoprenoid biosynthetic pathway. J. Biol. Chem. 277, 8667–8672. https://doi.org/10.1074/jbc.C100739200

Richard, S.B., Lillo, A.M., Tetzlaff, C.N., Bowman, M.E., Noel, J.P., Cane, D.E., 2004. Kinetic analysis of Escherichia coli 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate cytidyltransferase, wild type and mutants, reveals roles of active site amino acids. Biochemistry 43, 12189–12197. https://doi.org/10.1021/bi0487241

Richardson, D.L., Reed, R.H., Stewart, W.D.P., 1983. Synechocystis PCC6803: a euryhaline cyanobacterium. FEMS Microbiol. Lett. 18, 99–102. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1983.tb00457.x

Rippka, R., Deruelles, J., Stanier, R.Y., Herdman, M., Waterbury, J.B., 1979. Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. Microbiology 111, 1–61. https://doi.org/10.1099/00221287-111-1-1

Robles-Rengel, R., Florencio, F.J., Muro-Pastor, M.I., 2019. Redox interference in nitrogen status via oxidative stress is mediated by 2-oxoglutarate in cyanobacteria. New Phytol. 224, 216–228. https://doi.org/10.1111/nph.15979

Rodríguez-Concepción, M., 2006. Early Steps in Isoprenoid Biosynthesis: Multilevel Regulation of the Supply of Common Precursors in Plant Cells. Phytochem. Rev. 5, 1–15. https://doi.org/10.1007/s11101-005-3130-4

Rodríguez-Concepción, M., Boronat, A., 2002. Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. Plant Physiol. 130, 1079–1089. https://doi.org/10.1104/pp.007138

Rodríguez-Villalón, A., Pérez-Gil, J., Rodríguez-Concepción, M., 2008. Carotenoid accumulation in bacteria with enhanced supply of isoprenoid precursors by upregulation of exogenous or endogenous pathways. J. Biotechnol. 135, 78–84. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.02.023

Rohmer, M., Knani, M., Simonin, P., Sutter, B., Sahm, H., 1993. Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. Biochem. J. 295 (Pt 2), 517–524. https://doi.org/10.1042/bj2950517

Rosgaard, L., de Porcellinis, A.J., Jacobsen, J.H., Frigaard, N.-U., Sakuragi, Y., 2012. Bioengineering of carbon fixation, biofuels, and biochemicals in cyanobacteria and plants. J. Biotechnol. 162, 134–147. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.05.006

Rossi, F., De Philippis, R., 2015. Role of cyanobacterial exopolysaccharides in phototrophic biofilms and in complex microbial mats. Life Basel Switz. 5, 1218–1238. https://doi.org/10.3390/life5021218

Ruffing, A.M., 2014. Improved free fatty acid production in cyanobacteria with Synechococcus sp. PCC 7002 as host. Front. Bioeng. Biotechnol. 2, 1–10. https://doi.org/10.3389/fbioe.2014.00017

Rufino, A.T., Ribeiro, M., Judas, F., Salgueiro, L., Lopes, M.C., Cavaleiro, C., Mendes, A.F., 2014. Anti-inflammatory and Chondroprotective Activity of (+)-α-Pinene: Structural and Enantiomeric Selectivity. J. Nat. Prod. 77, 264–269. https://doi.org/10.1021/np400828x

Ruthsatz, J., Ruthsatz, K., Stephens, K.R., 2014. Putting practice into perspective: Child prodigies as evidence of innate talent. Intelligence, Acquiring Expertise: Ability, Practice, and Other Influences 45, 60–65. https://doi.org/10.1016/j.intell.2013.08.003

Ruzicka, L., 1953. The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. Experientia 9, 357–367. https://doi.org/10.1007/bf02167631

Sadler, N.C., Bernstein, H.C., Melnicki, M.R., Charania, M.A., Hill, E.A., Anderson, L.N., Monroe, M.E., Smith, R.D., Beliaev, A.S., Wright, A.T., 2016. Dinitrogenase-Driven Photobiological Hydrogen Production Combats Oxidative Stress in Cyanothece sp. Strain ATCC 51142. Appl. Environ. Microbiol. 82, 7227–7235. https://doi.org/10.1128/AEM.02098-16

Sakamoto, T., Bryant, D.A., 1998. Growth at low temperature causes nitrogen limitation in the cyanobacterium Synechococcus sp. PCC 7002. Arch. Microbiol. 169, 10–19. https://doi.org/10.1007/s002030050535

Sakamoto, T., Delgaizo, V.B., Bryant, D.A., 1998. Growth on urea can trigger death and peroxidation of the cyanobacterium Synechococcus sp. strain PCC 7002. Appl. Environ. Microbiol. 64, 2361–2366.

Sangari, F.J., Pérez-Gil, J., Carretero-Paulet, L., García-Lobo, J.M., Rodríguez-Concepción, M., 2010. A new family of enzymes catalyzing the first committed step of the methylerythritol 4-phosphate (MEP) pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107, 14081–14086. https://doi.org/10.1073/pnas.1001962107

Sarrade, S., 2011. La chimie d'une planète durable, Editions du pommier. ed.

Sarria, S., Wong, B., García Martín, H., Keasling, J.D., Peralta-Yahya, P., 2014. Microbial synthesis of pinene. ACS Synth. Biol. 3, 466–475. https://doi.org/10.1021/sb4001382

Satagopan, S., Huening, K.A., Robert Tabita, F., 2019. Selection of Cyanobacterial (Synechococcus sp. Strain PCC 6301) RubisCO Variants with Improved Functional Properties That Confer Enhanced CO2-Dependent Growth of Rhodobacter capsulatus, a Photosynthetic Bacterium. mBio 10, e01537-19. https://doi.org/10.1128/mBio.01537-19

Satou, T., Miyagawa, M., Seimiya, H., Yamada, H., Hasegawa, T., Koike, K., 2014. Prolonged anxiolytic-like activity of sandalwood (Santalum album L.) oil in stress-loaded mice. Flavour Fragr. J. 29, 35–38. https://doi.org/10.1002/ffj.3176

Satou, T., Ogawa, Y., Koike, K., 2015. Relationship Between Emotional Behavior in Mice and the Concentration of (+)-α-Santalol in the Brain. Phytother. Res. PTR 29, 1246–1250. https://doi.org/10.1002/ptr.5372

Savage, D.F., Way, J., Silver, P.A., 2008. Defossiling Fuel: How Synthetic Biology Can Transform Biofuel Production. ACS Chem. Biol. 3, 13–16. https://doi.org/10.1021/cb700259j

Savakis, P., Hellingwerf, K.J., 2015. Engineering cyanobacteria for direct biofuel production from CO2. Curr. Opin. Biotechnol. 33, 8–14. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.09.007

Scalcinati, G., Knuf, C., Partow, S., Chen, Y., Maury, J., Schalk, M., Daviet, L., Nielsen, J., Siewers, V., 2012a. Dynamic control of gene expression in Saccharomyces cerevisiae engineered for the production of plant sesquitepene α-santalene in a fed-batch mode. Metab. Eng. 14, 91–103. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2012.01.007

Scalcinati, G., Partow, S., Siewers, V., Schalk, M., Daviet, L., Nielsen, J., 2012b. Combined metabolic engineering of precursor and co-factor supply to increase α-santalene production by Saccharomyces cerevisiae. Microb. Cell Factories 11, 117. https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-117

Schäfer, L., Vioque, A., Sandmann, G., 2005. Functional in situ evaluation of photosynthesis-protecting carotenoids in mutants of the cyanobacterium Synechocystis PCC6803. J. Photochem. Photobiol. B 78, 195–201. https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2004.11.007

Schalk, M., 2009. Procédé De Production D'alpha-Santalène. WO2009109597A1.

Schempp, F.M., Drummond, L., Buchhaupt, M., Schrader, J., 2018. Microbial Cell Factories for the Production of Terpenoid Flavor and Fragrance Compounds. J. Agric. Food Chem. 66, 2247–2258. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00473

Schmetterer, G., Wolk, C.P., 1988. Identification of the region of cyanobacterial plasmid pDU1 necessary for replication in Anabaena sp. strain M-131. Gene 62, 101–109. https://doi.org/10.1016/0378-1119(88)90583-5

Schneegurt, M.A., Sherman, D.M., Nayar, S., Sherman, L.A., 1994. Oscillating behavior of carbohydrate granule formation and dinitrogen fixation in the cyanobacterium Cyanothece sp. strain ATCC 51142. J. Bacteriol. 176, 1586–1597. https://doi.org/10.1128/jb.176.6.1586-1597.1994

Schneegurt, M.A., Sherman, D.M., Sherman, L.A., 1997. Growth, Physiology, and Ultrastructure of a Diazotrophic Cyanobacterium, Cyanothece Sp. Strain Atcc 51142, in Mixotrophic and Chemoheterotrophic Cultures1. J. Phycol. 33, 632–642. https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1997.00632.x

Schofer, S.J., McPhee, D., Moriguchi, N., Yamana, Y., Chapman, B., Hirata, K., Uehara, Y., 2014. Biofene, a renewable monomer for elastomer materials with novel properties: Polymer development, characterization and use 250, 25–30.

Schopf, W., 2011. The paleobiological record of photosynthesis. Photosynth. Res. 107, 87–101. https://doi.org/10.1007/s11120-010-9577-1

Schuurmans, R.M., van Alphen, P., Schuurmans, J.M., Matthijs, H.C.P., Hellingwerf, K.J., 2015. Comparison of the Photosynthetic Yield of Cyanobacteria and Green Algae: Different Methods Give Different Answers. PloS One 10, e0139061. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139061

Sebesta, J., Peebles, C.AM., 2019. Improving heterologous protein expression in Synechocystis sp. PCC 6803 for alpha-bisabolene production. Metab. Eng. Commun. 10. https://doi.org/10.1016/j.mec.2019.e00117

Seefeldt, L.C., Peters, J.W., Beratan, D.N., Bothner, B., Minteer, S.D., Raugei, S., Hoffman, B.M., 2018. Control of electron transfer in nitrogenase. Curr. Opin. Chem. Biol. 47, 54–59. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.08.011

Sgraja, T., Kemp, L.E., Ramsden, N., Hunter, W.N., 2005. A double mutation of Escherichia coli 2C-methyl-d-erythritol-2,4-cyclodiphosphate synthase disrupts six hydrogen bonds with, yet fails to prevent binding of, an isoprenoid diphosphate. Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun. 61, 625–629. https://doi.org/10.1107/S1744309105018762

Shabestary, K., Hudson, E.P., 2016. Computational metabolic engineering strategies for growth-coupled biofuel production by Synechocystis. Metab. Eng. Commun. 3, 216–226. https://doi.org/10.1016/j.meteno.2016.07.003

Sharma, B.K., Biresaw, G., 2016. Environmentally Friendly and Biobased Lubricants. CRC Press. https://doi.org/10.1201/9781315373256

Shen, C.R., Liao, J.C., 2012. Photosynthetic production of 2-methyl-1-butanol from CO2 in cyanobacterium Synechococcus elongatus PCC7942 and characterization of the native acetohydroxyacid synthase. Energy Environ. Sci. 5, 9574–9583. https://doi.org/10.1039/C2EE23148D

Sherman, L.A., Min, H., Toepel, J., Pakrasi, H.B., 2010. Better living through cyanothece - unicellular diazotrophic cyanobacteria with highly versatile metabolic systems. Adv. Exp. Med. Biol. 675, 275–290. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1528-3_16

Shi, T., Falkowski, P.G., 2008. Genome evolution in cyanobacteria: the stable core and the variable shell. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105, 2510–2515. https://doi.org/10.1073/pnas.0711165105

Simanis. 1985. in D. Hanahan. DNA cloning vol. I p121. Glover DM (ed), IRL Press, Oxford

Sivonen, K., Leikoski, N., Fewer, D.P., Jokela, J., 2010. Cyanobactins—ribosomal cyclic peptides produced by cyanobacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol. 86, 1213–1225. https://doi.org/10.1007/s00253-010-2482-x

Soo, R.M., Hemp, J., Parks, D.H., Fischer, W.W., Hugenholtz, P., 2017. On the origins of oxygenic photosynthesis and aerobic respiration in Cyanobacteria. Science 355, 1436–1440. https://doi.org/10.1126/science.aal3794

Stanier, R.Y., Kunisawa, R., Mandel, M., Cohen-Bazire, G., 1971. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). Bacteriol. Rev. 35, 171–205.

Stevens, S.E., Porter, R.D., 1980. Transformation in Agmenellum quadruplicatum. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 77, 6052–6056. https://doi.org/10.1073/pnas.77.10.6052

Stöckel, J., Jacobs, J.M., Elvitigala, T.R., Liberton, M., Welsh, E.A., Polpitiya, A.D., Gritsenko, M.A., Nicora, C.D., Koppenaal, D.W., Smith, R.D., Pakrasi, H.B., 2011. Diurnal Rhythms Result in Significant Changes in the Cellular Protein Complement in the Cyanobacterium Cyanothece 51142. PLOS ONE 6, e16680. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016680

Stöckel, J., Welsh, E.A., Liberton, M., Kunnvakkam, R., Aurora, R., Pakrasi, H.B., 2008. Global transcriptomic analysis of Cyanothece 51142 reveals robust diurnal oscillation of central metabolic processes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105, 6156–6161. https://doi.org/10.1073/pnas.0711068105

Summerfield, T.C., Sherman, L.A., 2008. Global transcriptional response of the alkali-tolerant cyanobacterium Synechocystis sp. strain PCC 6803 to a pH 10 environment. Appl. Environ. Microbiol. 74, 5276–5284. https://doi.org/10.1128/AEM.00883-08

Takahama, K., Matsuoka, M., Nagahama, K., Ogawa, T., 2003. Construction and analysis of a recombinant cyanobacterium expressing a chromosomally inserted gene for an ethylene-forming enzyme at the psbAI locus. J. Biosci. Bioeng. 95, 302–305. https://doi.org/10.1016/S1389-1723(03)80034-8

Takaichi, S., Maoka, T., Masamoto, K., 2001. Myxoxanthophyll in Synechocystis sp. PCC 6803 is Myxol 2′-Dimethyl-Fucoside, (3R,2′S)-Myxol 2′-(2,4-di-O-Methyl-α-l-Fucoside), not Rhamnoside. Plant Cell Physiol. 42, 756–762. https://doi.org/10.1093/pcp/pce098

Takeya, M., Hirai, M.Y., Osanai, T., 2017. Allosteric inhibition of phosphoenolpyruvate carboxylases is determined by a single amino acid residue in cyanobacteria. Sci. Rep. 7. https://doi.org/10.1038/srep41080

Tanaka, S., Yasuda, A., Yamamoto, H., Nozaki, H., 1975. General method for the synthesis of 1,3-dienes. Simple syntheses of .beta.- and trans-.alpha.-farnescene from farnesol. J. Am. Chem. Soc. 97, 3252–3254. https://doi.org/10.1021/ja00844a073

Tang, S.-Y., Cirino, P.C., 2011. Design and Application of a Mevalonate-Responsive Regulatory Protein. Angew. Chem. Int. Ed. 50, 1084–1086. https://doi.org/10.1002/anie.201006083

Taroncher-Oldenburg, G., Nishina, K., Stephanopoulos, G., 2000. Identification and analysis of the polyhydroxyalkanoate-specific beta-ketothiolase and acetoacetyl coenzyme A reductase genes in the cyanobacterium Synechocystis sp. strain PCC6803. Appl. Environ. Microbiol. 66, 4440–4448. https://doi.org/10.1128/aem.66.10.4440-4448.2000

Tashiro, M., Kiyota, H., Kawai-Noma, S., Saito, K., Ikeuchi, M., Iijima, Y., Umeno, D., 2016. Bacterial Production of Pinene by a Laboratory-Evolved Pinene-Synthase. ACS Synth. Biol. 5, 1011–1020. https://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00140

Testa, C.A., Lherbet, C., Pojer, F., Noel, J.P., Poulter, C.D., 2006. Cloning and expression of IspDF from Mesorhizobium loti. Characterization of a bifunctional protein that catalyzes non-consecutive steps in the methylerythritol phosphate pathway. Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics 1764, 85–96. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.08.006

Teuscher, E., Lindequist, U., 2010. Biogene Gifte: Biologie, Chemie, Pharmakologie, Toxikologie, 3rd ed. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart.

Thiel, T., 2019. Organization and regulation of cyanobacterial nif gene clusters: implications for nitrogenase expression in plant cells. FEMS Microbiol. Lett. 366. https://doi.org/10.1093/femsle/fnz077

Thiel, T., Poo, H., 1989. Transformation of a filamentous cyanobacterium by electroporation. J. Bacteriol. 171, 5743–5746. https://doi.org/10.1128/jb.171.10.5743-5746.1989

Tippmann, S., Scalcinati, G., Siewers, V., Nielsen, J., 2016. Production of farnesene and santalene by Saccharomyces cerevisiae using fed-batch cultivations with RQ-controlled feed. Biotechnol. Bioeng. 113, 72–81. https://doi.org/10.1002/bit.25683

Toepel, J., Welsh, E., Summerfield, T.C., Pakrasi, H.B., Sherman, L.A., 2008. Differential Transcriptional Analysis of the Cyanobacterium Cyanothece sp. Strain ATCC 51142 during Light-Dark and Continuous-Light Growth. J. Bacteriol. 190, 3904–3913. https://doi.org/10.1128/JB.00206-08

Tóth, T.N., Chukhutsina, V., Domonkos, I., Knoppová, J., Komenda, J., Kis, M., Lénárt, Z., Garab, G., Kovács, L., Gombos, Z., van Amerongen, H., 2015. Carotenoids are essential for the assembly of cyanobacterial photosynthetic complexes. Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg. 1847, 1153–1165. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2015.05.020

Tracy, N.I., Chen, D., Crunkleton, D.W., Price, G.L., 2009. Hydrogenated monoterpenes as diesel fuel additives. Fuel 88, 2238–2240. https://doi.org/10.1016/j.fuel.2009.02.002

Trongtokit, Y., Rongsriyam, Y., Komalamisra, N., Apiwathnasorn, C., 2005. Comparative repellency of 38 essential oils against mosquito bites. Phytother. Res. PTR 19, 303–309. https://doi.org/10.1002/ptr.1637

Troost, K., Loeschcke, A., Hilgers, F., Özgür, A.Y., Weber, T.M., Santiago-Schübel, B., Svensson, V., Hage-Hülsmann, J., Habash, S.S., Grundler, F.M.W., Schleker, A.S.S., Jaeger, K.-E., Drepper, T., 2019. Engineered Rhodobacter capsulatus as a Phototrophic Platform Organism for the Synthesis of Plant Sesquiterpenoids. Front. Microbiol. 10. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01998

Tsang, A., Seidle, H., Jawaid, S., Zhou, W., Smith, C., Couch, R.D., 2011. Francisella tularensis 2-C-Methyl-D-Erythritol 4-Phosphate Cytidylyltransferase: Kinetic Characterization and Phosphoregulation. PLOS ONE 6, e20884. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020884

Turmo, A., Gonzalez-Esquer, C.R., Kerfeld, C.A., 2017. Carboxysomes: metabolic modules for CO2 fixation. FEMS Microbiol. Lett. 364. https://doi.org/10.1093/femsle/fnx176

Tuskan, G.A., Difazio, S., Jansson, S., Bohlmann, J., Grigoriev, I., Hellsten, U., Putnam, N., Ralph, S., Rombauts, S., Salamov, A., Schein, J., Sterck, L., Aerts, A., Bhalerao, R.R., Bhalerao, R.P., Blaudez, D., Boerjan, W., Brun, A., Brunner, A., Busov, V., Campbell, M., Carlson, J., Chalot, M., Chapman, J., Chen, G.-L., Cooper, D., Coutinho, P.M., Couturier, J., Covert, S., Cronk, Q., Cunningham, R., Davis, J., Degroeve, S., Déjardin, A., Depamphilis, C., Detter, J., Dirks, B., Dubchak, I., Duplessis, S., Ehlting, J., Ellis, B., Gendler, K., Goodstein, D., Gribskov, M., Grimwood, J., Groover, A., Gunter, L., Hamberger, B., Heinze, B., Helariutta, Y., Henrissat, B., Holligan, D., Holt, R., Huang, W., Islam-Faridi, N., Jones, S., Jones-Rhoades, M., Jorgensen, R., Joshi, C., Kangasjärvi, J., Karlsson, J., Kelleher, C., Kirkpatrick, R., Kirst, M., Kohler, A., Kalluri, U., Larimer, F., Leebens-Mack, J., Leplé, J.-C., Locascio, P., Lou, Y., Lucas, S., Martin, F., Montanini, B., Napoli, C., Nelson, D.R., Nelson, C., Nieminen, K., Nilsson, O., Pereda, V., Peter, G., Philippe, R., Pilate, G., Poliakov, A., Razumovskaya, J., Richardson, P., Rinaldi, C., Ritland, K., Rouzé, P., Ryaboy, D., Schmutz, J., Schrader, J., Segerman, B., Shin, H., Siddiqui, A., Sterky, F., Terry, A., Tsai, C.-J., Uberbacher, E., Unneberg, P., Vahala, J., Wall, K., Wessler, S., Yang, G., Yin, T., Douglas, C., Marra, M., Sandberg, G., Van de Peer, Y., Rokhsar, D., 2006. The genome of black cottonwood, Populus trichocarpa (Torr. & Gray). Science 313, 1596–1604. https://doi.org/10.1126/science.1128691

Ubersax, J., Frenz, L., 2012. Procédés et compositions pour détecter la production microbienne de composés immiscibles avec l'eau. WO2012158466A1.

Valladares, A., Montesinos, M.L., Herrero, A., Flores, E., 2002. An ABC-type, high-affinity urea permease identified in cyanobacteria. Mol. Microbiol. 43, 703–715. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02778.x

Van Baalen, C., 1962. Studies on Marine Blue-Green Algae. Bot. Mar. 4. https://doi.org/10.1515/botm.1962.4.1-2.129

van der Plas, J., Oosterhoff-Teertstra, R., Borrias, M., Weisbeek, P., 1992. Identification of replication and stability functions in the complete nucleotide sequence of plasmid pUH24 from the cyanobacterium Synechococcus sp. PCC 7942. Mol. Microbiol. 6, 653–664. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1992.tb01513.x

van der Woude, A.D., Angermayr, S.A., Puthan Veetil, V., Osnato, A., Hellingwerf, K.J., 2014. Carbon sink removal: Increased photosynthetic production of lactic acid by Synechocystis sp. PCC6803 in a glycogen storage mutant. J. Biotechnol. 184, 100–102. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.04.029

Vardakou, M., Salmon, M., Faraldos, J.A., O'Maille, P.E., 2014. Comparative analysis and validation of the malachite green assay for the high throughput biochemical characterization of terpene synthases. MethodsX 1, 187–196. https://doi.org/10.1016/j.mex.2014.08.007

Vasudevan, R., Gale, G.A.R., Schiavon, A.A., Puzorjov, A., Malin, J., Gillespie, M.D., Vavitsas, K., Zulkower, V., Wang, B., Howe, C.J., Lea-Smith, D.J., McCormick, A.J., 2019. CyanoGate: A Modular Cloning Suite for Engineering Cyanobacteria Based on the Plant MoClo Syntax. Plant Physiol. 180, 39–55. https://doi.org/10.1104/pp.18.01401

Veaudor, T., 2017. Vers la reprogrammation métabolique de la cyanobactérie modèle Synechocystis pour la production durable de biocarburants : structuration des flux du carbone par CP12 et implications sur l'équilibre bioénergétique, l'hydrogénase et l'intégrité génomique (phdthesis). Thèse de l'Université Paris-Saclay.

Veaudor, T., Blanc-Garin, V., Chenebault, C., Diaz-Santos, E., Sassi, J.-F., Cassier-Chauvat, C., Chauvat, F., 2020. Recent Advances in the Photoautotrophic Metabolism of Cyanobacteria: Biotechnological Implications. Life 10, 71. https://doi.org/10.3390/life10050071

Veaudor, T., Cassier-Chauvat, C., Chauvat, F., 2019. Genomics of Urea Transport and Catabolism in Cyanobacteria: Biotechnological Implications. Front. Microbiol. 10, 2052. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02052

Veaudor, T., Ortega-Ramos, M., Jittawuttipoka, T., Bottin, H., Cassier-Chauvat, C., Chauvat, F., 2018. Overproduction of the cyanobacterial hydrogenase and selection of a mutant thriving on urea, as a possible step towards the future production of hydrogen coupled with water treatment. PloS One 13, e0198836. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198836

Vickers, C.E., Sabri, S., 2015. Isoprene. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 148, 289–317. https://doi.org/10.1007/10_2014_303

Videau, P., Wells, K.N., Singh, A.J., Gerwick, W.H., Philmus, B., 2016. Assessment of Anabaena sp. Strain PCC 7120 as a Heterologous Expression Host for Cyanobacterial Natural Products: Production of Lyngbyatoxin A. ACS Synth. Biol. 5, 978–988. https://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00038

Vranová, E., Coman, D., Gruissem, W., 2013. Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis. Annu. Rev. Plant Biol. 64, 665–700. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120116

Vyvyan, J.R., Loitz, C., Looper, R.E., Mattingly, C.S., Peterson, E.A., Staben, S.T., 2004. Synthesis of Aromatic Bisabolene Natural Products via Palladium-Catalyzed Cross-Couplings of Organozinc Reagents. J. Org. Chem. 69, 2461–2468. https://doi.org/10.1021/jo035778s

Wang, W., Liu, X., Lu, X., 2013. Engineering cyanobacteria to improve photosynthetic production of alka(e)nes. Biotechnol. Biofuels 6, 69. https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-69

Wang, X., Liu, W., Xin, C., Zheng, Y., Cheng, Y., Sun, S., Li, R., Zhu, X.-G., Dai, S.Y., Rentzepis, P.M., Yuan, J.S., 2016. Enhanced limonene production in cyanobacteria reveals photosynthesis limitations. Proc. Natl. Acad. Sci. 113, 14225–14230. https://doi.org/10.1073/pnas.1613340113

Warlick, B.P., Evans, B.S., Erb, T.J., Ramagopal, U.A., Sriram, J., Imker, H.J., Sauder, J.M., Bonanno, J.B., Burley, S.K., Tabita, F.R., Almo, S.C., Sweedler, J.S., Gerlt, J.A., 2012. 1-Methylthio-D-Xylulose 5-Phosphate Methylsulfurylase: A Novel Route to 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate in Rhodospirillum rubrum. Biochemistry 51, 8324–8326. https://doi.org/10.1021/bi301215g

Watanabe, S., 2020. Cyanobacterial multi-copy chromosomes and their replication. Biosci. Biotechnol. Biochem. 1–13. https://doi.org/10.1080/09168451.2020.1736983

Watzer, B., Spät, P., Neumann, N., Koch, M., Sobotka, R., MacEk, B., Hennrich, O., Forchhammer, K., 2019. The signal transduction protein PII controls ammonium, nitrate and urea uptake in cyanobacteria. Front. Microbiol. 10. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01428

Welkie, D.G., Sherman, D.M., Chrisler, W.B., Orr, G., Sherman, L.A., 2013. Analysis of carbohydrate storage granules in the diazotrophic cyanobacterium Cyanothece sp. PCC 7822. Photosynth. Res. 118, 25–36. https://doi.org/10.1007/s11120-013-9941-z

Welsh, E.A., Liberton, M., Stöckel, J., Loh, T., Elvitigala, T., Wang, C., Wollam, A., Fulton, R.S., Clifton, S.W., Jacobs, J.M., Aurora, R., Ghosh, B.K., Sherman, L.A., Smith, R.D., Wilson, R.K., Pakrasi, H.B., 2008. The genome of Cyanothece 51142, a unicellular diazotrophic cyanobacterium important in the marine nitrogen cycle. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105, 15094–15099. https://doi.org/10.1073/pnas.0805418105

Wendt, K.E., Pakrasi, H.B., 2019. Genomics Approaches to Deciphering Natural Transformation in Cyanobacteria. Front. Microbiol. 10, 1259. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01259

Wichmann, J., Baier, T., Wentnagel, E., Lauersen, K.J., Kruse, O., 2018. Tailored carbon partitioning for phototrophic production of (E)-α-bisabolene from the green microalga Chlamydomonas reinhardtii. Metab. Eng. 45, 211–222. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2017.12.010

Williams, D.C., McGarvey, D.J., Katahira, E.J., Croteau, R., 1998. Truncation of limonene synthase preprotein provides a fully active "pseudomature" form of this monoterpene cyclase and reveals the function of the amino-terminal arginine pair. Biochemistry 37, 12213–12220. https://doi.org/10.1021/bi980854k

Wilson, R.H., Martin-Avila, E., Conlan, C., Whitney, S.M., 2018. An improved Escherichia coli screen for Rubisco identifies a protein-protein interface that can enhance CO2-fixation kinetics. J. Biol. Chem. 293, 18–27. https://doi.org/10.1074/jbc.M117.810861

Winnacker, M., Sag, J., 2018. Sustainable terpene-based polyamides via anionic polymerization of a pinene-derived lactam. Chem. Commun. 54, 841–844. https://doi.org/10.1039/C7CC08266E

Witkewitz, D., Richey, L., Thomas, S., 1992. US5158790. 5,158,790.

Wolk, C.P., 1996. Heterocyst formation. Annu. Rev. Genet. 30, 59–78. https://doi.org/10.1146/annurev.genet.30.1.59

Wolk, C.P., Cai, Y., Cardemil, L., Flores, E., Hohn, B., Murry, M., Schmetterer, G., Schrautemeier, B., Wilson, R., 1988. Isolation and complementation of mutants of Anabaena sp. strain PCC 7120 unable to grow aerobically on dinitrogen. J. Bacteriol. 170, 1239–1244.

