



HAL
open science

Ingénierie du métabolisme de capture du CO₂ chez les cyanobactéries pour la photoproduction de molécules à haute valeur ajoutée (terpènes)

Victoire Blanc-Garin

► **To cite this version:**

Victoire Blanc-Garin. Ingénierie du métabolisme de capture du CO₂ chez les cyanobactéries pour la photoproduction de molécules à haute valeur ajoutée (terpènes). Biotechnologie. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UPASL061 . tel-04188755

HAL Id: tel-04188755

<https://theses.hal.science/tel-04188755>

Submitted on 27 Aug 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.

Ingénierie du métabolisme de capture du CO₂ chez les cyanobactéries pour la photoproduction de molécules à haute valeur ajoutée (terpènes)

*Engineering cyanobacteria's CO₂ capture metabolism for the
photoproduction of high value-added molecules (terpenes)*

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 Paris-Saclay,
le 24 septembre 2021, par

Victoire BLANC-GARIN

Composition du Jury

Emmanuelle ISSAKIDIS-BOURGUET

Directrice de recherche CNRS IPS2, Université Paris-Saclay Présidente du Jury

Christophe SIX

Maître de conférence (HDR) CNRS, Sorbonne Université, Station Biologique de Roscoff Rapporteur & Examinateur

Xenie JOHNSON

Directrice de recherche CEA BIAM, Université Aix-Marseille Rapporteuse & Examinatrice

Pierre CROZET

Maître de conférence, CNRS IBPC, Sorbonne Université Examinateur

Hélène LAUNAY

Chargée de recherche, CNRS BIP, Université Aix-Marseille Examinatrice

Direction de la thèse

Corinne CASSIER-CHAUVAT

Directrice de recherche, CNRS, Université Paris-Saclay Directrice de thèse

REMERCIEMENTS

Je souhaiterais tout d'abord exprimer ma gratitude à tous les membres du jury d'avoir accepté d'examiner mon manuscrit de thèse.

Mes remerciements s'adressent ensuite à vous, Franck et Corinne. Je vous remercie de m'avoir accueillie, initialement en stage de Master 2, dans votre laboratoire. Moi qui, au cours de celui-ci, me rappelle à plusieurs reprises vous avoir regardé droit dans les yeux, pour vous narrer ma forte conviction de ne pas vouloir poursuivre mes études avec un doctorat. Finalement, je me suis laissée complètement enrôlée par ce sujet de thèse passionnant et ces 3 ans et demi au laboratoire... qui sont passés en un claquement de doigts. Merci pour votre confiance.

Un immense merci à ma directrice de thèse Corinne, merci pour votre gentillesse, votre bienveillance, votre pertinence, et votre disponibilité à toute heure.

Cette thèse ne serait pas ce qu'elle a été en particulier grâce à vous les filles, Célia et Sigrid. Notre trinôme a été très spécial pour moi et je vous remercie d'avoir été présentes dans les hauts comme dans les bas. Merci pour ces moments de rire pendant les pauses café, déjeuner, et même à distance pendant cet épisode Covid, et puis sportivement et ...culinairement lors de nos sorties de grimpe. Merci à vous, même si vous m'avez abandonnée lors de cette dernière année de thèse... je me réjouis de nos week-ends en Belgique, à Narbonne et en Suisse. Et puis à quand ce Paris-Honfleur à vélo ?

Merci à vous Xavier et Encarni pour vos conseils et votre aide au début de mon doctorat, et merci à Cyril d'avoir toujours été le premier à organiser nos virées sympathiques dans Paris ! Également merci à tous les stagiaires nous ayant rejoint pour un temps au laboratoire, Anaëlle, Nicolas, Arthur et pour tous les bons moments passés ensemble. Also, thank you Monis for our nice conversations at lunchtime and for getting me back to speaking English...

Merci à la relève du laboratoire Edern, Marine, Fanny ! Merci d'avoir fait de cette dernière année de thèse, des moments de rires. Un grand merci Marine pour ton aide précieuse et Fanny pour ta gentillesse. Merci à toi Edern pour ta bonne humeur ainsi que pour tes blagues quotidiennes et tes fameuses imitations de l'accent canadien léchées, à se tordre littéralement de rire !

Je remercie également tout le bâtiment 142, Pierre Sétif du LMB pour notre collaboration pour l'article CP12, l'équipe du SCBM pour m'avoir laissé utiliser la GC-MS et tout particulièrement Amélie, merci de ta gentillesse et de m'avoir aidée à injecter mes centaines et centaines d'échantillons.

Merci à mes amis, de l'EBI, de Paris, et de Marseille, « Les zoulettes » Valentine, Anaïs, Adeline, Fanny et Maud, pour nos virées, Victoria pour ces week-ends dans le Sud, Morgane et Isabelle pour toutes nos folies marseillaises et au reste de notre Bucket List, Julie, Audrey et mon équipe d'équitation de l'ACBB et tous nos bons moments passés ensemble à Boulogne et aux championnats de France ces dernières années.

Merci à ma famille, ma sœur d'amour Valentine, mon frère Antoine (loin des yeux près du cœur), à Maman d'avoir toujours été là pour moi et à Papa de m'avoir donné cette niaque pour construire mon parcours d'étudiante.

Merci à toi Mamie-Lo de m'avoir donné la fibre scientifique, merci de m'avoir emmenée plus jeune au Palais de la Découverte, à la Cité des Sciences puis aux conférences à l'Institut Pasteur et ainsi de m'avoir fait découvrir cet univers. Sans toi je ne serai pas arrivée jusqu'ici aujourd'hui.

Tout particulièrement merci à toi Zacchary, cette histoire que l'on aurait pu penser impossible entre le Mexique, la Suisse, Paris, l'armée et le Covid... me rend à chaque instant heureuse. Cette dernière année de thèse n'a pas été facile, mais tu as inconditionnellement toujours été là pour moi. Merci pour tous nos moments, merci pour ton amour.

AVANT-PROPOS

Mon travail de thèse présenté dans ce manuscrit est le résultat d'expériences menées sur trois années et demie au sein du laboratoire de Biologie et de Biotechnologie des Cyanobactéries (LBBC) au Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives (CEA) de Saclay, sous la direction du Dr Corinne Cassier-Chauvat.

Cette thèse a été financée par une bourse octroyée par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR CalvinDesign : ANR-17-CE05-0001) en partenariat avec le Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire des Eucaryotes (LBMCE) de l'Institut de Biologie Physico-Chimique (IBPC) à Paris 5^e. L'ANR CalvinDesign coordonnée par le Dr Stéphane Lemaire (IBPC) porte sur la conception d'un cycle de Calvin-Benson optimisé pour améliorer la fixation du CO₂ et la photoproduction de biocarburants et de matières premières chimiques par les microalgues et les cyanobactéries.

Au vu de l'épuisement des sources traditionnelles de combustibles fossiles associé à l'accumulation de gaz à effet de serre produits par leur combustion, au dérèglement climatique (réchauffement de l'atmosphère, des océans et des terres), et à la multiplication des événements extrêmes, il devient urgent de développer des formes alternatives de sources de carbone, dans une optique de neutralité carbone (émissions nettes de CO₂ égales à zéro), pour la production de molécules d'intérêt au sein de divers secteurs industriels (carburant, agroalimentaire, cosmétique, pharmaceutique) nécessaires à la société.

La figure issue du rapport du GIEC 2021 ci-dessous, illustre la relation quasi linéaire entre l'émission cumulée de CO₂ et l'augmentation de la température de la surface de la planète, et appuie l'urgence des mesures à prendre pour un développement durable (Figure 1.).

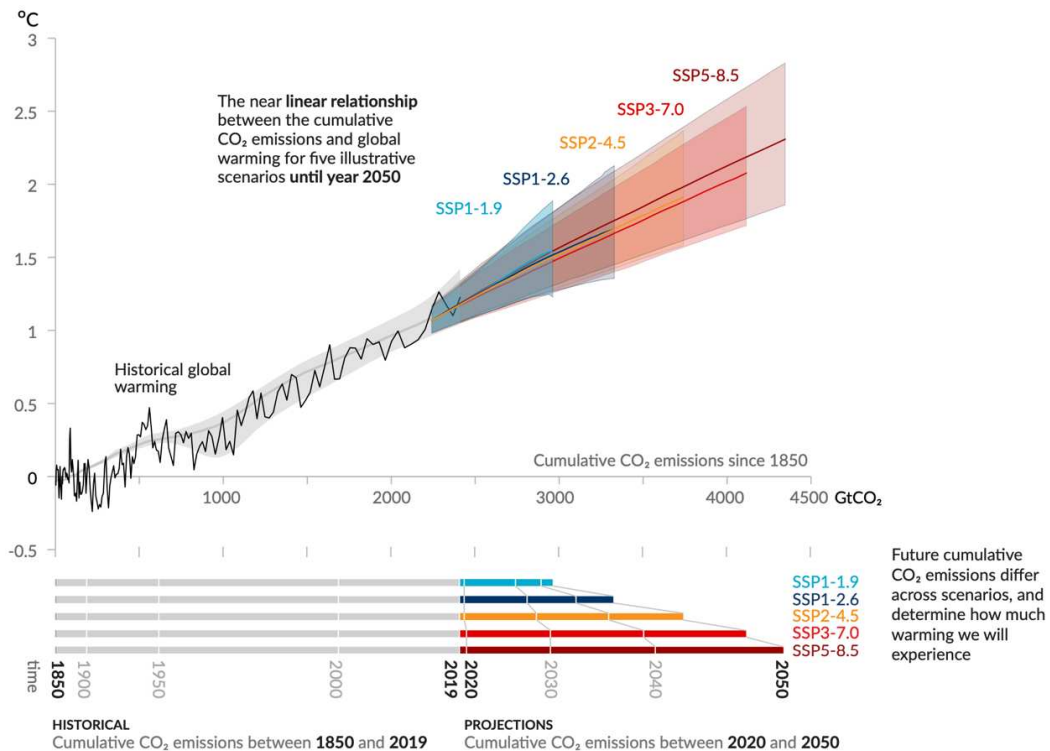


Figure 1. Augmentation de la température à la surface du globe depuis 1850-1900 (°C) en fonction des émissions cumulées de CO₂ (GtCO₂). (GIEC 2021)

Les cyanobactéries sont des microorganismes photosynthétiques considérés comme des usines cellulaires prometteuses pour le développement de concepts innovants basés sur leur capacité inhérente à fixer le CO₂, afin de produire diverses molécules organiques par un procédé durable dépendant de la lumière du soleil (source d'énergie inépuisable) et d'eau (même salée et/ou polluée). Un des défis majeurs pour permettre une production commercialement viable, durable et soutenable de molécules carbonées d'intérêts à partir de ces microorganismes demande de mieux comprendre et améliorer leur métabolisme et notamment l'assimilation du carbone (CO₂) dépendant de la photosynthèse (Cycle de Calvin Benson).

Mon travail de thèse s'articule autour de l'ingénierie du métabolisme des cyanobactéries en vue de l'optimisation du métabolisme de capture du CO₂ et de la photo-production de terpènes, des molécules carbonées qui ont des applications pour la santé, les cosmétiques, les biocarburants, ou servir de plateformes pour la chimie) de manière durable et renouvelable.

Plusieurs volets sont abordés :

- (1) L'ingénierie du cycle de Calvin-Benson (CCB) pour l'amélioration de son efficacité de capture du CO₂ chez trois cyanobactéries modèles avec diverses caractéristiques physiologiques.
- (2) L'ingénierie métabolique au sein de trois cyanobactéries optimisées pour une redirection du flux de carbone du CCB vers la production de différentes molécules d'intérêt : les terpènes.
- (3) La régulation du CCB d'une cyanobactérie modèle par la protéine CP12, et son rôle dans la réorientation du carbone assimilé vers la production de terpènes.

(1) Des pertes d'énergie majeures lors de la photosynthèse réduisant l'efficacité globale de la conversion de la lumière peuvent être attribuées à des goulots d'étranglement au niveau du CCB qui comprend 11 enzymes et 14 étapes finement régulées et synchronisées avec l'activité photosynthétique pour préserver les équilibres énergétiques et rédox.

De nombreuses possibilités existent pour améliorer l'efficacité du CCB : je me suis concentrée sur l'influence de la modification (au niveau de leur séquence) et de leur quantité (surproduction) de deux enzymes clés du CCB (la ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase (RuBisCO) et la Phosphoribulokinase (PRK)) au sein de trois châssis cyanobactériens modèles du laboratoire : *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Synechococcus* sp. PCC 7942 et *Synechococcus* sp. PCC 7002, génétiquement manipulables et présentant des particularités physiologiques intéressantes pour des applications biotechnologiques. Au total, 34 mutants cyanobactériens permettant la surexpression des gènes ou opérons codants pour la PRK et la RuBisCO de 4 cyanobactéries ont été construits.

Ces souches ont été cultivées dans diverses conditions de croissance (concentration en CO₂, lumière, sources de carbone (CO₂, Na₂CO₃), source d'azote (NaNO₃)) et leurs phénotypes ont été comparés à la souche sauvage (vitesse de croissance, gain de productivité en biomasse). Les résultats acquis génèreront de nouvelles connaissances sur le métabolisme du carbone. Les souches les plus performantes en termes de productivité constitueront des châssis pour développer de nouvelles stratégies d'ingénierie pour une production accrue de produits carbonés d'intérêts (alcools, terpènes, etc.).

Dans mon manuscrit, je détaillerai au sein du chapitre 1 le métabolisme anabolique des cyanobactéries, le fonctionnement de leur photosynthèse oxygénique (notamment les réactions dépendantes de la lumière de la photosynthèse (ou phase photochimique)), leurs voies d'assimilation du carbone inorganique, leurs mécanismes de concentrations du carbone (CCM) et leurs régulations. Dans le chapitre 2, je détaillerai la fixation du carbone inorganique par le cycle de Calvin-Benson-Bassham (CCB), et j'exposerai les différentes études et stratégies sur la (sur)expression des gènes codants pour des enzymes natives ou hétérologues du CCB, au sein de différents châssis (autotrophes ou hétérotrophes), les différents phénotypes observés, avec ou sans production de molécules d'intérêt biotechnologique. Les résultats de la construction et de l'analyse des mutants de surexpression des gènes *prk* et opérons *rbc*, codants pour deux enzymes du CCB au sein de différents châssis cyanobactériens, seront détaillés dans la Partie 1 du Chapitre 4 Résultats & Discussion.

- (2) Au vu de la grande diversité des cyanobactéries combinée à la grande famille des molécules d'intérêt que sont les terpènes, le laboratoire souhaiterait déterminer les meilleures combinaisons 'souches-terpènes'.

Depuis 2010, quelques articles dans la littérature relatent de l'étude de la photo-production des terpènes chez les cyanobactéries. Ces molécules carbonées sont naturellement produites par les plantes, et sont considérées comme la famille de produits naturels la plus grande et la plus diversifiée au niveau structurel et stéréochimique. Elles sont très utilisées pour une myriade d'applications dans diverses industries du parfum, cosmétique, agroalimentaire, de la santé et à l'avenir des biocarburants comme alternatives au diesel ou aux carburants pour l'aviation.

Jusqu'à présent, les stratégies utilisées dans la littérature ont principalement porté sur la réorientation du carbone assimilé vers la production de molécules carbonées. Dans ce travail de thèse, j'ai entrepris la combinaison de la régulation de la voie anabolique du CCB et l'amélioration de la fixation du CO₂ (partie (1)), avec la production de terpènes, ceci afin de maximiser les rendements et la durabilité des productions.