Woo, Y.-H., Fernandes, R.P.M., Proteau, P.J., 2006. Evaluation of fosmidomycin analogs as inhibitors of the Synechocystis sp. PCC6803 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase. Bioorg. Med. Chem. 14, 2375–2385. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.11.012

Work, V.H., D'Adamo, S., Radakovits, R., Jinkerson, R.E., Posewitz, M.C., 2012. Improving photosynthesis and metabolic networks for the competitive production of phototroph-derived biofuels. Curr. Opin. Biotechnol., Energy biotechnology • Environmental biotechnology 23, 290–297. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.11.022

Wu, W., Maravelias, C.T., 2018. Synthesis and techno-economic assessment of microbial-based processes for terpenes production. Biotechnol. Biofuels 11, 294. https://doi.org/10.1186/s13068-018-1285-7

Xu, W., McFadden, B.A., 1997. Sequence analysis of plasmid pCC5.2 from cyanobacterium Synechocystis PCC 6803 that replicates by a rolling circle mechanism. Plasmid 37, 95–104. https://doi.org/10.1006/plas.1997.1281

Xu, Y., Alvey, R.M., Byrne, P.O., Graham, J.E., Shen, G., Bryant, D.A., 2011. Expression of genes in cyanobacteria: adaptation of endogenous plasmids as platforms for high-level gene expression in Synechococcus sp. PCC 7002. Methods Mol. Biol. Clifton NJ 684, 273–293. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-925-3_21

Xue, Y., Zhao, P., Quan, C., Zhao, Z., Gao, W., Li, J., Zu, X., Fu, D., Feng, S., Bai, X., Zuo, Y., Li, P., 2018. Cyanobacteria-derived peptide antibiotics discovered since 2000. Peptides 107, 17–24. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2018.08.002

Yang, M., Qiao, Z., Zhang, W., Xiong, Q., Zhang, J., Li, T., Ge, F., Zhao, J., 2013. Global phosphoproteomic analysis reveals diverse functions of serine/threonine/tyrosine phosphorylation in the model cyanobacterium Synechococcus sp. strain PCC 7002. J. Proteome Res. 12, 1909–1923. https://doi.org/10.1021/pr4000043

Yang, X., McFadden, B.A., 1994. The complete DNA sequence and replication analysis of the plasmid pCB2.4 from the cyanobacterium Synechocystis PCC 6803. Plasmid 31, 131–137. https://doi.org/10.1006/plas.1994.1014

Yang, X., McFadden, B.A., 1993. A small plasmid, pCA2.4, from the cyanobacterium Synechocystis sp. strain PCC 6803 encodes a rep protein and replicates by a rolling circle mechanism. J. Bacteriol. 175, 3981–3991. https://doi.org/10.1128/jb.175.13.3981-3991.1993

Yang, X., Nambou, K., Wei, L., Hua, Q., 2016. Heterologous production of α-farnesene in metabolically engineered strains of Yarrowia lipolytica. Bioresour. Technol. 216, 1040–1048. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.028

Yang, Z.-Y., Ledbetter, R., Shaw, S., Pence, N., Tokmina-Lukaszewska, M., Eilers, B., Guo, Q., Pokhrel, N., Cash, V.L., Dean, D.R., Antony, E., Bothner, B., Peters, J.W., Seefeldt, L.C., 2016. Evidence That the Pi Release Event Is the Rate-Limiting Step in the Nitrogenase Catalytic Cycle. Biochemistry 55, 3625–3635. https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00421

Yin, X., Proteau, P.J., 2003. Characterization of native and histidine-tagged deoxyxylulose 5-phosphate reductoisomerase from the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC6803. Biochim. Biophys. Acta 1652, 75–81. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2003.08.005

Yoo, S.-H., Lee, B.-H., Moon, Y., Spalding, M.H., Jane, J.-L., 2014. Glycogen synthase isoforms in Synechocystis sp. PCC6803: identification of different roles to produce glycogen by targeted mutagenesis. PloS One 9, e91524. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091524

Yoon, S.-H., Lee, Y.-M., Kim, J.-E., Lee, S.-H., Lee, J.-H., Kim, J.-Y., Jung, K.-H., Shin, Y.-C., Keasling, J.D., Kim, S.-W., 2006. Enhanced lycopene production in Escherichia coli engineered to synthesize isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate from mevalonate. Biotechnol. Bioeng. 94, 1025–1032. https://doi.org/10.1002/bit.20912

Yoshihara, S., Geng, X., Okamoto, S., Yura, K., Murata, T., Go, M., Ohmori, M., Ikeuchi, M., 2001. Mutational Analysis of Genes Involved in Pilus Structure, Motilityand Transformation Competency in the Unicellular Motile CyanobacteriumSynechocystis sp. PCC6803. Plant Cell Physiol. 42, 63–73. https://doi.org/10.1093/pcp/pce007

Yoshikuni, Y., Dietrich, J.A., Nowroozi, F.F., Babbitt, P.C., Keasling, J.D., 2008. Redesigning enzymes based on adaptive evolution for optimal function in synthetic metabolic pathways. Chem. Biol. 15, 607–618. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2008.05.006

Yoshikuni, Y., Ferrin, T.E., Keasling, J.D., 2006a. Designed divergent evolution of enzyme function. Nature 440, 1078–1082. https://doi.org/10.1038/nature04607

Yoshikuni, Y., Martin, V.J.J., Ferrin, T.E., Keasling, J.D., 2006b. Engineering Cotton (+)-δ-Cadinene Synthase to an Altered Function: Germacrene D-4-ol Synthase. Chem. Biol. 13, 91–98. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2005.10.016

Yuan, L.Z., Rouvière, P.E., Larossa, R.A., Suh, W., 2006. Chromosomal promoter replacement of the isoprenoid pathway for enhancing carotenoid production in E. coli. Metab. Eng. 8, 79–90. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2005.08.005

Zang, X., Liu, B., Liu, S., Arunakumara, K.K.I.U., Zhang, X., 2007. Optimum conditions for transformation of Synechocystis sp. PCC 6803. J. Microbiol. Seoul Korea 45, 241–245.

Zhan, X., Zhang, Y.-H., Chen, D.-F., Simonsen, H.T., 2014. Metabolic engineering of the moss Physcomitrella patens to produce the sesquiterpenoids patchoulol and α/β-santalene. Front. Plant Sci. 5. https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00636

Zhang, A., Carroll, A.L., Atsumi, S., 2017. Carbon recycling by cyanobacteria: Improving CO2 fixation through chemical production. FEMS Microbiol. Lett. 364. https://doi.org/10.1093/femsle/fnx165

Zhang, C., Chen, X., Zou, R., Zhou, K., Stephanopoulos, G., Too, H.-P., 2013. Combining genotype improvement and statistical media optimization for isoprenoid production in E. coli. PloS One 8, e75164. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075164

Zhang, S., Bryant, D.A., 2011. The tricarboxylic acid cycle in cyanobacteria. Science 334, 1551–1553. https://doi.org/10.1126/science.1210858

Zhang, S., Bryant, D.A., 2015. Biochemical Validation of the Glyoxylate Cycle in the Cyanobacterium Chlorogloeopsis fritschii Strain PCC 9212. J. Biol. Chem. 290, 14019–14030. https://doi.org/10.1074/jbc.M115.648170

Zhang, S., Qian, X., Chang, S., Dismukes, G.C., Bryant, D.A., 2016. Natural and Synthetic Variants of the Tricarboxylic Acid Cycle in Cyanobacteria: Introduction of the GABA Shunt into Synechococcus sp. PCC 7002. Front. Microbiol. 7, 1972. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01972

Zhang, X., Sherman, D.M., Sherman, L.A., 2014. The uptake hydrogenase in the unicellular diazotrophic cyanobacterium Cyanothece sp. strain PCC 7822 protects nitrogenase from oxygen toxicity. J. Bacteriol. 196, 840–849. https://doi.org/10.1128/JB.01248-13

Zhou, J., Zhu, T., Cai, Z., Li, Y., 2016. From cyanochemicals to cyanofactories: areview and perspective. Microb. Cell Factories 15, 2. https://doi.org/10.1186/s12934-015-0405-3

Zhou, K., Zou, R., Stephanopoulos, G., Too, H.-P., 2012. Metabolite Profiling Identified Methylerythritol Cyclodiphosphate Efflux as a Limiting Step in Microbial Isoprenoid Production. PLOS ONE 7, e47513. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047513

Zhou, R., Gibbons, W., 2012. Genetically Engineered Cyanobacteria. US2012276637 (A1).

Zhu, L.D., Hiltunen, E., Takala, J., 2012. Microalgal Biofuels Beat the First and Second Generation Biofuels [WWW Document]. Appl. Mech. Mater. https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMM.197.760

Zhu, X.-G., Long, S.P., Ort, D.R., 2010. Improving Photosynthetic Efficiency for Greater Yield. Annu. Rev. Plant Biol. 61, 235–261. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112206

Zhu, Y., Graham, J.E., Ludwig, M., Xiong, W., Alvey, R.M., Shen, G., Bryant, D.A., 2010. Roles of xanthophyll carotenoids in protection against photoinhibition and oxidative stress in the cyanobacterium Synechococcus sp. strain PCC 7002. Arch. Biochem. Biophys., Carotenoids 504, 86–99. https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.07.007

Site internet

Connaissances des energies.org [WWW Document], n.d.

Ecologique-solidaire.gouv, 2020. Biocarburants [WWW Document].

http://www-heliobiotec.cea.fr [WWW Document], 2017.

http://www.yschem.co.jp/english/terpene/process.html [WWW Document], n.d.

Hydrogen Analysis Resource Center [WWW Document], n.d. URL https://h2tools.org/hyarc

Ignition Timing Animation [WWW Document], 2018. URL https://www.youtube.com/watch?v=QV-svXli2zw

La pétrochimie : une industrie incontournable [WWW Document], 2014. www.planete-energies.com

Planetoscope.com [WWW Document], n.d.

statista.com [WWW Document], n.d.
WWF.fr [WWW Document], n.d.

Annexe

Annexe 1 : Revue sur le métabolisme photoautotrophique de la cyanobactérie publiée dans Life (Veaudor *et al.*, 2020)

life

MDPI

Review

Recent Advances in the Photoautotrophic Metabolism of Cyanobacteria: Biotechnological Implications

Théo Veaudor [1], Victoire Blanc-Garin [1], Célia Chenebault [1], Encarnación Diaz-Santos [1], Jean-François Sassi [2], Corinne Cassier-Chauvat [1] and Franck Chauvat [1,*]

[1] Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, 91198 Gif-sur-Yvette, France; theo.veaudor@cea.fr (T.V.); victoire.blanc-garin@cea.fr (V.B.-G.); celia.chenebault@cea.fr (C.C.); encdiasan@hotmail.com (E.D.-S.); corinne.cassier-chauvat@cea.fr (C.C.-C.)

[2] Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives (CEA), Centre de Cadarache St Paul Lez, 13108 Durance, France; Jean-Francois.SASSI@cea.fr

* Correspondence: franck.chauvat@cea.fr; Tel.: +33-1-69-08-78-11

Received: 15 April 2020; Accepted: 18 May 2020; Published: 19 May 2020

check for updates

Abstract: Cyanobacteria constitute the only phylum of oxygen-evolving photosynthetic prokaryotes that shaped the oxygenic atmosphere of our planet. Over time, cyanobacteria have evolved as a widely diverse group of organisms that have colonized most aquatic and soil ecosystems of our planet and constitute a large proportion of the biomass that sustains the biosphere. Cyanobacteria synthesize a vast array of biologically active metabolites that are of great interest for human health and industry, and several model cyanobacteria can be genetically manipulated. Hence, cyanobacteria are regarded as promising microbial factories for the production of chemicals from highly abundant natural resources, e.g., solar energy, CO_2, minerals, and waters, eventually coupled to wastewater treatment to save costs. In this review, we summarize new important discoveries on the plasticity of the photoautotrophic metabolism of cyanobacteria, emphasizing the coordinated partitioning of carbon and nitrogen towards growth or compound storage, and the importance of these processes for biotechnological perspectives. We also emphasize the importance of redox regulation (including glutathionylation) on these processes, a subject which has often been overlooked.

Keywords: cyanobacteria; biodiversity; photosynthesis; CO_2 assimilation; nitrogen fixation; metabolic plasticity; regulation; redox control; production of chemicals for health and industries

1. Introduction

Cyanobacteria are very ancient organisms (from 2.3 to 3.5 billion years old [1]) that perform oxygen-evolving (plant-like) photosynthesis. These organisms are regarded as the ancestors of the plant chloroplast [2] and were responsible for oxygenation of the Earth's atmosphere [3]. Present-day cyanobacteria are responsible for ~25% of the organic carbon fixation on Earth [4], and some strains that can also fix atmospheric nitrogen (N_2) have been used for a long time for the nitrogen fertilization of rice fields [5]. Cyanobacteria are surrounded by a gram-negative cell envelope that comprises an outer membrane, a peptidoglycan layer and a plasma membrane [6]. They also possess thylakoids, the internal membranes that contain both the photosynthetic and respiratory machineries, excepting strains of the genus *Gloeobacter* that possess only the cytoplasmic membrane [7].

In colonizing most aquatic ecosystems (fresh, brackish, and marine) and soils (including deserts) of our planet, where they face environmental challenges, cyanobacteria have evolved as a widely diverse group of organisms. They display various cell morphologies [8], and widely diverse genome sizes (from 1.44 to 12.07 Mb) and organization [9]. All cyanobacteria possess a circular chromosome

and, depending on the particular strain, ecotype or species, a linear chromosome (rarely) and/or one to several circular plasmids (frequently).

Cyanobacteria produce a wealth of metabolites that can influence (i) their tolerance to environmental stresses; (ii) their interactions with competitors, predators or symbiotic hosts; and (iii) human health including: antioxidants, antibacterial, antifungal, antiviral, toxins, and vitamins [10–12]. Cyanobacteria of the genera *Arthrospira* (often misidentified as *Spirulina*), *Anabaena* and *Nostoc* have been consumed by humans for over a thousand years [13]. Currently, *Arthrospira platensis* and *Arthrospira maxima* serve as a highly digestible supplementary source of high-quality proteins, vitamins, minerals, and essential fatty acids. A few edible cyanobacteria are being tested as a way to replenish O_2, provide food, and recycle CO_2 and urea wastes during long-term space missions [14]. Furthermore, genome analyses have indicated that cyanobacteria have the potential to produce many more metabolites than those characterized so far [11,15]. Thus, it should be interesting in the future to exploit the metabolic diversity of cyanobacteria (they produce a wealth of natural products), their photosynthesis, and their radiation resistance (they can grow on $^{14}CO_2$) for the production of ^{14}C-labelled bioactive metabolites to screen for new drugs and analyze their absorption, distribution, metabolism, and excretion properties in mammalian cells and tissues [16].

Cyanobacteria are also increasingly regarded as promising cell factories for the production of high value-added chemicals (biofuels, bioplastic, cosmetics, drugs, and vitamins) from highly-abundant natural resources such as solar energy, water, CO_2, and minerals [6,17,18], eventually being combined with wastewater treatment to reduce costs [5]. Cyanobacteria capture solar energy at high efficiencies (3–9%) [19] to fix annually about 25 gigatons of carbon from atmospheric CO_2 into a huge energy-dense biomass [20], and they can also tolerate high CO_2-containing (≥50%) industrial gas [19].

Furthermore, cyanobacteria also have the potential for the photoproduction of hydrogen (H_2) that has a higher energy content than oil (142 MJ/kg for H2 vs. 44.2 MJ/kg for oil) and burns cleanly, producing only water as the by-product. Indeed, cyanobacteria possess the two enzymes that produce hydrogen, (bidirectional) hydrogenase [21] and nitrogenase [22]. However, as these two enzymes are sensitive to oxygen they need to be engineered to become oxygen tolerant [21,22]

In the following sections, the plasticity of the photoautotrophic metabolism of cyanobacteria will be placed in the context of the great interest in these organisms for basic and applied science objectives. We will emphasize the best-studied models *Synechocystis* PCC 6803, *Synechococcus* PCC 7942, and *Synechococcus* PCC 7002 because they possess a simple (unicellular) morphology, a small genome (3.95; 2.75, and 3.40 Mb, respectively) and powerful genetic tools [23]. Furthermore, these three cyanobacteria possess interesting physiological and metabolic differences. Both *Synechocystis* PCC 6803 and *Synechococcus* PCC 7002 are euryhaline cyanobacteria (*Synechococcus* PCC 7002 is a costal strain), and they are both able to grow on urea as the sole nitrogen source, unlike the freshwater organism *Synechococcus* PCC 7942 [24]. The growth of *Synechococcus* PCC 7002 requires vitamin B12 and it can be accelerated by glycerol [25], a cheap surplus of oil industries that can improve microbiological production [26]. In contrast, *Synechocystis* PCC 6803 and *Synechococcus* PCC 7942 do not need vitamin B12 and they cannot use glycerol for faster growth (it is even toxic for *Synechocystis* PCC 6803). Furthermore, *Synechocystis* PCC 6803 can grow on glucose under very-low light or darkness, unlike *Synechococcus* PCC 7942 and *Synechococcus* PCC 7002 [27].

2. Cyanobacteria Perform Oxygenic Photosynthesis to Power up Their Photoautotrophic Metabolism

Cyanobacteria capture light by their antenna that are composed of chlorophyll and phycobiliproteins, which covalently bind linear tetrapyrrole pigments called bilins as well as linker proteins. The phycobilisomes are assemblies of phycobiliproteins that have a core made up of allophycocyanin, from which phycocyanin rods project. In some cyanobacteria, the rods also contain phycoerythrin in addition to phycocyanin [28]. The light-harvesting antennae serve a dual role in photosynthesis, depending on the light intensities. Under "physiological" light, they ensure photosynthetic efficiency by maximizing the light absorption cross-section and subsequent energy

storage. Under excess light conditions, the light-harvesting complexes perform photoprotective quenching functions to prevent harmful chemical species such as triplet chlorophyll and singlet oxygen from forming and damaging the photosynthetic apparatus [28].

Solar energy captured by the antenna is transferred to the multi-subunits photosystems II (PSII) that uses it to split H_2O_2 molecules into O_2 and reducing equivalents. Four high energy electrons, together with four protons ($4H^+$), are used to reduce plastoquinone (PQ), the terminal electron acceptor of PSII, to plastoquinol (PQH2). Then, PQH2 passes its reducing equivalents to an electron transfer chain, which feeds into photosystem I (PSI) where they gain additional reducing potential from a second light reaction [29], to generate chemical energy (ATP) and reducing power (NADPH) [30]. This chemical energy powers up the assimilation of inorganic nutrients, including carbon (CO_2) nitrogen (N_2, NO_3, NH_4) (see below), sulfur (SO_4), and other metals and minerals (Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, P, Zn, *etc*) to produce a huge biomass that sustains most life forms on Earth. The Great Oxidation Event (GOE) that occurred 2.4 billion years ago likely resulted from the accumulation of oxygen evolved by the ancestors of cyanobacteria [3]. Cyanobacteria can also assimilate organic compounds such as carbohydrates, amino acids, or urea [24,25,27].

Cyanobacteria perform both photosynthesis and respiration in cell and intra-cytoplasmic membranes. Photosynthesis takes place in the thylakoids, respiration occurs in the cytoplasmic and in the thylakoid membranes, excepting members of the *Gloeobacter* genus that have only the cytoplasmic membrane [7]. Some cyanobacteria living exclusively in sulfide-rich microbial mats can also switch between oxygenic and anoxygenic photosynthesis, which relies on PSI only [31]. In darkness, the regular mode of cyanobacterial metabolism is aerobic respiration, while cyanobacterial species that are often exposed to anaerobic conditions also have the capacity of fermenting internal carbon-storage compounds, e.g., glycogen (glycogen) [6]. Fermentation likely operates for the generation of energy to cope with long periods of darkness under anoxic conditions.

3. RubisCO: The Key Enzyme Player in CO_2 Fixation

Carbon fixation is arguably one of the most important metabolic processes on Earth. A large part of the biological fixation of CO_2 (260 gigatons tons, annually [32]) is carried out by the Calvin–Benson–Bassham metabolic pathway (CBB cycle, hereafter referred to as the Calvin cycle), which uses the ATP energy and NADPH reducing power provided by photosynthetic electron transport. The key ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase enzyme (RubisCO) catalyzes the addition of one molecule of CO_2 to one molecule of the five-carbons sugar 1,5-ribulose bisphosphate (RuBP) to generate two molecules of the three-carbons 3-phosphoglycerate (3PGA). They then undergo a series of interconversions to form the six-carbons sugar fructose-1,6-bisphosphate (FBP), while regenerating RuBP. The net Calvin cycle reaction is given by the following equation

$$3CO_2 + 5H_2O + 6NADPH + 9ATP \rightarrow 3PGA + 6NADP + 9ADP + 8\ Pi. \quad (1)$$

Considering its pivotal role, RubisCO is surprisingly inefficient as an enzyme [32,33]. In plants, its slow catalytic rate of only ~2–10 CO_2 molecules fixed per second (compared to above 100 molecules of substrate per second for most enzymes) necessitates the production of significant levels of RubisCO, which can reach levels as high as 50% of the soluble leaf proteins [32]. Cyanobacterial RubisCO is a ~550-kDa hexadecameric complex consisting of eight large (RbcL, ~50–55 kDa) and eight small (RbcS, ~12–18 kDa) subunits. The assembly of the RbcL8S8 holoenzyme is thought to involve the formation of an RbcL8 core, followed by the docking of RbcS subunits. RubisCO assembly involves the ATP-independent chaperons RbcX along with Raf1 and Raf2, which also occur in plants and green algae. RbcX has been reported to be essential in *Synechococcus* PCC 7002, although not in *Synechocystis* PCC 6803 [34] nor in *Synechococcus* PCC 7942 [32]. Raf1 is present in all cyanobacteria that also have RbcX. Both RbcX and Raf1 stabilize the RbcL2 unit by using different interaction sites on RbcL [35]. Raf2 homologs have been identified in a subset of (marine) cyanobacteria expressing form IA RubisCO.

The RubisCO enzyme cannot discriminate O_2 from CO_2. Its photorespiration activity drives the oxygenation of RuBP that generates one molecule each of 3PGA and 2-phosphoglycolate (2PG). As 2PG is toxic, cyanobacteria have evolved strategies to recycle two molecules of 2PG to one molecule of 3PGA, while releasing CO_2. Thus, 75% of (fixed) organic carbon is salvaged and used to synthesize RuBP and refill the Calvin cycle [36].

Several strategies are being used to increase the cyanobacterial RubisCO activity for biotechnological purposes, such as directed evolution, for example. This uses the generation of a library of mutants followed by a selection process, to identify mutant proteins with the desired properties. In one study, an engineered *E. coli* reporter strain dependent on a functional RubisCO for growth was developed to screen libraries of RubisCO mutants [32]. They all possessed an increased solubility, but not improved catalytic properties, though they did not show improved photosynthesis when tested in cyanobacteria [32]. Similarly, successive rounds of mutation and selection in *E. coli* of the RubisCO from the cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP1 identified two RbcL and six RbcS mutations that improved the solubility and carboxylation efficiency of RubisCO: 3–14 and ~40 fold, respectively [37]. In another study, a strain of the purple bacterium *Rhodobacter capsulatus* lacking its own RubisCO was used as a reporter host for selecting variants of *Synechococcus* PCC 6301 RubisCO that provided a more active CO_2-dependent growth than the wild-type enzyme [38]. One of these mutations improved (~2-fold) the carboxylase activity of RubisCO. In the other cases, the enhanced growth performance was traceable to differential interactions of the mutant enzymes with CO_2 and O_2. Effective amino acid substitutions also appeared to be localized to two other conserved hydrophobic regions of the holoenzyme.

Instead of attempting to increase the activity of RubisCO, overexpression and FLAG-tagging RubisCO in engineered *Synechocystis* PCC 6803 have helped to increase the abundance of RubisCO and enhance (~2-fold) CO_2 fixation [39]. Furthermore, the overproduction of any of the Calvin cycle enzymes, RuBisCO, sedoheptulose bisphosphatase, fructose bisphosphate aldolase, or transketolase, improved (~50%) the total carbon fixation rates in *Synechocystis* PCC 6803 [40]. Interestingly, from a biotechnological perspective, the cloning of additional RubisCO genes from *Synechococcus* PCC 6301 in *Synechococcus* PCC 7942 expressing heterologous isobutyraldehyde synthesis genes improved RubisCO activity (~1.5-fold) and the production (~2-fold) of isobutyraldehyde [41]. Similarly, a three-fold increased fatty acid production by *Synechococcus* PCC 7002 was observed after the overproduction of the *Synechococcus* PCC 7942 RuBisCO [42].

Exogenous pathways can also be integrated into cyanobacteria to decrease the undesired photorespiration that produces the toxic metabolite 2PG. Heterologous expression of an oxygen-insensitive 3-hydroxyproprionate bi-cycle in *Synechococcus* PCC 7942 has been able to reduce the synthesis of 2PG [43]. This six-enzymes cycle was designed to function as both a photorespiratory bypass and an additional CO_2-fixing pathway, supplementing the Calvin cycle. This synthetic enzyme system, in producing a phosphoglycerate phosphatase and a glycolate dehydrogenase, redirects glyoxylate, originating from 2PG, toward the synthesis of pyruvate and it fixes an additional two molecules of HCO_3^- [39,43].

4. Carboxysome A Complex Intracellular Compartment for CO_2 Fixation

To favor the carbon-fixing (carboxylase) activity of RubisCO over its oxygenase activity, cyanobacteria have evolved a carbon concentrating mechanism (CCM, Figure 1), which uses bicarbonate transporters to actively transport bicarbonate into the cell to overcome the slower (10^4-fold) diffusion rates of CO_2 in water compared to air [23]. An important part of the CCM is the subcellular compartment, called the carboxysome, that encapsulates the RubisCO and carbonic anhydrase enzymes in a CO_2 concentrating environment [44]. The carboxysome, likely assembled around RubisCO [4], comprises hundreds of protein homologs that self-assemble in space to form an icosahedral structure [36]. The carboxysome shell favors the selective entry of the charged molecules of RuBP and bicarbonate (HCO_3^-), over the uncharged molecules of O_2 and CO_2. The diffusion of CO_2 across the carboxysome

(10^{-5} cm·s^{-1}) is significantly slower than CO_2 crossing the cellular membrane (10^{-2} cm/s) [45]. Following this, the carbonic anhydrase (CA) catalyzes the hydration of CO_2 and dehydration of HCO_3^- inside the carboxysome lumen to accumulate CO_2 in the vicinity of RubisCO, which fixes CO_2 to generate 3-phosphoglycerate (3PGA) that then leaves the carboxysome and is transformed into sugars by the cytosolic Calvin-cycle enzymes [46].

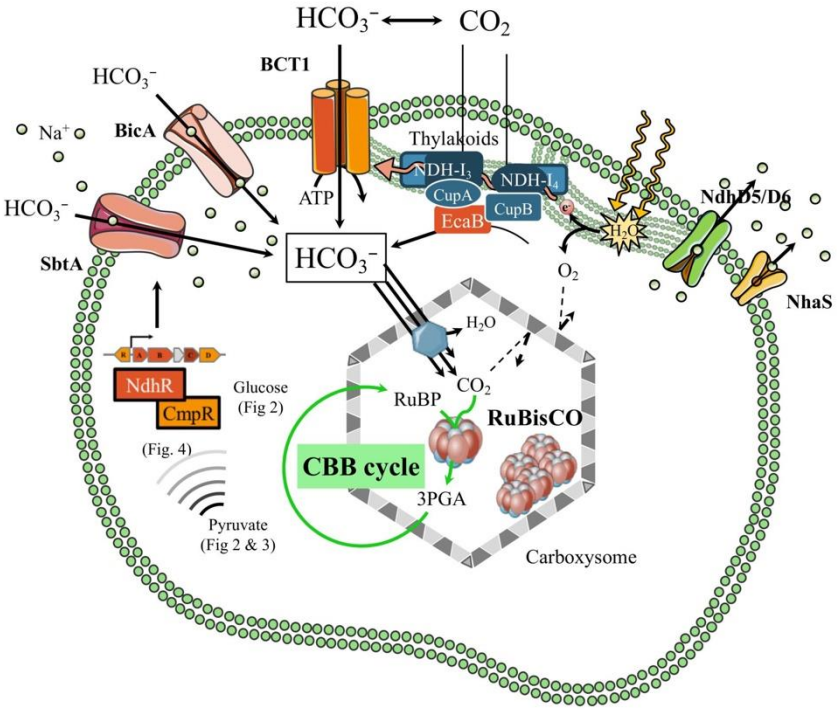


Figure 1. Schematic representation of the carbon concentrating mechanism in *Synechocystis* PCC 6803. It comprises two CO_2 uptake systems, a Na^+/H^+ gradient-restoring system, and three HCO_3^- transporters, as well as the carboxysome. Inside the carboxysome, the carbonic anhydrase (CA) enzyme dehydrates HCO_3^- to CO_2, that is subsequently fixed by RubisCO (RuBP (ribulose-1,5-bisphosphate) + CO_2 to yield 2 molecules of 3PGA (3-phosphoglycerate). The triose phosphates derived from 3PGA can be used by the Calvin cycle to regenerate RuBP or be further catabolized (see Figures 2 and 3). Some intermediates of these pathways serve as metabolic signals and effectors for transcriptional regulation of the carbon concentrating mechanism (CCM) described (see Figure 4). The two thylakoid-bound CO_2 uptake systems are: (i) the low-flux/high-affinity/low Ci-inducible NDH-I_3 complex consisting of the NdhF3/NdhD3/CupA proteins and (ii), the high-flux/low-affinity/constitutive complex NDH-I_4 comprising the NdhF4/NdhD4/CupB subunits. The NDH-$I_{3/4}$ complexes possess CA-like activity driven by the CupA/CupB-interacting CA enzyme EcaB, which converts CO_2 into HCO_3^- by creating a proton gradient. The HCO_3^- uptake systems consist of: (i) the high-affinity ATP-consuming (ABC-type) BCT1 transporter (comprising the CmpA/B/C/D subunits) and two sodium-dependent transporters: SbtA (low-flux/high-affinity/low-Ci-inducible) and a high-flux/medium-affinity transporter, BicA. NhaS or other subunits of NDH-1 complexes located within the membrane (NdhD5/D6) export sodium to balance its intracellular concentration.

Two types of carboxysomes can be distinguished depending on the nature of their encapsulated RubisCO [44]. The α-carboxysomes (containing RubisCO Form IA) occur in α-cyanobacteria (typically marine cyanobacteria), while β-carboxysomes (harboring RubisCO Form IB) are present in β-cyanobacteria (mostly freshwater cyanobacteria). In α-carboxysomes the CA activity is provided by a β-CA (CsoSCA) associated with the shell [47]; whereas in β-carboxysomes it is mostly a γ-CA (CcmM), which also interacts with the shell, or in some cases an ancillary β-CA (CcaA) [48,49].

Synechococcus PCC 7942 and *Synechocystis* PCC 6803 possess prokaryotic β-type CA encoded by the *icfA* and *ccaA* genes, respectively, which share over 55% sequence identity and harbor a 50–60 amino acids C-terminus essential to localizing CAs near RubisCO within a carboxysome.

In biological systems, where inorganic carbon can exist in the forms of H_2CO_3, HCO_3^-, and CO_3^{-2}, the pH affects the CCM efficiency and increases the selectivity of RubisCO toward CO_2 over O_2. At pH = 7.5, the carboxylase activity of RubisCO is maximal. At higher pH ranges between 7.5 and 8.5, the reduced energetic costs of HCO_3^- transportation into the cytosol reduce the carbon fixation cost [39]. This pH range is within the natural pH levels of *Synechococcus* PCC 7942 incubated in darkness (7.3) and light (8.4) [50].

The essential genes for α- and β-carboxysomes are encoded by the *cso* and the *ccm* operons, respectively, which are nested within conserved gene clusters that also encode Ci transporters and other ancillary proteins [48].

The β-carboxysomes of *Synechococcus* PCC 7942 have been extensively characterized. They are composed of: (i) the hexameric proteins CcmK2, CcmK3, and CcmK4 forming the shell facets; (ii) the pentameric protein CcmL capping the vertices of the polyhedron; and (iii) the trimeric proteins CcmO and CcmP. The core enzymes of β-carboxysomes consist of a paracrystalline arrangement of RubisCO (comprising the large and small subunits RbcL and RbcS assembled in a RbcL8S8 holoenzyme) and β-carbonic anhydrase (CcaA). In addition, the "linker" proteins CcmM and CcmN promote RubisCO packing and shell-interior association. CcmM occurs as two isoforms, the 58-kD full-length form and a 35-kD truncated version. CcmM58, which recruits CcaA to the shell, has a N-terminal α-CA-like domain and the three RbcS-like domains which interact with RubisCO and are also present also in CcmM35 [49]. In addition, RbcX, a RubisCO chaperonin, performs a role in carboxysome assembly and sub-cellular distribution [51]. Interestingly, RbcX was found to be essential in *Synechococcus* PCC 7002, but not in *Synechococcus* PCC 7942 [52].

4.1. Carboxysomes Stochiometry

Recently, live-cell single-molecule fluorescence microscopy, coupled with confocal and electron microscopy, were used to decipher the protein stoichiometry, diameter, localization, and mobility patterns of single β-carboxysomes in *Synechococcus* PCC 7942. These parameters appeared to depend on CO_2 levels and light intensity occurring during cell growth [51]. It has been estimated that there are about 1500, 850, 550, and 370 copies of RubisCO per β-carboxysome under high light (80 μE $m^{-2}{\cdot}s^{-1}$), moderate light (ML, 50 μE $m^{-2}{\cdot}s^{-1}$), ML + high CO_2 (3% v/v), and low light (LL, 10 μE $m^{-2}{\cdot}s^{-1}$), respectively. This study also confirmed the different interior organization of β-carboxysomes (densely packed with RubisCO forming paracrystalline arrays) as compared to α-carboxysomes (random packing of RubisCO). These differences may result from the distinct carboxysome biogenesis pathways; assembly of β-carboxysomes is initiated by the nucleation of RubisCO and CcmM35 that precedes shell encapsulation, whereas α-carboxysome biogenesis starts from shell formation and/or a shell-interior assembly [53].

These findings will certainly influence the rational design and construction of cyanobacterial cell factories for the photosynthetic production of chemicals, as well as the installation of powerful carboxysomes into plants, especially C_3 plants, to increase the photosynthetic fixation of CO_2 and improve crop production [51].

4.2. Carboxysome Positioning Systems

The ability for cells to organize their interior space is ubiquitous among all organisms. In cyanobacteria [39], each daughter cell receives an equal number of carboxysomes during cell division thanks to the two-component McdAB system that equidistantly positions each carboxysome relative to the others [54].

Hence, in *Synechococcus* PCC 7942 approximately four carboxysomes are evenly spaced in the cytosol along the length of each rod-shaped cell. McdA, a ParA-type ATPase, non-specifically binds the nucleoid in the presence of ATP, while McdB directly binds carboxysomes, and displaces McdA from the nucleoid. Thus, *parA* deletion strains have unevenly spaced carboxysomes [54]. The McdAB system, absent in α-cyanobacteria, is widespread among β-cyanobacteria, with the type 2 McdAB system being the most ancestral and frequent, while the type 1 system, like that of *Synechococcus* PCC 7942, appears to be of more recent origin. These two McdA types may also have differences in ATPase activity, as suggested by their differences in amino acid sequence in and around the ATP-binding motifs. McdAB positioning of carboxysomes also operates in spherical-celled cyanobacterial, whereas no *mcdAB* genes were observed in many cyanobacteria displaying baeocystous morphologies [54].

Together, the above-mentioned conceptual frameworks provide the foundation for 'plug-and-play' engineering of carboxysomes as CO_2 fixation modules in a variety of biotechnological applications (production of chemicals from solar energy and CO_2).

5. Phosphoenol-Pyruvate-Carboxylase: Another Important Player in CO_2 Fixation

In addition to RubisCO, the phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) enzyme catalyzes an irreversible carboxylation of the three-carbons metabolite phosphoenolpyruvate (PEP) with bicarbonate (HCO_3^-) to generate oxaloacetate (a four-carbons metabolite of the citric acid cycle) and inorganic phosphate. PEPC, which is widely distributed in cyanobacteria, was shown to account for 25% of CO_2 fixation in *Synechocystis* PCC 6803 [55], and to be essential for the photoautotrophic growth of this organism [56] and *Synechococcus* PCC 7942 [57].

Attesting to the importance of PEPC for biotechnological work, it was shown in *Synechocystis* PCC 6803 that the overproduction of PEPC increased the production of chemicals such as succinate [58] and ethylene [59]. As well, the downregulation of pyruvate dehydrogenase (PDH) and PEP-C provided significant improvements in aldehyde production pathway by *Synechococcus* PCC 7942 [60].

6. Plasticity of the Cyanobacterial Carbon Metabolism

As is true for all organisms, the metabolism of cyanobacteria is tightly linked with, and capable of responding to, environmental conditions.

6.1. Occurrence of Multiple Glycolytic Pathways

Cyanobacteria possess all known glycolytic variant pathways: The Embden–Meyerhof–Parnas (EMP) pathway, the oxidative pentose phosphate (OPP) pathway, the phosphoketolase (PK) pathway, and the Entner–Doudoroff (ED) pathway [61]. They all share reactions and metabolites with the Calvin cycle and provide ATP, NAD(P)H, and carbon precursors for the synthesis of amino acids, nucleotides, and fatty acids [61,62].

In the EMP pathway (Figure 2), glucose is phosphorylated twice to generate fructose bisphosphate (FBP) using the phosphofructokinase enzyme (PFK) that is unique to the EMP pathway. Then, fructose bisphosphate is cleaved into two triose-phosphates: glyceraldehyde-3-phosphate (GAP) and dihydroxyacetone phosphate (DHAP), which are both used to produce ATP through the phosphorylations occurring in lower glycolysis [61].

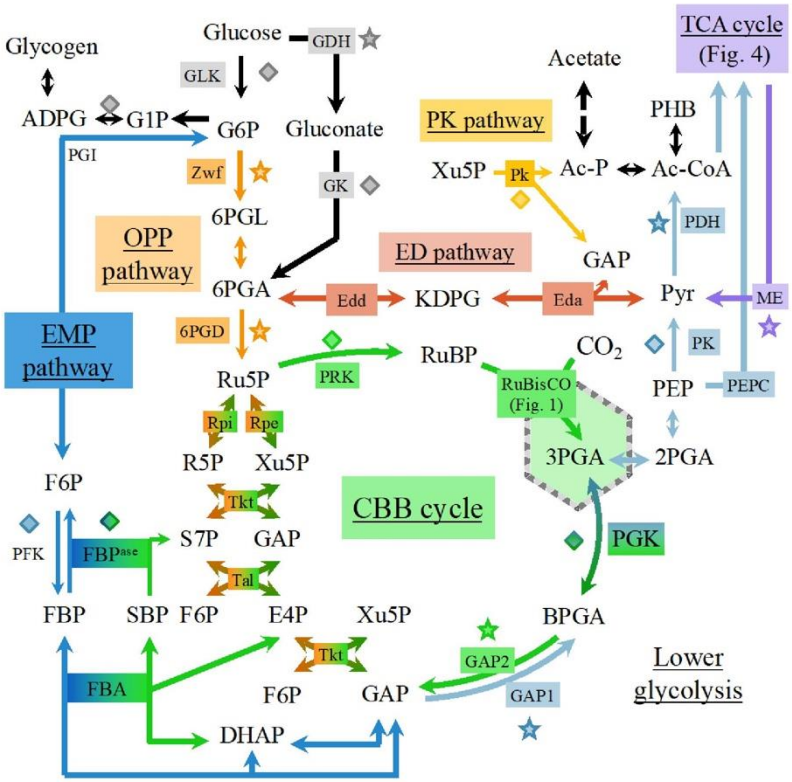


Figure 2. Schematic representation of the carbon metabolism in *Synechocystis* PCC 6803. These pathways comprise the EMP pathway (Embden–Meyerhof–Parnas, upper glycolysis and neoglucogenesis, typical reactions in dark blue), lower glycolysis (light blue), the ED pathway (Entner-Doudoroff; red), the OPP pathway (oxidative pentose phosphate; orange), the CBB cycle (Calvin-Benson-Bassham; green) and the recently discovered phosphoketolase pathway (yellow). Diamonds and stars indicate reactions using ATP or electron carriers (mostly NADPH and NADH) as cofactors, respectively. ADPG: ADP-glucose; BPGA: bisphosphoglycerate; Ac-CoA: acetyl-CoA; Ac-P: acetyl phosphate; DHAP: dihydroxyacetone phosphate; E4P: erythrose-4-phosphate; Edda: KDPG aldolase; Edd: 6PGA dehydratase; FBA: fructose-1,6-bisphosphate aldolase; FBP^{ase}: fructose-1,6-bisphosphate; F6P: fructose-6-phosphate; G1P: glucose-1-phosphate; G6P: glucose-6-phosphate; GAP: glyceraldehyde-3-phosphate; GAP1-2: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1 or 2; GDH: glucose dehydrogenase; GK: gluconate kinase; GLK: glucokinase; KDPG: keto-3-deoxy-6-phospho-gluconate; ME: malic enzyme; PDH: pyruvate dehydrogenase; PEP: phosphoenolpyruvate; PEPC: PEP carboxylase; PFK: phosphofructokinase; PGI: phosphoglucose isomerase; PGK: phosphoglycerate kinase; PHB: poly-β-hydroxybutyrate; Pk: phosphoketolase; PK: pyruvate kinase; PRK: phosphoribulokinase; Pyr: pyruvate; Rpe: Ru5P epimerase; R5P: ribose-5-phosphate; Rpi: R5P isomerase; RuBisCO: ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase; Ru5P: ribulose-5-phosphate; RuBP: ribulose-1,5-bisphosphate; S7P: sedoheptulose-7-phosphate; SBP: sedoheptulose-1,7-bisphosphate; Tal: transaldolase; Tkt: transketolase; Xu5P: Xylulose-5-phosphate; Zwf: glucose-6-phosphate dehydrogenase; 2PGA: 2-phosphoglycerate; 3PGA: 3-phosphoglycerate; 6PGL: 6-phosphogluconolactone; 6PGA: 6-phosphogluconate; 6PGD: 6-phosphogluconate dehydrogenase.

In the ED pathway (Figure 2), glucose is phosphorylated only once to glucose-6P (G6P) and sequentially converted to 6-phosphogluconate (6PGA) and 2-keto-3-deoxy-6-phospho-gluconate (KDPG), a metabolite unique to the ED pathway, which is then cleaved into one pyruvate and one GAP that is used to produce ATP. The ED pathway requires 3.5 times less enzymatic proteins to achieve the same glycolytic flux as the EMP pathways. However, one glucose molecule catabolized by EMP generates two ATP and two NADH molecules; whereas if one glucose molecule is catabolized by the ED pathway it yields one ATP, one NADH, and one NADPH. Usually cyanobacteria rely on the ED pathway rather than on the EMP pathway because they are nutrient-limited, rather than ATP-limited [61].

The OPP pathway (Figure 2) redirects 6PGA to pentose phosphates, generating an extra NADPH through 6PGA-dehydrogenase (6PGAD). Pentose phosphates are then converted to triose phosphates by the transketolase and transaldolase activities. As the pentose phosphate pathway can either run in its oxidative mode (OPP pathway) to oxidize carbohydrates or in its reductive mode (Calvin cycle) to fix CO_2, it is tightly regulated [61].

The PK pathway (Figure 2) differs from the aforementioned pathways in splitting phosphorylated sugars (G6P/xylulose 5-phosphate) to produce C2 units (acetyl phosphate), thereby bypassing the oxidation of triose to acetyl compounds.

The multiple glycolytic pathways of cyanobacteria differ in the number of ATP and NAD(P)H molecules they produce per molecule of glucose catabolized, ranging from 1 to 2.33 for ATP and 0 to 5.33 for NAD(P)H. These pathways allow cyanobacteria to promptly respond to variations in energy input from sunlight and/or organic compounds [62].

In *Synechocystis* PCC 6803, which can grow under photoautotrophic (light + CO_2), mixotrophic (light + CO_2 +glucose), and heterotrophic (glucose catabolism) conditions, the Calvin cycle, OPP, and EMP plastic pathways can regulate their fluxes under various growth conditions. In contrast, the (rigid) tricarboxylic acid cycle (TCA) always operates at relatively low levels. Under dark or low light conditions, the metabolism relies upon oxidative phosphorylation to generate ATP from NADPH. Moreover, a negligible flux was detected through the EDP pathway under heterotrophic conditions [63].

6.2. Occurrence of Multiple Tricarboxylic Acid Cycles

As observed for the glycolytic pathways (Figure 2), cyanobacteria possess more than one version of the TCA cycle that can synthesize important metabolites at the interface of carbon and nitrogen metabolisms [62]. The TCA cycle has long been considered as incomplete because of the lack of the 2-oxoglutarate dehydrogenase enzyme that normally converts 2-oxoglutarate (2OG, also called α-ketoglutarate) to succinyl-CoA, which is then transformed to succinate by the succinate-CoA ligase. Recently, it has been shown that the TCA gap between 2OG and succinate can be filled by at least three different metabolic shunts: the 2OG decarboxylase (OGDC) bypass, the gamma-aminobutyric acid (GABA) shunt, and the glyoxylate bypass (Figure 3).

The OGDC shunt converts 2OG to succinate via succinic semialdehyde (SSA), using OGDC and SSA dehydrogenase (SSADH) [64]. The sll1981 product from *Synechocystis* PCC 6803, previously annotated as L-myo-inositol-1-phosphate synthase, was shown to function as OGDC [36].

The GABA shunt connects 2OG and succinate, via glutamate decarboxylase (GAD), GABA aminotransferase, and SSADH, respectively [64]. In *Synechocystis* PCC 6803, which harbors the enzymes for both OGDC and GABA shunts, the GABA route was proposed to be more active than the OGDC route [36].

The glyoxylate shunt, which exists in very few genera of cyanobacteria (such as the two *Cyanothece* strains PCC 7424 and PCC 7822 and *Chlorogloeopsis fritschii*) [65,66]. It produces succinate from isocitrate by isocitrate lyase (ICL), and the co-product glyoxylate is combined with an acetyl CoA to generate malate, thus bypassing the decarboxylation steps of the TCA cycle. The GABA pathway can play a key role in cellular tolerance to acidic, heat, and oxidative stresses, while the glyoxylate shunt allows cells to use acetate both as a carbon and energy sources for faster growth [62,66].

All three TCA cycle variants (Figure 3) produce succinate, the very important electron donor for oxidative phosphorylation, and offer the metabolic plasticity needed to cope with rapid environmental changes (light and nutrients availabilities, *etc*) [62]. *Synechocystis* PCC 6803, which has only the KGD pathway and the GABA shunt that contribute to the intracellular GABA pool, show that they can be functionally independent of each other.

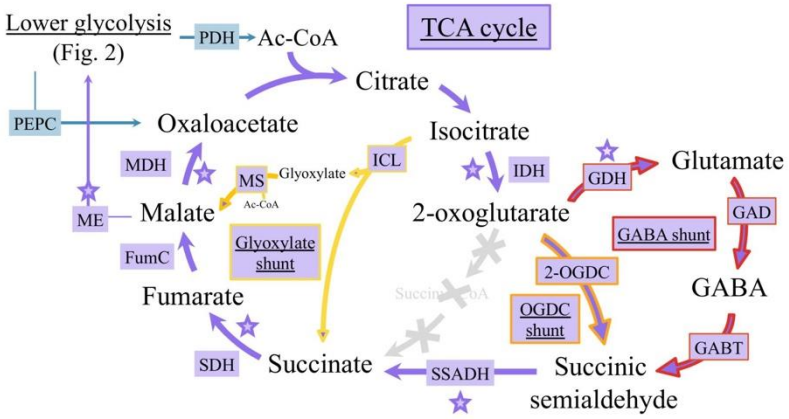


Figure 3. Schematic representation of the cyanobacterial shunts of the tricarboxylic acid (TCA) cycle. Cyanobacteria possess an atypical TCA cycle lacking the 2-oxoglutarate (2OG) dehydrogenase, which normally transforms 2-OG to succinyl-CoA that generates succinate via the succinate-CoA ligase. The gap in between 2OG and succinate can be filled by at least three different metabolic shunts. The glyoxylate shunt (outlined in yellow) produces succinate directly from isocitrate by isocitrate lyase. The 2OGDC shunt (outlined in orange) converts 2-oxoglutarate (2OG) to succinate via the 2OG decarboxylase (2OGDC) and succinic semialdehyde (SSA) dehydrogenase enzymes. The γ-aminobutyrate or GABA shunt (outlined in red) converts glutamate to succinate using the GABA amino-transferase and succinic semialdehyde (SSA) dehydrogenase enzymes. Diamonds and stars indicate reactions using ATP or electron carriers (generally NADPH and NADH) as cofactors, respectively. FumC: fumarase; GABT: GABA aminotransferase; GAD: glutamate decarboxylase; GDH: glutamate dehydrogenase; ICL: isocitrate lyase; IDH: isocitrate dehydrogenase; MDH: malate dehydrogenase; ME: malic enzyme; MS: malate synthase; PDH: pyruvate dehydrogenase; PEPC: PEP carboxylase; SDH: succinate dehydrogenase; SSADH: succinic semialdehyde dehydrogenase.

7. Nitrogen Fixation and Assimilation

Nitrogen is the second-most abundant element in living cells (representing approximately 10% of their dry mass) and is present in amino acids, nucleotides, and cell wall (peptidoglycan) components. In cyanobacteria, nitrogen is accumulated in light-harvesting pigments (chlorophyll, phycocyanin and in many but not all species phycoerythrin) and stored as cyanophycin, a copolymer of arginine and aspartate [67]. Cyanophycin is synthesized by a single enzyme, cyanophycin synthetase, CphA1, in a two-step reaction from L-aspartate and L-arginine, using one ATP per amino acid [36]. Cyanobacteria can use ammonium, nitrate, or nitrite as N sources, and some species can also assimilate urea or amino-acids [24], or fix atmospheric N_2 [67].

Ammonium is the preferred nitrogen source. When it is present with other suitable nitrogen sources, it is utilized first. As ammonium is scarce in most habitats, cyanobacteria possess a high-affinity ammonium uptake system, such as the Amt1 permease of *Synechocystis* PCC 6803. However, ammonium transport must be tightly controlled as high ammonium concentrations can be toxic [68].

Cyanobacteria have two types of nitrate/nitrite transport systems, a high-affinity permease NrtP and the ABC-type transporter NrtABCD (NRT). Intracellular nitrate is sequentially reduced to nitrite and then to ammonium by nitrate reductase (NR) and nitrite reductase (NiR), using the ferredoxin-transported electrons provided by photosystem I. Addition of ammonium to nitrate adapted cells triggers an immediate inhibition of nitrate uptake and assimilation. The ammonium-induced inhibition of NRT is regulated by the P_{II} protein and the C-terminal domain of NrtC [68].

For the assimilation of urea, which is frequently present in aquatic ecosytems (it contributes to about 50% of the total nitrogen used by cyanobacteria thriving in oceanic or estuarine waters), cyanobacteria possess a high affinity ABC-type transporter that can import urea even at low concentrations (≤1 μM). This urea transport system, encoded by the five genes cluster *urtABCDE*, is regulated by the NtcA transcription factor [69]. Inside the cells, urea ($CO(NH_2)_2$) is catabolized into ammonia (NH_3) and CO_2 by the enzymes urea amidolyase and urease [24]. The ATP-requiring urea amidolyase enzyme has two activities, which can be exhibited by two different proteins: urea carboxylase and allophanate hydrolase in prokaryotes and green algae. The nickel-requiring (ATP-independent) enzyme urease is encoded by seven genes, *ureABCDEFG* (frequently clustered), that compose the urease per se (UreABC) and its Ni-assembly chaperones (UreDEFGH). Recently, we have analyzed the genome of 308 cyanobacteria [24]. We found that most of them harbor all urea transport (*urtABCDE*) and urease (*ureABCDEFG*) genes, indicating that most cyanobacteria should be able to grow on urea as the sole nitrogen source, as observed in the case of the few cyanobacteria already tested [70]. This finding suggests that in the future, the photoproduction of biotechnologically interesting chemicals by engineered cyanobacteria could be coupled to water treatment (urea consumption), as we observed in the case of hydrogen production [70]. Many cyanobacteria possess either *ureABCDEFG* or *urtABCDE*, indicating that some cyanobacteria use their urease to recycle nitrogen and carbon from internally generated urea, while other cyanobacteria employ their *urtABCDE* system to transport various nutrients (and not just urea). Three cyanobacteria of the genera *Gloeobacter* and *Gloeomargarita*, which likely diverged early from other cyanobacteria and lack *ureABCDEFG*, have the genes encoding both urea carboxylase and allophanate hydrolase. These findings suggest that the urea carboxylase and allophanate hydrolase enzymes appeared prior to urease in cyanobacteria [24].

Many cyanobacteria can also fix atmospheric dinitrogen (N_2). As N_2 is very stable, the fixation of one molecule of N_2 catalyzed by the nitrogenase enzyme is energetically expensive [67]:

$$N_2 + 16ATP + 8H^+ + 8e^- \rightarrow 2NH_3 + H_2 + 16ADP + 16Pi. \quad (2)$$

Because nitrogenase is irreversibly inactivated by O_2, the N_2-fixing (diazotrophic) cyanobacteria developed several strategies to protect their nitrogenase from O_2. Many diazotrophic filamentous cyanobacteria, such as *Nostoc* sp., respond to nitrogen depletion by differentiating (irreversibly) some of their vegetative cells (one of every 10 to 20 vegetative cells along a filament) into heterocysts [71]. These N_2-fixing cells harbor a thick extracellular glycolipid envelope that decreases the diffusion of O_2 and maintains an active respiration that consumes O_2. Furthermore, heterocysts retain photosystem I to harvest light and produce chemical energy (ATP), but have no O_2-producing photosystem II [22]. Thus, they cannot generate electrons from water and are dependent on their neighboring vegetative cells for reduced (organic) carbon [67,71]. For example, vegetative cells provide glutamate to heterocysts and receive glutamine from heterocysts [71]. Due to their oxygen-free environment and their genetic tools for heterocyst-specific expression, heterocysts are attracting interest to serve as cell factories for biotechnological purposes [22,72].

The non-heterocystous filamentous (*Lyngbya*) and unicellular cyanobacteria (*Crocosphera*, *Gloeothece* and *Cyanothece*) temporally separate photosynthesis (production of O_2) during the day from N_2 fixation during the night, where O_2 is no longer produced by photosynthesis and is consumed by respiration [67].

Within cells, ammonia is assimilated via the coupled glutamine synthetase (GS) and glutamine-oxoglutarate amidotransferase (GOGAT) reactions. GS catalyzes the ATP-requiring ligation of ammonia with glutamate, producing glutamine. The subsequent GOGAT reaction transfers the

amido-group of glutamine to the α-C atom of 2-oxoglutarate (2OG), yielding two molecules of glutamate. The net yield of the GS–GOGAT cycle is therefore the conversion of 2OG with ammonia into glutamate, consuming one ATP and two reduction equivalents [73]. Then, the organic nitrogen of glutamate and glutamine are distributed to the other amino acids and various cellular building blocks, in a metabolic architecture placing 2OG at the intersection of carbon- and nitrogen-assimilatory reactions [36].

To avoid a detrimental glutamate depletion, the activity of GS must be tightly adjusted to the glutamate-refilling GOGAT activity. GS activity is mainly regulated by the small inhibitory proteins IF7 and IF17, encoded by the *gifA* and *gifB* genes in *Synechocystis* PCC 6803 [74]. Considering the 2OG decarboxylase reaction (see below) as a minor bypass, the flux from 2OG to glutamate, catalyzed by GOGAT, represents the dominant metabolic route for the consumption of 2OG among cyanobacteria [73].

8. Coordination of the Carbon and Nitrogen Metabolisms

Carbon and nitrogen are the two most abundant nutrient elements for all living organisms. In cyanobacteria the processes of nitrogen and carbon assimilation are strongly interdependent in competing for electrons (NAD(P)H) and ATP provided by photosynthesis [75]. Consequently, cyanobacteria have evolved a sophisticated regulatory system to maintain a carbon to nitrogen ratio of about five to one, which implies that for five molecules of CO_2 one molecule of ammonia must be assimilated [36]. This regulation system involves a complex signal transduction network employing three types of actors: (i) the transcription factors NdhR [76], CmpR [36], NtcA [69], LexA [77,78], and AbrB2 [76]; (ii) the key metabolites 2-oxoglutarate (2OG) [73] and 2-phosphoglycolate (2PG); and (iii) the regulatory proteins P_{II} [68] and PipX [36].

Recently, several non-coding RNAs have been identified that play crucial roles in the regulation of the carbon and nitrogen metabolisms and their crosstalk [79].

8.1. Role of Key Transcription Regulators (NdhR, CmpR, AbrB2, and LexA) and Associated Key Metabolites (2-oxoglutarate and 2-phosphoglycolate)

In cyanobacteria, three LysR-type transcriptional factors, NdhR [80], CmpR [81], and AbrB2 [82], operate in the regulation of the CCM [36]. The CCM system is expressed at a basal level under CO_2-replete conditions whereas its expression and activity are strongly enhanced under Ci limitation. The transcription factors NdhR and CmpR, which share a high sequence identity [76], are regulated by the small metabolites 2OG (2-oxoglutarate) and 2PG (2-phosphoglycolate). The 2OG metabolite, the carbon skeleton for nitrogen assimilation [73], is produced from CO_2 fixation products via glycolysis and the TCA cycle (via the isocitrate dehydrogenase), and is consumed by the nitrogen assimilating GOGAT reaction (linked to GS activity). Under nitrogen limitation, when ammonia assimilation via GS cannot provide enough glutamine for the subsequent GOGAT reaction, 2OG consumption is slowed down and its levels are increased. The accumulation of intracellular 2OG is an indicator of a high C/N ratio. In contrast, the accumulation of 2PG, generated by the oxygenase activity of RubisCO, is an indicator of a low C/N ratio [36,76].