J'ai donc contribué à l'ingénierie de plusieurs châssis cyanobactériens pour la production de six terpènes différents (limonène, farnésène, bisabolène, α -santalène, α -bergamotène et épi- β -santalène) via l'introduction de leurs cassettes d'expression (terpène synthases spécifiques) au niveau de sites neutres génomiques (chromosome ou plasmides endogènes) sélectionnés ; tout en combinant la surexpression constitutive (à partir d'un plasmide répliatif à large spectre d'hôte : pC) de différentes versions de gènes *prk* ou opérons *rbc* codants pour les enzymes du CCB (diversité de séquences) ou bien des gènes codants pour les terpènes synthases (nombre de cassettes d'expression des terpènes synthases doublées). Au total, 25 mutants cyanobactériens permettant la surexpression des gènes et opérons codants pour la PRK et la RuBisCO ainsi que la production de différents terpènes ont été construits.

Dans mon manuscrit, je détaillerai au sein du chapitre 3, la diversité, la classification et les nombreux rôles des terpènes dans la nature, puis j'aborderai leurs très nombreuses applications au sein d'industries très hétéroclites, leurs voies de biosynthèses chez les espèces végétales et les progrès récents dans la production de terpènes par les microorganismes. Les résultats d'ingénierie métabolique pour la redirection du flux de carbone du CCB vers la production de terpènes seront détaillés dans la Partie 2 du Chapitre 4 Résultats & Discussion.

(3) D'autre part, par une approche génétique chez la souche *Synechocystis* sp. PCC 6803, j'ai participé à l'analyse des relations structure-fonction de la protéine rédox et intrinsèquement désordonnée CP12, un régulateur majeur du CCB qui opère dans la formation (dépendante de l'oxydoréduction) d'un complexe supramoléculaire avec deux enzymes clés du CCB : la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase et la phosphoribulokinase. L'influence de CP12 sur la production de divers terpènes (monoterpènes C10 et sesquiterpènes C15) a également été analysée. Au total, 10 mutants cyanobactériens (soit délétés pour le gène *cp12*, soit des variants du gène *cp12*, soit combinant la délétion du gène *cp12* à la surexpression de terpènes synthases permettant la production de différents terpènes), ont été construits.

Un chapitre indépendant, le chapitre 5, sera dédié aux travaux réalisés sur la protéine CP12, avec une partie introductive suivie d'une partie « Résultats et discussion » qui présentera les résultats obtenus de l'étude quant au rôle *in vivo* de la protéine CP12.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	3
AVANT-PROPOS	5
TABLE DES MATIÈRES	10
INDEX DES FIGURES	19
INDEX DES TABLEAUX.....	27
LISTE DES ABREVIATIONS	29
CHAPITRE 1. LE METABOLISME ANABOLIQUE DES CYANOBACTERIES	31
I. Des origines de l'atmosphère oxygénique, à la genèse du développement des mécanismes de concentration du carbone (CCM)	31
II. La photosynthèse oxygénique chez les cyanobactéries	32
A. Phase photochimique ou réactions dépendantes de la lumière de la photosynthèse.....	32
1) Principe général.....	32
2) Les structures de la membrane thylacoïdale chez deux souches modèles de cyanobactéries	33
B. Les différents complexes de la chaîne photosynthétique.....	34
a) La capture des photons par les complexes d'antennes de collecte de lumière : les phycobilisomes	34
b) La photolyse des molécules d'eau au niveau du photosystème II	36
c) Le complexe de cytochromes b6 et cytochrome f.....	37
d) Le photosystème I (PSI)	37
e) La ferrédoxine (Fd) et la ferrédoxine-NADP ⁺ réductase (FNR).....	37
f) L'ATP synthase.....	37
g) La régulation des différents complexes de la chaîne photosynthétique.....	38
III. Les voies d'assimilation du carbone inorganique chez les cyanobactéries	38
A. Le carbone inorganique et ses différentes formes assimilables par la cellule	38
B. La fixation du carbone inorganique par le cycle de Calvin-Benson-Bassham (ou fixation du carbone en C3)	39
C. Les voies alternatives d'assimilation du carbone inorganique chez les cyanobactéries : les voies de fixation en C4.....	39
1) La Phosphoénolpyruvate carboxylase (PEPc).....	39
2) L'acétyl-CoA carboxylase (ACCase).....	40
3) La Carbamoyl phosphate synthétase (CPS).....	41
IV. Les mécanismes de concentration du carbone chez les cyanobactéries	41
A. Le principe du mécanisme de concentration du carbone.....	41
1) Le rôle majeur du carboxysome dans les mécanismes de concentration du C _i	41
2) Les deux types de carboxysomes des cyanobactéries.....	42
3) L'organisation des éléments du CCM et leurs mécanismes de régulation au sein des cellules de cyanobactérie	43
a) Organisation des composants du CCM au sein des cyanobactéries de types α et β	43
b) Les composants physiques et biochimiques majeurs du CCM des cyanobactéries β : protéines et transporteurs de carbone inorganique	45
c) Le transport et la fixation du carbone inorganique au sein de la cellule et du carboxysome	47
d) Assemblage des carboxysomes de type α ou β chez les cyanobactéries	47
B. La régulation du mécanisme de concentration du carbone (CCM) chez les cyanobactéries.....	49
1) L'influence de certains paramètres physicochimiques sur l'assimilation du carbone inorganique dans la cellule	49
a) Nature de l'environnement (air ambiant ou milieu aqueux).....	49
b) Le pH.....	49

c)	La température.....	50
d)	L'intensité lumineuse	51
2)	Les niveaux multiples de régulation du CCM chez les cyanobactéries.....	51
3)	La régulation du CCM chez les différentes souches modèles de β -cyanobactéries.....	52
a)	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.....	53
b)	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942.....	53
c)	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002.....	54

CHAPITRE 2. LE CYCLE DE CALVIN-BENSON ET LES STRATEGIES D'INGENIERIE POUR L'OPTIMISATION DE LA CAPTURE DU CO₂..... 56

I.	<i>Le cycle de Calvin Benson-Bassham</i>	56
A.	<i>Qu'est-ce que le cycle de Calvin-Benson ?</i>	56
1)	La fixation du CO ₂ par la carboxylation du ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP)	58
a)	L'activation de la RuBisCO	58
b)	L'activité de carboxylation de la RuBisCO.....	59
c)	L'activité d'oxygénation délétère de la RuBisCO	60
2)	La réduction du 3-phosphoglycérate (PGA) en glycéraldéhyde 3-phosphate (G3P).....	60
3)	La régénération du ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP)	61
B.	<i>Les 11 enzymes du cycle de Calvin-Benson-Bassham</i>	63
1)	La Phosphoribulokinase (PRK).....	63
2)	La Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygénase (RuBisCO).....	64
a)	La structure et l'assemblage de la RuBisCO.....	64
➤	La grande et la petite sous-unités de la RuBisCO : RbcL et RbcS	64
➤	Les protéines chaperonnes et leurs rôles dans la structure et l'assemblage de la RuBisCO	64
➤	Protéines chaperonnes GroEL/GroES	64
➤	Protéines chaperonnes RbcX : la RuBisCO activase	64
➤	Protéines chaperonnes Raf1/ Raf 2	65
b)	Les différentes formes structurales de la RuBisCO.....	66
c)	La spécificité de la RuBisCO selon les espèces.....	67
3)	La phosphoglycérate kinase (PGK)	69
4)	La glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH).....	69
5)	La triose phosphate isomérase (TPI)	70
6)	La Fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FBA)	70
7)	La fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase), la sédoheptulose-1,7-bisphosphatase (SBPase) et l'enzyme bifonctionnelle la fructose-1,6/sédoheptulose-1,7-bisphosphatase (BiBPase)	70
8)	La transkétolase (TK).....	71
9)	La Ribulose-5-phosphate 3-épimérase (RPE)	71
10)	La Ribose-5-phosphate isomérase (RPI).....	71
C.	<i>La régulation du cycle de Calvin-Benson</i>	71
1)	Intensité lumineuse, pH et concentration en Mg ²⁺ au sein du cytosol.....	72
2)	Les interactions protéines-protéines et les modifications post-traductionnelles.....	73
a)	Le système ferrédoxine-thiorédoxine impliqué au niveau de l'état rédox de protéines du CCB (présence de ponts disulfures)	73
b)	Glutathionylation.....	73
c)	Nitrosylation	74
3)	L'association-dissociation de complexes supramoléculaires impliquant CP12	74
II.	<i>Les stratégies d'ingénierie du CCB pour l'optimisation de la capture du CO₂, avec ou sans la production de molécules d'intérêt biotechnologique</i>	75
A.	<i>Introduction d'enzymes natives ou hétérologues supplémentaires plus actives et efficaces</i>	75
1)	La RuBisCO.....	75
➤	Enzymes natives.....	75
➤	Enzymes hétérologues.....	76
➤	Enzymes hybrides	76
2)	La phosphoribulokinase (PRK).....	76
3)	Autres enzymes du CCB impliquées dans la régénération du substrat RuBP de la RuBisCO ...	77
4)	Co(sur)expression de plusieurs gènes codants pour des enzymes du CCB	77

B.	Choix des paramètres de cultures.....	78
C.	Stratégies d'utilisation de systèmes performants l'analyse computationnelle des flux métaboliques.....	78
D.	Mutagenèse par ingénierie rationnelle.....	78
E.	Évolution dirigée des enzymes du CCB basée sur de la mutagenèse aléatoire et des systèmes de sélection alternatifs (sélection sur l'expression, l'activité...)	79
F.	Outils génétiques	80
1)	Choix des promoteurs	80
2)	Stabilisation des protéines par marquage.....	80
G.	Stratégies d'ingénierie parallèles participant à l'augmentation de l'assimilation du CO2 et de l'activité enzymatique des enzymes du CCB.....	81
1)	Stratégie d'ingénierie des mécanismes de concentration du carbone (CCM)	81
2)	L'influence des protéines chaperonnes sur l'activité de la RuBisCO	82
H.	Stratégie d'ingénierie du CCB pour l'optimisation des rendements de production de molécules d'intérêt biotechnologique.....	82
➤	Production d'éthanol.....	83
➤	Production de 2,3-butanediol.....	83
➤	Production de sorbitol	83
➤	Production de limonène	83
➤	Production d'esters de cires	84
➤	Production d'iso-butyraldéhyde	84
➤	Production d'acides gras libres	84

CHAPITRE 3. LA PRODUCTION DE MOLECULES D'INTERET A HAUTE VALEUR AJOUTEE : LES TERPENES 103

I.	La diversité et la classification des terpènes	103
A.	Les terpènes	103
B.	La classification des terpènes et des terpénoïdes.....	103
1)	Longueur de la chaîne carbonée et règle de l'isoprène	104
2)	Les réarrangements structuraux du squelette carboné	105
C.	Les nombreuses fonctions et rôles des terpènes dans la nature	107
1)	Rôles importants des terpènes dans le métabolisme primaire.....	107
2)	Rôles importants des terpènes comme métabolites secondaires via la médiation d'interactions mutualistes (effet attractif) et antagonistes (effets dissuasifs ou répulsifs)	107
II.	Les applications biotechnologiques des terpènes au sein d'industries très hétéroclites.....	109
A.	Industrie des parfums et des cosmétiques	109
B.	Industrie alimentaire et nutraceutiques	112
C.	Agriculture	112
D.	Produits chimiques industriels.....	112
E.	Biocarburants.....	113
1)	Le monoterpène limonène et les sesquiterpènes (farnésène et bisabolène) représentent une alternative au diesel	116
2)	Certains terpènes peuvent être utilisés comme alternatives au carburant d'aviation commercial (Jet-A, JP-5 et JP-8) ou militaire (JP-10 et RJ-5)	117
F.	Industrie pharmaceutique	119
1)	Activités anti-parasitaires.....	119
2)	Activités antimicrobiennes (antibactériennes et antifongiques)	119
3)	Activités antivirales	121
4)	Activités anti-inflammatoires	121
5)	Activités anticancéreuses.....	121
III.	Les voies de biosynthèse des terpènes	123
A.	La synthèse des précurseurs des terpènes (FPP, GPP et GGPP) à partir du pyruvate et du G3P.....	123
1)	Les voies de biosynthèse de l'IPP et du DMAPP	123
2)	Processus en aval de la synthèse des terpènes.....	125
B.	La régulation de la voie MEP	127
IV.	Les progrès récents dans la production de terpènes par les microorganismes.....	128
A.	Extraction de la biomasse végétale et synthèse chimique des terpènes.....	128
1)	Extraction de la biomasse végétale	128

2) Synthèse chimique	128
B. La production de terpènes via une usine cellulaire microbienne	128
1) Production durable de terpènes via une usine cellulaire microbienne et l'utilisation de matières premières de différentes générations	129
2) Les avantages de la production de terpènes par une usine cellulaire cyanobactérienne.....	130
C. La production de terpènes chez les cyanobactéries dans la littérature.....	131
D. Conclusions et perspectives d'ingénierie génétique et métabolique pour accroître la production de terpènes.....	137
CHAPITRE 4. RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	141
PARTIE 1. CONSTRUCTION ET ANALYSE DE MUTANTS DE SUREXPRESSION DES GÈNES <i>PRK</i> ET OPÉRONS <i>RBC</i>, CODANTS POUR DEUX ENZYMES DU CCB, AU SEIN DE DIFFÉRENTS CHÂSSIS CYANOBACTÉRIENS.	142
I. <i>Stratégie de sélection des châssis, des biobricks, et de différents systèmes d'expression plasmidique.....</i>	<i>142</i>
A. Choix des châssis : les cyanobactéries modèles.....	142
1) <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	143
2) <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942	144
3) <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002	145
4) <i>Cyanothece</i> sp. PCC 7425	146
B. Choix des enzymes du CCB à surproduire	147
C. Choix du système d'expression : les vecteurs d'expression pFC1.....	149
II. <i>Surexpression des gènes <i>prk</i> ou <i>rbc</i> dépendante de la température à partir du plasmide réplcatif 'pT' (pFC1).....</i>	<i>150</i>
A. Stratégie de construction des cassettes d'expression	150
B. Stratégie d'introduction des cassettes d'expression au sein de différents châssis cyanobactériens	160
1) Introduction de chaque plasmide pT par conjugaison au sein du châssis <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	160
2) Introduction des divers plasmides dérivés pT par conjugaison au sein du châssis <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942.....	162
3) Introduction de chaque plasmide pT par conjugaison au sein du châssis <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002.....	164
C. Analyses phénotypiques des châssis cyanobactériens dans les conditions de surexpression forte et constitutive du système d'expression thermorégulé pT	165
1) Analyses phénotypiques des châssis WT <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 et <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942	165
2) Analyses phénotypiques des châssis mutants et contrôles (pT) <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 et <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942.....	168
III. <i>Surexpression indépendante de la température via le plasmide réplcatif constitutif 'pC' chez les souches <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803, <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942 et <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002.</i>	<i>172</i>
A. Stratégie de construction des cassettes d'expression	172
B. Stratégie d'introduction des cassettes d'expression au sein de différents châssis cyanobactériens	178
1) Introduction de chaque plasmide pC par conjugaison au sein du châssis <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942.....	178
2) Introduction de chaque plasmide pC par conjugaison au sein du châssis <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	181
3) Introduction de chaque plasmide pC par conjugaison au sein du châssis <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002.....	182
C. Analyses phénotypiques des châssis cyanobactériens dans les conditions de surexpression forte et constitutive du système d'expression thermorégulé pC.....	182
1) Courbes de croissance en conditions standard	183
2) Etudes de la phototolérance	184
IV. <i>Conclusions et perspectives</i>	<i>188</i>
➤ Mesure de l'accumulation des réserves carbonées.....	188

➤ Mesure de l'impact de la surexpression des enzymes du CCB via la mesure de l'évolution de l'O ₂	188
➤ Mesure de la dynamique du pouvoir réducteur au fluoromètre.....	188
➤ Mesure de l'activité photosynthétique du PSII.....	188
➤ Quantification des protéines PRK et RuBisCO	188
➤ Mesure des activités enzymatiques de la PRK et de la RuBisCO.....	188
PARTIE 2. INGÉNIERIE MÉTABOLIQUE POUR UNE REDIRECTION DU FLUX DE CARBONE DU CCB, VERS LA PRODUCTION DE MOLÉCULES D'INTÉRÊT : LES TERPÈNES	189
I. Contexte et stratégies	189
II. Introduction de voies cataboliques dans le métabolisme des cyanobactéries pour la production de molécules d'intérêt : les terpènes.....	191
A. Les voies métaboliques nécessaires à la production de terpènes : la voie du méthylérythritol (voie MEP) en lien avec le cycle de Calvin-Benson et la glycolyse.....	191
B. Sélection de cassettes d'expression exprimant diverses terpènes synthases pour la production de terpènes (monoterpènes ou sesquiterpènes).....	193
C. Choix des châssis cyanobactériens et des terpènes dont la production doit être améliorée.....	193
III. Design de cassettes d'expression de terpènes synthases et leur intégration au sein diverses régions génomiques désignées comme 'sites neutres'	194
A. Sélection de 5 régions génomiques désignées comme sites neutres au sein des châssis cyanobactériens modèles.....	194
1) Sites neutres chez <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	195
a) NS_slr0168 : site neutre au niveau du chromosome de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.....	195
b) NS_pCA2.4 : site neutre du plasmide endogène pCA2.4.....	196
c) NS_pCC5.2 : site neutre au niveau du plasmide endogène pCC5.2 de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	197
2) NSI_7942 : site neutre au niveau du chromosome de <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942	200
3) NSI_7002 : site neutre au niveau du chromosome de <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002	201
B. Design des cassettes d'expression pour l'intégration de gènes hétérologues au niveau de sites neutres	202
1) Stratégie	202
2) Design des plasmides plateformes pour les 5 sites neutres sélectionnés.....	203
3) Design des cassettes d'expression de la santalène synthase au sein des 5 sites neutres sélectionnés	204
4) Design des cassettes d'expression de la limonène synthase au sein du site neutre de <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002.....	206
5) Design des cassettes d'expression du gène codant pour la farnésène synthase au sein de sites neutres de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 et <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942.....	208
6) Design des cassettes d'expression de la bisabolène synthase au sein des 3 sites neutres sélectionnés de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	210
C. Intégration des cassettes d'expression au niveau des sites neutres de différentes souches mutantes ou sauvages de cyanobactéries par transformation naturelle.....	212
1) Stratégies d'ingénierie génétique	212
2) Récapitulatif des diverses souches productrices de terpènes construites.....	214
D. Des sites neutres, pas si neutres que la littérature semble l'indiquer.....	215
IV. Analyses phénotypiques par la détection et quantification de la production de terpènes en GC-MS des terpènes par les souches productrices.....	218
A. Principe	218
B. Analyses phénotypiques préliminaires	218
V. Constructions et analyses phénotypiques des souches <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002 productrices de limonène.....	220
A. Construction de la souche <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002 productrice de limonène.....	220
B. Analyses phénotypiques des souches <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002 productrices de limonène	224
1) Augmentation de la production de limonène par augmentation du nombre de copies de cassettes d'expression du gène codant pour la limonène synthase chez <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002	224

2) Absence d'effets notables de l'expression surnuméraire des gènes codants pour les enzymes CCB sur la production de limonène chez <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002	225
VI. Constructions et analyses phénotypiques des souches <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 productrices de farnésène	226
A. Construction de la souche <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 productrice de farnésène.....	226
B. Analyses phénotypiques des souches <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 productrices de farnésène .	230
1) Augmentation de la production de farnésène par augmentation du nombre de copies de cassettes d'expression du gène codant pour la farnésène synthase chez <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	230
2) L'expression hétérologue du gène <i>prk</i> de <i>Cyanothece</i> sp. PCC 7425 et de certaines versions d'opérons <i>rbc</i> augmentent la production de farnésène chez <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	232
VII. Constructions et analyses phénotypiques des souches <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942 productrices de farnésène	233
A. Construction de la souche <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942 productrice de farnésène.....	233
B. Analyses phénotypiques des souches <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942 productrices de farnésène	236
1) Augmentation de la production de farnésène par augmentation du nombre de copies de cassettes d'expression du gène codant pour la farnésène synthase chez <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942	236
2) Absence d'effets notables de la surexpression du gène codant pour la PRK de <i>Cyanothece</i> sp. PCC 7425 sur la production de farnésène chez <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942	239
VIII. Constructions et analyses phénotypiques des souches <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002 productrices de santalène.....	240
A. Construction de la souche <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002 productrice de santalène	240
B. Analyses phénotypiques des souches <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002 productrices de santalène	243
1) Le système d'expression plasmidique ne permet pas la production des 3 isomères et le doublement du nombre de cassettes d'expression de la santalène synthase a un impact négatif sur leurs rendements.....	243
2) La surexpression des gènes codants pour les enzymes du CCB n'a pas d'influence sur la production des 3 différents isomères chez <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002	246
IX. Influence de la composition du milieu sur la production en terpènes chez la souche <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.....	248
A. Comparaison de la croissance et de la production en farnésène de la souche <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 au sein de différents milieux	248
B. Comparaison de la croissance et de la production en limonène de la souche <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 au sein de différents milieux	249
1) Construction de la souche <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 productrice de limonène pCLS	249
2) Analyses phénotypiques de la souche <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 productrice de limonène au sein de différents milieux	250
X. Conclusions et perspectives	252
➤ La toxicité de la <i>prk</i>	252
➤ La surexpression des gènes/opérons codants pour les enzymes du CCB	252
➤ L'intégration de cassettes d'expression au sein de sites neutres	253
➤ La combinaison de la surexpression des gènes/opérons codants pour des enzymes du CCB à la production de terpènes.....	254
➤ Perspectives de mise en place au laboratoire d'un système de culture permettant d'atteindre de fortes densités cellulaires (système HDC de Cell DEG©)	254
PARTIE 3. STRATÉGIE D'INTRODUCTION D'UNE CASSETTE DE SUREXPRESSION (PROMOTEUR FORT) DANS LE CHROMOSOME DE DIFFÉRENTES CYANOBACTÉRIES EN AMONT DU GÈNE <i>PRK</i> OU DE L'OPÉRON <i>RBC</i>.....	256

CHAPITRE 5. LA PROTEINE CP12 : UN REGULATEUR MAJEUR DE L'ACTIVITE DU CYCLE DE CALVIN ET DU METABOLISME CENTRAL

INTRODUCTION

I. Découverte et caractéristiques de la protéine CP12 au sein de plusieurs organismes photosynthétiques	258
A. Découverte de la protéine CP12	258
B. Caractéristiques de la protéine CP12.....	259

II. La formation de complexes supramoléculaires entre CP12 et deux enzymes du cycle de Calvin	260
A. Formation d'un complexe binaire entre CP12 et GAPDH.....	261
B. ... puis d'un complexe ternaire entre PRK, CP12 et GAPDH	262
C. Dissociation du supracomplexe	263
III. La diversité phylogénétique de CP12	264
A. La diversité phylogénétique selon les motifs portés par la séquence codante	264
B. Les fonctions encore énigmatiques des domaines CBS fusionnés au gène cp12.....	266
C. Les études in vitro et in vivo de la protéine CP12 chez divers organismes photosynthétiques..	267
1) Les cyanobactéries	268
2) Les algues	269
3) Les plantes supérieures.....	269
IV. Le chevauchement des voies glycolytiques et anaboliques en mixotrophie et le rôle de la protéine CP12.....	270
A. Le métabolisme du carbone.....	270
B. Les 4 voies glycolytiques	273
1) La voie Embden-Meyerhof-Parnas (EMP)	273
2) La voie oxydative des pentoses phosphates (OPP)	273
3) La voie Entner-Doudoroff (ED)	273
4) La voie phosphokétolase (PK)	274
C. Le devenir du carbone assimilé.....	274
1) Molécules plateformes / carrefour du métabolisme	274
2) Molécules de réserves carbonées : les PHB et le glycogène	274
D. Le rôle de la protéine CP12 dans la régulation fine du chevauchement des réactions anaboliques et cataboliques	275
RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	276
I. Stratégie de construction de la souche <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 Δcp12 et des variants	276
A. Construction de la souche <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 Δ cp12	276
B. Stratégie de construction des variants de la protéine CP12 de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.....	278
II. Analyses phénotypiques de la souche <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 Δcp12 et des variants de la protéine CP12.....	283
A. Analyses phénotypiques sous différents régimes photosynthétiques.....	283
1) Sous une lumière continue.....	283
2) Sous une alternance jour/nuit.....	284
3) En conditions oxydantes, à l'obscurité.....	285
III. Utilisation du fluoromètre DUAL PAM pour le suivi de la consommation de pouvoir réducteur (NAD(P)H des mutants de la protéine CP12	287
IV. La protéine CP12 est nécessaire pour préserver l'équilibre carbone/azote dans des conditions de mixotrophie.....	292
A. Croissance en mixotrophie des différents mutants de la protéine CP12 avec le glucose comme source de carbone.	292
1) La protéine CP12 est essentielle pour métaboliser correctement le glucose	292
2) Certains résidus conservés de la protéine CP12 exercent un rôle important pour que <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 métabolise correctement le glucose	294
a) En régime photohétérotrophique aux dépens du glucose	294
b) Régime mixotrophique supplémenté de 5 mM de glucose.....	295
c) Régime mixotrophique supplémenté de 55 mM de glucose.....	296
B. La protéine CP12 est nécessaire pour préserver l'équilibre carbone/azote (C/N) dans des conditions de mixotrophie.	298
1) Analyse de la réponse transcriptionnelle des cellules de la souche Δ cp12 en mixotrophie ..	298
2) Accumulation de granules de polyhydroxybutyrates (PHB) visibles par la coloration au Nile red chez certains mutants de CP12	300
C. Régimes mixotrophiques avec des acides organiques (acétate de sodium ou de citrate) comme sources de carbone	301
V. Création de souches mutantes dépourvues de protéines CP12 combinant la production de terpènes	304

A.	Stratégie de construction des souches Δ cp12 productrices de terpènes	304
B.	Analyse du rôle de CP12 sur la production de monoterpènes (en C10) et sesquiterpènes (en C15) 305	
	CONCLUSIONS	309
	CHAPITRE 6. MATERIELS ET METHODES	311
	PARTIE 1. MATÉRIEL	311
I.	<i>Souches E. coli utilisées et conditions de cultures</i>	<i>311</i>
A.	Souches E. coli TOP10, NEB10 β , Rosetta et CM404	311
B.	Conditions et milieux de culture des souches E. coli	312
C.	Conservation des souches d'E. coli	312
II.	<i>Souches de cyanobactéries modèles utilisées et leurs conditions de culture</i>	<i>312</i>
A.	Souches de cyanobactéries modèles utilisées : <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803, <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942 et <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002	312
B.	Conditions et milieux de cultures des souches de cyanobactéries modèles	312
1)	Conditions de culture	312
2)	Milieux de culture	312
a)	Milieu de culture MM	314
b)	Milieu de culture A+	315
C.	Conservation des souches cyanobactériennes	315
III.	<i>Plasmides</i>	<i>316</i>
A.	Plasmides de clonage et d'expression	316
1)	Plasmide de clonage pET3-d de NovagenTM	316
2)	Plasmide de clonage pTwist Amp Medium Copy de Twist BioscienceTM	317
3)	Plasmide de clonage pEX-A128 de Eurofins GenomicsTM	318
B.	Plasmide réplcatif d'expression thermorégulé (pFC1, pT) ou constitutif (pC)	319
IV.	<i>Table des plasmides</i>	<i>320</i>
V.	<i>Table des amorces</i>	<i>326</i>
	CHAPITRE 2. MÉTHODES	337
I.	<i>Biologie moléculaire</i>	<i>337</i>
A.	Extraction et purification des acides nucléiques	337
1)	Resuspension des acides nucléiques	337
2)	Extraction d'ADN plasmidique et génomique	337
a)	Extraction de l'ADN plasmidique	337
b)	Extraction de l'ADN génomique	337
3)	Purification des acides nucléiques	338
4)	Stockage des acides nucléiques	338
B.	Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	338
1)	Synthèse de fragments synthétiques d'acides nucléiques	338
2)	Analyse des produits PCR	338
C.	Analyse des produits : séquençage	339
D.	Assemblage de l'ADN	339
1)	Par restriction enzymatique puis ligation	339
2)	Par la méthode d'assemblage GIBSON	339
E.	Transformation de E. coli	341
➤	Principe de la transformation	341
➤	Protocole	342
VI.	<i>Manipulation génétique chez les cyanobactéries</i>	<i>342</i>
A.	La transformation naturelle chez les cyanobactéries	342
1)	Principe de la transformation naturelle	342
2)	Intégration de cassettes d'expression au sein de sites ciblés du génome désignés comme 'site neutre' (SN)	343
3)	Protocole de la transformation naturelle chez les 3 cyanobactéries modèles	344
B.	La conjugaison chez les cyanobactéries	345
	CHAPITRE 3. ANALYSES PHÉNOTYPIQUES DES SOUCHES MUTANTES DE L'ÉTUDE	347
I.	<i>Test de croissance</i>	<i>347</i>

II. Mesure du contenu en pigments des cyanobactéries	347
III. Mesure de la production et de la consommation du pouvoir réducteur (NAD(P)H)	348
A. Principe	348
B. Protocole expérimental	348
VII. Microscopie à fluorescence pour observation des PHB par le Nile Red	350
A. Principe	350
B. Préparation des cultures de cyanobactéries, de la solution de marquage et des échantillons ..	350
C. Configuration du microscope inversé à fluorescence pour l'observation des PHB	350
VIII. Mesure de la production de terpènes par de la chromatographie phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS).....	352
A. Mise en culture des souches modèles de cyanobactéries dans un intérêt de production	352
1) Mise en culture des souches de cyanobactéries productrices de terpènes.....	352
2) Suivi et quantification de la production en terpènes au cours de la croissance des cyanobactéries.....	352
B. Préparation des échantillons de dodécane pour le dosage des terpènes par GC-MS.	354
C. La quantification des terpènes par de la chromatographie phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS).....	354
1) Principe de la GC-MS.....	355
2) Analyse quantitative des terpènes produits	356
a) Paramètres et réglages spécifiques utilisés pour la détection des terpènes produits	356
b) Les paramètres à déterminer pour le dosage de la production en terpènes par GC-MS..	357
➤ Influence de la fonction Split/Splitless de l'injecteur de la GCMS	358
➤ Influence du débit de la phase mobile sur l'efficacité de séparation des molécules ...	358
➤ Influence du rapport des phases mobiles et stationnaires sur le temps de rétention .	358
➤ Influence de la température et de programmes spécifiques du four (température en mode isotherme ou en mode gradient)	358
c) Analyse quantitative des terpènes produits par la méthode de l'étalonnage interne.....	359
d) Synthèse de l'ensemble des paramètres retenus pour la quantification de chaque terpène produit dans cette étude	360
➤ Les paramètres retenus pour la quantification du limonène	360
➤ Les paramètres retenus pour la quantification du bisabolène et du farnésène.....	360
➤ Les paramètres retenus pour le dosage du santalène.....	361
➤ Principe et méthode de réalisation des gammes étalons pour la quantification de chaque terpène d'intérêt	361
TABLE DES ANNEXES.....	365
ANNEXES.....	366
BIBLIOGRAPHIE	460