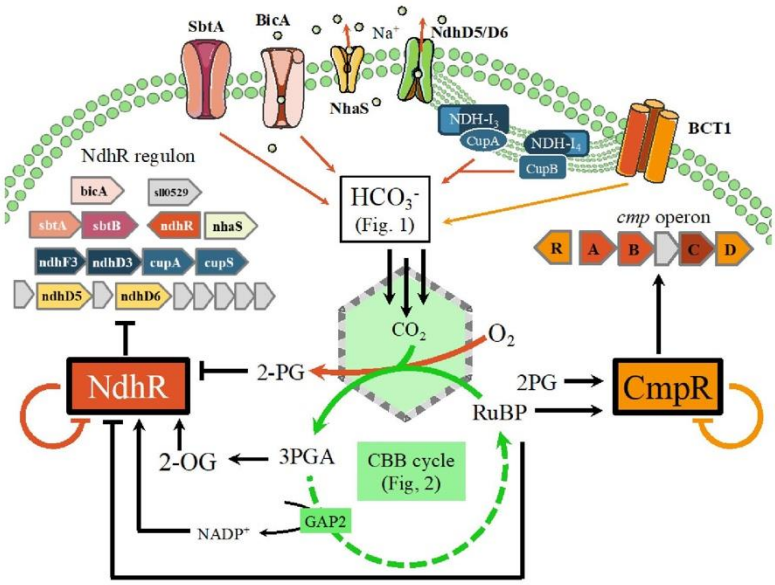


Figure 4. Regulation of the *Synechocystis* PCC 6803 carbon concentration mechanism by the CmpR and NdhR transcription factors and their modulation by the $NADP^+$, 2OG (2-oxoglutarate, an indicator of high C/N ratio), 2PG (2-phosphoglycolate, an indicator of low C/N ratio), and RuBP metabolites. $NADP^+$ and 2OG produced by the Calvin cycle accumulate when Ci is abundant. They stabilize the NdhR tetramers, favoring its repressor activity on the promoters of target genes encoding BicA (*sll0834*), SbtAB (*slr1512-slr1513*), NhaS (*slr1727*), NdhD3-F3-CupA-CupS (*sll1732-sll1733-sll1734-sll1735*), and NdhD5-D6 (*slr2007-slr2009*), as well as its own gene (*sll1594*) [76,80,83]. The *sll0529* gene encodes a putative transketolase whose function is not known. Under low Ci conditions, the increased O_2/CO_2 ratio leads to the oxygenation of RuBP that produce 2PG, which competes with 2OG for binding on NdhR, ultimately leading to its release from its target promoters. In addition, 2PG acts as a positive effector of CmpR that stimulates expression of the bicarbonate transporter BCT1, encoded by the *cmpABCD* operon (*slr0040-slr0041-slr0042-slr0043-slr0044*), while repressing its own promoter (*sll0030*) in opposition to that of the *cmpABCD* operon. Its affinity for the target DNA sequence is increased by RuBP that is also accumulated because of the lower activity of the Calvin cycle.

8.1.1. Role of the NdhR Transcription Factor

The NAD(P)H dehydrogenase transcription factor (NdhR), a global repressor of carbon-assimilation genes (Figure 4), was originally identified by us [80] as the repressor of its own gene expression as well as of the *ndhF3/ndhD3/cupA/sll1735* gene cluster (the *ndh-I3* operon), which encode the high-affinity CO_2-uptake system proteins [76]. NdhR (also called CcmR [83]) represses the genes encoding the two sodium-dependent bicarbonate uptake systems: SbtA (a high affinity/low flux transporter) and BicA (a medium affinity/high flux transporter), using, as co-repressors, the 2OG and $NADP^+$ metabolites that are both accumulated under CO_2-sufficient conditions [76]. NdhR binds as a tetramer to the promoter regions of its target genes thereby blocking their transcription. The binding of 2OG onto NdhR stabilizes its tetrameric conformation with its high DNA binding affinity [36]. This effect is antagonized by 2PG that binds onto a different NdhR regulatory site, which then dissociates from its target gene operators, allowing transcription of the CCM genes and leading to increased carbon input. The binding of 2OG or 2PG to NdhR being mutually exclusive, their relative levels determine whether NdhR acts as a repressor or not, to maintain the C/N balance. When 2OG levels increase due

to carbon excess or nitrogen deficiency, CCM activity is repressed to its basal level. In contrast, at high levels of 2PG the CCM-related genes are derepressed to increase the CCM-dependent CO_2 fixation by RubisCO [36].

8.1.2. Role of the CmpR Transcription Factor

CmpR activates the *cmpABCD* operon (Figure 4), which encodes an ABC-type bicarbonate transporter (BCT1), whereas it represses its own gene. Its DNA binding affinity is increased by the addition of the metabolites RuBP or 2PG, whose concentrations are expected to increase under low CO_2 conditions. The crystal structure of the *Synechococcus* PCC 7942 CmpR was solved in a complex with RuBP, indicating that RuBP-induced conformational changes of CmpR to affect the regulation of the *Cmp* operon [36].

Considering the 54% sequence identity with NdhR, it has been proposed that CmpR binds to 2PG (produced under carbon limitation) in a manner similar to 2PG binding by NdhR, although CmpR and NdhR regulate gene expression in an opposite manner. The opposite effects of 2OG and 2PG on the activity of NdhR provide an example of the integration of the metabolic signaling necessary for cyanobacterial adaptation in response to the cellular status of carbon or nitrogen metabolism [76].

8.1.3. Roles of the AbrB2 Transcription Factor

In addition to NdhR and CmpR [76], the AbrB2 transcription factor, which represses the hydrogenase operon [84], was found to positively regulate CCM-related genes (*cmpABCB*, *sbtAB* and *ndhF3/ndhD3/cupA* operons) under carbon limitations [85]. Intriguingly, AbrB2 appeared to positively regulate several genes of the NtcA-regulon, including *urtA*, *amt1*, *glnB*, *sigE* and the *nrtABCD* operon [36]. In contrast, we found no AbrB2-mediated regulation of the *urtA*, *amt1*, *glnB* genes and the *nrtABCD* operon [86]. This discrepancy might somehow result from the fact that our unlike AbrB2-deleted mutant (constructed in the true wild-type background) grows as healthily as the WT strain, whereas the AbrB2-deleted mutant constructed by Ishii and co-workers (in a glucose-tolerant genetic background) exhibits a slow growth [82].

8.1.4. Roles of the LexA Transcription Factor

In *Synechocystis* PCC 6803, we showed that the LexA transcription factor does not regulate the genes involved in DNA repair, unlike the well-known LexA (SOS) regulator of *E. coli* [77]. Instead, the *Synechocystis* PCC 6803 LexA protein directly regulates numerous genes operating in carbon assimilation or controlled by carbon availability [77], including the bidirectional hydrogenase [87,88] and the RNA helicase CrhR [89]. Recently, LexA was shown to directly bind to the promoter regions of genes involved in twitching motility, and biosynthesis of fatty acids and the major compatible solute, glucosyl-glycerol [78].

8.2. Roles of the Key Transcription Factor NtcA and the Regulatory Proteins P_{II}, PipX

Expression of the nitrogen assimilation genes encoding GS, GOGAT, and GS-inhibiting proteins, GifA and GifB, is controlled by: (i) the transcription factor NtcA [69], (ii) the P_{II} and PipX proteins [68], (iii) the nsiR4 non-coding RNA, and (iv) a glutamine riboswitch in the 5′UTR of *gifB* [36].

NtcA, a transcription factor belonging to the CRP (cAMP receptor protein) family serves as the global regulator for nitrogen assimilation and metabolism. Of biotechnological interest, NtcA has been shown to control the expression of microcystin (a toxin) synthesis genes in *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 [90], as well as the production of ethylene in an engineered strain of *Synechocystis* PCC 6803 [91]. The P_{II} protein indirectly regulates NtcA through binding to the NtcA co-activator PipX (P_{II} interacting protein X). P_{II} senses both the energy status of the cell by the competitive binding of ADP *vs* ATP, and the carbon/nitrogen status by the binding of 2OG. In addition, depending on nitrogen availability, P_{II} can be phosphorylated [68].

Under nitrogen limitation (high 2OG levels), NtcA activates the expression of genes for nitrogen uptake and assimilation, including *urtA, nirA, ntcB and glnA*, and it represses the *gifA* and *gifB* genes encoding the GS inactivating factors IF7 and IF17. Furthermore, the accumulation of 2OG stimulates the binding of NtcA to its target genes. Maximal activation of NtcA requires the subsequent binding of the coactivator PipX. Under conditions of low nitrogen abundance, P_{II} binds 2OG in a cooperative manner with adenosine triphosphate (ATP) and is phosphorylated. This causes the release of PipX and its interaction with NtcA, stabilizing the active 2OG-bound conformation of NtcA. Recently, it was shown in *Synechocystis* PCC 6803 that PII can form a specific P_{II} -PEPC complex that influences the activity of PEPC (phosphoenolpyruvate carboxylase), the second major carbon-fixing enzyme in photoautotrophic organisms (see above). Whereas in the absence of P_{II}, PEPC is subjected to ATP inhibition, it is activated beyond its basal activity in the presence of P_{II}. Furthermore, P_{II}-PEPC complex formation is inhibited by ADP and PEPC activation by P_{II}-ATP is mitigated in the presence of 2-OG, linking PEPC regulation to the cell's global carbon/nitrogen status [92].

When nitrogen is abundant, P_{II} binds to PipX to counteract NtcA activity [69,75]. P_{II} also interacts with the Amt1 ammonium permease, the NrtC and NrtD subunits of the nitrate/nitrite transporter NrtABCD, and the UrtE subunit of the ABC-type urea transporter UrtABCDE. The deregulation of urea uptake in a P_{II} deletion mutant causes ammonium excretion when urea is provided as nitrogen source. Furthermore, P_{II} regulates arginine biosynthesis by interacting with the rate-limiting enzyme *N*-acetylglutamate kinase (NAGK) [93]. If sufficient energy and nitrogen are available, indicated by a high intracellular ATP and low 2OG levels, non-phosphorylated P_{II} interacts with NAGK, enhancing its catalytic efficiency and relieving it from feedback inhibition by arginine. At high intracellular arginine levels, the carbon/nitrogen storage polymer cyanophycin (multi-L-arginyl-poly-L-aspartate) accumulates in *Synechocystis* PCC 6803 [67]. In addition, P_{II} protein can control acetyl-CoA levels by interacting with the biotin carboxyl carrier protein (BCCP) of acetyl-CoA carboxylase (ACC) [68]. Furthermore, other status reporter metabolites have recently been discovered, including cAMP that is sensed by the P_{II}-like protein SbtB [36].

Intriguingly, a recent study showed that reactive oxygen species (ROS) naturally generated by respiration and photosynthesis interferes with C/N status sensing by decreasing the intracellular concentrations of 2OG, thereby altering the function of the nitrogen regulator NtcA [73,76]. Furthermore, the 2OG-sensing global signal detected by NtcA is combined with redox-stress signal perceived by the Hik33/RpaB relay [73].

9. Redox Regulation of the Central Metabolism

Reversible protein thiol oxidation is an essential post-translational regulatory mechanism enabling living organisms to respond to changes in metabolic demands and environmental conditions. In *Synechocystis* PCC 6803, the redox dynamics of ~2100 cysteinyl amino acids sites from 1060 proteins under light, dark, and 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU, a photosystem II inhibitor) conditions were quantified. The overall results revealed broad changes in thiol oxidation in many key biological processes, including photosynthetic electron transport, carbon fixation, and glycolysis [94].

A group of well-known redox-sensitive proteins, thioredoxins, play a major role in the regulation of cellular processes in cyanobacteria [95]. The thioredoxin-mediated regulation involves the post-translational modification of cysteinyl residues on target proteins, reducing disulfide bridges to thiol groups [96].

In higher plants, two thioredoxins (Trx f and Trx m) were first identified as activators of enzymes involved in photosynthetic carbon assimilation in the chloroplast. The Trx redox state links the activity of the Calvin cycle enzymes phosphoribulokinase (PRK), NADP-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), fructose 1, 6-bisphosphatase (FBP), and sedoheptulose 1,7-bisphosphatase (SBP) to the supply of ATP and NADPH in response to variations in light intensity [96].

9.1. Prominent Role of the Redox-Responsive CP12 Protein

A small intrinsically-disordered protein, CP12, operates in the thioredoxin-mediated regulation of the Calvin cycle, in mediating the formation of a complex between glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and phosphoribulokinase (PRK) in response to changes in light intensity [96,97]. Under low light, the formation of the PRK/CP12/GAPDH complex results in a reduction in the activity of both PRK and GAPDH. Under light conditions, a thioredoxin mediates the dissociation of the complex to increase both GAPDH and PRK activity [96]. The formation/dissociation of the PRK/CP12/GAPDH complex provides a rapid regulation of the rate of carbon fixation by the Calvin cycle in response to changes in light availability to produce NADPH and ATP [98]. In pea leaves exposed to high light, dissociation occurred in under 1 min, while re-association was evident 1 min after transfer to low light and complete after 5 min under darkness [96].

A number of studies suggest that CP12 proteins may play a wider role [96,97,99]. In *Arabidopsis thaliana* CP12 is expressed in a range of tissues, including the roots which usually receive no light. Furthermore, similarly to higher plant genomes that encode up to three forms of CP12, cyanobacterial genomes possess multiple CP12 genes, raising questions about the role of these different CP12 proteins [97]. The diverse primary structure of cyanobacterial CP12-like proteins can be classified into eight different groups based on the presence or absence of the three conserved features of classical CP12 proteins, i.e., the N- and C- terminal cysteine pairs and the central highly conserved "AWD_VEE" motif [97]. When oxidized, the N- and C-terminal cysteine pairs form two intramolecular disulfide bridges, which are necessary for the formation of the PRK/CP12/GAPDH complex, and are converted to thiol groups when reduced by Trx. On conversion to the reduced form, CP12 loses the conserved α-helices present and becomes completely unstructured, flexible, and inactive [97].

The discovery of eight CP12-like cyanobacterial classes, some of whom have proteins that are fused to an N-terminal cystathionine-β-synthase (CBS) domain, raises interesting questions about the role of these fusion proteins in the regulation of metabolism [96]. No individual cyanobacteria has all eight different classes of CP12-like proteins, but, except for the marine picocyanobacteria, all other groups possess at least one copy of the classical CP12 form [96].

Metal binding studies in vitro have shown that the *Chlamydomonas* CP12 protein can bind copper (Cu^{2+}) with an affinity (Kd 26 μM) similar to that of the prion protein (Kd of about 14 μM) and nickel-binding chaperone proteins (Ni^{2+} Kd 11 μM) [96]. There is evidence showing that Cu^{2+} ions aid the formation of disulfide bonds in the *Chlamydomonas* CP12 protein, though this protein can interact with GAPDH and PRK in the presence or absence of copper ions [96]. In addition, the backbone structures of the *Synechococcus* PCC 7942 CP12-GAPDH binary complex in copper-free and copper-bound forms are very similar, suggesting that copper is not essential for the formation of the PRK/CP12/GAPDH complex [96].

In *Synechococcus* PCC 7942, the analysis of a CP12 knockout mutant indicated that CP12 operates in the separation of the activities of the Calvin cycle from the oxidative pentose phosphate pathway (OPP) during day-night cycles. Interestingly, some cyanobacterial phages exploit this regulatory mechanism by introducing a CP12-like protein into the cyanobacterial host to downregulate its Calvin cycle and upregulate its OPP [100]. Furthermore, phage genes involved in OPP, photosynthesis, and deoxynucleotide biosynthesis are expressed in the host cyanobacteria, likely to boost the production of NADPH and deoxynucleotides for phage replication [96].

Of biotechnological interest, it has been shown in a *Synechococcus* PCC 7942 strain engineered for the production of 2,3-butanediol that the level of this production was increased by the deletion of the CP12 gene combined with the overexpression of the RubisCO operon (*rbcLXS*) and the phosphoribulokinase (*prk*) gene [101].

9.2. Glutathionylation: An Overlooked Mechanism Operating in the Regulation of the Central Metabolism

Photosynthetic organisms are continuously challenged with toxic reactive oxygen species (ROS) generated mostly by photosynthesis and respiration. These ROS are handled by cellular defense

systems that, among other processes, maintain the redox homeostasis of cellular thiols (Figure 5). Glutathione, a very important player in this process, is a highly abundant (from 0.1 to 10 mM) tripeptide (γ-Glu-Cys-Gly) that occurs in two forms. The reduced (major) form (GSH) maintains the intracellular cell environment in a reduced state. The resulting glutathione disulfide (GSSG) is reduced back to GSH by various factors, such as the NADPH-using enzyme glutathione reductase (GR) that occurs in most cyanobacteria, with the noticeable exception of the two well-studied models *Synechocystis* PCC 6803 [102] and *Synechococcus* PCC 7002 [103].

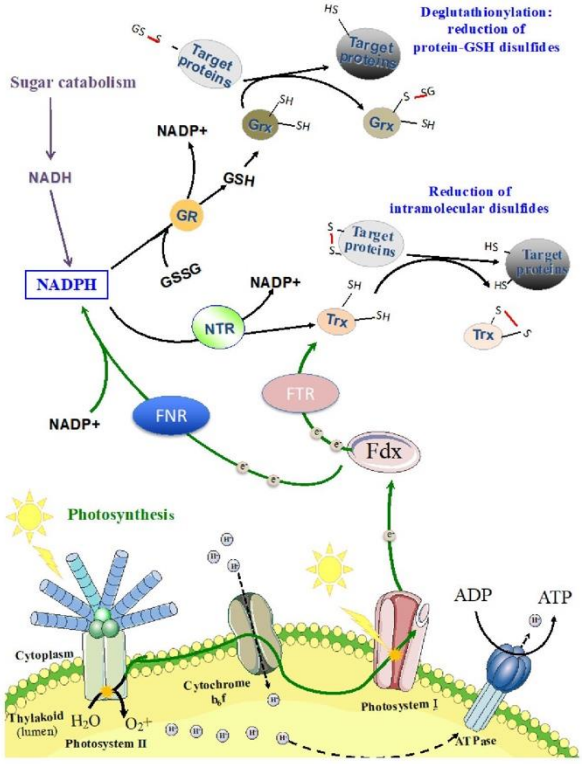


Figure 5. Schematic representation of the redox regulation mechanisms. Fed: ferredoxin; FNR: ferredoxin NADP+ reductase; FTR: ferredoxin thioredoxin reductase; GR: glutathione reductase; Grx: glutaredoxin; GSH: reduced glutathione (monomer form); GSSG: oxidized glutathione (glutathione disulphide = dimeric form); H^+: proton; NTR: NADPH dependent thioredoxin reductase; SG: glutathionylated cysteine; SH: thiol in a cysteine residue; Trx: Thioredoxin. The green lines represent the photosynthetic electron transfer, while the purple lines correspond to the sugar catabolism.

Glutathione can form a mixed-disulfide bridge between the thiol group of its cysteine and an accessible thiol of a protein (Figure 5). This reaction, called protein glutathionylation, can occur spontaneously by reacting with activated thiols (sulfenic acids) or it can be catalyzed by specific enzymes, such as glutathione transferase (GST) [104]. As this post-translational modification is reversible, it constitutes an important mechanism of redox signaling by protecting specific cysteine residues and/or by modulating protein activity [105,106]. The reverse reaction, deglutathionylation

(Figure 5), is catalyzed by the thiol−disulfide oxidoreductase thioredoxins (Trx) or the GSH-dependent enzymes GST or glutaredoxins (Grx) [106].

Using *Synechocystis* PCC 6803 as a model, we recently identified 383 proteins that can be glutathionylated *in vitro* [107]. These glutathionylable proteins participate in a wide range of cellular processes and metabolic pathways, including carbon and nitrogen metabolisms (see below), cell division, stress responses, and hydrogen production. The glutathionylation of several proteins, namely, the antioxidant peroxiredoxin II, the mercuric reductase, the AbrB2 transcription factor, and the metabolic enzyme 3-phosphoglycerate dehydrogenase, was confirmed by biochemical studies of the purified recombinant proteins [105–107].

Nine proteins operating in the Calvin cycle were identified as potential targets of glutathionylation, namely: RubisCO (small and large subunits), phosphoglycerate kinase (PGK), D-fructose 1,6-bisphosphatase class 2/sedoheptulose 1,7-bisphosphatase, transketolase, transaldolase, ribulose-phosphate epimerase, glyceraldehyde-3-P dehydrogenase (GAPDH), phosphoribulokinase (PRK), and CP12 [107]. The possible glutathionylation of the GAPDH, PRK, and CP12 proteins is of particular interest since it could influence the formation of the PRK/CP12/GAPDH supramolecular complex that down-regulates GAPDH and PRK activities [107]. Together, these data suggest that glutathionylation could regulate the Calvin cycle in cyanobacteria facing oxidative stress [107] as observed in photosynthetic eukaryotes [108]. Again as observed in eukaryotes, two sugar metabolism enzymes were identified as glutathionylable [107,108].

Furthermore, numerous putative targets of glutathionylation are involved in nitrogen assimilation and amino-acid metabolism, such as glutamine synthetase, GOGAT, methionine synthase, and acetolactate synthase, which operates in the synthesis of leucine and isoleucine as well as in the TCA cycle that produces NADPH and carbon metabolites for nitrogen assimilation and thereby cell growth [36,62].

Collectively, these results suggest that glutathionylation constitutes a major mechanism of global regulation of the cyanobacterial metabolism under (photo)oxidative stress conditions that can occur especially in large-scale cultures for biotechnological projects [107].

10. Cyanobacteria Facing Carbon/Nitrogen Imbalance can Produce Exopolysaccharides and Biodegradable Plastics of Biotechnological Interest

In response to nitrogen limitation, many cyanobacteria can increase their production of extracellular polysaccharides (EPS), which harbor six to twelve types of monosaccharides, are more complex than the EPS formed by other bacteria or eukaryotic microalgae, which usually contain less than four monosaccharides [109]. Cyanobacterial EPS are usually strongly anionic since they contain one or two different uronic acids, as well as sulfate groups, a rare feature among bacteria [109]. The presence of negatively charged EPS surrounding cyanobacterial cells may play an important role in adsorption sequestration of metabolites, inorganic micronutrients, and/or metal cations [110,111], creating an extracellular pool of resources that can be re-used [112]. The EPS can also serve as the structural scaffold for the formation and maintenance of biofilms, which protect internal cells against various noxious agents, including O_2, UV, salt, and heavy metals [110,113], eventually combine to result in the sacrificial death of surface-exposed cells. Hence, EPS can be of biotechnological interest for processes such as the adsorption of toxic metals for water treatment and/or controlling cell buoyancy (sedimentation/flotation) to facilitate biomass harvesting [113,114]. Furthermore, cyanobacterial EPS also have the potential to serve as food-thickening agents [115] or in wound-healing or anti-inflammatory treatments [116]. Cyanobacterial EPS are also involved in the colonization of soils and the biomineralization of calcium (and/or magnesium) carbonates, sometimes leading to the formation of stromatolites [6].

Cyanobacteria facing nitrogen starvation can also produce poly-3-hydroxybutyrate (PHB) [117], the best-characterized member of the polyhydroxyalkanoates (PHAs) family of biodegradable plastics [118], as carbon storage compounds [119]. These PHB form water insoluble inclusions (granules) inside the cyanobacterial cells that can make up between 5–20% of the dry cell weight [120,121]. The accumulation

of PHB is highly heterogeneous at the single-cell level [122]. The main carbon flux in the light-driven CO_2-capturing synthesis of PHB goes from the Calvin cycle, through the lower part of glycolysis, to pyruvate and then acetyl coenzyme A (acetyl-CoA). Then, two acetyl-CoA groups are condensed into aceto-acetyl-CoA and subsequently reduced by NADPH to hydroxybutyryl-CoA which can then be polymerized to PHB [123].

The CO_2-capturing photosynthetic production of PHA/PHB polymers by cyanobacteria is very interesting since these bioplastics can be completely degraded into CO_2 and water by naturally occurring microorganisms [118]. In contrast, the petroleum-based plastics massively used in packaging industries are refractory to biodegradation. Thus, they accumulate as microplastics in oceans [124] and challenge the production and quality of the marine food chain (production of plankton, entanglement or intestinal blockage or gastric impaction of fishes *etc*) [125].

11. Concluding Remarks

Cyanobacteria are widely diverse photosynthetic organisms that play a crucial role in the biosphere, including the production a large part of the organic matter and oxygen for the rest of the food chain. They also have a great potential for the production of chemicals from solar energy, fresh or marine water, and minerals, thanks to their powerful photosynthesis and the effective synthetic biology tools of several model strains [23]. To turn the biotechnological promise of cyanobacteria into an industrial reality there are several options. We can continue to study a few genetically tractable species (such as *Synechocystis* PCC 6803, *Synechococcus* PCC 7942, *Synechococcus* PCC 7002, and *Anabaena* PCC 7120) to continue to identify key metabolic players (enzymes and protein regulators and their co-factors; RNA regulators, metabolites, *etc*.). When this is achieved, mathematical models will be of great help to design genetic engineering strategies of these model hosts for the photosynthetic production of biotechnologically important chemicals. However, one cannot guarantee that it is possible to combine in the same genetic model all properties required for the efficient and stable photoproduction of an intended chemical. Knowing that the large biodiversity of cyanobacteria has been frequently overlooked so far, it is certainly interesting to begin studying non-model cyanobacteria with the goal of combining their specific interest with the engineering strategies developed in well-studied genetic model. To do so major challenge remains to determine if, and when, the required genetic toolbox developed for the well-studied cyanobacterial models can be adapted to these "new" model cyanobacteria emerging from such investigations. Furthermore, communication should be strengthened between academic researchers who engineer cyanobacteria for biotechnological purposes, but have a limited access to large-scale photobioreactors, and industrial partners who attempt to use the engineered cyanobacteria to actually produce intended chemicals at reasonable costs, but may lack academic knowledge on cyanobacterial physiology and metabolism. Finally, it would certainly be helpful to put a tax on the CO_2 emitted by oil combustion and transformation, to be used to decrease the cost of the photosynthetic production of chemicals by cyanobacteria in order to turn their promises into industrial realities.

Author Contributions: Conceptualization, F.C., C.C.-C. and J.-F.S.; writing—original draft preparation, F.C., C.C.-C. and T.V.; writing—review and editing, F.C., C.C.-C., T.V. V.B.-G., C.C., E.D.-S. and J.-F.S.; supervision, F.C. and C.C.-C.; project administration, F.C., C.C.-C. and J.-F.S.; funding acquisition, F.C. and J.-F.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by (i) the ABACUS project, grant agreement N° 745668, funded by the BBI-JU under the European Union's Horizon 2020 R&I program and (ii) the ANR CalvinDesign (ANR-17-CE05-0001).