INDEX des FIGURES

Figure 1. Augmentation de la température à la surface du globe depuis 1850-1900 (°C) en fonction des émissions cumulées de CO ₂ (GtCO ₂). (GIEC 2021)	5
Figure 2. Représentation schématique des différentes étapes de mon projet de doctorat.	9
Figure 3. Changements proposés des niveaux de CO ₂ et d'O ₂ au cours de l'air phanérozoïque.	31
Figure 4. Architecture des complexes photosynthétiques au sein des thylacoïdes et circulation des électrons et protons chez les cyanobactéries (Extrait de Liu, 2016).	33
Figure 5. La distribution des complexes de transport d'électrons au sein des différents systèmes membranaires de la cyanobactérie <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942 (Extrait de Lu-Ning Liu, 2016).	33
Figure 6. Absorption de la lumière, états d'excitation des électrons et conversion en énergie.	35
Figure 7. Schéma en Z de la photosynthèse : voie du flux d'électrons linéaires et cycliques de la molécule d'H ₂ O jusqu'au NADP ⁺	36
Figure 8. Le flux d'électron au sein du PSI vers la ferrédoxine (Extrait de Berg et al., 2002).	37
Figure 9. Réaction irréversible de la PEP carboxylase (PEPc)	40
Figure 10. Réaction catalytique de l'acétyl-CoA carboxylase au niveau de la première étape de la synthèse des acides gras (Extrait de Cronan et Waldrop., 2002).	40
Figure 11. Mécanisme séquentiel des réactions de la carbamoyl phosphate synthétase (CPS) (adapté de Cunin et al., 1986).	41
Figure 12. Arbre phylogénétique se basant sur les similarités de séquences protéiques de la grande sous-unité de la RuBisCO (Extrait de Klanchui et al., 2017).	42
Figure 13. Organisation des composants du CCM des cyanobactéries de types α et β	44
Figure 14. Assemblage du carboxysome de type α et β	48
Figure 15. Les différentes formes de carbone inorganique en solution et leurs équilibres et rapports en concentrations en fonction du pH (Extrait de Göltzenboth et al., 2006).	49
Figure 16. Graphique représentant l'intensité des flux de Ci en fonction du pH cytosolique de la cyanobactérie <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942 (Extrait de Mangan et al., 2016).	50
Figure 17. La solubilité de l'oxygène et du dioxyde de carbone dans l'eau en fonction de la température.	50
Figure 18. Induction ou inactivation de l'absorption de Ci et de la photosynthèse chez la cyanobactérie <i>A. variabilis</i> (Extrait de Kaplan et al., 1986).	51
Figure 19. Aperçu des différents niveaux de régulation permettant d'ajuster l'activité des mécanismes de concentration du carbone (CCM) selon les niveaux de carbone inorganique ambiant.	52
Figure 20. Régulation transcriptionnelle des gènes sensibles au CO ₂ chez la souche <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 (Extrait de Price et al., 2008).	53
Figure 21. Représentation des composants CCM présents lors des deux états extrêmes du CCM chez la souche <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942 (Extrait de Price et al., 2008).	54
Figure 22. Régulation transcriptionnelle des gènes sensibles au CO ₂ chez la souche <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002 (Extrait de Price et al., 2008).	54
Figure 23. Le cycle de Calvin-Benson-Bassham	57
Figure 24. Représentation simplifiée des deux activités oxygénase et carboxylase de la RuBisCO	58
Figure 25. Les réactions impliquées dans le processus d'activation de la RuBisCO (Biochemistry : A Short Course, Second Edition, 2013 W. H. Freeman and Company).	59

Figure 26. Les étapes et intermédiaires de réaction de la réaction de carboxylation par la RuBisCO (Biochemistry : A short course, Second edition © 2013 W.H Freeman and company).	59
Figure 27. Les étapes et intermédiaires de réaction de la réaction d'oxygénation par la RuBisCO (Biochemistry : A short course, Second edition © 2013 W.H Freeman and company).	60
Figure 28. La réduction du 3-phosphoglycérate (PGA) en glycéraldéhyde 3-phosphate (G3P). (Extrait de Heldt & Piechulla, 2011).	61
Figure 29. Les réactions enzymatiques impliquées dans la régénération du RuBP et l'interconversion des molécules carbonées	61
Figure 30. Détails de la suite de réactions enzymatique pour la régénération du RuBP	62
Figure 31. La réaction de la PRK	63
Figure 32. Structures représentatives des formes I, II, III, IV de la RuBisCO (Extrait de Tabita et al., 2008).	66
Figure 33. Variation des paramètres cinétiques de la RuBisCO selon les types d'organismes photosynthétiques	68
Figure 34. Schéma non exhaustif des régulations des enzymes du CCB et de la voie OPP...	72
Figure 35. Représentation schématique des influx et des efflux en Mg^{2+} et H^+ dans les thylacoïdes et le cytosol en fonction de la présence ou non de lumière	72
Figure 36. Le système ferrédoxine/thiorédoxine réductase	73
Figure 37. Représentation schématique de la classification selon la règle de l'unité isoprène	104
Figure 38. Voie de biosynthèse des santalènes et des santalols	111
Figure 39. Cycle neutre du carbone (Extrait de Tjandra et Huang, 2018)	113
Figure 40. Structures chimiques du bisabolène et bisabolane	116
Figure 41. L'herbe chinoise <i>Artemisia annua</i> (haut) produit la molécule bioactive artémisinine (bas)	119
Figure 42. Représentation schématique de certains modes d'action des terpènes/ terpénoïdes sur des pathogènes. Extrait de (Mahizan et al., 2019)	120
Figure 43. Les voies de biosynthèse des isoprènes (Extrait de Immethun et al., 2013)	126
Figure 44. Matières premières potentielles pour la production de biocarburants à partir d'hôtes microbiens. Extrait de (Walls et Rios-Solis, 2020)	129
Figure 45. Image de la morphologie cellulaire de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 au microscope électronique à balayage (MEB) (Lee et al., 2009)	143
Figure 46. Image de la morphologie cellulaire de <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942 au microscope électronique à balayage (MEB) (Gorelova et al., 2013)	144
Figure 47. Image de la morphologie cellulaire de <i>Synechococcus</i> PCC 7002 au microscope électronique à balayage (MEB) (Ahmad et al., 2020)	145
Figure 48. Photomicrographie de la souche <i>Cyanothece</i> sp. PCC 7425. Barre (échelle) = 5 μm . Extrait de Bandyopadhyay et al., 2011	146
Figure 49. Régions génomiques autour des gènes et opérons codants pour les deux enzymes du CCB : la PRK et la RuBisCO des 4 châssis cyanobactériens <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803, <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942, <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002 et <i>Cyanothece</i> sp. PCC 7425.	148
Figure 50. Carte des plasmides pFC1 (pT) et pC	149
Figure 51. Construction du plasmide pT-rbcLXS_Scy6803 pour l'expression thermorégulée de l'opéron (rbcLXS_Scy6803) codant pour RuBisCO de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.	151
Figure 52. Construction du plasmide pT-rbcLXS_Sco7002 pour l'expression thermorégulée de l'opéron (rbcLXS_Sco7002) codant pour RuBisCO de <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002.	152
Figure 53. Construction du plasmide pT-rbcLS_Sco7942 pour l'expression thermorégulée de l'opéron (rbcLS_Sco7942) codant pour la RuBisCO de <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942.	153

Figure 54. Construction du plasmide pT-rbcLXS_Cya7425 pour l'expression thermorégulée de l'opéron (rbcLXS_Cya7425) codant pour la RuBisCO de Cyanothecce sp. PCC 7425.....	154
Figure 55. Construction du plasmide pT-prk_Scy6803 pour l'expression thermorégulée du gène (prk) codant pour la PRK de Synechocystis sp. PCC 6803.....	155
Figure 56. Construction du plasmide pT-prk_Sco7942 pour l'expression thermorégulée du gène (prk) codant pour la PRK de Synechococcus sp. PCC 7942.....	156
Figure 57. Construction du plasmide pT-prk_Sco7002 pour l'expression thermorégulée du gène (prk) codant pour la PRK de Synechococcus sp. PCC 7002.....	157
Figure 58. Construction du plasmide pT-prk_Cya7425 pour l'expression thermorégulée du gène (prk) codant pour la PRK de Cyanothecce sp. PCC 7425.....	159
Figure 59. Composition génomique des 7 souches de Synechocystis sp. PCC 6803 portant un dérivé du 'pT' permettant l'expression contrôlée par la température des gènes codants pour une des diverses RuBisCO ou PRK.	160
Figure 60. Vérification de l'introduction des différents plasmides permettant l'expression soit des gènes prk ou opérons rbc chez Synechocystis sp. PCC 6803	161
Figure 61. Composition génomique des 7 souches de Synechococcus sp. PCC 7942 possédant un des 7 plasmides dérivés du 'pT' permettant l'expression contrôlée par la température des gènes codants pour les RuBisCO ou de PRK native ou hétérologue.	162
Figure 62. Vérification de l'introduction des différents plasmides permettant l'expression soit des gènes prk ou opérons rbc chez Synechococcus sp. PCC 7942	163
Figure 63. Composition génomique des 5 souches de Synechococcus sp. PCC 7002 possédant un des 5 plasmides dérivés du 'pT' permettant l'expression contrôlée par la température des gènes codants pour les RuBisCO ou de PRK native ou hétérologue.	164
Figure 64. Vérification de l'introduction des différents plasmides permettant l'expression soit des gènes prk ou opérons rbc chez Synechococcus sp. PCC 7002	164
Figure 65. Comparaison de croissance entre les souches Synechocystis sp. PCC 6803 et Synechococcus sp. PCC 7942 en milieu minéral MM A. à 39°C ou B. à 30°C C. à 39°C par nombre de cellules.....	165
Figure 66. Courbes de croissance des souches WT Synechocystis sp. PCC 6803 et Synechococcus sp. PCC 7942 à 39°C, 2500 lux ($\approx 35 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) en MM avec ou sans ajout de carbone (Na_2CO_3) ou azote (NaNO_3) 7 jours après le début de la culture.....	167
Figure 67. Comparaison de croissance (à 39°C, 2500 lux ($\approx 35 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) en MM) des différentes souches mutantes Synechococcus sp. PCC 7942 (A.) ou Synechocystis sp. PCC 6803 (B.) surexprimant le gène codant pour différentes versions de PRK.	168
Figure 68. Comparaison de croissance des souches WT Synechococcus sp. PCC 7942 et mutantes surexprimant le gène codant pour différentes versions de PRK, à 39°C et 2500 lux ($\approx 35 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) (A.) en MM-Ci (B.) en MM et (C.) en MM + Ci.....	169
Figure 69. Comparaison de croissance (à 39°C, 2500 lux ($\approx 35 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) en MM) des différentes souches mutantes Synechococcus sp. PCC 7942 (A.) ou Synechocystis sp. PCC 6803 (B.) surexprimant l'opéron codant pour différentes version de RuBisCO.....	170
Figure 70. Comparaison de la croissance de différentes souches de Synechocystis sp. PCC 6803 surexprimant l'opéron codant pour différentes version de RuBisCO et sauvage à 39°C, 2500 lux ($\approx 35 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) en MM (A.), MM-Ci (B.) et MM+Ci (C.).....	171
Figure 71. Construction du plasmide pC-rbcLXS_Scy6803 pour l'expression forte et constitutive de l'opéron (rbcLXS_Scy6803) codant pour la RuBisCO de Synechocystis sp. PCC 6803.....	173
Figure 72. Construction du plasmide pC-rbcLXS_Sco7002 pour l'expression forte et constitutive de l'opéron (rbcLXS_Sco7002) codant pour la RuBisCO de Synechococcus sp. PCC 7002.	174

Figure 73. Construction du plasmide pC-rbcLS_Sco7942 pour l'expression forte et constitutive de l'opéron (rbcLS_Sco7942) codant pour la RuBisCO) de <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942.	175
Figure 74. Construction du plasmide pC-rbcLXS_Cya7425 pour l'expression forte et constitutive de l'opéron (rbcLXS_Cya7425) codant pour la RuBisCO de <i>Cyanothece</i> sp. PCC 7425.	176
Figure 75. Construction du plasmide pC-prk_Cya7425 pour l'expression forte et constitutive du gène (prk_Cya7425) codant pour la PRK de <i>Cyanothece</i> sp. PCC 7425.	177
Figure 76. Composition génomique des 5 souches de <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942 portant chacune un des 5 plasmides dérivés du 'pC' permettant l'expression forte et constitutive des gènes codants pour les enzymes RuBisCO de 4 versions différentes ou de la PRK de <i>Cyanothece</i> sp. PCC 7425.	178
Figure 77. Corrélation des résultats de conjugaison et de surexpression des gènes codants pour les enzymes du CCB par le biais du 'pT' chez <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942.	180
Figure 78. Composition génomique des 5 souches de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 portant chacune un des 5 plasmides dérivés du 'pC' permettant l'expression forte et constitutive des gènes codants pour les enzymes RuBisCO de 4 versions différentes ou de la PRK de <i>Cyanothece</i> sp. PCC 7425.	181
Figure 79. Composition génomique des 5 souches de <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002 portant chacune un des 5 plasmides dérivés du 'pC' permettant l'expression forte et constitutive des gènes codants pour les enzymes RuBisCO de 4 versions différentes ou de la PRK de <i>Cyanothece</i> sp. PCC 7425.	182
Figure 80. Courbes de croissance des souches mutantes WT et contrôles en photoautotrophie (2500 lux, 30°C).	183
Figure 81. Étude de la phototolérance des mutants de la souche <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 surexprimants les gènes prk ou opérons rbc.	185
Figure 82. Étude de la phototolérance des mutants de la souche <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942 surexprimants les gènes prk ou opérons rbc.	186
Figure 83. Étude de la phototolérance des mutants de la souche <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002 surexprimants les gènes prk ou opérons rbc.	187
Figure 84. Représentation schématique des hypothèses de redirection de flux de carbone pour la mise en place de la stratégie de la création de double mutants combinant la production de terpènes à la surexpression gènes/opérons codants pour des enzymes du CCB.	190
Figure 85. Expression hétérologue de terpènes synthases grâce aux voies métaboliques en amont : CCB, Glycolyse et voie MEP de synthèse de monoterpènes et sesquiterpènes.	192
Figure 86. Carte de la région génomique portant le locus du site neutre chromosomique sélectionné de la souche <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	195
Figure 87. Carte du plasmide endogène pCA2.4 (2378bp) à la souche <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	196
Figure 88. Carte du plasmide endogène pCC5.2 (5214 bp) de la souche <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	198
Figure 89. Carte de la région génomique portant le loci du site neutre chromosomique sélectionné de la souche <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942	200
Figure 90. Carte de la région génomique portant le loci du site neutre chromosomique sélectionné de la souche <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002	201
Figure 91. Schéma représentatif d'une cassette d'expression d'un gène codant pour une terpène synthase qui s'intégrera par recombinaison homologue au niveau de plateformes d'homologies de sites neutres ciblés	202
Figure 92. Représentation schématique des plasmides plateformes (avec gènes synthétiques) commandés à TwistBiosciences™	203

Figure 93. Amplification PCR spécifiques des biobricks pR-SS et Km ^R -SS pour chaque site neutre pour assemblage GIBSON	204
Figure 94. Représentation des cassettes d'expression permettant l'expression du gène codant pour la santalène synthase au sein des 5 sites neutres sélectionnés et leurs vérifications par PCR amplification.....	205
Figure 95. Amplification PCR spécifiques des biobricks pR-LS et Km ^R -LS pour le site neutre chromosomique de <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002 pour assemblage Gibson	206
Figure 96. Représentation de la cassette permettant l'expression du gène codant pour la limonène synthase au sein du site neutre NS-S7002 et vérification par amplification PCR..	207
Figure 97. Amplification PCR spécifiques des biobricks pR-FS et Km ^R -FS pour chaque site neutre pour l'assemblage Gibson	208
Figure 98. Représentation de la cassette permettant l'expression du gène codant la farnésène synthase au sein des sites neutres sélectionnés et leurs vérifications par PCR amplification	209
Figure 99. Amplification PCR spécifiques des biobricks pR-BS et Km ^R -BS pour chaque site neutre pour assemblage Gibson.....	210
Figure 100. Représentation des cassettes permettant l'expression du gène codant pour la bisabolène synthase au sein des sites neutres sélectionnés et leurs vérifications par PCR amplification.....	211
Figure 101. Schéma des 3 types de souches mutantes pouvant découler de la transformation avec la cassette d'expression portant les gènes codants pour une terpène synthase.	212
Figure 102. Amplification PCR spécifiques au niveau des sites neutres pCA2.4 et pCC5.2 des petits plasmides endogènes de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.....	216
Figure 103. Principe de la chromatographie en phase gazeuse couplée à de la spectrométrie de masse (GC-MS) pour détection et quantification de la production en terpènes d'intérêt entre souches contrôles et mutantes (Figure adaptée de www.shimadzu.fr).....	218
Figure 104. Comparaison de la croissance des souches sauvages de plusieurs châssis cyanobactériens avec ou sans dodécane dans leur milieu de culture	219
Figure 105. Construction de la souche mutante <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002 portant la cassette d'expression du gène codant la limonène synthase au sein du site neutre chromosomique A0935-A0936.....	221
Figure 106. Composition génomique des 7 souches mutantes <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002 productrices de limonène et leurs vérifications par amplification PCR.....	223
Figure 107. Production en limonène des souches <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002 en fonction de la localisation (plasmidique ou chromosomique) et du nombre de cassettes d'expression du gène codant pour la limonène synthase (ls).....	224
Figure 108. Comparaison de la production en limonène des souches <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002 combinant la surexpression du gène <i>prk</i> ou des opérons <i>rbc</i> par rapport à la souche contrôle.....	225
Figure 109. Construction de la souche mutante <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 portant la cassette d'expression du gène codant pour la farnésène synthase au sein du site neutre chromosomique slr0168	227
Figure 110. Composition génomique des 7 souches mutantes <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 productrices de farnésène et leurs vérifications par amplification PCR	229
Figure 111. Production en farnésène des souches <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 en fonction de la localisation et du nombre de cassettes d'expression (plasmidique ou chromosomique) ...	231
Figure 112. Production en farnésène des souches <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 combinant la surexpression du gène <i>prk</i> ou des opérons <i>rbc</i> par rapport à la souche contrôle.	232
Figure 113. Construction de la souche mutante <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942 portant la cassette d'expression du gène codant pour la farnésène synthase au sein du site neutre chromosomique NSI	234

Figure 114. Composition génomique de 3 souches <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942 productrices de farnésène et leurs vérifications par amplification PCR.....	235
Figure 115. Production en farnésène des souches <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942 en fonction de la localisation (plasmidique ou chromosomique) et du nombre de la cassette d'expression du gène codant pour la farnésène synthase (fs).....	236
Figure 116. Production en farnésène des souches <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942 combinant la surexpression du gène <i>prk</i> par rapport à la souche contrôle.....	239
Figure 117. Construction de la souche mutante <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002 portant la cassette d'expression du gène codant pour la santalène synthase clonée au site neutre chromosomique NS_S7002 (A0935-A0936).....	241
Figure 118. Composition génomique des 7 souches de <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002 productrices de santalène et leurs vérifications par amplification PCR.....	243
Figure 119. Production en santalène des souches <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002 en fonction de la localisation et du nombre de cassette d'expression (plasmidique ou chromosomique).....	244
Figure 120. Production des isomères α -santalène, α -exo-bergamotène et epi- β -santalène des souches <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002 combinant la surexpression du gène <i>prk</i> et opérons <i>rbc</i> à l'expression du gène codant pour la santalène synthase au sein du site neutre A0935-A0936	247
Figure 121. Résultats de la quantification par GC-MS de la production en farnésène et suivi de la croissance sur 21 jours de la souche mutante <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 pCFS.....	248
Figure 122. Construction du plasmide pC-LS pour l'expression constitutive du gène codant pour la 4S-limonène synthase de <i>Mentha spicata</i>	249
Figure 123. Comparaison de l'influence des milieux MM, MM-Ci et A+ chez une souche <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 productrice de limonène	251
Figure 124. Représentation schématique du système HDC. Extrait de (Dienst et al., 2020).255	255
Figure 125. Design des biobricks pour la stratégie de surexpression des gènes/opérons du CCB naturels au sein de différents châssis cyanobactériens.....	256
Figure 126. Cassettes d'expression en vue de recombinaisons homologues pour la surexpression des gènes <i>prk</i> et opérons <i>rbc</i> endogènes des 3 souches modèles de cyanobactéries	257
Figure 127. Conservation des acides aminés dans les protéines CP12 de cyanobactéries.....	259
Figure 128. Modèle de formations du supracomplexe PRK-CP12-GAPDH basé sur une approche biochimique in vitro (McFarlane et al., 2019).....	260
Figure 129. Structures cristallines du complexe binaire GAPDH-CP12 (Tirée de Matsumura et al., 2011 et McFarlane et al., 2019).....	261
Figure 130. Représentation de la liaison entre CP12 et le dimère PRK (McFarlane et al., 2019)	262
Figure 131. Reconstruction du supracomplexe GAPDH-CP12-PRK montrant la résolution des structures cristallines de la GAPDH d'une cyanobactérie thermophile (<i>Thermosynechococcus elongatus</i>) et de la protéine CP12 par cryo-microscopie électronique (cryo-ME) (McFarlane et al., 2019). GAPDH (en bleu), PRK (en orange) et CP12 (en rose) (Échelle : 30 Å).	263
Figure 132. Séquences de variants cyanobactériens CP12 classés en 8 groupes en fonction des principales caractéristiques structurelles.	265
Figure 133. Les variants CBS-CP12 cyanobactériens.....	267
Figure 134. Représentation schématique du métabolisme du carbone de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.	271
Figure 135. Chevauchement entre les voies glycolytiques et le CCB.....	272
Figure 136. Stratégie de construction de la cassette de délétion $\Delta cp12::Km^R$ et transformation au sein de la souche sauvage de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.	277

Figure 137. Régions génomiques et vérifications par PCR de la souche mutante <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 Δ cp12	278
Figure 138. Stratégie de construction des mutants ponctuels du gène cp12 chez <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	280
Figure 139. Régions génomiques et vérifications PCR des souches mutantes <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 WTr, Δ 4cys et Core	281
Figure 140. Régions génomiques et vérifications par PCR des souches mutantes <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 Δ 2cys-Nter, Δ 2cys-Cter et CBS-cp12(S7002)	282
Figure 141. Comparaison de croissance sous conditions de photoautotrophie en lumière continue entre souche <i>Synechocystis</i> sauvage et la souche délétée pour le gène cp12	283
Figure 142. Croissance des différents mutants CP12 en conditions standard photoautotrophiques (MM, 2500 lux ($\approx 35 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) et 30°C)	284
Figure 143. Croissance des souches Δ cp12 et sauvage sous une alternance de cycle de lumière/obscurité (8h/16h)	284
Figure 144. Principe de mesure de la dynamique du pouvoir réducteur par DUAL-PAM chez <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 (Thèse de Théo Veaudor)	287
Figure 145. Spectre d'absorbance ($\lambda = 400\text{-}750\text{nm}$) de chacune des souches mutantes et WT de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 utilisée pour les mesures de Dual-PAM	288
Figure 146. Cinétique de la fluorescence du NAD(P)H chez les souches <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 WT et Δ cp12	289
Figure 147. Cinétique de la fluorescence du NAD(P)H chez les souches <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 WT, WTr et Δ cp12	290
Figure 148. Cinétique de la fluorescence du NADPH chez les souches <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 Δ cp12, WTr, Core, Δ 4cys, Δ 2cys-Cter, Δ 2cys-Nter.	291
Figure 149. Analyse de la croissance des souches WT et Δ cp12 sous différents régimes de photosynthèse	293
Figure 150. Croissance en photohétérotrophie aux dépens du glucose des souches WT et mutantes <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 portant différents variants cp12.	294
Figure 151. Croissance en mixotrophie (5 mM de glucose) des souches WT et mutantes <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 portant différents variants cp12	295
Figure 152. Croissance en mixotrophie (55 mM de glucose) des souches WT et mutantes <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 portant différents variants cp12	296
Figure 153. Croissance en mixotrophie (55 mM de glucose) sous lumière standard (2500 lux) des souches WT et mutantes <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 portant différents variants cp12	297
Figure 154. Spectres d'absorption (350-850 nm) des diverses souches mutantes de cp12. ...	297
Figure 155. Représentation schématique de la réponse transcriptionnelle de la souche Δ cp12 cultivée (24h) sous un régime mixotrophique à faible lumière. Extrait de la thèse de Théo Veaudor)	299
Figure 156. Coloration au Nile Red des cellules des souches WT et Δ cp12 cultivées en mixotrophie	301
Figure 157. Croissance en mixotrophie des souches WT et mutantes de la protéine CP12 avec les substrats carbonés acétate ou citrate.	302
Figure 158. Composition génomique des différentes souches <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 Δ cp12 productrices de terpènes	304
Figure 159. Vérifications PCR des différentes souches mutantes Δ cp12 productrice de terpènes	305
Figure 160. Comparaison de la production en monoterpènes et sesquiterpènes de la souche <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 Δ cp12 par rapport aux souches contrôles	307
Figure 161. Spectre d'absorbance des cellules de la souche <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 ...	313
Figure 162. Carte du vecteur plasmidique pET3-d de Novagen TM	316

Figure 163. Région de clonage et d'expression du vecteur plasmidique pET3-d de Novagen™.	316
Figure 164. Carte du vecteur plasmidique pTwist Amp Medium Copy de Twist Bioscience™	317
Figure 165. Carte du vecteur plasmidique pEX-A128 d'Eurofins Genomics™	318
Figure 166. Carte du vecteur d'expression thermorégulée pFC1 développé au laboratoire.	319
Figure 167. Principe de l'assemblage GIBSON	340
Figure 168. Principe de la transformation chez E. coli	341
Figure 169. Principe de la transformation et de recombinaison homologue chez un châssis cyanobactérien	343
Figure 170. Principe de la conjugaison à 3 partenaires	345
Figure 171. Spectres d'absorption des cellules de Synechocystis	347
Figure 172. Principe de mesure par DUAL-PAM de l'état métabolique des cellules par la dynamique du pouvoir réducteur chez Synechocystis sp. PCC 6803.	348
Figure 173. Fluorescence émise par les cofacteurs NAD(P)H après différents temps d'illuminations.	349
Figure 174. Schéma de synthèse du suivi de la production de terpènes des cyanobactéries mutantes, de la prise d'échantillons au traitement des résultats	353
Figure 175. Représentation schématique du système de la chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse. Extrait de (Wu et al., 2012)	355
Figure 176. Les spectres d'ions des terpènes d'intérêt	357
Figure 177. 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 (Extrait de la thèse de Célia Chenebault).	362
Figure 178. Gammes étalon permettant la quantification de S-(-)-limonène (A), l' α -pinène (B), l'E- α -bisabolène (C), l' α -farnésène (D), l' α -santalène (E), l' α -exo-bergamotène (F), et l'épi- β -santalène (G)	363
Figure 179. Gel du résultat d'électrophorèse SDS-page	367
Figure 180. Gel du résultat d'électrophorèse SDS-(15 %)PAGE réducteur	368

INDEX des TABLEAUX

Tableau 1. Propriétés des protéines et transporteurs de carbone inorganique (Ci) impliqués dans le CCM ainsi que leur présence ou absence chez chacune des 3 cyanobactéries β modèles. ...	45
Tableau 2. Les diverses formes de RuBisCO présentes dans le vivant (adapté de Tabita et al., 2008). RLP pour RuBisCO-like-protein.	66
Tableau 3. Tableau récapitulatif des différentes études et stratégies sur la (sur)expression des gènes codants pour des enzymes natives ou hétérologues du cycle de Calvin, au sein de différents châssis (autotrophes ou hétérotrophes), les différents phénotypes observés, avec ou sans production de molécules d'intérêt biotechnologique.	86
Tableau 4. Classification des terpènes et des terpénoïdes.....	106
Tableau 5. Caractéristiques olfactives de certains composés individuels des huiles essentielles (Extrait de Sharmeen et al., 2021).	110
Tableau 6. Terpènes identifiés dans la littérature pouvant remplacer ou faire partie d'un mélange avec les carburants actuels dérivés du pétrole (Essence, biodiesel, JP-10, RJ-5). Adapté de (Mewalal et al., 2016).	115
Tableau 7. Caractéristiques des « terpènes carburants » par rapport à celles du Diesel fossile et du biodiesel (esters d'acide gras).	117
Tableau 8. Caractéristiques des « terpènes carburants » par rapport à celle du carburant d'aviation commerciale Jet A-1.	118
Tableau 9. Tableau récapitulatif des différentes études de photo-production de terpènes par les cyanobactéries. Ici les rendements obtenus sont ceux obtenus en présence du gène codant pour une terpène synthase sans autre modification génétique (Thèse de Célia Chenebault).	132
Tableau 10. Comparaison des résultats phénotypiques de souches mutantes obtenues après intégration de cassettes d'expression au sein des sites neutres de 2 petits plasmides endogènes (pCA2.4 et pCC5.2) du génome de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.	199
Tableau 11. Tableau récapitulatif des 13 souches d' <i>E. coli</i> obtenues après transformation avec les plasmides portant des cassettes d'expression de gènes codants pour diverses terpènes synthase et les plateformes d'homologies de sites neutres de 3 souches modèles de cyanobactéries.	203
Tableau 12. Tableau récapitulatif des mutants cyanobactériens obtenus après intégration (par transformation naturelle) des cassettes d'expression de gènes codants pour différentes terpènes synthase au niveau des sites neutres chromosomiques slr0168 , NSI_S7942 et NS_S7002 , respectivement des souches WT ou mutantes <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803, <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942 et <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002.	214
Tableau 13. Tableau récapitulatif de la formation de complexe moléculaire entre CP12, Gap2 et PRK et de leurs activités enzymatiques en conditions oxydantes, chez chacune des souches WT ou mutantes portant un variant de la séquence cp12.	286
Tableau 14. Correspondance entre une unité de DO ($\lambda=750\text{nm}$) mesurée par le spectrophotomètre JENWAY et le nombre de cellules par mL de culture des 3 souches cyanobactériennes modèles.	313
Tableau 15. Concentrations en $\mu\text{g/mL}$ des antibiotiques utilisés pour sélectionner et maintenir les diverses souches mutantes. ND = non déterminé	313
Tableau 16. Composition du MM en minéraux et en éléments traces	314
Tableau 17. Composition du milieu A+ en minéraux et en éléments traces métalliques.	315
Tableau 18. Table des plasmides.....	320
Tableau 19. Table des amorces	326
Tableau 20. Protocole de transformation et analyse des transformants chez 3 châssis cyanobactériens modèles.	344

Tableau 21. Propriétés de fluorescence du Nile Red dans différents solvants organiques. ...	351
Tableau 22. Configuration et propriétés optiques des filtres passe-bandes du microscope inversé à fluorescence Leica DM IRE2.	351
Tableau 23. Traitement des données issues des résultats d'analyse après injections en GCMS des échantillons préparés en chromacoles : de l'aire des pics chromatographiques aux concentrations en g/Lculture.	353
Tableau 24. Liste des références des solutions mères utilisées pour le dosage des terpènes.	354
Tableau 25. Concentrations et volumes des standards internes ajouté aux 200µL d'échantillon de dodécane collectés contenant les terpènes d'intérêt à quantifier.....	354
Tableau 26. Les terpènes à quantifier et les standards internes choisis	359
Tableau 27. Synthèse des caractéristiques chromatographiques et des paramètres déterminés pour l'analyse quantitative d'isomères d'intérêts et la production de limonène.....	360
Tableau 28. Synthèse des caractéristiques chromatographiques et des paramètres déterminés pour l'analyse quantitative d'isomères d'intérêts et la production de bisabolène et farnésène	360
Tableau 29. Synthèse des caractéristiques chromatographiques et des paramètres déterminés pour l'analyse quantitative des isomères d'intérêts et la production de santalène.....	361
Tableau 30. Paramètres définis des différentes courbes étalons pour la quantification de chaque terpène d'intérêt.....	364