Acknowledgments: We thank Michael S. DuBow for his critical reading of the manuscript and his help to improve our English.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Schopf, J.W. The paleobiological record of photosynthesis. *Photosynth. Res.* **2011**, *107*, 87–101. [CrossRef] [PubMed]
2. Ponce-Toledo, R.I.; Deschamps, P.; López-García, P.; Zivanovic, Y.; Benzerara, K.; Moreira, D. An Early-Branching Freshwater Cyanobacterium at the Origin of Plastids. *Curr. Biol.* **2017**, *27*, 386–391. [CrossRef] [PubMed]
3. Hamilton, T.L.; Bryant, D.A.; Macalady, J.L. The role of biology in planetary evolution: Cyanobacterial primary production in low-oxygen Proterozoic oceans. *Environ. Microbiol.* **2016**, 325–340. [CrossRef] [PubMed]
4. Dai, W.; Chen, M.; Myers, C.; Ludtke, S.J.; Pettitt, B.M.; King, J.A.; Schmid, M.F.; Chiu, W. Visualizing Individual RuBisCO and Its Assembly into Carboxysomes in Marine Cyanobacteria by Cryo-Electron Tomography. *J. Mol. Biol.* **2018**, *430*, 4156–4167. [CrossRef]
5. Singh, J.S.; Kumar, A.; Rai, A.N.; Singh, D.P. Cyanobacteria: A precious bio-resource in agriculture, ecosystem, and environmental sustainability. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*. [CrossRef]
6. Cassier-Chauvat, C.; Chauvat, F. Cyanobacteria: Wonderful Microorganisms for Basic and Applied Research. *eLS* **2018**. [CrossRef]
7. Nakamura, Y.; Kaneko, T.; Sato, S.; Mimuro, M.; Miyashita, H.; Tsuchiya, T.; Sasamoto, S.; Watanabe, A.; Kawashima, K.; Kishida, Y.; et al. Complete Genome Structure of Gloeobacter violaceus PCC 7421, a Cyanobacterium that Lacks Thylakoids. *DNA Res.* **2003**, *10*, 137–145. [CrossRef]
8. Cassier-Chauvat, C.; Chauvat, F. Cell division in cyanobacteria. In *The cell Biology of Cyanobacteria*; Flores, E., Herrero, A., Eds.; Caister Academic Press: Norfolk, UK, 2014.
9. Cassier-Chauvat, C.; Veaudor, T.; Chauvat, F. Comparative genomics of DNA recombination and repair in cyanobacteria: Biotechnological implications. *Fronti. Microbiol.* **2016**, *7*. [CrossRef]
10. Narainsamy, K.; Farci, S.; Braun, E.; Junot, C.; Cassier-Chauvat, C.; Chauvat, F. Oxidative-stress detoxification and signalling in cyanobacteria: The crucial glutathione synthesis pathway supports the production of ergothioneine and ophthalmate. *Mol. Microbiol.* **2016**, *100*, 15–24. [CrossRef]
11. Demay, J.; Bernard, C.; Reinhardt, A.; Marie, B. Natural products from cyanobacteria: Focus on beneficial activities. *Mar. Drugs* **2019**, *17*, 320. [CrossRef]
12. Pearson, L.A.; Dittmann, E.; Mazmouz, R.; Ongley, S.E.; D'Agostino, P.M.; Neilan, B.A. The genetics, biosynthesis and regulation of toxic specialized metabolites of cyanobacteria. *Harmful Algae* **2016**, *54*, 98–111. [CrossRef] [PubMed]
13. Panjiar, N.; Mishra, S.; Yadav, A.N.; Verma, P. Functional Foods from Cyanobacteria. In *Microbial Functional Foods and Nutraceuticals*; Gupta, V.K., Treichel, H., Shapaval, V.O., de Oliveira, L.A., Tuohy, M.G., Eds.; Wiley: New York, NY, USA, 2017.
14. Verseux, C.; Baqué, M.; Lehto, K.; De Vera, J.P.P.; Rothschild, L.J.; Billi, D. Sustainable life support on Mars-The potential roles of cyanobacteria. *Int. J. Astrobiol.* **2016**, *15*, 65–92. [CrossRef]
15. Dittmann, E.; Gugger, M.; Sivonen, K.; Fewer, D.P. Natural Product Biosynthetic Diversity and Comparative Genomics of the Cyanobacteria. *Trends Microbiol.* **2015**, *23*, 642–652. [CrossRef] [PubMed]
16. Cassier-Chauvat, C.; Dive, V.; Chauvat, F. Cyanobacteria: Photosynthetic factories combining biodiversity, radiation resistance, and genetics to facilitate drug discovery. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *101*, 1359–1364. [CrossRef] [PubMed]
17. Knoot, C.J.; Ungerer, J.; Wangikar, P.P.; Pakrasi, H.B. Cyanobacteria: Promising biocatalysts for sustainable chemical production. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 5044–5052. [CrossRef]
18. Lin, P.C.; Pakrasi, H.B. Engineering cyanobacteria for production of terpenoids. *Planta* **2019**, *249*, 145–154. [CrossRef]
19. Ducat, D.C.; Way, J.C.; Silver, P.A. Engineering cyanobacteria to generate high-value products. *Trends Biotechnol.* **2011**, *29*, 95–103. [CrossRef]
20. Jansson, C.; Northen, T. Calcifying cyanobacteria-the potential of biomineralization for carbon capture and storage. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21*, 365–371. [CrossRef]
21. Cassier-Chauvat, C.; Veaudor, T.; Chauvat, F. Advances in the function and regulation of hydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 19938–19951. [CrossRef]
22. Magnuson, A. Heterocyst thylakoid bioenergetics. *Life* **2019**, *9*, 13. [CrossRef]

23. Santos-Merino, M.; Singh, A.K.; Ducat, D.C. New applications of synthetic biology tools for cyanobacterial metabolic engineering. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2019**, *7*. [CrossRef] [PubMed]
24. Veaudor, T.; Cassier-Chauvat, C.; Chauvat, F. Genomics of Urea Transport and Catabolism in Cyanobacteria: Biotechnological Implications. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*. [CrossRef] [PubMed]
25. Lambert, D.H.; Stevens, S.E. Photoheterotrophic growth of Agmenellum quadruplicatum PR-6. *J. Bacteriol.* **1986**, *165*. [CrossRef] [PubMed]
26. da Silva, G.P.; Mack, M.; Contiero, J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnol. Adv.* **2009**, *27*, 30–39. [CrossRef] [PubMed]
27. Rippka, R.; Deruelles, J.; Waterbury, J.B.; Herdman, M.; Stanier, R.Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyano- bacteria. Journal of General Microbiology 11: 1-61. *J. Gen. Microbiol.* **1979**, *111*, 1–61. [CrossRef]
28. Magdaong, N.C.M.; Blankenship, R.E. Photoprotective, excited-state quenching mechanisms in diverse photosynthetic organisms. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 5018–5025. [CrossRef] [PubMed]
29. Barber, J. Photosynthetic water splitting by the Mn4Ca2+OX catalyst of photosystem II: Its structure, robustness and mechanism. *Q. Rev. Biophys.* **2017**, *50*. [CrossRef]
30. Gao, J.; Wang, H.; Yuan, Q.; Feng, Y. Structure and function of the photosystem supercomplexes. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*. [CrossRef]
31. Klatt, J.M.; Al-Najjar, M.A.A.; Yilmaz, P.; Lavik, G.; de Beer, D.; Polerecky, L. Anoxygenic photosynthesis controls oxygenic photosynthesis in a cyanobacterium from a sulfidic spring. *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, *81*, 2025–2031. [CrossRef]
32. Bracher, A.; Whitney, S.M.; Hartl, F.U.; Hayer-Hartl, M. Biogenesis and Metabolic Maintenance of Rubisco. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2017**, *68*, 29–60. [CrossRef]
33. Zhu, B.; Chen, G.; Cao, X.; Wei, D. Molecular characterization of CO2 sequestration and assimilation in microalgae and its biotechnological applications. *Bioresour. Technol.* **2017**, *244*, 1207–1215. [CrossRef] [PubMed]
34. Kolesinski, P.; Rydzy, M.; Szczepaniak, A. Is RAF1 protein from *Synechocystis* sp. PCC 6803 really needed in the cyanobacterial Rubisco assembly process? *Photosynth. Res.* **2017**, *132*, 135–148. [CrossRef] [PubMed]
35. Hauser, T.; Bhat, J.Y.; Milicic, G.; Wendler, P.; Hartl, F.U.; Bracher, A.; Hayer-Hartl, M. Structure and mechanism of the Rubisco-assembly chaperone Raf1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2015**, *22*, 720–728. [CrossRef] [PubMed]
36. Forchhammer, K.; Selim, K.A. Carbon/nitrogen homeostasis control in cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **2019**, *44*, 33–53. [CrossRef]
37. Wilson, R.H.; Martin-Avila, E.; Conlan, C.; Whitney, S.M. An improved Escherichia coli screen for Rubisco identifies a protein-protein interface that can enhance CO2-fixation kinetics. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 18–27. [CrossRef]
38. Satagopan, S.; Huening, K.A.; Robert Tabita, F. Selection of Cyanobacterial (*Synechococcus* sp. Strain PCC 6301) RubisCO Variants with Improved Functional Properties That Confer Enhanced CO2-Dependent Growth of Rhodobacter capsulatus, a Photosynthetic Bacterium. *mBio* **2019**, *10*, e01537-19. [CrossRef]
39. Zhang, A.; Carroll, A.L.; Atsumi, S. Carbon recycling by cyanobacteria: Improving CO2 fixation through chemical production. *FEMS Microbiol. Lett.* **2017**, *364*. [CrossRef]
40. Liang, F.; Lindblad, P. Effects of overexpressing photosynthetic carbon flux control enzymes in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Metab. Eng.* **2016**, *38*, 56–64. [CrossRef]
41. Atsumi, S.; Higashide, W.; Liao, J.C. Direct photosynthetic recycling of carbon dioxide to isobutyraldehyde. *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27*, 1177–1180. [CrossRef]
42. Ruffing, A.M. Improved free fatty acid production in cyanobacteria with *Synechococcus* sp. PCC 7002 as host. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2014**, *2*, 1–10. [CrossRef]
43. Shih, P.M.; Zarzycki, J.; Niyogi, K.K.; Kerfeld, C.A. Introduction of a synthetic CO2-fixing photorespiratory bypass into a cyanobacterium. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 9493–9500. [CrossRef] [PubMed]
44. Sommer, M.; Sutter, M.; Gupta, S.; Kirst, H.; Turmo, A.; Lechno-Yossef, S.; Burton, R.L.; Saechao, C.; Sloan, N.B.; Cheng, X.; et al. Heterohexamers formed by CcmK3 and CcmK4 increase the complexity of beta carboxysome shells. *Plant Physiol.* **2019**, *179*, 156–167. [CrossRef] [PubMed]
45. Kinney, J.N.; Axen, S.D.; Kerfeld, C.A. Comparative analysis of carboxysome shell proteins. *Photosynth. Res.* **2011**, *109*, 21–32. [CrossRef] [PubMed]

46. Montgomery, B.L.; Lechno-Yossef, S.; Kerfeld, C.A. Interrelated modules in cyanobacterial photosynthesis: The carbon-concentrating mechanism, photorespiration, and light perception. *J. Exp. Bot.* **2016**, *67*, 2931–2940. [CrossRef] [PubMed]
47. Cai, F.; Dou, Z.; Bernstein, S.L.; Leverenz, R.; Williams, E.B.; Heinhorst, S.; Shively, J.; Cannon, G.C.; Kerfeld, C.A. Advances in understanding carboxysome assembly in Prochlorococcus and *Synechococcus* implicate CsoS2 as a critical component. *Life* **2015**, *50*, 1141–1171. [CrossRef] [PubMed]
48. Turmo, A.; Gonzalez-Esquer, C.R.; Kerfeld, C.A. Carboxysomes: Metabolic modules for CO2 fixation. *FEMS Microbiol. Lett.* **2017**, *364*. [CrossRef]
49. Wang, H.; Yan, X.; Aigner, H.; Bracher, A.; Nguyen, N.D.; Hee, W.Y.; Long, B.M.; Price, G.D.; Hartl, F.U.; Hayer-Hartl, M. Rubisco condensate formation by CcmM in β-carboxysome biogenesis. *Nature* **2019**, *566*. [CrossRef]
50. Mangan, N.M.; Flamholz, A.; Hood, R.D.; Milo, R.; Savage, D.F. PH determines the energetic efficiency of the cyanobacterial CO2 concentrating mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 5354–5362. [CrossRef]
51. Sun, Y.; Wollman, A.J.M.; Huang, F.; Leake, M.C.; Liu, L.N. Single-organelle quantification reveals stoichiometric and structural variability of carboxysomes dependent on the environment. *Plant Cell* **2019**, *31*, 1648–1664. [CrossRef]
52. Huang, F.; Vasieva, O.; Sun, Y.; Faulkner, M.; Dykes, G.F.; Zhao, Z.; Liu, L.N. Roles of RBcX in carboxysome biosynthesis in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC7942. *Plant Physiol.* **2019**, *179*, 184–194. [CrossRef]
53. Cameron, J.C.; Wilson, S.C.; Bernstein, S.L.; Kerfeld, C.A. Biogenesis of a bacterial organelle: The carboxysome assembly pathway. *Cell* **2013**, *155*, 1131–1140. [CrossRef] [PubMed]
54. MacCready, J.S.; Basalla, J.L.; Vecchiarelli, A.G. Origin and Evolution of Carboxysome Positioning Systems in Cyanobacteria. *Mol. Biol. Evol.* **2020**. [CrossRef]
55. Takeya, M.; Hirai, M.Y.; Osanai, T. Allosteric inhibition of phosphoenolpyruvate carboxylases is determined by a single amino acid residue in cyanobacteria. *Sci. Rep.* **2017**, *7*. [CrossRef] [PubMed]
56. Angermayr, S.A.; Van Der Woude, A.D.; Correddu, D.; Vreugdenhil, A.; Verrone, V.; Hellingwerf, K.J. Exploring metabolic engineering design principles for the photosynthetic production of lactic acid by *Synechocystis* sp. PCC6803. *Biotechnol. Biofuels* **2014**, *7*. [CrossRef] [PubMed]
57. Luinenburg, I.; Coleman, J.R. A requirement for phosphoenolpyruvate carboxylase in the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942. *Arch. Microbiol.* **1990**, *154*, 471–474. [CrossRef]
58. Hasunuma, T.; Matsuda, M.; Kato, Y.; Vavricka, C.J.; Kondo, A. Temperature enhanced succinate production concurrent with increased central metabolism turnover in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Metab. Eng.* **2018**, *48*, 109–120. [CrossRef]
59. Durall, C.; Lindberg, P.; Yu, J.; Lindblad, P. Increased ethylene production by overexpressing phosphoenolpyruvate carboxylase in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Biotechnol. Biofuels* **2020**, *13*. [CrossRef]
60. Cheah, Y.E.; Xu, Y.; Sacco, S.A.; Babele, P.K.; Zheng, A.O.; Johnson, C.H.; Young, J.D. Systematic identification and elimination of flux bottlenecks in the aldehyde production pathway of *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Metab. Eng.* **2020**, *60*, 56–65. [CrossRef]
61. Chen, X.; Schreiber, K.; Appel, J.; Makowka, A.; Fähnrich, B.; Roettger, M.; Hajirezaei, M.R.; Sönnichsen, F.D.; Schönheit, P.; Martin, W.F.; et al. The Entner-Doudoroff pathway is an overlooked glycolytic route in cyanobacteria and plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 5441–5446. [CrossRef]
62. Xiong, W.; Cano, M.; Wang, B.; Douchi, D.; Yu, J. The plasticity of cyanobacterial carbon metabolism. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2017**, *41*, 12–19. [CrossRef]
63. Wan, N.; DeLorenzo, D.M.; He, L.; You, L.; Immethun, C.M.; Wang, G.; Baidoo, E.E.K.; Hollinshead, W.; Keasling, J.D.; Moon, T.S.; et al. Cyanobacterial carbon metabolism: Fluxome plasticity and oxygen dependence. *Biotechnol. Bioeng.* **2017**, *114*, 1593–1602. [CrossRef] [PubMed]
64. Kanwal, S.; Incharoensakdi, A. GABA synthesis mediated by γ-aminobutanal dehydrogenase in *Synechocystis* sp. PCC6803 with disrupted glutamate and α-ketoglutarate decarboxylase genes. *Plant Sci.* **2020**, *290*. [CrossRef] [PubMed]
65. Gründel, M.; Knoop, H.; Steuer, R. Activity and functional properties of the isocitrate lyase in the cyanobacterium *Cyanothece* sp. PCC 7424. *Microbiology (United Kingdom)* **2017**, *163*. [CrossRef] [PubMed]

66. Zhang, S.; Bryant, D.A. Biochemical validation of the glyoxylate cycle in the cyanobacterium Chlorogloeopsis fritschii strain PCC 9212. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 14019–14030. [CrossRef]
67. Esteves-Ferreira, A.A.; Inaba, M.; Fort, A.; Araújo, W.L.; Sulpice, R. Nitrogen metabolism in cyanobacteria: Metabolic and molecular control, growth consequences and biotechnological applications. *Crit. Rev. Microbiol.* **2018**, *44*, 541–560. [CrossRef]
68. Watzer, B.; Spät, P.; Neumann, N.; Koch, M.; Sobotka, R.; MacEk, B.; Hennrich, O.; Forchhammer, K. The signal transduction protein PII controls ammonium, nitrate and urea uptake in cyanobacteria. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*. [CrossRef]
69. Giner-Lamia, J.; Robles-Rengel, R.; Hernández-Prieto, M.A.; Isabel Muro-Pastor, M.; Florencio, F.J.; Futschik, M.E. Identification of the direct regulon of NtcA during early acclimation to nitrogen starvation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, 11800–11820. [CrossRef]
70. Veaudor, T.; Cassier-Chauvat, C.; Chauvat, F. Overproduction of the cyanobacterial hydrogenase and selection of a mutant thriving on urea, as a possible step towards the future production of hydrogen coupled with water treatment. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0198836. [CrossRef]
71. Herrero, A.; Stavans, J.; Flores, E. The multicellular nature of filamentous heterocyst-forming cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **2016**, *40*, 831–854. [CrossRef]
72. Avilan, L.; Roumezi, B.; Risoul, V.; Bernard, C.S.; Kpebe, A.; Belhadjhassine, M.; Rousset, M.; Brugna, M.; Latifi, A. Phototrophic hydrogen production from a clostridial [FeFe] hydrogenase expressed in the heterocysts of the cyanobacterium *Nostoc* PCC 7120. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *102*, 5775–5783. [CrossRef]
73. Robles-Rengel, R.; Florencio, F.J.; Muro-Pastor, M.I. Redox interference in nitrogen status via oxidative stress is mediated by 2-oxoglutarate in cyanobacteria. *New Phytol.* **2019**, *224*, 216–228. [CrossRef] [PubMed]
74. García-Domínguez, M.; Reyes, J.C.; Florencio, F.J. NtcA represses transcription of gifA and gifB, genes that encode inhibitors of glutamine synthetase type I from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol. Microbiol.* **2000**, *35*, 1192–1201. [CrossRef] [PubMed]
75. Zhang, C.C.; Zhou, C.Z.; Burnap, R.L.; Peng, L. Carbon/Nitrogen Metabolic Balance: Lessons from Cyanobacteria. *Trends Plant Sci.* **2018**, *23*, 1116–1130. [CrossRef] [PubMed]
76. Jiang, Y.L.; Wang, X.P.; Sun, H.; Han, S.J.; Li, W.F.; Cui, N.; Lin, G.M.; Zhang, J.Y.; Cheng, W.; Cao, D.D.; et al. Coordinating carbon and nitrogen metabolic signaling through the cyanobacterial global repressor NdhR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *115*, 403–408. [CrossRef]
77. Domain, F.; Houot, L.; Chauvat, F.; Cassier-Chauvat, C. Function and regulation of the cyanobacterial genes lexA, recA and ruvB: LexA is critical to the survival of cells facing inorganic carbon starvation. *Mol. Microbiol.* **2004**, *53*, 65–80. [CrossRef]
78. Kizawa, A.; Kawahara, A.; Takashima, K.; Takimura, Y.; Nishiyama, Y.; Hihara, Y. The LexA transcription factor regulates fatty acid biosynthetic genes in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant J.* **2017**, *92*, 89–98. [CrossRef]
79. Muro-Pastor, A.M.; Hess, W.R. Regulatory RNA at the crossroads of carbon and nitrogen metabolism in photosynthetic cyanobacteria. *Biochimica et Biophysica Acta-Gene Regulatory Mechanisms* **2020**, *1863*, 194477. [CrossRef]
80. Figge, R.M.; Cassier-Chauvat, C.; Chauvat, F.; Cerff, R. Characterization and analysis of an NAD(P)H dehydrogenase transcriptional regulator critical for the survival of cyanobacteria facing inorganic carbon starvation and osmotic stress. *Mol. Microbiol.* **2001**, *39*, 455–468. [CrossRef]
81. Takahashi, Y.; Yamaguchi, O.; Omata, T. Roles of CmpR, a LysR family transcriptional regulator, in acclimation of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 to low-CO2 and high-light conditions. *Mol. Microbiol.* **2004**, *52*, 837–845. [CrossRef]
82. Ishii, A.; Hihara, Y. An AbrB-like transcriptional regulator, Sll0822, is essential for the activation of nitrogen-regulated genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiol.* **2008**, *148*, 660–670. [CrossRef]
83. Wang, H.L.; Postier, B.L.; Burnap, R.L. Alterations in Global Patterns of Gene Expression in *Synechocystis* sp. PCC 6803 in Response to Inorganic Carbon Limitation and the Inactivation of ndhR, a LysR Family Regulator. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 5739–5751. [CrossRef] [PubMed]
84. Dutheil, J.; Saenkham, P.; Sakr, S.; Leplat, C.; Ortega-Ramos, M.; Bottin, H.; Cournac, L.; Cassier-Chauvat, C.; Chauvat, F. The AbrB2 autorepressor, expressed from an atypical promoter, represses the hydrogenase operon to regulate hydrogen production in *Synechocystis* strain PCC6803. *J. Bacteriol.* **2012**, *194*, 5423–5433. [CrossRef] [PubMed]

85. Orf, I.; Timm, S.; Bauwe, H.; Fernie, A.R.; Hagemann, M.; Kopka, J.; Nikoloski, Z. Can cyanobacteria serve as a model of plant photorespiration?-A comparative meta-analysis of metabolite profiles. *J. Exp. Bot.* **2016**, *67*, 2941–2952. [CrossRef] [PubMed]
86. Leplat, C.; Champeimont, R.; Saenkham, P.; Cassier-Chauvat, C.; Jean-Christophe, A.; Chauvat, F. Genome-wide transcriptome analysis of hydrogen production in the cyanobacterium *Synechocystis*: Towards the identification of new players. *Int. J. Hydrog. Energy* **2013**, *38*, 1866–1872. [CrossRef]
87. Gutekunst, K.; Phunpruch, S.; Schwarz, C.; Schuchardt, S.; Schulz-Friedrich, R.; Appel, J. LexA regulates the bidirectional hydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 as a transcription activator. *Mol. Microbiol.* **2005**, *58*, 810–823. [CrossRef]
88. Oliveira, P.; Lindblad, P. LexA, a transcription regulator binding in the promoter region of the bidirectional hydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEMS Microbiol. Lett.* **2005**, *251*, 59–66. [CrossRef]
89. Patterson-Fortin, L.M.; Colvin, K.R.; Owttrim, G.W. A LexA-related protein regulates redox-sensitive expression of the cyanobacterial RNA helicase, crhR. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 3446–3454. [CrossRef]
90. Pimentel, J.S.M.; Giani, A. Microcystin production and regulation under nutrient stress conditions in toxic Microcystis strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, *80*, 5836–5843. [CrossRef]
91. Mo, H.; Xie, X.; Zhu, T.; Lu, X. Effects of global transcription factor NtcA on photosynthetic production of ethylene in recombinant *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biotechnol. Biofuels* **2017**, *10*. [CrossRef]
92. Scholl, J.; Dengler, L.; Bader, L.; Forchhammer, K. Phosphoenolpyruvate carboxylase from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 is under global metabolic control by P II signaling. *Mol. Microbiol.* **2020**. [CrossRef]
93. Lüddecke, J.; Forchhammer, K. From PII signaling to metabolite sensing: A novel 2-oxoglutarate sensor that details PII-NAGK complex formation. *PLoS ONE* **2013**, *8*. [CrossRef] [PubMed]
94. Guo, J.; Nguyen, A.Y.; Dai, Z.; Su, D.; Gaffrey, M.J.; Moore, R.J.; Jacobs, J.M.; Monroe, M.E.; Smith, R.D.; Koppenaal, D.W.; et al. Proteome-wide light/dark modulation of thiol oxidation in cyanobacteria revealed by quantitative site-specific redox proteomics. *Mol. Cell Proteom.* **2014**, *13*, 3270–3285. [CrossRef] [PubMed]
95. Florencio, F.J.; Pérez-Pérez, M.E.; López-Maury, L.; Mata-Cabana, A.; Lindahl, M. The diversity and complexity of the cyanobacterial thioredoxin systems. *Photosynth. Res.* **2006**, *89*, 157–171. [CrossRef]
96. López-Calcagno, P.E.; Howard, T.P.; Raines, C.A. The CP12 protein family: A thioredoxin-mediated metabolic switch? *Front. Plant Sci.* **2014**, *5*. [CrossRef]
97. Hackenberg, C.; Hakanpää, J.; Cai, F.; Antonyuk, S.; Eigner, C.; Meissner, S.; Laitaoja, M.; Jänis, J.; Kerfeld, C.A.; Dittmann, E.; et al. Structural and functional insights into the unique CBS–CP12 fusion protein family in cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, 7141–7146. [CrossRef] [PubMed]
98. McFarlane, C.R.; Shah, N.R.; Kabasakal, B.V.; Echeverria, B.; Cotton, C.A.R.; Bubeck, D.; Murray, J.W. Structural basis of light-induced redox regulation in the Calvin–Benson cycle in cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 20984–20990. [CrossRef] [PubMed]
99. Stanley, D.N.; Raines, C.A.; Kerfeld, C.A. Comparative analysis of 126 cyanobacterial genomes reveals evidence of functional diversity among homologs of the redox-regulated CP12 protein. *Plant Physiol.* **2013**, *161*, 824–835. [CrossRef] [PubMed]
100. Gontero, B.; Maberly, S.C. An intrinsically disordered protein, CP12: Jack of all trades and master of the Calvin cycle. *Biochem. Soc. Trans.* **2012**, *40*, 995–999. [CrossRef] [PubMed]
101. Kanno, M.; Carroll, A.L.; Atsumi, S. Global metabolic rewiring for improved CO2 fixation and chemical production in cyanobacteria. *Nat. Commun.* **2017**, *8*. [CrossRef]
102. Marteyn, B.; Domain, F.; Legrain, P.; Chauvat, F.; Cassier-Chauvat, C. The thioredoxin reductase-glutaredoxins-ferredoxin crossroad pathway for selenate tolerance in *Synechocystis* PCC6803. *Mol. Microbiol.* **2009**, *71*, 520–532. [CrossRef]
103. Narainsamy, K.; Marteyn, B.; Sakr, S.; Cassier-Chauvat, C.; Chauvat, F. Genomics of the Pleïotropic Glutathione System in Cyanobacteria. In *Advances in Botanical Research*; Elsevier Academic Press: San Diego, CA, USA, 2013; ISBN 9780123943132.
104. Carvalho, A.N.; Marques, C.; Guedes, R.C.; Castro-Caldas, M.; Rodrigues, E.; Van Horssen, J.; Gama, M.J. S-Glutathionylation of Keap1: A new role for glutathione S-transferase pi in neuronal protection. *FEBS Lett.* **2016**, *590*, 1455–1466. [CrossRef] [PubMed]

105. Sakr, S.; Dutheil, J.; Saenkham, P.; Bottin, H.; Leplat, C.; Ortega-Ramos, M.; Aude, J.C.; Chapuis, V.; Guedeney, G.; Decottignies, P.; et al. The activity of the *Synechocystis* PCC6803 AbrB2 regulator of hydrogen production can be post-translationally controlled through glutathionylation. *Int. J. Hydrog. Energy* **2013**, *38*, 13547–13555. [CrossRef]
106. Marteyn, B.; Sakr, S.; Farci, S.; Bedhomme, M.; Chardonnet, S.; Decottignies, P.; Lemaire, S.D.; Cassier-Chauvat, C.; Chauvat, F. The *Synechocystis* PCC6803 MerA-like enzyme operates in the reduction of both mercury and uranium under the control of the glutaredoxin 1 enzyme. *J. Bacteriol.* **2013**, *195*, 4138–4145. [CrossRef] [PubMed]
107. Chardonnet, S.; Sakr, S.; Cassier-Chauvat, C.; Le Maréchal, P.; Chauvat, F.; Lemaire, S.D.; Decottignies, P. First proteomic study of S-glutathionylation in cyanobacteria. *J. Proteome Res.* **2015**, *14*, 59–71. [CrossRef]
108. Gao, X.H.; Bedhomme, M.; Veyel, D.; Zaffagnini, M.; Lemaire, S.D. Methods for analysis of protein glutathionylation and their application to photosynthetic organisms. *Mol. Plant* **2009**, *2*, 218–235. [CrossRef]
109. Pereira, S.; Zille, A.; Micheletti, E.; Moradas-Ferreira, P.; De Philippis, R.; Tamagnini, P. Complexity of cyanobacterial exopolysaccharides: Composition, structures, inducing factors and putative genes involved in their biosynthesis and assembly. *FEMS Microbiol. Rev.* **2009**, *33*, 917–941. [CrossRef]
110. Jittawuttipoka, T.; Planchon, M.; Spalla, O.; Benzerara, K.; Guyot, F.; Cassier-Chauvat, C.; Chauvat, F. Multidisciplinary Evidences that *Synechocystis* PCC6803 Exopolysaccharides Operate in Cell Sedimentation and Protection against Salt and Metal Stresses. *PLoS ONE* **2013**, *8*. [CrossRef]
111. Kamennaya, N.A.; Zemla, M.; Mahoney, L.; Chen, L.; Holman, E.; Holman, H.Y.; Auer, M.; Ajo-Franklin, C.M.; Jansson, C. High pCO2-induced exopolysaccharide-rich ballasted aggregates of planktonic cyanobacteria could explain Paleoproterozoic carbon burial. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 216. [CrossRef]
112. Stuart, R.K.; Mayali, X.; Boaro, A.A.; Zemla, A.; Everroad, R.C.; Nilson, D.; Weber, P.K.; Lipton, M.; Bebout, B.M.; Pett-Ridge, J.; et al. Light regimes shape utilization of extracellular organic C and N in a cyanobacterial biofilm. *mBio* **2016**, *7*, e00650-16. [CrossRef] [PubMed]
113. Planchon, M.; Jittawuttipoka, T.; Cassier-Chauvat, C.; Guyot, F.; Gelabert, A.; Benedetti, M.F.; Chauvat, F.; Spalla, O. Exopolysaccharides protect *Synechocystis* against the deleterious effects of Titanium dioxide nanoparticles in natural and artificial waters. *J. Colloid Interface Sci.* **2013**, *405*, 35–43. [CrossRef]
114. Rossi, F.; De Philippis, R. Role of cyanobacterial exopolysaccharides in phototrophic biofilms and in complex microbial mats. *Life* **2015**, *5*, 1218–1238. [CrossRef] [PubMed]
115. Bernaerts, T.M.M.; Gheysen, L.; Foubert, I.; Hendrickx, M.E.; Van Loey, A.M. The potential of microalgae and their biopolymers as structuring ingredients in food: A review. *Biotechnol. Adv.* **2019**, *37*. [CrossRef] [PubMed]
116. Zampieri, R.M.; Adessi, A.; Caldara, F.; Codato, A.; Furlan, M.; Rampazzo, C.; De Philippis, R.; La Rocca, N.; Dalla Valle, L. Anti-Inflammatory Activity of Exopolysaccharides from Phormidium sp. ETS05, the Most Abundant Cyanobacterium of the Therapeutic Euganean Thermal Muds, Using the Zebrafish Model. *Biomolecules* **2020**, *10*, 582. [CrossRef] [PubMed]
117. Gonzalez-Esquer, C.R.; Smarda, J.; Rippka, R.; Axen, S.D.; Guglielmi, G.; Gugger, M.; Kerfeld, C.A. Cyanobacterial ultrastructure in light of genomic sequence data. *Photosynth. Res.* **2016**, *192*, 147–157. [CrossRef]
118. Balaji, S.; Gopi, K.; Muthuvelan, B. A review on production of poly β hydroxybutyrates from cyanobacteria for the production of bio plastics. *Algal Res.* **2013**, *2*, 278–285. [CrossRef]
119. Kamravamanesh, D.; Pflügl, S.; Nischkauer, W.; Limbeck, A.; Lackner, M.; Herwig, C. Photosynthetic poly-β-hydroxybutyrate accumulation in unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6714. *AMB Express* **2017**, *7*. [CrossRef] [PubMed]
120. Ansari, S.; Fatma, T. Cyanobacterial polyhydroxybutyrate (PHB): Screening, optimization and characterization. *PLoS ONE* **2016**, *11*. [CrossRef] [PubMed]
121. Kaewbai-ngam, A.; Incharoensakdi, A.; Monshupanee, T. Increased accumulation of polyhydroxybutyrate in divergent cyanobacteria under nutrient-deprived photoautotrophy: An efficient conversion of solar energy and carbon dioxide to polyhydroxybutyrate by Calothrix scytonemicola TISTR 8095. *Bioresour. Technol.* **2016**, *212*. [CrossRef]
122. Koch, M.; Berendzen, K.W.; Forchhammer, K. On the role and production of polyhydroxybutyrate (Phb) in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. pcc 6803. *Life* **2020**, *10*, 47. [CrossRef]

123. Carpine, R.; Du, W.; Olivieri, G.; Pollio, A.; Hellingwerf, K.J.; Marzocchella, A.; Branco dos Santos, F. Genetic engineering of *Synechocystis* sp. PCC6803 for poly-β-hydroxybutyrate overproduction. *Algal Res.* **2017**, *27*, 117–127. [CrossRef]
124. Courtene-Jones, W.; Quinn, B.; Ewins, C.; Gary, S.F.; Narayanaswamy, B.E. Microplastic accumulation in deep-sea sediments from the Rockall Trough. *Mar. Pollut. Bull.* **2020**, *154*. [CrossRef] [PubMed]
125. Li, P.; Wang, X.; Su, M.; Zou, X.; Duan, L.; Zhang, H. Characteristics of Plastic Pollution in the Environment: A Review. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2020**. [CrossRef] [PubMed]

© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Annexe 2 Rôles des caroténoïdes chez les cyanobactéries et phénotype des mutants de délétion

Tableau 39 Rôles des caroténoïdes chez les cyanobactéries

Caroténoïdes	Rôle (détaillé ensuite)
Cis-Phytoene	
Phytofluene	
Trans-ζ-Carotene	• Rôle dans la viscosité de la membrane
Trans-Neurosporene	
Trans-Lycopene	-
γ-Carotene	• Rôle dans la viscosité de la membrane
Chlorobactene	
Myxol-2'(2,4 di O methyl α L fucoside)	• Stabilise la membrane thylakoidienne • Composant de la partie externe de la bicouche lipidique et du S-layer
Myxol-2'α L fucoside)	• Stabilise la membrane thylakoidienne • Composant de la partie externe de la bicouche lipidique et du S-layer
β-Carotene	• Assemblage du PSII • Rôle dans la fluidité de la membrane
Echinenone	• Stabilisation du PSII • Dissipation de l'énergie des chlorophylles des centres réactionnelles • Détoxification des ROS • Rôle dans la synthèse de la protéine D1 qui permet la réparation du PSI • Rôle dans la fluidité de la membrane
Canthaxanthin	• Stabilisation du PSII • Caroténoïde qui protège le plus la cellule du stress oxydant, de la forte lumière et des radiations UV • Détoxification des ROS • Rôle dans la fluidité de la membrane
3'-hydroxy-echinenone	• Stabilisation du PSII • Dissipation de l'énergie des chlorophylles des centres réactionnelles

	• Détoxification des radicaux peroxydés et des ROS • Rôle dans la fluidité de la membrane
β-crytoxanthin	• Stabilisation du PSII • Détoxification des radicaux peroxydés • Rôle dans la fluidité de la membrane
Zeaxanthin (cis et trans)	• Stabilisation du PSII • Dissipation de l'énergie des chlorophylles des centres réactionnelles • Détoxification des radicaux peroxydés et des ROS • Protection de la membrane contre les ROS • Rôle dans la synthèse de la protéine D1 qui permet la réparation du PSI • Rôle dans la fluidité de la membrane
Synechoxanthin	• Protection contre stress extracellulaire quand la souche est en phase stationaire
Isorenieratene	

Tableau 40 Les mutants de *Synechocystis* PCC 6803 déficients en certains caroténoïdes et leurs phénotypes.

Souche	Gène délété	Déficience en quels caroténoïdes ?	Phénotype	Référence
S6803	ΔcrtR (sll1468),	Zeaxanthine, cryptoxanthine, 3′-hydroxyechinénone, myxoxanthophylles,	**Production de β-carotènes plus importante que la souche sauvage** Peu de dommage à intensité lumineuse normal mais mutant un peu sensible au stress oxidatif (plus de ROS) Activité du PSII sensible à la forte lumière Incapable de réparer les dommages causés au PSII	(Schafer *et al.,* 2005; Kusama *et al.,* 2015)
S6803	ΔcrtO	Echinenon, 3′-hydroxyéchinenone	**Production de β-carotènes plus importante que la souche sauvage** Peu de dommage à intensité lumineuse normal mais mutant un peu sensible au stress oxidatif (plus de ROS) Activité du PSII sensible à la forte lumière Incapable de réparer les dommages causés au PSII	(Schafer *et al.,* 2005) (Fernandez-Gonzalez, 1997; Kusama *et al.,* 2015)
S6803	ΔcrtRO (slr0088 et (sll1468),	Zeaxanthine, cryptoxanthine, 3′-hydroxyechinénone, myxoxanthophylles,	**Production de β-carotènes et deoxymyxoxanthophylles plus importante que la souche sauvage** Très sensible à la lumière forte Incapable de réparer les dommages causés au PSII Réduction de la synthèse des protéines de la membrane thylakoidienne à haute intensité lumineuse Mutant plus sensible au stress oxidatif → plud de ROS ($^1O_2$)	(Schafer *et al.,* 2005; Toth *et al.,* 2015; Kusama *et al.,* 2015; Kłodawska *et al.,* 2012)
S6803	ΔcrtH	Pas de synthèse de trans-carotène donc incapable de produire des β-carotènes et des xantophylles. Cependant à la lumière il y a photoisomerization	Pousse en photoautotrophie à 35 µmol photons m^{-2} s^{-1} : Croissance identique au WT Même composition en caroténoïdes que WT quand culture en lumière continue Quantité de chlorophylle un peu inférieur au WT Activité du PSII identique au WT	(Breintenbach *et al.,* 1998; Masamoto *et al.,* 2001; Sozer *et al.,* 2010; Kłodawska *et al.,* 2012)

S6803	Double mutant ΔcrtH/B	Tous les caroténoïdes	Très sensible à la lumière → ne poussent que dans le noir en hétérotrophie sans O_2 PSI et cytochrome b_6f assemblé Pas de PSII actif, pas de production d'O_2 Baisse de la production des protéines membranaires Baisse de la quantité de chlorophylle mais pas de celle de phycobiliprotéine	(Sozer *et al.*, 2010)
S6803	ΔcrtB	Tous les caroténoïdes	Très sensible à la lumière → ne poussent que dans le noir en hétérotrophie sans O_2 PSI est en forme monomérique et que peu de traduction des protéines du PSII (peu de CP47, pas du tout de CP43) Unités de phycocyanine du PSII, non connectées au phycobillisomes	(Toth *et al.*, 2015)
S6803	ΔcrtQ	Tous les caroténoïdes sauf phytoène et ζ-Carotène	Ne pousse que en hétérotrophie, altered cell wall structure and thylakoid membrane organization and increased cyanophycin accumulation	(Toth *et al.*, 2015)

Annexe 3 : Différence de biais de codon entre les cyanobactéries utilisées dans cette étude et impact sur l'expression des gènes codant pour les terpènes synthases

Synechocystis sp. PCC 6803 **[gbbct]: 3623 CDS's (1161949 codons)**

fields: [triplet] [amino acid] [fraction] [frequency: **per thousand**] ([number])

```
UUU F 0.74 29.4 ( 34201)  UCU S 0.15  9.0 ( 10445)  UAU Y 0.59 17.4 ( 20257)  UGU C 0.62  6.3 (  7322)
UUC F 0.26 10.5 ( 12206)  UCC S 0.27 15.8 ( 18364)  UAC Y 0.41 11.9 ( 13849)  UGC C 0.38  3.9 (  4482)
UUA L 0.23 26.4 ( 30619)  UCA S 0.07  4.3 (  5029)  UAA * 0.44  1.4 (  1607)  UGA * 0.21  0.6 (   747)
UUG L 0.26 28.9 ( 33614)  UCG S 0.07  4.1 (  4723)  UAG * 0.35  1.1 (  1269)  UGG W 1.00 15.5 ( 17981)

CUU L 0.09 10.2 ( 11827)  CCU P 0.20 10.0 ( 11628)  CAU H 0.62 11.7 ( 13564)  CGU R 0.20 10.3 ( 12025)
CUC L 0.12 13.9 ( 16178)  CCC P 0.48 24.5 ( 28447)  CAC H 0.38  7.2 (  8310)  CGC R 0.24 12.2 ( 14172)
CUA L 0.12 14.0 ( 16296)  CCA P 0.16  8.1 (  9434)  CAA Q 0.62 34.0 ( 39494)  CGA R 0.11  5.4 (  6267)
CUG L 0.18 20.0 ( 23264)  CCG P 0.16  8.3 (  9614)  CAG Q 0.38 21.2 ( 24630)  CGG R 0.26 13.4 ( 15524)

AUU I 0.64 40.0 ( 46527)  ACU T 0.25 13.9 ( 16157)  AAU N 0.63 25.7 ( 29897)  AGU S 0.26 15.1 ( 17502)
AUC I 0.28 17.8 ( 20730)  ACC T 0.48 26.0 ( 30223)  AAC N 0.37 15.0 ( 17423)  AGC S 0.18 10.3 ( 11939)
AUA I 0.08  4.9 (  5744)  ACA T 0.13  7.0 (  8150)  AAA K 0.70 30.1 ( 34968)  AGA R 0.09  4.6 (  5315)
AUG M 1.00 19.3 ( 22456)  ACG T 0.14  7.8 (  9038)  AAG K 0.30 12.8 ( 14924)  AGG R 0.10  4.8 (  5602)

GUU V 0.25 16.8 ( 19493)  GCU A 0.24 20.0 ( 23248)  GAU D 0.65 32.5 ( 37772)  GGU G 0.27 19.8 ( 23048)
GUC V 0.17 11.2 ( 12973)  GCC A 0.45 37.5 ( 43610)  GAC D 0.35 17.8 ( 20706)  GGC G 0.31 22.3 ( 25904)
GUA V 0.16 10.5 ( 12223)  GCA A 0.13 10.9 ( 12646)  GAA E 0.74 44.7 ( 51919)  GGA G 0.18 12.9 ( 15026)
GUG V 0.42 28.0 ( 32580)  GCG A 0.18 15.2 ( 17647)  GAG E 0.26 16.1 ( 18664)  GGG G 0.24 17.6 ( 20506)
```

Coding GC 48.25% 1st letter GC 55.82% 2nd letter GC 39.74% 3rd letter GC 49.19%
Genetic code 1: Standard

Figure 119 Biais de codon de *Synechocysits* PCC 6803

Synechococcus elongatus PCC 7942 **[gbbct]: 3000 CDS's (911886 codons)**

fields: [triplet] [frequency: **per thousand**] ([number])

```
UUU 19.2( 17496)  UCU  6.6(  5975)  UAU 10.7(  9763)  UGU  4.5(  4100)
UUC 15.5( 14123)  UCC  7.6(  6962)  UAC 13.7( 12526)  UGC  6.3(  5731)
UUA  8.7(  7908)  UCA  5.6(  5131)  UAA  1.1(   985)  UGA  0.9(   830)
UUG 25.2( 22961)  UCG 11.7( 10713)  UAG  1.3(  1185)  UGG 17.5( 15955)

CUU  9.3(  8463)  CCU 10.3(  9368)  CAU  8.3(  7535)  CGU 10.3(  9425)
CUC 26.7( 24371)  CCC 18.3( 16731)  CAC  8.9(  8111)  CGC 30.5( 27818)
CUA 11.2( 10224)  CCA  9.5(  8620)  CAA 30.1( 27443)  CGA 10.2(  9266)
CUG 41.6( 37974)  CCG 16.5( 15063)  CAG 30.8( 28115)  CGG 14.1( 12824)

AUU 26.1( 23843)  ACU 10.1(  9244)  AAU 13.4( 12255)  AGU 11.7( 10706)
AUC 27.3( 24888)  ACC 20.1( 18339)  AAC 14.1( 12824)  AGC 16.8( 15338)
AUA  1.0(   879)  ACA  7.2(  6544)  AAA 13.8( 12542)  AGA  1.6(  1419)
AUG 15.2( 13852)  ACG 14.6( 13280)  AAG 12.4( 11274)  AGG  1.0(   880)

GUU 15.9( 14510)  GCU 25.5( 23271)  GAU 33.4( 30419)  GGU 18.4( 16771)
GUC 22.8( 20784)  GCC 33.4( 30421)  GAC 17.8( 16266)  GGC 31.7( 28871)
GUA  4.6(  4198)  GCA 18.8( 17145)  GAA 32.4( 29535)  GGA  8.8(  8018)
GUG 23.2( 21116)  GCG 27.4( 24963)  GAG 24.3( 22192)  GGG 12.7( 11604)
```

Coding GC 55.96% 1st letter GC 63.76% 2nd letter GC 44.01% 3rd letter GC 60.10%

Figure 120 Biais de codon de *Synechococcus* PCC 7942

***Synechococcus sp. PCC 7002* [gbbct]: 149 CDS's (44579 codons)**

fields: [triplet] [amino acid] [fraction] [frequency: **per thousand**] ([number])

```
UUU F 0.67 30.2 (  1347)  UCU S 0.18 10.1 (   450)  UAU Y 0.56 17.6 (   783)  UGU C 0.60  7.2 (   320)
UUC F 0.33 15.0 (   667)  UCC S 0.20 11.2 (   501)  UAC Y 0.44 13.8 (   617)  UGC C 0.40  4.7 (   209)
UUA L 0.16 17.5 (   778)  UCA S 0.07  4.0 (   180)  UAA * 0.56  1.9 (    84)  UGA * 0.15  0.5 (    23)
UUG L 0.19 21.2 (   944)  UCG S 0.13  7.0 (   314)  UAG * 0.28  0.9 (    42)  UGG W 1.00 14.6 (   652)

CUU L 0.10 11.5 (   514)  CCU P 0.16  7.7 (   345)  CAU H 0.47  9.4 (   419)  CGU R 0.21 10.4 (   462)
CUC L 0.27 30.2 (  1347)  CCC P 0.47 23.3 (  1038)  CAC H 0.53 10.6 (   473)  CGC R 0.35 17.4 (   777)
CUA L 0.09  9.6 (   427)  CCA P 0.15  7.3 (   325)  CAA Q 0.59 29.5 (  1317)  CGA R 0.10  4.8 (   214)
CUG L 0.19 21.6 (   965)  CCG P 0.22 11.0 (   491)  CAG Q 0.41 20.5 (   912)  CGG R 0.28 13.8 (   617)

AUU I 0.56 35.9 (  1601)  ACU T 0.15  8.5 (   381)  AAU N 0.61 21.1 (   941)  AGU S 0.21 11.8 (   527)
AUC I 0.42 26.9 (  1198)  ACC T 0.48 27.7 (  1236)  AAC N 0.39 13.6 (   606)  AGC S 0.20 11.1 (   495)
AUA I 0.02  1.2 (    53)  ACA T 0.15  8.5 (   377)  AAA K 0.66 27.4 (  1221)  AGA R 0.05  2.3 (   104)
AUG M 1.00 22.9 (  1021)  ACG T 0.22 12.4 (   555)  AAG K 0.34 14.0 (   622)  AGG R 0.03  1.4 (    61)

GUU V 0.24 16.5 (   737)  GCU A 0.18 15.9 (   711)  GAU D 0.69 31.9 (  1424)  GGU G 0.30 22.0 (   979)
GUC V 0.27 18.9 (   842)  GCC A 0.42 37.3 (  1663)  GAC D 0.31 14.3 (   636)  GGC G 0.34 25.1 (  1120)
GUA V 0.11  7.9 (   350)  GCA A 0.14 12.7 (   567)  GAA E 0.76 44.1 (  1965)  GGA G 0.11  8.4 (   376)
GUG V 0.37 25.9 (  1156)  GCG A 0.26 23.5 (  1047)  GAG E 0.24 13.8 (   615)  GGG G 0.25 18.8 (   838)
```

Coding GC 50.77% 1st letter GC 57.58% 2nd letter GC 40.28% 3rd letter GC 54.46%
Genetic code 1: Standard

Figure 121 Biais de codon de *Synechococcus* PCC 7002

Les codons rares chez *Synechocystis* PCC 6803 le sont aussi pour les deux autres cyanobactéries modèles utilisées dans cette étude. AUA est un codon très rare dans le génome de *Synechococcus* PCC 7002 (fréquence 0,02). Cependant le nombre AUA présent dans le gène codant pour la bisabolène et farnésène synthase est peu élevé (5 et 3 pour la BS et FS respectivement), cela ne devrait donc pas être limitant pour la transcription de ces gènes (Figure 122 et 123). AGA et AGG sont également des codons très rare chez S7002 (frequence 0,05 et 0,03). Cependant, le nombre de ces codons dans le gène coadant pour la bisabolène et farnésène synthase est peu élevé (5 et 4 dans la BS et 4 et 3 dans la FS, Figure 122 et 123)

Codon + rare chez S7002	Frequence chez S7002	Frequence chez S6803	Frequence dans la BS opt S6803	Nombre dans la sequence BS
L : CUA	0.09	0.12	0.13	13
I : AUA	0.02	0.08	0.11	5
T : ACU	0.15	0.25	0.22	8
R: AGA	0.05	0.09	0.12	5
R : AGG	0.03	0.1	0.09	4
G : GGA	0.11	0.18	0.18	7

Figure 122 Comparaison des biais de codon rares chez *Synechocystis* PCC 6803 et *Synechococcus* PCC 7002 et impact sur l'expression du gène codant pour la bisabolène synthase

Codon + rare chez S7002	Frequence chez S7002	Frequence chez S6803	Frequence dans la FS opt S6803	Nombre dans la sequence FS
L : CUA	0.09	0.12	0.15	9
I : AUA	0.02	0.08	0.08	3
T : ACU	0.15	0.25	0.25	6
R: AGA	0.05	0.09	0.12	4
R : AGG	0.03	0.1	0.09	3
G : GGA	0.11	0.18	0.17	5

Figure 123 Comparaison des biais de codon rares chez *Synechocystis* PCC 6803 et *Synechococcus* PCC 7002 et impact sur l'expression du gène codant pour la farnésène synthase

CCA(P) 0.93%	CGA(R) 0.80%	CAA(Q) 2.70%	CTA(L) 0.90%
CCG(P) 1.01%	CGG(R) 1.69%	CAG(Q) 3.45%	CTG(L) 4.58%
CCT(P) 1.12%	CGT(R) 0.98%	CAT(H) 1.17%	CTT(L) 1.00%
CCC(P) 2.35%	CGC(R) 1.66%	CAC(H) 0.91%	CTC(L) 1.76%
GCA(A) 1.50%	GGA(G) 1.55%	GAA(E) 3.84%	GTA(V) 0.75%
GCG(A) 1.54%	GGG(G) 1.72%	GAG(E) 2.05%	GTG(V) 2.51%
GCT(A) 2.24%	GGT(G) 1.68%	GAT(D) 3.35%	GTT(V) 1.77%
GCC(A) 3.56%	GGC(G) 1.87%	GAC(D) 1.33%	GTC(V) 1.58%
ACA(T) 0.82%	AGA(R) 0.42%	AAA(K) 2.22%	ATA(I) 0.28%
ACG(T) 1.12%	AGG(R) 0.30%	AAG(K) 1.32%	ATG(M) 1.80%
ACT(T) 1.05%	AGT(S) 1.35%	AAT(N) 1.99%	ATT(I) 3.30%
ACC(T) 2.51%	AGC(S) 1.21%	AAC(N) 1.38%	ATC(I) 2.16%
TCA(S) 0.60%	TGA(*) 0.10%	TAA(*) 0.14%	TTA(L) 1.90%
TCG(S) 0.55%	TGG(W) 1.59%	TAG(*) 0.09%	TTG(L) 1.88%
TCT(S) 1.04%	TGT(C) 0.64%	TAT(Y) 1.71%	TTT(F) 2.66%
TCC(S) 1.29%	TGC(C) 0.44%	TAC(Y) 1.21%	TTC(F) 1.08%

Figure 124 Biais de codon de *Cyantohece* PCC 7425

UUU	=	UCU	=	UAU	=	UGU	=
UUC	=	UCC	-	UAC	=	UGC	=
UUA	=	UCA	=	UAA	=	UGA	++
UUG	--	UCG	=	UAG	=	UGG	=
CUU	=	CCU	=	CAU	=	CGU	=
CUC	=	CCC	=	CAC	=	CGC	+
CUA	-	CCA	=	CAA	--	CGA	+
CUG	+++	CCG	=	CAG	++	CGG	+
AUU	-	ACU	=	AAU	=	AGU	=
AUC	+	ACC	=	AAC	=	AGC	=
AUA	- Codon rare	ACA	=	AAA	=	AGA	=
AUG	=	ACG	+	AAG	=	AGG	-
GUU	=	GCU	=	GAU	=	GGU	=
GUC	+	GCC	-	GAC	--	GGC	=
GUA	-	GCA	=	GAA	=	GGA	++
GUG	=	GCG	=	GAG	=	GGG	=

Figure 125 Comparaison du biais de codon de *Cyanothece* PCC 7425 et de celui de *Synechocystis* PCC 6803. Quand la fréquence d'un codon est similaire dans les deux génome un « = » est inscrit dans le tableau. Au contraire, quand la fréquence est inférieure ou supérieure dans le génome de *Cyanothece* PCC 7425 par rapport à celui de *Synechocystis* PCC 6803, un/des « - » ou un/des « + » sont incrits. Le nombre de « - » ou de « + » plus est corrélé avec la différence de fréquence : plus elle est élévée plus il y a de « - » ou de « + ».

Annexe 4 : Séquence nucléotidique de l'*E-α-bisabolène synthase* d'*Abies grandis* adaptée au biais de codon de *Synechocystis* PCC 6803 et séquence en acides aminées correspondante

ATGGCAGGGGTCAGTGCTGTTTCCAAAGTCAGTAGTCTGGTTTGTGACCTGTCCT
CTACGAGTGGTCTCATTCGACGCACAGCTAATCCTCATCCGAACGTTTGGGGGTA
TGACCTAGTTCACTCGTTAAAAAGCCCTTACATAGACAGTAGTTACCGAGAGCGA
GCGGAAGTCCTCGTTTCGGAAATCAAAGCTATGCTGAACCCCGCTATAACGGGCG
ATGGCGAGTCCATGATTACTCCATCAGCCTATGACACCGCCTGGGTTGCTCGGGT
TCCCGCTATTGATGGGTCAGCGCGGCCCCAATTTCCACAAACTGTCGACTGGATA
CTCAAAAATCAGTTAAAGGACGGAAGTTGGGGCATACAATCTCATTTTTTACTCA
GTGACCGACTCTTGGCTACACTCTCCTGCGTGCTCGTGCTTCTCAAGTGGAACGTC
GGCGATCTGCAAGTGGAACAAGGTATTGAGTTCATCAAGTCCAATTTGGAACTGG
TCAAAGATGAGACCGACCAAGATAGCCTCGTGACCGATTTTGAGATCATCTTCCC
CTCCCTACTACGTGAGGCACAGTCCCTAAGATTAGGTCTTCCGTACGACCTTCCCT
ACATCCACCTACTCCAAACTAAAAGGCAAGAACGCCTCGCAAAGTTGAGTCGGG
AGGAAATCTACGCCGTCCCAAGCCCATTACTCTACTCTTTGGAGGGCATCCAGGA
TATCGTCGAATGGGAGAGAATTATGGAGGTGCAATCCCAGGATGGCTCTTTTCTA
TCTTCTCCTGCGTCGACTGCATGCGTCTTTATGCACACCGGCGACGCGAAGTGCCT
TGAGTTCTTGAACTCTGTGATGATTAAGTTTGGTAATTTCGTACCCTGTTTGTACC
CAGTAGATTTACTAGAGCGTTTACTTATTGTCGATAATATCGTTAGGTTAGGTATC
TATAGGCACTTCGAGAAAGAAATCAAAGAAGCTCTGGACTATGTTTATAGGCATT
GGAACGAGCGGGGGATAGGCTGGGGGCGTCTCAACCCGATCGCGGACCTGGAAA
CTACAGCACTAGGTTTCCGCCTCCTTAGATTACATCGCTATAATGTGTCACCTGCA
ATCTTTGATAATTTCAAGGATGCTAATGGTAAGTTCATTTGTAGCACAGGACAGT
TCAATAAAGATGTAGCAAGTATGTTAAATTTATATAGAGCGAGCCAACTCGCGTT
TCCTGGCGAGAACATTTTAGACGAGGCTAAGTCCTTTGCTACGAAATACCTTAGA
GAAGCTCTCGAGAAAAGTGAGACCAGCTCCGCTTGGAATAATAAGCAGAACCTT
TCCCAAGAAATTAAGTACGCCCTTAAGACCAGCTGGCATGCCTCGGTGCCGCGGG
TAGAAGCCAAGCGCTATTGTCAAGTGTATCGTCCCGATTACGCGCGGATTGCTAA
GTGTGTTTACAAGTTACCCTATGTTAACAATGAAAAATTTTTGGAATTAGGGAAA
TTGGACTTTAACATTATTCAAAGTATTCATCAAGAGGAGATGAAAAATGTCACCA
GTTGGTTTCGGGACTCGGGACTACCCCTGTTTACCTTTGCGCGGGAGCGTCCCCTG
GAATTTTATTTTCTAGTTGCCGCGGGCACGTACGAACCACAGTACGCCAAATGTC
GTTTTCTGTTTACCAAAGTAGCCTGTCTGCAGACCGTGCTAGATGATATGTATGAC
ACCTACGGTACCTTAGATGAATTGAAATTATTTACTGAAGCCGTTCGCCGCTGGG
ACTTGTCCTTTACTGAAAATTTGCCTGACTACATGAAATTGTGTTACCAGATTTAT
TATGATATTGTACATGAAGTGGCCTGGGAAGCCGAAAAAGAACAAGGGCGCGAA
CTGGTGAGTTTTTTTCGGAAAGGTTGGGAAGACTATTTATTGGGCTATTATGAAG
AAGCCGAATGGTTGGCCGCCGAATACGTGCCGACCTTGGATGAATATATTAAAAA
TGGTATTACGTCCATTGGGCAACGCATTCTTTTGCTATCGGGTGTGCTGATTATGG

ATGGCCAATTGTTGTCCCAAGAAGCCCTCGAAAAAGTGGATTATCCAGGACGGCG
GGTGCTGACCGAACTGAATAGCCTGATTTCCCGTTTAGCCGATGATACTAAAACC
TATAAAGCCGAAAAGGCCCGCGGAGAACTGGCCTCTTCCATTGAATGCTACATGA
AAGATCATCCCGAATGTACCGAAGAAGAAGCCCTGGATCACATTTATTCTATTTT
GGAACCCGCCGTGAAAGAATTGACGCGTGAATTTTTAAAACCGGATGATGTGCCG
TTTGCCTGCAAAAAAATGTTGTTTGAGGAAACCCGTGTGACCATGGTGATTTTTA
AAGATGGAGATGGTTTTGGAGTGTCAAAATTAGAAGTGAAAGATCATATTAAAG
AATGCTTGATTGAACCGTTGCCACTATAA

MAGVSAVSKVSSLVCDLSSTSGLIRRTANPHPNVWGYDLVHSLKSPYIDSSYRERAE
VLVSEIKAMLNPAITGDGESMITPSAYDTAWVARVPAIDGSARPQFPQTVDWILKNQ
LKDGSWGIQSHFLLSDRLLATLSCVLVLLKWNVGDLQVEQGIEFIKSNLELVKDETD
QDSLVTDFEIIFPSLLREAQSLRLGLPYDLPYIHLLQTKRQERLAKLSREEIYAVPSPLL
YSLEGIQDIVEWERIMEVQSQDGSFLSSPASTACVFMHTGDAKCLEFLNSVMIKFGNF
VPCLYPVDLLERLLIVDNIVRLGIYRHFEKEIKEALDYVYRHWNERGIGWGRLNPIAD
LETTALGFRLLRLHRYNVSPAIFDNFKDANGKFICSTGQFNKDVASMLNLYRASQLA
FPGENILDEAKSFATKYLREALEKSETSSAWNNKQNLSQEIKYALKTSWHASVPRVE
AKRYCQVYRPDYARIAKCVYKLPYVNNEKFLELGKLDFNIIQSIHQEEMKNVTSWFR
DSGLPLFTFARERPLEFYFLVAAGTYEPQYAKCRFLFTKVACLQTVLDDMYDTYGTL
DELKLFTEAVRRWDLSFTENLPDYMKLCYQIYYDIVHEVAWEAEKEQGRELVSFFRK
GWEDYLLGYYEEAEWLAAEYVPTLDEYIKNGITSIGQRILLLSGVLIMDGQLLSQEAL
EKVDYPGRRVLTELNSLISRLADDTKTYKAEKARGELASSIECYMKDHPECTEEEAL
DHIYSILEPAVKELTREFLKPDDVPFACKKMLFEETRVTMVIFKDGDGFGVSKLEVKD
HIKECLIEPLPL*

Annexe 5 : Séquence nucléotidique de l'*α-farnésène synthase* de *Picea abies* adaptée au biais de codon de Synechocystis PCC 6803 et séquence en acides aminées correspondante