Liste des abréviations

1,3-PGA	1,3-bisphosphoglycérate
3-PGA	3-phosphoglycérate
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
Balance C/N	Balance Carbone/Azote
BET	Bromure d'éthidium
BS	Bisabolène synthase
CCB	Cycle de Calvin-Benson
Ci	Carbone inorganique
Chl <i>a</i>	Chlorophylle <i>a</i>
CP12	12 kDa Chloroplastic Protein
DHAP	Dihydroxyacétone phosphate
dNTP	Désoxyribonucléoside triphosphate
DO	Densité optique
DTT	Dithiothréitol
Ni	Nickel
Fe	Fer
ROS	Espèces réactives à l'oxygène
CCM	Mécanismes de concentration du carbone
CBS	Cystathionine- β -synthase
E4P	Erythrose-4-phosphate
F1,6P	Fructose-1,6-bisphosphate
F6P	Fructose-6-phosphate
FBA	Fructose-1,6-bisphosphate aldolase
FBP	Fructose-1,6-bisphosphatase
Fdx	Ferrédoxine
FS	Farnésène synthase
G3P	Glycéraldéhyde-3-phosphate
GAPGH	Glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase
Gm	Gentamycine
Km	Kanamycine
LS	Limonène synthase
LSU	Grande sous-unité
MM	Milieu Minéral
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NaCO₃	Carbonate de sodium
NaNO₃	Nitrate de sodium
NH₄⁺	Ammonium
NO₃⁻	Nitrate
PCC	Collection de cultures de l'Institut Pasteur
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PGK	Phosphoglycérate kinase
PHB	Poly- β -hydroxybutyrate
PRK	Phosphoribulokinase
PSII/PSI	Photosystème II/Photosystème I
Pyr	Pyruvate

PS	Pinène synthase
RH	Recombinaison homologue
RPE	Ribulose-5-phosphate 3-épimérase.
RPI	Ribose-5-phosphate isomérase
Ru5P	Ribulose-5-phosphate
Ri5P	Ribose-5-phosphate
RuBisCO	Ribulose-1,5- Bisphosphate Carboxylase/Oxygénase
RuBP	Ribulose-1,5-bisphosphate
SBPase	Sédoheptulose-1,7- bisphosphatase
S1,7P	Sédoheptulose-1,7-bisphosphate
S7P	Sédoheptulose-7-phosphate
Sm/Sp	Streptomycine/Spectinomycine
SSU	Petite sous-unité de la RuBisCO
SS	Santalène synthase
TKT	Transkétolase
TPI	Triose phosphate isomérase
Trx	Thiorédoxine
UV	Rayonnement ultraviolet
X5P	Xylulose-5-phosphate
α-KG	α -cétoglutarate

CHAPITRE 1. Le métabolisme anabolique des cyanobactéries

I. Des origines de l'atmosphère oxygénique, à la genèse du développement des mécanismes de concentration du carbone (CCM).

Il y a environ 3,2-2,4 milliards d'années l'atmosphère protérozoïque ne contenait que très peu d'oxygène, mais présentait en revanche des niveaux de CO₂ estimés de 100 à 200 fois plus élevés que ceux actuels (Kaufman et Xiao, 2003), des conditions très favorables aux mécanismes de photosynthèse, aux réactions de carboxylation de la RuBisCO, efficaces sans mécanismes de concentration du carbone. C'est à cette époque qu'on estime que les cyanobactéries ont émergé sur Terre et ont développé la photosynthèse oxygénique (Schopf, 2000).

Ces microorganismes débutèrent alors un changement de l'environnement terrestre, par la lente formation d'une atmosphère oxygénique. Finalement il y a un peu plus de 400 millions d'années d'une chute importante du ratio CO₂/O₂ (Singh *et al.*, 2016) caractérisée par une forte réduction des concentrations en CO₂ couplée avec une augmentation drastique des concentrations en O₂ (Figure 3.). Ce phénomène aboutissant au grand événement d'oxygénation (GOE) il y a 350 millions d'années environ a permis la transition vers l'atmosphère oxygénée actuelle à un taux approchant 20% d'O₂ (Figure 3.).

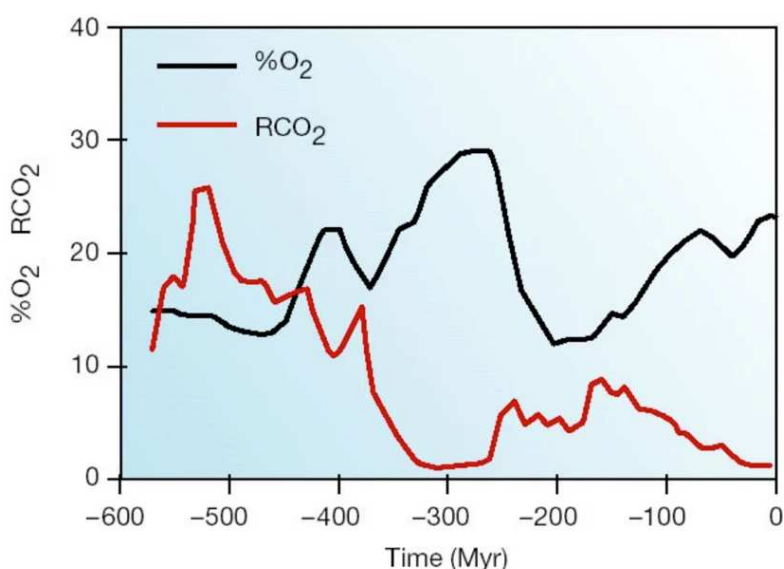


Figure 3. Changements proposés des niveaux de CO₂ et d'O₂ au cours de l'air phanérozoïque.

Le CO₂ est indiqué comme le rapport de la masse de dioxyde de carbone dans l'atmosphère dans le passé à celle du présent préindustriel (RCO₂); Myr 'Millions of years' correspond à l'échelle de temps en millions d'années. Les valeurs de l'O₂ sont affichées en pourcentage (Berner, 2001 ; Hayes *et al.*, 1999, Korte *et al.*, 2003) et RCO₂ sont issues du modèle GEOCARB III (Berner and Kothavala, 2001). (Extrait de Berner, 2003).

Devant de telles variations de concentrations en carbone inorganique (Ci), les environnements terrestres et aquatiques sont devenus progressivement moins favorables à la photosynthèse oxygénique des organismes photoautotrophes notamment au niveau des capacités catalytiques de la RuBisCO. Les organismes photoautotrophes se sont donc adaptés, au fur et à mesure de l'évolution, pour assurer leur survie en améliorant leur efficacité de fixation du carbone. Les cyanobactéries par exemple ont ainsi développé des systèmes adaptés de concentration du carbone au niveau de centres de carboxylation, que l'on définit aujourd'hui comme les mécanismes de concentration du carbone inorganique (CCM).

La datation du développement des CCM chez les cyanobactéries est assez controversée : il pourrait avoir eu lieu lors des périodes glaciaires (il y a 2,3 ou 0,75 ou 0,6 milliard d'années) (Giordano *et al.* 2005 ; Raven *et al.* 2012) mais pourraient aussi être associés à la calcification et minéralisation des cyanobactéries durant la période du Précambrien. La formation de stromatolites pouvant être à l'origine de mécanismes de concentration du Ci à cause de leurs rôles dans le ralentissement de la diffusion du CO₂ vers les cellules (Kupriyanova *et al.*, 2007).

Chez les cyanobactéries, le CCM permet une augmentation ciblée et un confinement spatial de la concentration de CO₂ au niveau de microcompartiments, sites de carboxylation appelés carboxysomes. L'objectif principal du CCM étant de saturer le site actif de la RuBisCO en CO₂ au sein du carboxysome, car l'enzyme possède une double activité enzymatique d'oxygénation et de carboxylation. Ainsi le CCM permet une assimilation du Ci plus rapide et efficace tout en diminuant les fuites de CO₂ dans le cytoplasme (Singh *et al.*, 2016).

II. La photosynthèse oxygénique chez les cyanobactéries

A. Phase photochimique ou réactions dépendantes de la lumière de la photosynthèse.

1) Principe général

Chez les cyanobactéries le processus photosynthétique débute dans des membranes intracellulaires appelées thylacoïdes. Ils sont le lieu où s'opèrent des réactions dépendantes de la lumière. Et sont composés de complexes densément imbriqués permettant l'exécution en parallèle, d'un gradient électrochimique de protons au travers de la membrane ainsi qu'un transport linéaire et cyclique d'électrons au niveau de la chaîne photosynthétique et respiratoire. Ils regroupent différents complexes et molécules bien organisés : le phycobilisome, le photosystème II (PSII), le photosystème I (PSI), la plastoquinone (PQ), le cytochrome *b₆f*, la plastocyanine (PC), la ferrédoxine (Fd) et l'ATP synthase (ATPase).

Tous ces complexes et molécules permettent d'assurer le transport des électrons au sein de la chaîne photosynthétique afin de produire l'énergie nécessaire au bon fonctionnement du métabolisme cellulaire. Ainsi, l'énergie lumineuse est absorbée puis convertie en énergie chimique au cours d'une série de réactions dépendantes de la lumière permettant la production d'ATP et de NADPH qui sont ensuite utilisés par « les réactions non photochimiques » du cycle de Calvin (CCB) pour fixer le CO₂ et produire notamment des sucres à 3 carbones (Figure 4.).

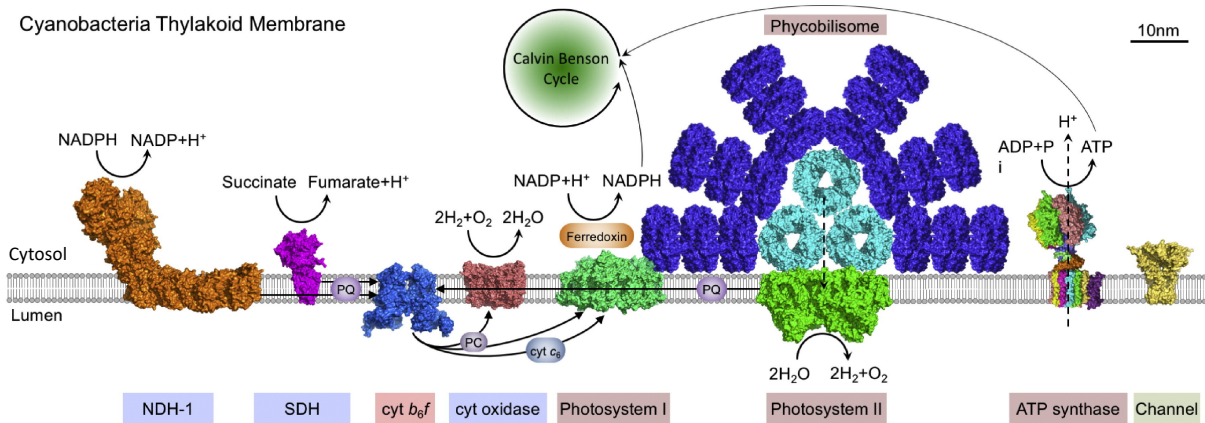


Figure 4. Architecture des complexes photosynthétiques au sein des thylacoïdes et circulation des électrons et protons chez les cyanobactéries (Extrait de Liu, 2016).

2) Les structures de la membrane thylacoïdale chez deux souches modèles de cyanobactéries

Les thylacoïdes de deux souches de cyanobactéries modèles *Synechocystis* sp. PCC 6803 (sphérique) et *Synechococcus* sp. PCC 7942 (bâtonnets) sont agencés de manière bien distincte.

Chez *Synechocystis* sp. PCC 6803, elles forment des feuilletts incurvés et parallèles rayonnant à partir des centres d'organisation des thylacoïdes. Ces membranes sont assez hétérogènes avec des régions internes concentrées en PSI, et les phycobilisomes et PSII plutôt localisés au niveau des thylacoïdes externes (Liu *et al.*, 2006).

Chez *Synechococcus* sp. PCC 7942 dont les cellules sont en forme de bâtonnets, les membranes photosynthétiques sont organisées en une série de couches concentriques régulières le long de la face interne de la membrane cytoplasmique et de ce fait entourent le cytoplasme central (Lu-Ning Liu, 2016). Au niveau de l'organisation des complexes, l'ATPase et le PSI sont situés au niveau des thylacoïdes externes, tandis que le PSII et le cytochrome *b6/f* sont répartis uniformément au sein du thylacoïde (Lu-Ning Liu, 2016 ; Sherman *et al.*, 1994).

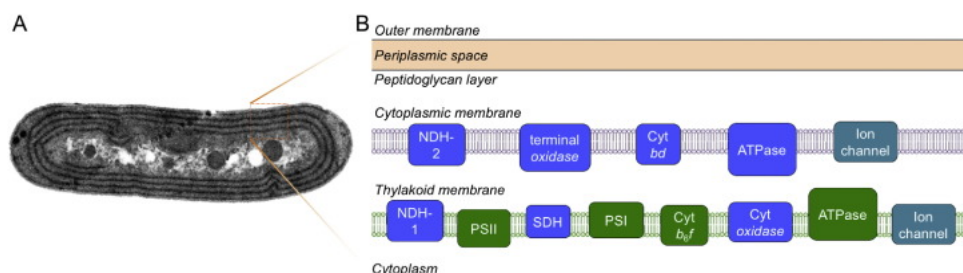


Figure 5. La distribution des complexes de transport d'électrons au sein des différents systèmes membranaires de la cyanobactérie *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Extrait de Lu-Ning Liu, 2016).

A. Image de microscopie électronique d'une cellule de la souche *Synechococcus* sp. PCC 7942 B. Organisation des principaux composants des voies de transport d'électrons au niveau des membranes cytoplasmiques et thylacoïdes: **les complexes des chaînes de transport d'électrons photosynthétiques et respiratoires situés au niveau des thylacoïdes (en vert)** et **les composants de la chaîne respiratoire du transport d'électrons (en bleu)** situés à la fois au sein des membranes cytoplasmiques et thylacoïdiennes. Abréviations : ATPase, ATP synthase ; cyt bd, cytochrome bd ; cyt *b6/f*, cytochrome *b6/f* ; cyt oxydase, cytochrome c oxydase ; NDH-1 et -2, NADPH déshydrogénase de type 1 et de type 2 ; terminal oxydase, oxydase des cytochromes terminal ; PSI, photosystème I ; PSII, photosystème II.

B. Les différents complexes de la chaîne photosynthétique

Le mécanisme de la chaîne de transport des électrons se base sur le principe suivant : lorsque les centres réactionnels pourvus de pigments chlorophylle *a* (chl *a*) absorbent l'énergie lumineuse sous la forme de photons, un électron de cette molécule est excité et devient instable, il est donc transféré à un autre complexe créant ainsi une chaîne de réactions d'oxydoréduction au sein de la chaîne photosynthétique.

a) *La capture des photons par les complexes d'antennes de collecte de lumière : les phycobilisomes*

Les phycobilisomes sont des complexes protéiques liés à la membrane thylacoïdale qui présentent des systèmes d'antennes extrinsèques au niveau du cytoplasme capable d'absorber l'énergie lumineuse (photons) de la lumière visible (entre les longueurs d'ondes 500-670 nm) et sont donc essentiels à la croissance en photoautotrophie des organismes photosynthétiques.

Les phycobilisomes sont composés de protéines appelées phycobiliprotéines (protéine chromophorylées soluble dans l'eau) auxquelles sont liées par liaisons covalentes des phycobilines. Les phycocyanobilines sont formées de plusieurs noyaux cylindriques à leur base qui contiennent le pigment bleu appelé phycocyanine (de longueurs d'onde d'absorbance 615-640 nm) ainsi que des tiges de disques empilés à l'extérieur de la structure qui contiennent le pigment allophycocyanine (de longueur d'onde d'absorbance 650-655nm). Certaines cyanobactéries peuvent également contenir un pigment rose appelé phycoérythrine.