ATGGATTTGGCCGTTGAGATTGCCATGGACCTTGCAGTCGACGATGTTGAGAGAA
GAGTAGGTGACTATCACTCGAATCTTTGGGACGATGATTTCATCCAATCGCTTTCC
ACACCCTACGGCGCGTCGTCCTATCGGGAGCGAGCAGAGCGCTTGGTCGGTGAA
GTGAAGGAAATGTTTACCTCAATTAGTATTGAGGACGGGGAACTTACCTCAGACC
TGTTGCAGCGCTTGTGGATGGTAGACAATGTGGAGCGCTTAGGGATTTCCAGACA
CTTTGAGAATGAGATCAAAGCTGCGATTGATTATGTGTACAGCTACTGGAGTGAC
AAAGGCATAGTCCGCGGTCGAGACTCCGCAGTTCCTGACTTAAATTCCATCGCCC
TCGGTTTCCGTACATTACGTTTACACGGTTACACTGTGTCAAGCGACGTTTTTAAG
GTCTTTCAGGATCGAAAGGGAGAATTTGCATGTTCTGCTATTCCGACCGAGGGTG
ACATTAAAGGAGTGCTTAATTTGCTCCGCGCGAGTTACATCGCGTTTCCCGGTGA
AAAGGTAATGGAGAAAGCGCAAACCTTTGCTGCCACTTACTTGAAAGAGGCGTT
GCAAAAGATTCAAGTGTCTTCTCTCTCCAGAGAGATTGAGTACGTGCTCGAATAC
GGGTGGCTAACCAACTTTCCGAGGTTAGAAGCGAGGAATTACATTGACGTTTTTG
GGGAAGAAATCTGCCCTTATTTCAAGAAACCATGCATTATGGTGGATAAATTACT
AGAGCTGGCTAAGCTCGAATTTAACCTATTTCACTCTCTACAACAGACTGAACTA
AAACATGTATCCAGGTGGTGGAAGGATAGTGGATTTTCCCAGCTCACGTTTACGC
GGCATCGGCACGTGGAATTTTACACCTTGGCTAGCTGCATAGCCATTGAACCCAA
ACATTCCGCGTTCCGGCTCGGCTTTGCTAAAGTGTGTTATCTAGGGATAGTCCTAG
ATGATATTTATGATACATTCGGAAAGATGAAGGAACTAGAACTGTTTACTGCGGC
GATTAAGCGGTGGGATCCTTCTACTACGGAATGTTTACCCGAATACATGAAAGGT
GTTTACATGGCTTTTTATAATTGTGTGAATGAACTTGCCTTACAAGCTGAAAAAAC
CCAAGGCCGTGATATGTTGAACTATGCTCGCAAAGCCTGGGAAGCCCTGTTTGAT
GCCTTTCTGGAAGAAGCCAAGTGGATTTCCAGCGGTTATCTGCCAACCTTTGAAG
AATATCTCGAAAATGGCAAAGTGAGTTTCGGCTATCGTGCCGCCACCTTGCAGCC
AATCCTAACCTTAGATATCCCTCTGCCCCTGCATATTTTACAGCAGATTGATTTTC
CCTCCCGCTTTAATGATTTGGCCAGTAGTATCTTGCGTCTGCGCGGGGATATTTGT
GGCTATCAAGCCGAACGGAGCCGGGGCGAAGAAGCAAGTTCCATTTCCTGTTATA
TGAAAGATAACCCGGGAAGCACTGAAGAAGATGCCTTGTCTCATATCAATGCCAT
GATTAGCGATAATATTAATGAATTGAACTGGGAATTATTGAAACCCAACAGTAAC
GTGCCCATTAGTAGTAAAAAACATGCCTTTGATATTTTGCGTGCCTTTTATCATCT
GTATAAATATCGGGATGGCTTTAGTATTGCCAAAATTGAAACGAAAAACTTAGTA
ATGCGTACCGTACTGGAACCCGTTCCCATGTAA

MDLAVEIAMDLAVDDVERRVGDYHSNLWDDDFIQSLSTPYGASSYRERAERLVGEV
KEMFTSISIEDGELTSDLLQRLWMVDNVERLGISRHFENEIKAAIDYVYSYWSDKGIV
RGRDSAVPDLNSIALGFRTLRLHGYTVSSDVFKVFQDRKGEFACSAIPTEGDIKGVLN
LLRASYIAFPGEKVMEKAQTFAATYLKEALQKIQVSSLSREIEYVLEYGWLTNFPRLE
ARNYIDVFGEEICPYFKKPCIMVDKLLELAKLEFNLFHSLQQTELKHVSRWWKDSGF
SQLTFTRHRHVEFYTLASCIAIEPKHSAFRLGFAKVCYLGIVLDDIYDTFGKMKELELF
TAAIKRWDPSTTECLPEYMKGVYMAFYNCVNELALQAEKTQGRDMLNYARKAWE
ALFDAFLEEAKWISSGYLPTFEEYLENGKVSFGYRAATLQPILTLDIPLPLHILQQIDFP
SRFNDLASSILRLRGDICGYQAERSRGEEASSISCYMKDNPGSTEEDALSHINAMISDN
INELNWELLKPNSNVPISSKKHAFDILRAFYHLYKYRDGFSIAKIETKNLVMRTVLEPV
PM*

Annexe 6 Tableaux contenant les aires obtenues pour les diverses gammes étalons permettant la quantification des terpènes présents dans le dodécane.

Tableau 41 Réalisation de la gamme étalon pour la quantification du limonène. Les données utilisées pour tracer la courbe étalon sont colorées en vert.

Concentration en limonène (en mg/$L_{dodécane}$)	0,1	0,25	0,5	0,75	1	2,5	5	7,5	10	25	50	75	100
Concentration en limonène (en mg/$L_{culture}$)	0,02	0,05	0,1	0,15	0,2	0,5	1	1,5	2	5	10	15	20
Aire S-limonène	519	1322	2142	3612	4826	9281	12943	30328	43585	90489	216217	266942	419115
	567	1176	2486	3479	4472	11960	22828	28412	49068	124945	173189	354735	297089
	592	1144	2232	3736	4090	12514	22758	34639	39393	88345	213968	259314	335784
Aire α-pinène à 10mg/L	36668	36685	36469	36084	36191	27154	19379	32766	30867	25723	28454	24956	28869
	34471	35773	38129	36954	36972	35469	34204	28788	35473	35011	23670	32848	20797
	36976	36994	35830	36092	29555	37414	34237	34121	28192	25598	28543	24919	22240
Aire S-limonène / Aire α-pinène	0,014	0,036	0,058	0,100	0,133	0,341	0,667	0,925	1,412	3,517	7,598	10,696	14,517
	0,016	0,032	0,065	0,094	0,120	0,337	0,667	0,986	1,383	3,568	7,316	10,799	14,285
	0,016	0,030	0,062	0,103	0,138	0,334	0,664	1,015	1,397	3,451	7,496	10,406	15,098
Moyenne	**0,015**	**0,033**	**0,062**	**0,099**	**0,130**	**0,337**	**0,666**	**0,976**	**1,397**	**3,512**	**7,470**	**10,63**	**14,63**
Ecart-type	**0,001**	**0,003**	**0,003**	**0,005**	**0,008**	**0,004**	**0,001**	**0,045**	**0,014**	**0,058**	**0,142**	**0,203**	**0,418**

Tableau 42 Réalisation de la gamme étalon pour la quantification du pinène. Les données utilisées pour tracer la courbe étalon sont colorées en vert.

Concentration en α-pinène ($mg/L_{dodécane}$)	0,1	0,25	0,5	0,75	1	2,5	5
Concentration en α-pinène ($mg/L_{culture}$)	0,02	0,05	0,1	0,15	0,2	0,5	1
Aire α-pinene	244	414	974	573	1330	5860	244
	352	257	666	448	3955	3979	352
	176	399	371	696	1849	1637	176
Aire S-limonène	6091	4096	6257	2421	1811	6043	6091
	5811	2502	3921	1901	7131	3396	5811
	3191	4258	2658	3010	3415	1448	3191
Aire α-pinène / Aire S-limonène	0,040	0,101	0,156	0,237	0,734	0,970	0,040
	0,061	0,103	0,170	0,236	0,555	1,172	0,061
	0,055	0,094	0,140	0,231	0,541	1,131	0,055
Moyenne	**0,052**	**0,099**	**0,155**	**0,235**	**0,610**	**1,091**	**0,052**
Ecart-type	**0,011**	**0,005**	**0,015**	**0,003**	**0,108**	**0,107**	**0,011**

Tableau 43 Réalisation de la gamme étalon pour la quantification du bisabolène. Les données utilisées pour tracer la courbe étalon sont colorées en bleu.

Concentration de tous les isomères (mg/$L_{dodecane}$)	0,26	0,78	1,04	2,6	5,2	7,8	10,3	20,6	25,7	38,6	52	104
Concentration en (E)- α-bisabolène (mg/$L_{dodecane}$)	0,05	0,15	0,20	0,50	1,0	1,5	2,0	3,9	5,0	7,3	10	20
Concentration en (E)- α-bisabolène (mg/$L_{culture}$)	0,01	0,03	0,04	0,10	0,2	0,3	0,4	0,8	1,0	1,46	2	4
Aire (E)- α-bisabolène	0	885	1001	610	6287	4694	8006	6696	6662	21743	45141	21789
	0	400	0	1892	3660	1999	5990		10223		22529	53201
	0	0	238	968	3123	8127	7242		9115		53723	
Aire β-caryophyllène à 10 mg/L	28576	81767	68787	16284	67880	36932	41930	18528	15805	30621	44405	19598
	61661	33649	33070	37689	39086	16876	31490		22942		25387	68263
	26437	18426	21025	20492	34569	56319	30870		19968		50576	
Aire (E)- α-bisabolène / Aire β-caryophyllène	0	0,011	0,015	0,037	0,093	0,127	0,191	0,361	0,422	0,710	1,017	1,112
	0	0,012	0,000	0,050	0,094	0,118	0,190		0,446		0,887	0,779
	0	0,000	0,011	0,047	0,090	0,144	0,235		0,456		1,062	
Moyenne	0	0,011	0,013	0,045	0,092	0,130	0,205	0,361	0,441	0,710	0,989	
Ecart-type	0	0,001	0,002	0,007	0,002	0,013	0,025		0,018		0,091	

Tableau 44 Réalisation de la gamme étalon pour la quantification du farnésène. Les données utilisées pour tracer la courbe étalon sont colorées en bleu.

Concentration de tous les isomères ($mg/L_{dodecane}$)	1,3	2,6	5,2	7,7	10,3	20,6	25,7	38,6
Concentration en α-farnésène ($mg/L_{dodecane}$)	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.6	2	3
Concentration en α-farnésène ($mg/L_{culture}$)	0,02	0,04	0,08	0,12				
Aire α-farnésène	0	0	932	1549	2593	1969	1927	7014
	0	601	532	1719	1689		3057	
	0	273	846	2070	2332		2478	
Aire β-caryophyllène à 10 mg/L	68787	16284	33756	46515	41930	18528	15805	30621
	33070	37689	24305	45600	31490		22942	
	21025	20492	32153	46512	30870		19968	
Aire α-farnésène / Aire β-caryophyllène	0	0	0,027	0,033	0,062	0,106	0,121	0,229
	0	0,015	0,021	0,037	0,054		0,133	
	0	0,013	0,026	0,044	0,076		0,124	
Moyenne	**0**	**0,0146**	**0,0252**	**0,0385**	**0,0636**	**0,106**	**0,126**	**0,229**
Ecart-type	**0**	**0,0018**	**0,0030**	**0,0056**	**0,0110**		**0,0067**	

Annexe 7 : Chromotogrammes montrant la production de limonène, pinène, bisabolène et farnésène par *Synechocystis* PCC 6803

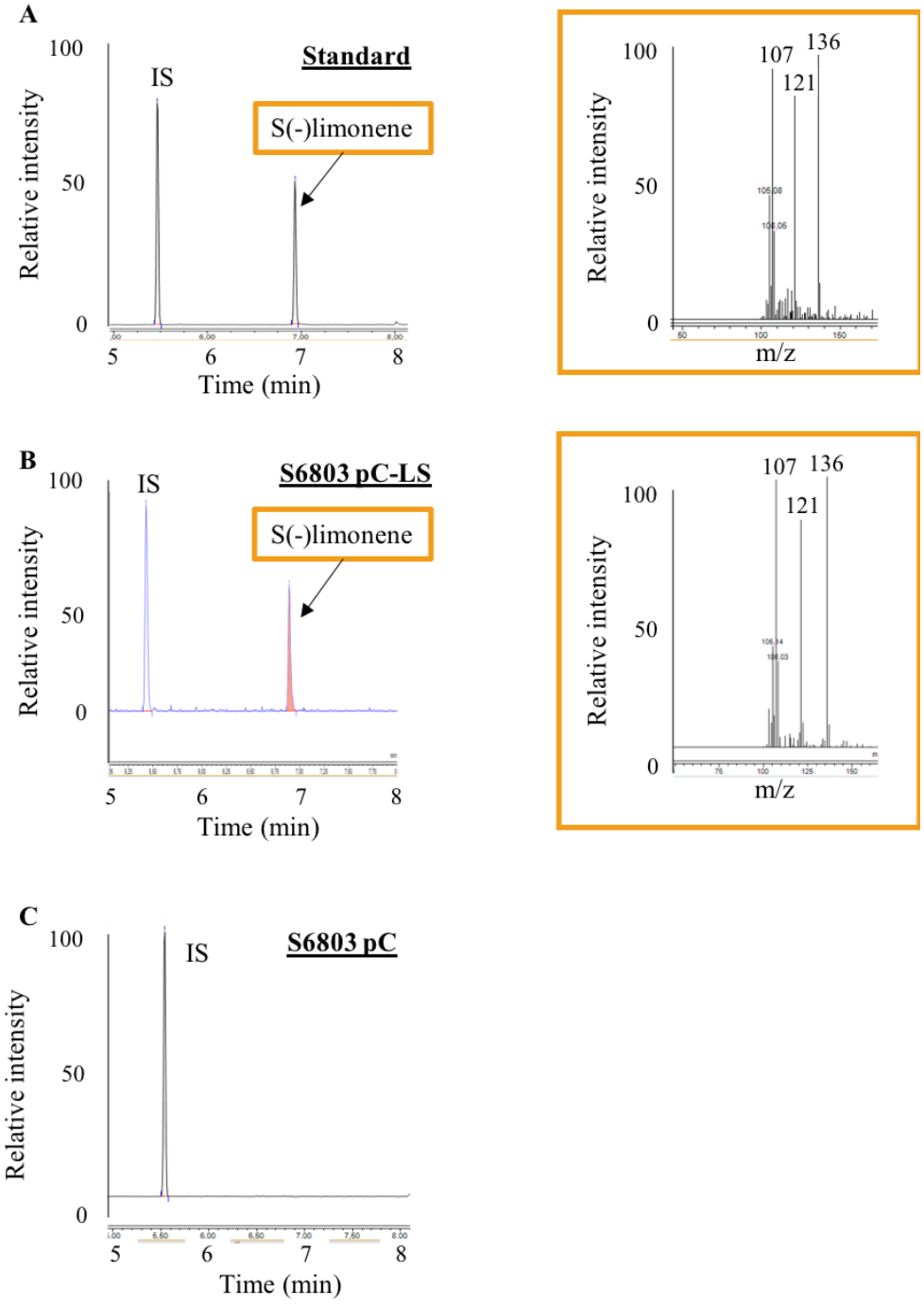


Figure 126 Chromatogrammes (panels de gauche) et spectres de masse correspondants (panels de droite) obtenus à partir de l'analyse GC-MS d'un standard authentic de S-(-)-limonène ou d'échantillons de dodécane de cultures de *Synechocystis* PCC 6803 possédant les plasmides pC (contrôle négatif) ou pC-LS (pour la production de S-(-)-limonène). L'α-pinène (temps de rétention = 5,44 min) a été utilisé comme standard interne (IS) pour la quantification.

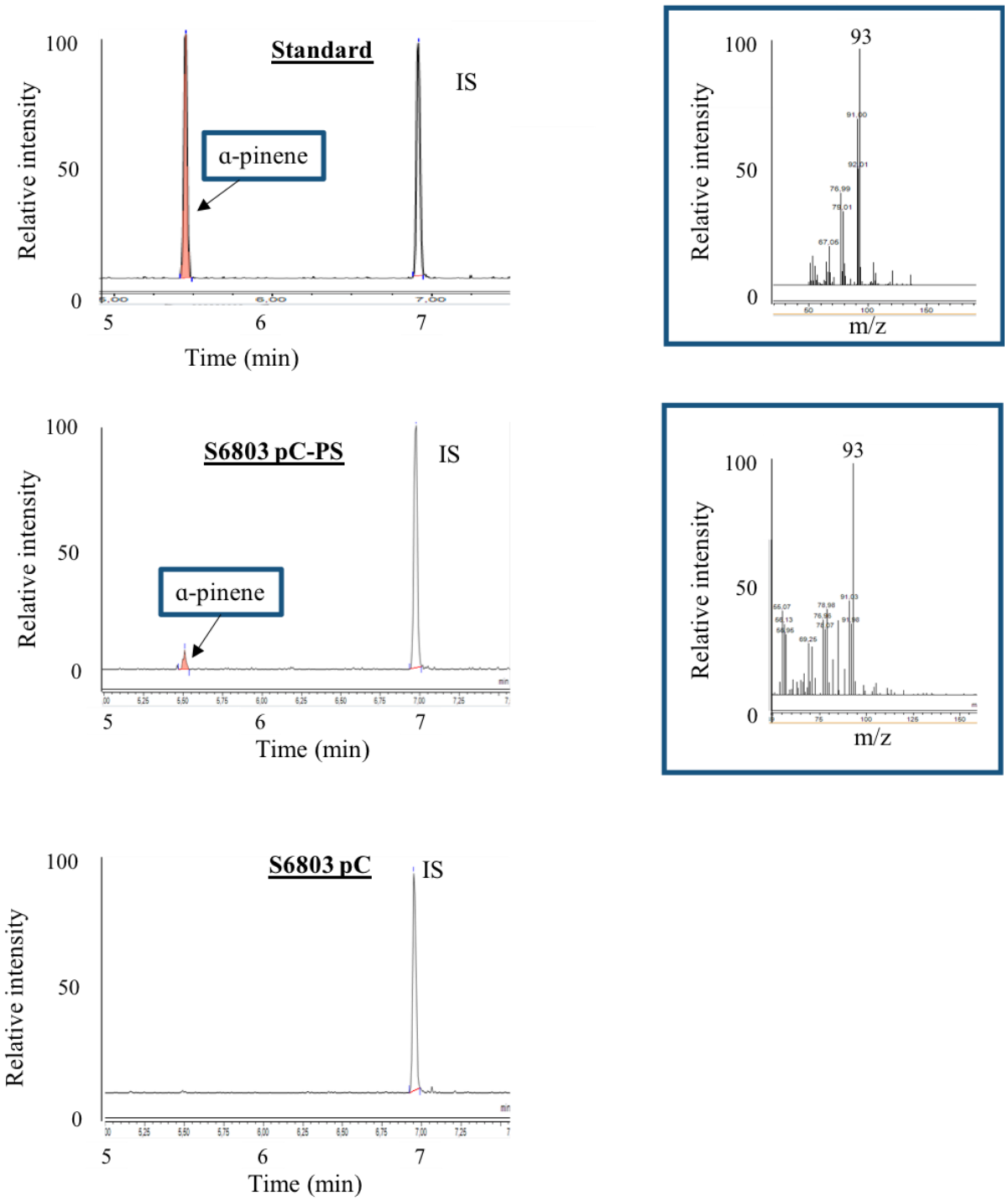


Figure 127 Chromatogrammes (panels de gauche) et spectres de masse correspondants (panels de droite) obtenus à partir de l'analyse GC-MS d'un standard authentic d'α-pinène ou d'échantillons de dodécane de cultures de *Synechocystis* PCC 6803 possédant les plasmides pC (contrôle négatif) ou pC-PS (pour la production d'α-pinène). Le S-(-)-limonène (temps de rétention = 6,98 min) a été utilisé comme standard interne (IS) pour la quantification.

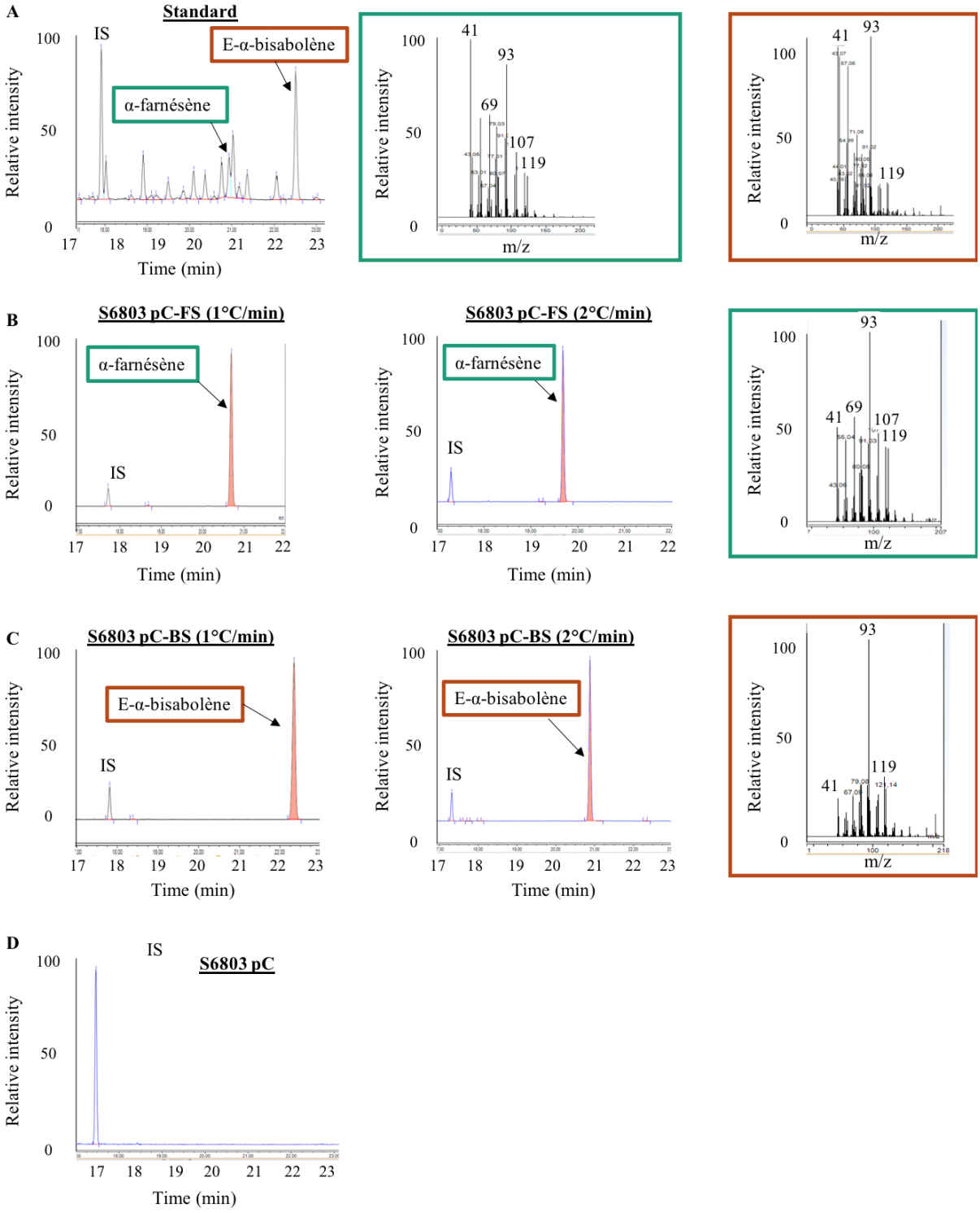


Figure 128 Chromatogrammes (panels de gauche et du milieu) et spectres de masse correspondants (panels du milieu et de droite) obtenus à partir de l'analyse GC-MS d'un mix d'isomères de farnésène (contenant du bisabolène) ou d'échantillons de dodécane de cultures de *Synechocystis* PCC 6803 possédant les plasmides pC (contrôle négatif) ou pC-BS (pour la production d'E-α-bisabolène) ou pC-FS (pour la production d'α-farnésène). Le β-caryophyllène (temps de rétention = 17,7 min avec le programme 1°C/min ou 17,3 min avec le programme 2°C/min) a été utilisé comme standard interne (IS) pour la quantification. Les deux programmes 1°C ou 2°C/min ont été définis dans la partie résultats Chapitre 1 II.2.

Annexe 8 : Chromotogrammes montrant la production de limonène, bisabolène et farnésène par *Synechococcus* PCC 7942

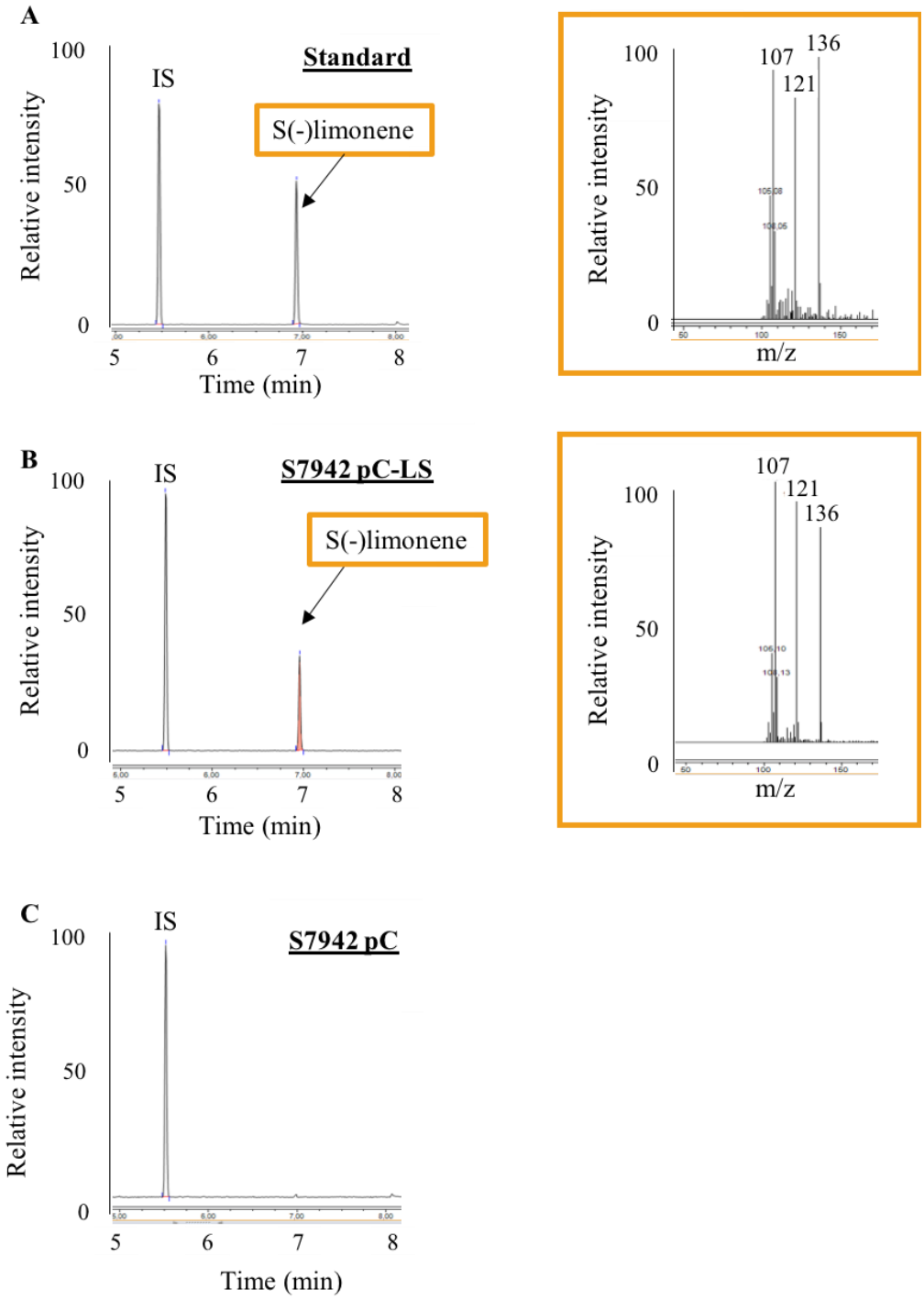


Figure 129 Chromatogrammes (panels de gauche) et spectres de masse correspondants (panels de droite) obtenus à partir de l'analyse GC-MS d'un standard authentic de S-(-)-limonène ou d'échantillons de dodécane de cultures de *Synechococcus* PCC 7942 possédant les plasmides pC (contrôle négatif) ou pC-LS (pour la production de limonène). L'α-pinène (temps de rétention = 5,44 min) a été utilisé comme standard interne (IS) pour la quantification.

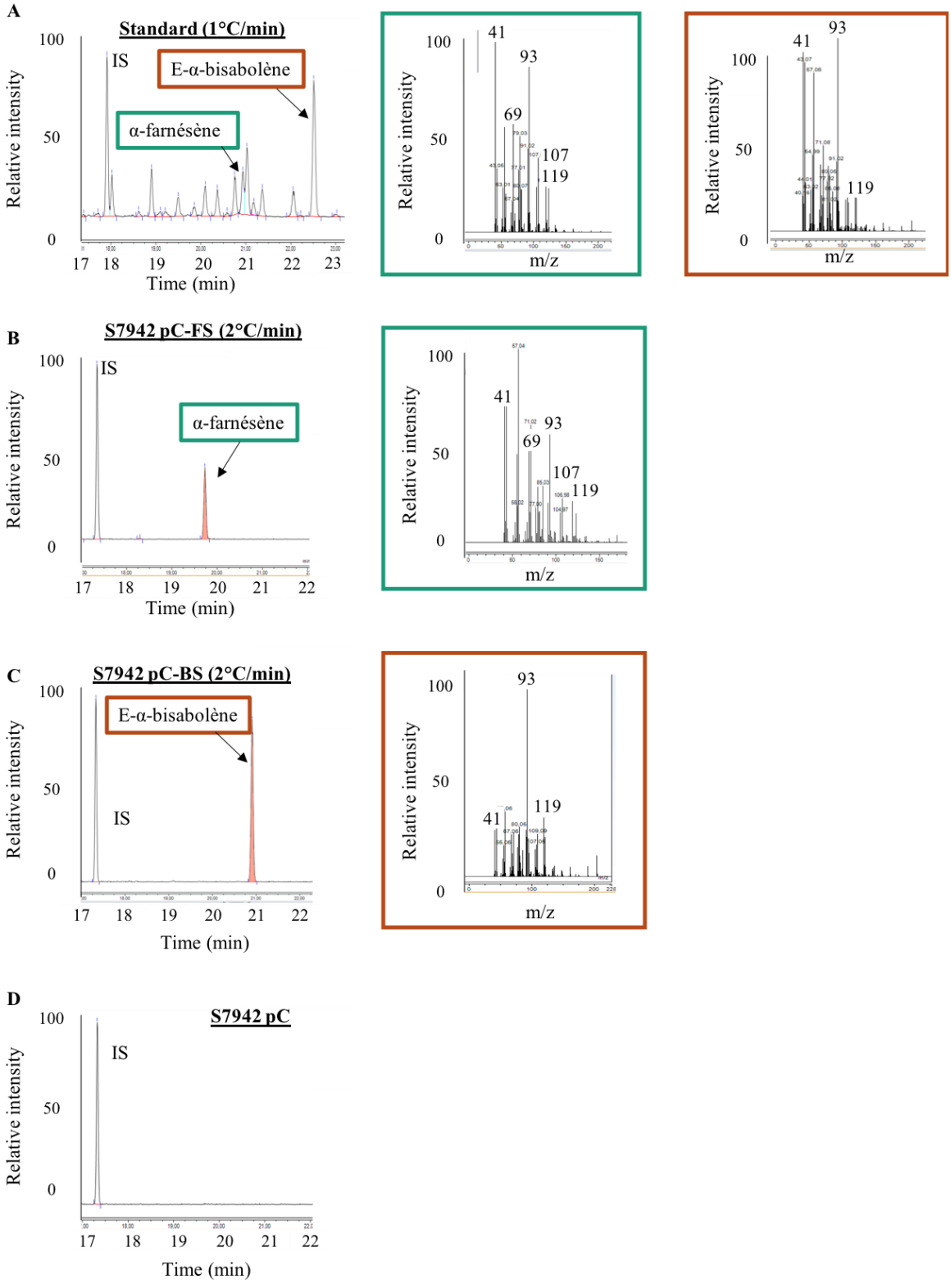


Figure 130 Chromatogrammes (panels de gauche et du milieu) et spectres de masse correspondants (panels du milieu et de droite) obtenus à partir de l'analyse GC-MS d'un mix d'isomères de farnésène (contenant du bisabolène) ou d'échantillons de dodécane de cultures de *Synechococcus* PCC 7942 possédant les plasmides pC (contrôle négatif) ou pC-BS (pour la production d'E-α-bisabolène) ou pC-FS (pour la production d'α-farnésène). Le β-caryophyllène (temps de rétention = 17,7 min avec le programme 1°C/min ou 17,3 min avec le programme 2°C/min) a été utilisé comme standard interne (IS) pour la quantification. Les deux programmes 1°C ou 2°C/min ont été définis dans la partie résultats Chapitre 1 II.2.

Annexe 9 : Chromotogrammes montrant la production de limonène, pinène, bisabolène et farnésène par *Synechococcus* PCC 7002

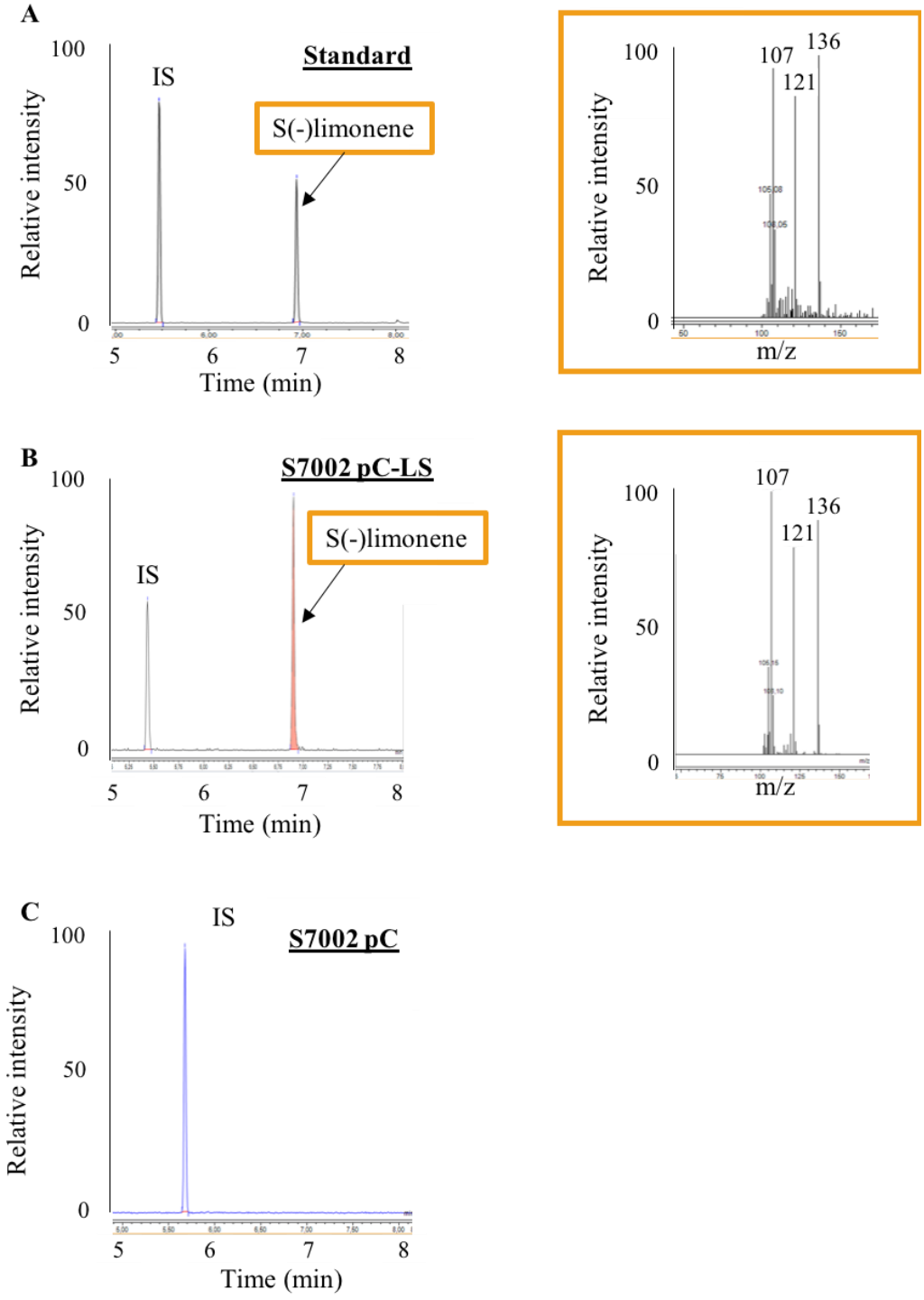


Figure 131 Chromatogrammes (panels de gauche) et spectres de masse correspondants (panels de droite) obtenus à partir de l'analyse GC-MS d'un standard authentic de S-(-)-limonène ou d'échantillons de dodécane de cultures de *Synechococcus* PCC 7002 possédant les plasmides pC (contrôle négatif) ou pC-LS (pour la production de limonène). L'α-pinène (temps de rétention = 5,44 min) a été utilisé comme standard interne (IS) pour la quantification.

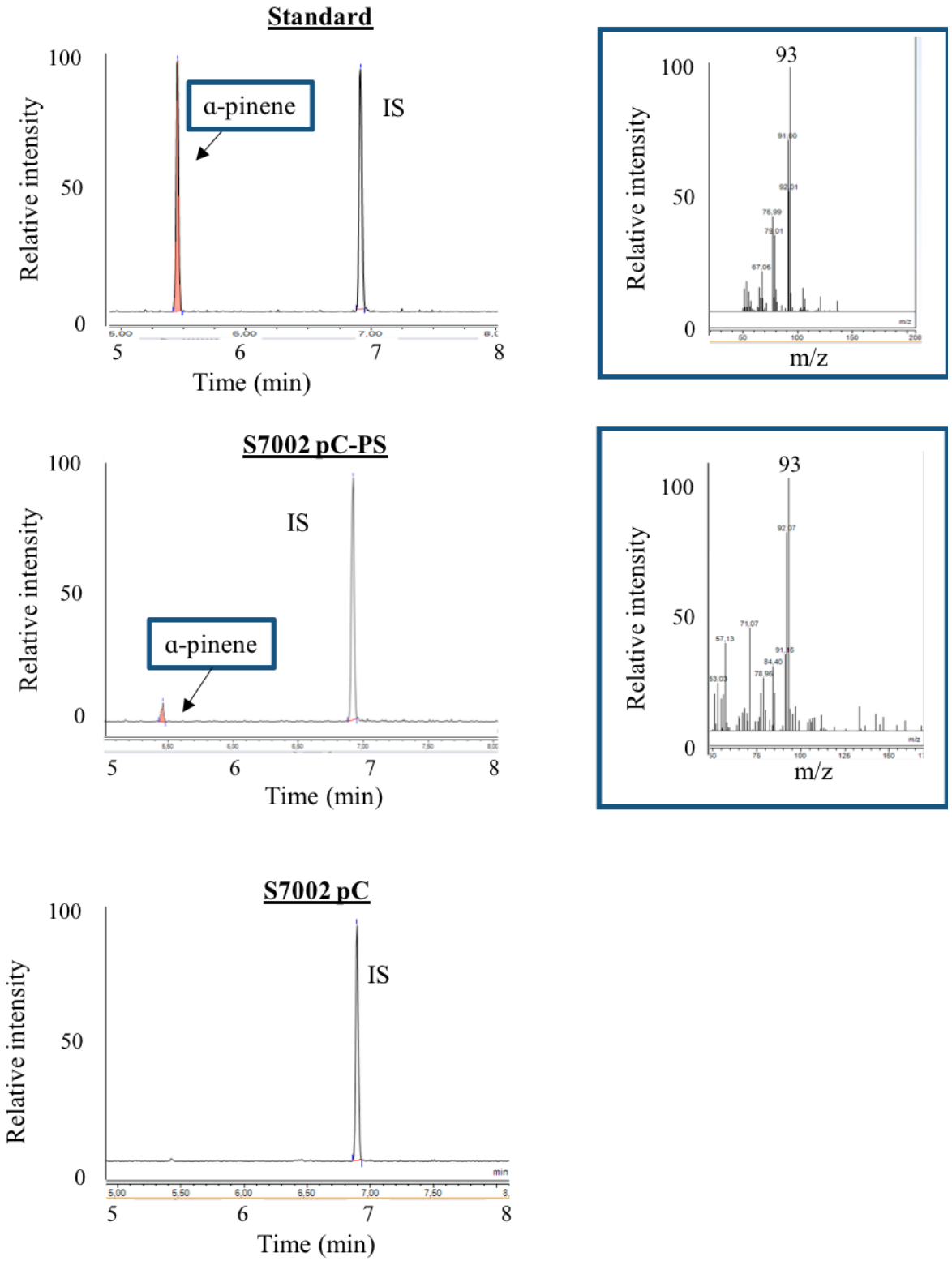


Figure 132 Chromatogrammes (panels de gauche) et spectres de masse correspondants (panels de droite) obtenus à partir de l'analyse GC-MS d'un standard authentic d'α-pinène ou d'échantillons de dodécane de cultures de *Synechococcus* PCC 7002 possédant les plasmides pC (contrôle négatif) ou pC-PS (pour la production d'α-pinène). Le S-(-)-limonène (temps de rétention = 6,98 min) a été utilisé comme standard interne (IS) pour la quantification.

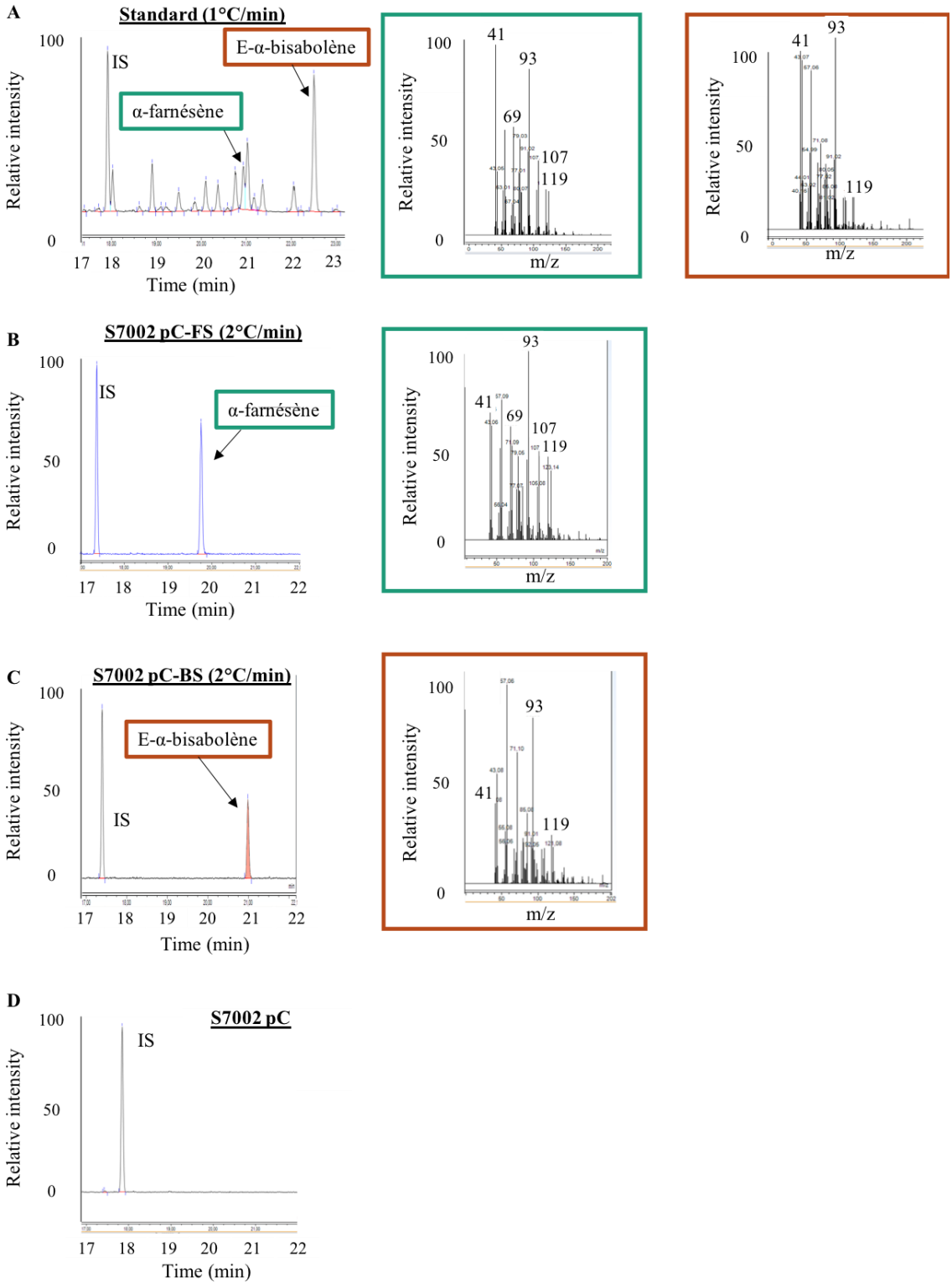


Figure 133 Chromatogrammes (panels de gauche et du milieu) et spectres de masse correspondants (panels du milieu et de droite) obtenus à partir de l'analyse GC-MS d'un mix d'isomères de farnésène (contenant du bisabolène) ou d'échantillons de dodécane de cultures de *Synechococcus* PCC 7002 possédant les plasmides pC (contrôle négatif) ou pC-BS (pour la production d'E-α-bisabolène) ou pC-FS (pour la production d'α-farnésène). Le β-caryophyllène (temps de rétention = 17,7 min avec le programme 1°C/min ou 17,3 min avec le programme 2°C/min) a été utilisé comme standard interne (IS) pour la quantification. Les deux programmes 1°C ou 2°C/min ont été définis dans la partie résultats Chapitre 1 II.2.

Annexe 10 : Chromotogrammes montrant la production de bisabolène et farnésène par *Cyanothece* PCC 7425

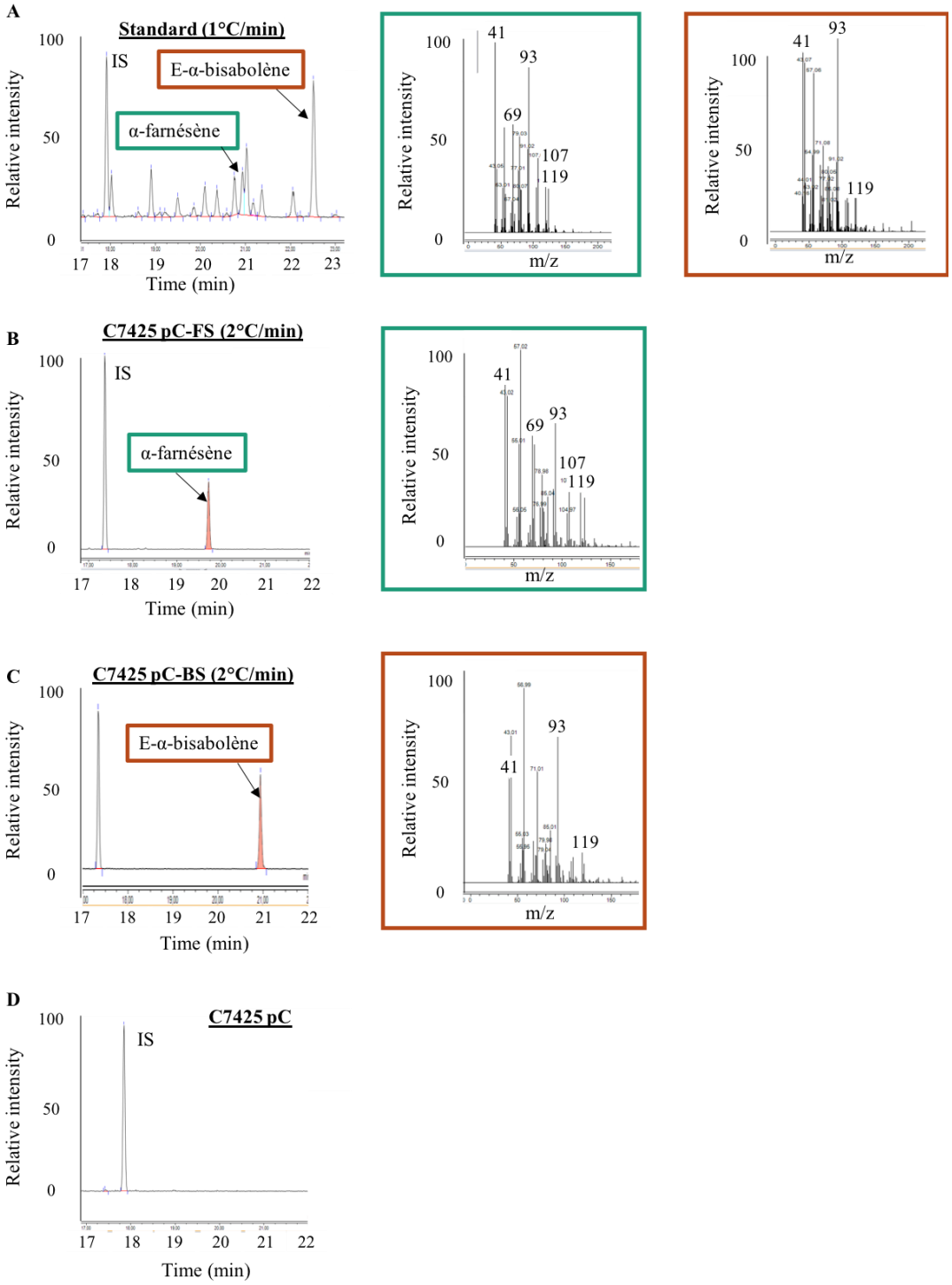


Figure 134 Chromatogrammes (panels de gauche et du milieu) et spectres de masse correspondants (panels du milieu et de droite) obtenus à partir de l'analyse GC-MS d'un mix d'isomères de farnésène (contenant du bisabolène) ou d'échantillons de dodécane de cultures de *Cyanothece* PCC 7425 possédant les plasmides pC (contrôle négatif) ou pC-BS (pour la production d'E-α-bisabolène) ou pC-FS (pour la production d'α-farnésène). Le β-caryophyllène (temps de rétention = 17,7 min avec le programme 1°C/min ou 17,3 min avec le programme 2°C/min) a été utilisé comme standard interne (IS) pour la quantification. Les deux programmes 1°C ou 2°C/min ont été définis dans la partie résultats Chapitre 1 II.2.

Annexe 11 : Chromotogrammes montrant la production de limonène par *Cyanothece* PCC 7822

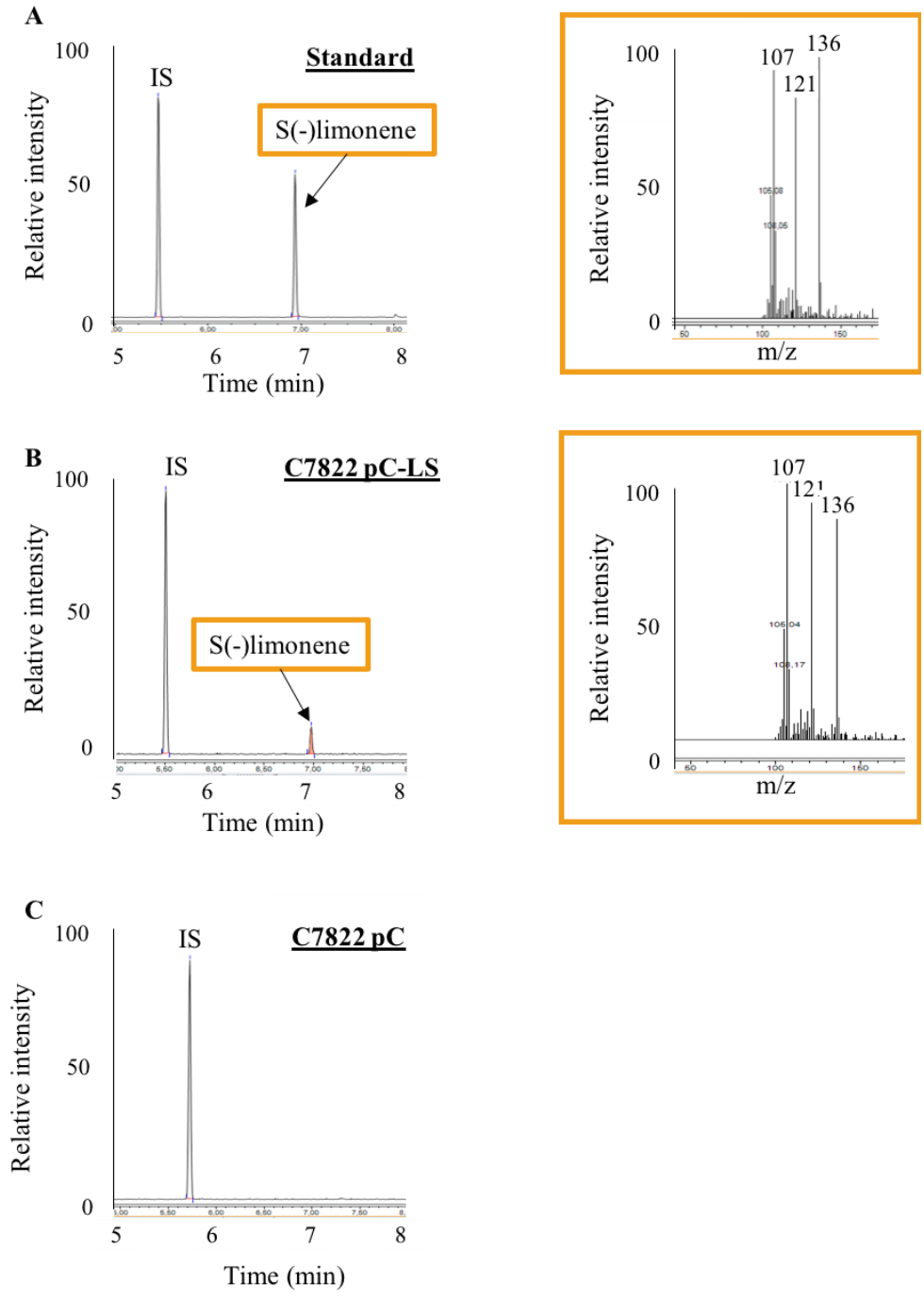


Figure 135 Chromatogrammes (panels de gauche) et spectres de masse correspondants (panels de droite) obtenus à partir de l'analyse GC-MS d'un standard authentic de S-(-)-limonène ou d'échantillons de dodécane de cultures de *Cyanothece* PCC 7822 possédant les plasmides pC (contrôle négatif) ou pC-LS (pour la production de limonène). L'α-pinène (temps de rétention = 5,44 min) a été utilisé comme standard interne (IS) pour la quantification.

université PARIS-SACLAY

ÉCOLE DOCTORALE
Structure et dynamique des systèmes vivants (SDSV)

Titre : Ingénierie de cyanobactéries pour la photoproduction de terpènes (biocarburants)

Mots clés : Cyanobactéries, Biologie de synthèse, Photoproduction, Biocarburants, Terpènes

Résumé : Grâce à leur photosynthèse oxygénique, les cyanobactéries peuvent produire des composés d'intérêt à partir de l'énergie solaire, du CO_2 atmosphérique et de l'eau (douce et marine) même polluée. Au laboratoire, on s'intéresse aux terpènes (molécules odorantes et volatiles) qui ont de nombreuses applications pour la cosmétique (parfums), la santé (antimicrobiens) et l'environnement (biocarburants). Peu d'études ont montré la production de terpènes par les cyanobactéries et les rendements obtenus sont faibles et difficilement comparables. L'objectif de mon travail de thèse était de combiner la diversité biologique de 5 cyanobactéries dotées d'atouts différents (*Synechocystis* PCC 6803, *Synechococcus* PCC 7942 et PCC 7002, *Cyanothece* PCC 7425 et PCC 7822), la diversité chimique de 5 terpènes (bisabolène, farnésène, limonène, pinène et santalène) et les outils génétiques polyvalents du laboratoire, pour générer de bons producteurs. Dans ce but j'ai développé la génétique de *Cyanothece* PCC 7425 (Chenebault *et al.,* 2020). J'ai contribué à montrer que certaines de nos cyanobactéries produisent mieux certains terpènes, validant notre démarche. Ainsi, *Synechocystis* PCC 6803 produit plus de bisabolène et de farnésène que les autres cyanobactéries et *Synechococcus* PCC 7002 est le meilleur châssis pour la production du limonène. En outre, j'ai montré que *Cyanothece* PCC 7425 peut produire des terpènes à partir d'eaux polluées par de l'urée ou du calcium. Enfin, la stabilité des rendements a été analysée sur plusieurs mois.

Title : Photoproduction of terpenes (biofuels) by engineered cyanobacteria

Keywords : Cyanobacteria, Synthetic biology, Photoproduction, Biofuels, Terpenes

Abstract : Thanks to their oxygenic photosynthesis, cyanobacteria can produce valued compounds from solar energy, atmospheric CO_2 and fresh or marine water (even polluted). In the laboratory, we focus on terpenes (odorous and volatile molecules) that have numerous applications in cosmetics (perfume), pharmaceutics (antimicrobial) and environment (biofuels). A few studies describe the production of terpenes by cyanobacteria and the yields are often weak and not comparable. My study aims to combine the biological diversity of 5 cyanobacteria endowed with attractive capabilities (*Synechocystis* PCC 6803, *Synechococcus* PCC 7942 et PCC 7002, *Cyanothece* PCC 7425 et PCC 7822), the chemical diversity of 5 terpenes (bisabolene, farnesene, limonene, pinene and santalene) and the laboratory ubiquitous genetic tools to generate good producers. To achieve that goal, I developed genetics tools for *Cyanothece* PCC 7425 (Chenebault *et al.,* 2020). I have also contributed to show that some of our cyanobacteria are higher terpene producers. Indeed, *Synechocystis* PCC 6803 produces more bisabolene and farnesene whereas *Synechococcus* PCC 7002 is a higher producer of limonene. Moreover, I showed that *Cyanothece* PCC 7425 can produce terpenes from water polluted with urea or calcium. Finally, the stability of the yields was assessed for several months.