Les phycobilisomes sont extrêmement sensibles à leur environnement et s'adapte à la qualité de lumière (longueur d'onde) ainsi qu'à leur intensité, en ajustant leur taille, nombre, composition localisation, *etc.* Par exemple sous faible intensité lumineuse leur taille augmente, tandis qu'elle diminue sous haute intensité lumineuse. Ceci permet de maximiser les rendements photosynthétiques tout en prévenant des dommages que pourraient provoquer les photons sur l'appareil photosynthétique (Shevela *et al.*, 2013). Les phycobilisomes sont également mobiles et peuvent se déplacer latéralement au niveau de la surface cytoplasmique de la membrane thylacoïdienne (Mullineaux *et al.*, 1997).

Par l'organisation de la membrane thylacoïdienne chez les différentes souches de cyanobactéries, il résulte que les phycobilisomes sont préférentiellement en contact avec le PSII et de surcroît chez *Synechocystis* sp. PCC 6803.

L'énergie lumineuse capturée par les phycobilisomes est ensuite transférée aux photosystèmes I (PSI) et II (PSII), les centres réactionnels de la photosynthèse, via la protéine de liaison 'linker' ApcE.

Les deux photosystèmes PSI et PSII ont la capacité de pouvoir absorber les photons de la lumière et de passer d'un état fondamental à un état excité (Figure 6.). Pour le PSII, les complexes protéines-pigments CP43 et CP47 forment l'antenne collectrice de l'énergie lumineuse.

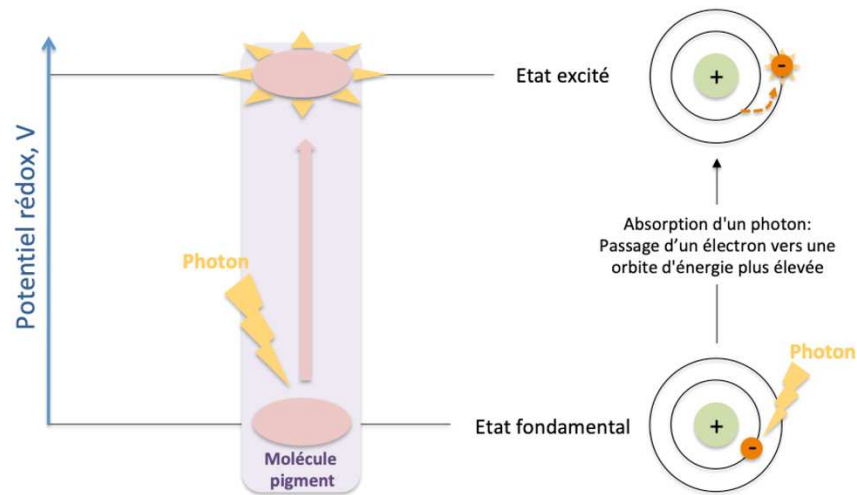


Figure 6. Absorption de la lumière, états d'excitation des électrons et conversion en énergie.
 La lumière sous la forme de photons est l'énergie qui permet aux électrons de passer d'un état fondamental à un état excité via le gain d'une énergie potentielle permettant à l'électron de transiter vers une orbite possédant une énergie potentielle supérieure. La molécule pigment correspond à la chl *a*.

Le transfert d'énergie entre les différents pigments composant le photosystème est effectué par des interactions électromagnétiques directes dans un processus appelé : transfert d'énergie par résonance. Ces interactions électromagnétiques se propagent jusqu'à atteindre le centre réactionnel du photosystème et les dimères de chlorophylle uniques (P700 pour PSI et P680 pour PSII) conduisant à l'excitation d'un électron qui sera cédé à l'accepteur d'électron primaire (la chlorophylle A_0 pour PSI et la phéophytine pour PSII) puis au reste de la chaîne photosynthétique.

Un flux d'électrons est alors créé et alimenté par les photosystèmes PSI (P680) et PSII (P700) au sein de la chaîne photosynthétique, de la molécule d' H_2O jusqu'au $NADP^+$ (Figure 7. ci-dessous).

Le flux d'électrons peut également être cyclique c'est-à-dire qu'une fois que les électrons sont excités au niveau du PSI ceux-ci sont transférés au sein de la plastoquinone puis du *Cytb₆f* en boucle. La photophosphorylation cyclique intervient dans des conditions où le PSII ne fonctionne plus ou bien lorsque le ratio $NADPH / NADP^+$ est trop élevé, c'est-à-dire quand le substrat $NADP^+$ n'est pas suffisamment disponible pour accepter des électrons provenant de la ferrédoxine réduite.

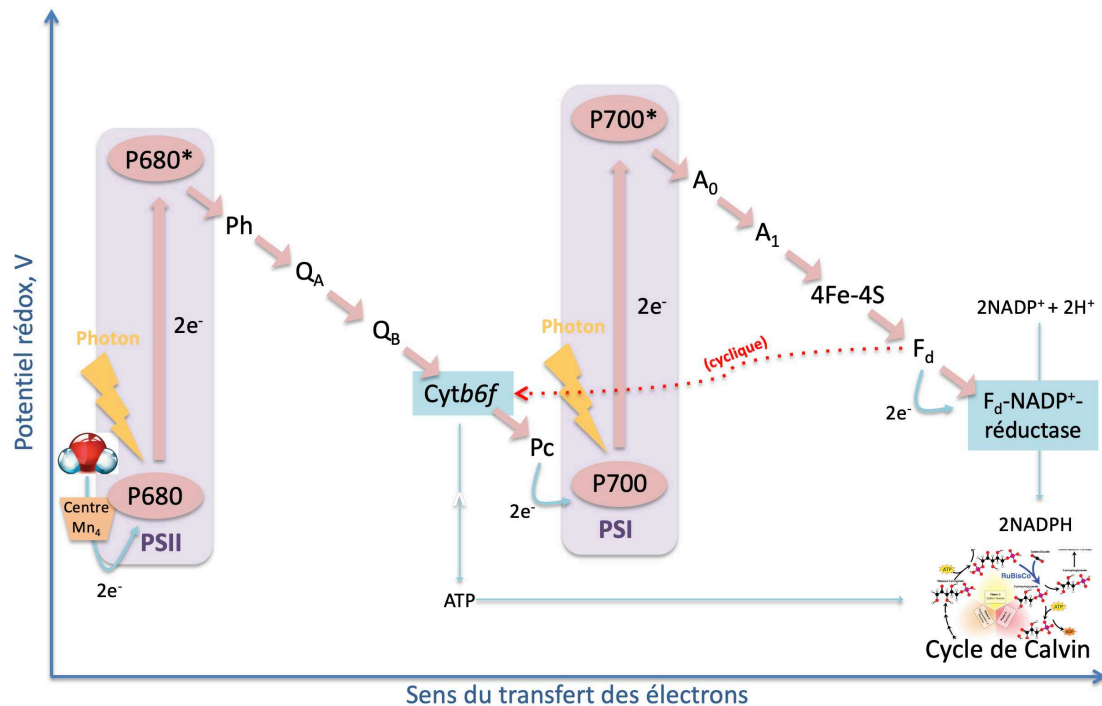


Figure 7. Schéma en Z de la photosynthèse : voie du flux d'électrons linéaires et cycliques de la molécule d' H_2O jusqu'au $NADP^+$

Abréviations : Centre Mn_4 , centre manganèse ; P680, ; P680* ; Ph, phéophytine ; Q_A et Q_B , protéines se liant à la plastoquinone ; Cytb6f, Cytochrome b6f ; Pc, plastocyanine (donneur d'électrons à P700) ; P700, ; P700* ; A_0 (chlorophylle a) et A_1 (phylloquinone) accepteurs d'électrons de P700* ; F_d , ferrédoxine ; 4Fe-4S, centres Fer-Soufre ; F_d , ferrédoxine ; F_d-NADP^+ -réductase.

b) La photolyse des molécules d'eau au niveau du photosystème II

Le photosystème II (PSII) est un large complexe multimérique de protéines pigmentées de poids total de 700 kDas composé d'un centre réactionnel formé par deux protéines D1 et D2. Le PSII est une oxydoréductase qui utilise l'énergie lumineuse via l'absorption de photons pour catalyser la réaction de l'oxydation de la molécule d'eau (H_2O) en électrons (e^-), protons (H^+) et oxygène (O_2). Le photosystème II répond à la lumière à une longueur d'onde de 680 nm.

L'énergie lumineuse est donc absorbée par le PSII via ses différents pigments chlorophylliens jusqu'au centre réactionnel et au dimère de chlorophylle P680 qui amène l'électron à un haut potentiel d'énergie. L'électron excité est transféré à l'accepteur d'électron primaire : la phéophytine a (chlorophylle a avec deux ions H^+ à la place de l'ion Mg^{2+} central) puis au reste de la chaîne photosynthétique et en premier lieu vers les quinones (Q_A et Q_B) par la réduction du plastoquinone.

L'électron cédé par le dimère de chlorophylles a est rendu via la scission de la molécule d'eau au sein du centre manganèse du PSII qui, dans sa forme réduite, vient oxyder deux molécules d' H_2O pour former une molécule O_2 ainsi que 4 protons et 4 électrons : $2H_2O \rightarrow O_2 + 4H^+ + 4e^-$. À l'issue de cette réaction, de di-oxygène (O_2) est libéré ; le PSII est ainsi responsable de la production d'une majeure partie de l'oxygène sur terre.

c) Le complexe de cytochromes *b6* et cytochrome *f*

Les photosystèmes I et II sont connectés par une pompe à protons transmembranaire : le complexe de cytochrome *b6f*. Le complexe permet le déplacement des électrons d'un porteur d'électrons mobile liposoluble (la plastoquinone, pQ), provenant du centre réactionnel PSII à un porteur d'électrons mobile hydrosoluble (la plastocyanine, pC) vers le centre réactionnel PSI. Le cytochrome *b6f* agit également comme une pompe à protons intra membranaire entre le stroma des chloroplastes et le lumen des thylacoïdes.

Lors de la photophosphorylation cyclique, complexe de cytochrome, *b6f* joue un rôle central pour le transfert des électrons, lorsque la photophosphorylation linéaire n'est pas faisable dans des conditions où le NADP^+ n'est pas suffisamment disponible pour accepter des électrons provenant de la ferrédoxine réduite (voir Figure 5).

d) Le photosystème I (PSI)

Le photosystème I des cyanobactéries est le plus gros complexe photosynthétique de protéines intramembranaires avec un poids moléculaire total d'environ 1100 kDa. Son centre réactionnel est composé d'un hétérodimère de protéines PsaA et PsaB d'environ 80 kDa qui absorbe la lumière à une longueur d'onde maximum de 700 nm.

Les électrons en provenance de la plastocyanine sont cédés au PSI. Afin de redonner un haut potentiel d'énergie aux électrons, de nouveaux photons sont absorbés par le PSI via ses antennes collectrices et acheminés jusqu'au centre réactionnel et au dimère de chlorophylle P700. L'électron excité est transféré à l'accepteur d'électrons primaires : la chlorophylle A_0 puis vers une phylloquinone A_1 , un centre « fer-souffre » Fe-S et la ferrédoxine (Fd) (Figure 8.).

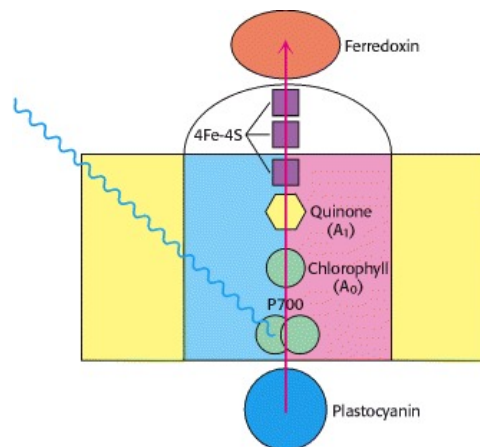


Figure 8. Le flux d'électron au sein du PSI vers la ferrédoxine (Extrait de Berg et al., 2002).

e) La ferrédoxine (Fd) et la ferrédoxine-NADP⁺ réductase (FNR)

Les électrons sont ensuite transférés au niveau de la ferrédoxine un porteur d'électrons soluble. Ceux-ci sont ensuite pris en charge par la ferrédoxine-NADP⁺ oxydoréductase (FNR) qui réduit le NADP^+ (dernier accepteur d'électrons à haut potentiel) pour générer du NADPH.

f) L'ATP synthase

L'ATP synthase est composée de deux parties : une partie membranaire fixe et hydrophobique appelée *rotor* (F_0) enchâssée au niveau de la membrane thylacoïde et une partie

extramembranaire mobile hydrophilique appelée *stator* (F_1) au niveau du stroma qui comprend 5 polypeptides (sous-unités α , β , δ , γ , et ϵ).

La production d'un gradient de protons (H^+) alimenté par la chaîne de transports d'électrons conduits à un transfert du flux de protons entre F_0 et F_1 au niveau de la membrane entraînant des mouvements rotatifs de la partie F_0 *rotor* de l'enzyme. Ce phénomène permet la synthèse d'ATP (couteuse en énergie) via la formation de liaison phosphate entre ADP et le substrat de phosphate inorganique (P_i) (photophosphorylation de l'ADP). La formation d'une molécule d'ATP par l'ATP synthase utilise en moyenne 3 protons.

À l'inverse, en absence de gradient de protons, cette même enzyme peut hydrolyser l'ATP pour former des protons.

g) *La régulation des différents complexes de la chaîne photosynthétique*

Les complexes et les molécules de la chaîne de transport d'électrons s'adaptent aux conditions environnementales changeantes. Par exemple, sous des conditions de forte intensité lumineuse, plusieurs mécanismes sont mis en œuvre :

- les antennes sont protégées par des mécanismes de photoprotection ;
- un flux cyclique d'électrons peut également se mettre en place car le substrat $NADP^+$ n'est pas suffisamment disponible pour accepter les électrons.
- La stœchiométrie des photosystèmes I et II va varier en fonction de l'intensité et du spectre lumineux. Par exemple, chez la souche *Synechocystis* sp. PCC 6803, le rapport monomères PSI/PSII varie entre 1,5:1 avec une lumière favorable au PSI (faible lumière rouge de 4 W m^{-2}), à 3:1 avec une lumière favorable à PSII (faible lumière orange de 3 W m^{-2}) (Aizawa *et al.*, 1992] aussi, le rapport PSI/PSII est plus élevé sous une lumière blanche de faible intensité que sous une lumière blanche de haute intensité ([Hihara *et al.*, 1998] ; Luimstra *et al.*, 2018) ont également émis l'hypothèse qu'au regard de l'utilisation de la lumière bleue de manière disproportionnée par le PSI au détriment du PSII, les cellules compenseraient ce phénomène en ajustant le rapport PSI:PSII.

III. Les voies d'assimilation du carbone inorganique chez les cyanobactéries

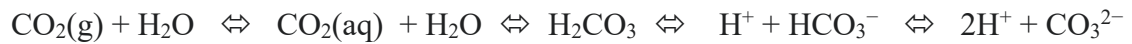
Chez les cyanobactéries plusieurs voies d'assimilation du carbone inorganique (Ci) coexistent : le cycle de Calvin-Benson-Bassham (CCB) permettant la fixation en C3 et les voies d'assimilation anaérobiques du CO_2 en C4.

A. Le carbone inorganique et ses différentes formes assimilables par la cellule

Au sein des systèmes biologiques le carbone inorganique peut exister sous plusieurs formes : le dioxyde de carbone (CO_2), l'anion bicarbonate (HCO_3^-), l'anion carbonate (CO_3^{2-}), et l'acide carbonique (H_2CO_3). Le carbone inorganique total (C_T) correspond à la somme des concentrations des différentes formes de carbone inorganique (la fraction en H_2CO_3 étant négligeable) :

$$C_T = [CO_2] + [HCO_3^-] + [CO_3^{2-}] + [H_2CO_3].$$

La constante d'équilibre des espèces de carbone inorganique dissoutes (DIC), dérivée de l'équilibre du pH, est la suivante :



La capacité des cellules à utiliser telle ou telle forme de carbone inorganique dépend de plusieurs critères et paramètres environnementaux : la concentration en C_i et les formes disponibles, le pH du milieu, la température, l'intensité lumineuse, la phylogénie de la souche cyanobactérienne et l'organisation de ses éléments du CCM (Kupriyanova, 2013).

B. La fixation du carbone inorganique par le cycle de Calvin-Benson-Bassham (ou fixation du carbone en C3)

La fixation du carbone en C3 est réalisée par la voie réductrice du pentose phosphate (le cycle de Calvin) ainsi que la voie oxydative du pentose phosphate. Cette partie sera largement détaillée dans le chapitre 2.

C. Les voies alternatives d'assimilation du carbone inorganique chez les cyanobactéries : les voies de fixation en C4

Les voies de fixation en C4 ont comme caractéristiques de limiter la photorespiration. Elles comportent des carboxylases qui disposent d'une seule activité enzymatique, à la différence de la voie de fixation en C3 avec la RuBisCO qui dispose de deux activités carboxylase et oxygénase. La fixation du CO_2 par la voie C4 est aussi plus rapide que par la voie C3, car pour concentrer le CO_2 au niveau de la RuBisCO, la cellule a besoin de molécules d'ATP : pour la voie C3, le nombre est de 18 molécules, pour la voie C4, le nombre est de 30. Mais la consommation supplémentaire de molécules d'ATP pour cette dernière (voie C4) rend la fixation de CO_2 plus efficace.

1) La Phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPc)

Les cyanobactéries sont connues pour assimiler le carbone inorganique via la voie photosynthétique C3, elles peuvent également fixer ce C_i en acide carboxylique et s'adonner à une activité de type C4 via la PEP carboxylase (PEPc). L'enzyme PEPc est la deuxième enzyme fixatrice de carbone majeure chez les organismes photoautotrophes, et elle est de plus très largement distribuée chez les cyanobactéries. L'enzyme PEPc peut représenter jusqu'à 25% de la fixation du CO_2 chez la souche *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Takeya *et al.*, 2017).

Il a également été observé que la PEPc est essentielle à croissance photoautotrophique des cyanobactéries (Linenburg and Coleman., 1990), comme *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Angermayr *et al.*, 2014) ou *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Cheah *et al.*, 2020).

La PEPc catalyse une réaction irréversible au niveau du phosphoenolpyruvate (PEP), un métabolite à trois carbones (C3), permettant la fixation de C_i sous la forme HCO_3^- et la synthèse d'oxaloacétate (OAA) un métabolite à quatre atomes de carbone (C4) du cycle de l'acide citrique, ainsi que du phosphate inorganique (Pi) (Figure 9.).

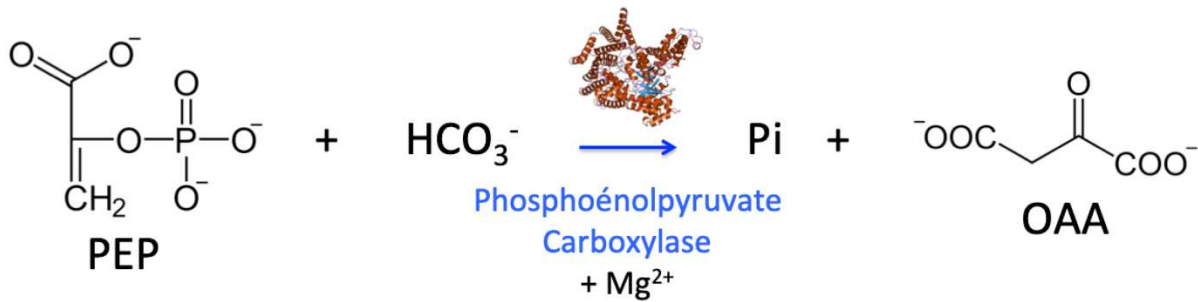


Figure 9. Réaction irréversible de la PEP carboxylase (PEPc)

Cette réaction catalysée par la PEP carboxylase (dépourvue d'activité oxygénase) est alimentée par le CO₂ atmosphérique hydraté en bicarbonate (HCO₃⁻) et le phosphoenolpyruvate (PEP) pour former, en présence de Mg²⁺, de l'oxaloacétate (OAA) et du phosphate inorganique (Pi, HPO₄²⁻).

D'un point de vue biotechnologique, il a été montré chez *Synechocystis* sp. PCC 6803, que la surproduction de l'enzyme PEPc augmentait la production de composés carbonés tels que le succinate (Hanusuma *et al.*, 2018) ou bien l'éthylène (Durall *et al.*, 2020).

2) L'acétyl-CoA carboxylase (ACCase)

La protéine cyanobactérienne acétyl-CoA carboxylase (ACCase) est impliquée dans la catalyse de la première étape de la biosynthèse des acides gras ; c'est une protéine constituée de multiples sous-unités et de quatre polypeptides différents : la biotine carboxylase (BC), la protéine liant les carboxyles à la biotine (BCCP) et les α et β -carboxyltransférases (α et β -CT) (Figure 10.).

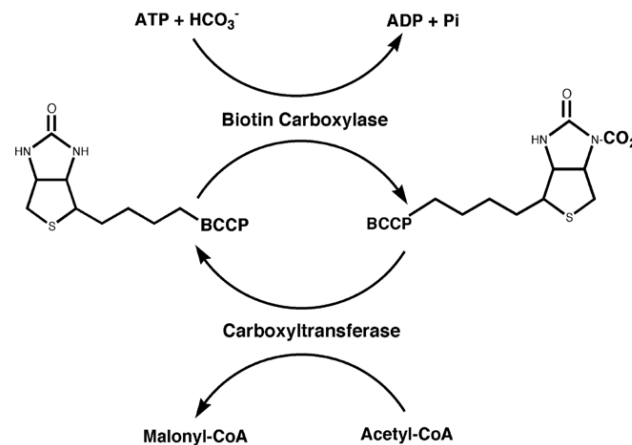


Figure 10. Réaction catalytique de l'acétyl-CoA carboxylase au niveau de la première étape de la synthèse des acides gras (Extrait de Cronan et Waldrop., 2002).

L'ATP et le HCO₃⁻ se lient à la première sous-unité BC qui interagit avec la sous-unité BCCP en catalysant à la fois la déshydratation de HCO₃⁻ et la fixation d'un groupe carboxyl à la BCCP. Les sous-unités α et β -CT interviennent ensuite pour former du malonyl-CoA à partir de l'acétyl-CoA et du CO₂ (provenant de BCCP) (Durall and Lindblad., 2015).

3) La Carbamoyl phosphate synthétase (CPS)

La carbamoyl phosphate synthétase joue le rôle de carboxylase en assurant l'incorporation du carbone inorganique (HCO_3^-) en carboxy-phosphate et la synthèse en carbamoyl phosphate dépendante de l'ATP, un précurseur des acides aminés pyrimidine et d'arginine.

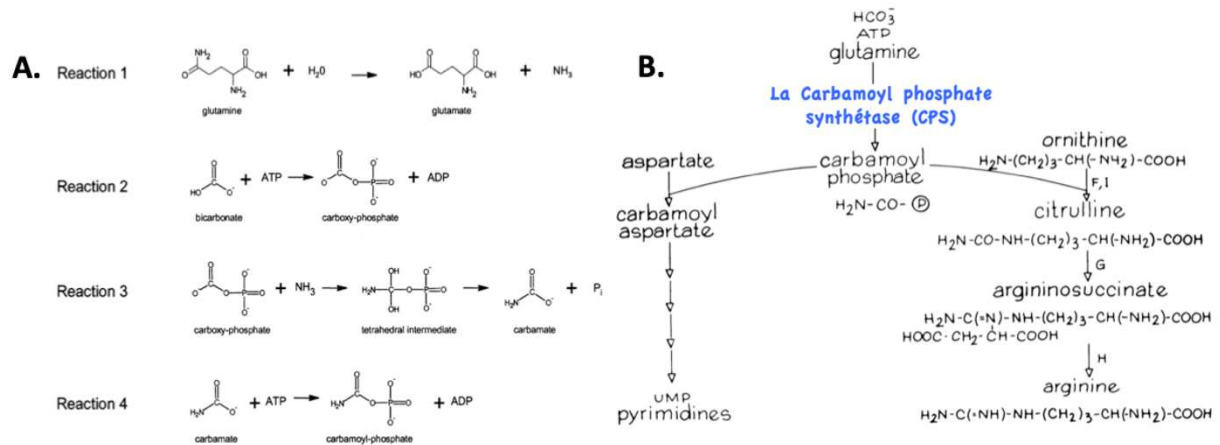


Figure 11. Mécanisme séquentiel des réactions de la carbamoyl phosphate synthétase (CPS) (adapté de Cunin *et al.*, 1986).

A. Les CPS cyanobactériennes se composent de deux sous-unités : une grande sous-unité qui catalyse la formation de carboxyphosphate à partir de glutamine, bicarbonate et d'ATP puis séquentiellement, le carboxyphosphate réagit avec l'ammoniac pour former du carbamate. La petite sous-unité de CPS catalyse la production du carbamoylphosphate via les substrats carbamate et l'ATP. (Extrait de Kothe *et al.*, 2005). **B.** La carbamoyl phosphate synthétase (CPS) catalyse la formation de carbamoyl phosphate (CP), le précurseur des acides aminés pyrimidine et arginine (Durall et Lindblad., 2015).

IV. Les mécanismes de concentration du carbone chez les cyanobactéries

A. Le principe du mécanisme de concentration du carbone

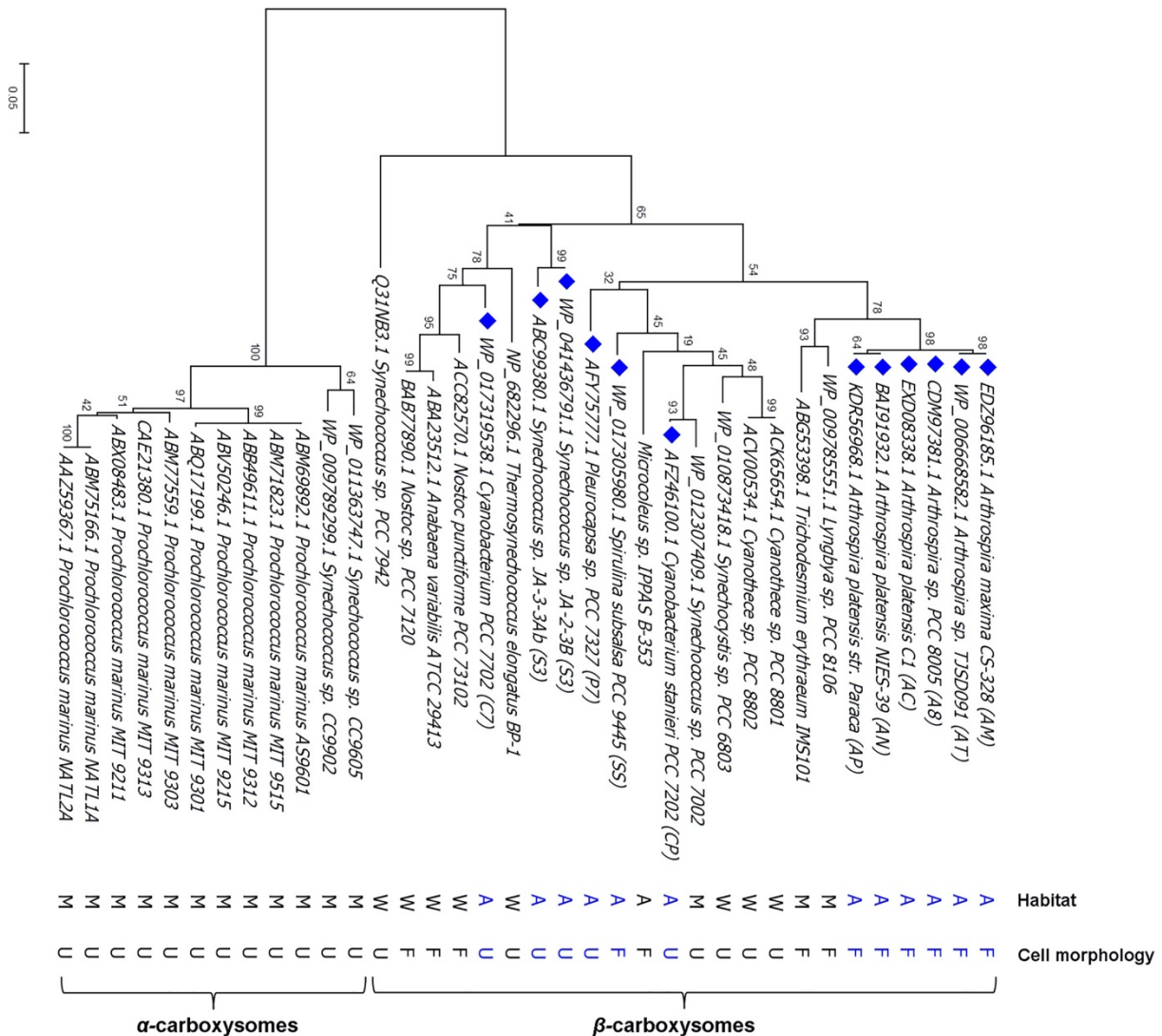
1) Le rôle majeur du carboxysome dans les mécanismes de concentration du C_i

Les carboxysomes sont des microcompartiments subcellulaires, de diamètre 70-200 nm et de forme icosaédrique, constituée d'une enveloppe protéique perméable, elle-même composée de protéines pentamériques et hexamériques (Kerfeld *et al.*, 2016). L'intérieur du microcompartiment comporte une forte densité de protéines solubles majoritairement composées de RuBisCO et d'anhydrases carboniques (CAs) (Beudeker *et al.*, 1980 ; McKay *et al.*, 1993). Le carboxysome agit comme une barrière de diffusion du carbone inorganique qui se retrouve donc concentré afin de maximiser les activités de carboxylation et minimiser l'oxygénation de la RuBisCO car l'oxygène n'y pénètre pas.

Le développement d'un CCM chez les cyanobactéries leur a aussi permis d'être plus compétitives au niveau écologique, en effet, beaucoup moins d'azote est ainsi attribué à la synthèse de la protéine RuBisCO, qui représente un peu moins de 3% des protéines solubles (Price *et al.*, 2011).

2) Les deux types de carboxysomes des cyanobactéries

Les cyanobactéries peuvent être divisées en 2 groupes : les α -cyanobactéries et les β -cyanobactéries selon la phylogénie de la RuBisCO (forme IA ou IB) ainsi qu'en fonction de leurs types de carboxysomes (α -carboxysomes ou β -carboxysomes) qui diffèrent par leur organisation génique, leurs composants protéiques et la manière dont la RuBisCO y est emballée.



Les 12 souches de cyanobactéries alcaliphiles examinées dans cette étude sont identifiées par le losange bleu, tandis que les autres espèces de référence sont représentées sans losange. Concernant l'habitat des cyanobactéries, les souches d'eau douce sont désignées par W, les souches marines par M et la niche alcaline par A. L'arrangement cellulaire est représenté par U pour unicellulaire et F pour filamenteux.

Les α -cyanobactéries avec les α -carboxysomes portent la forme IA de la RuBisCO et ont des carboxysomes de type CsoS (1,2,3,4). On retrouve les α -cyanobactéries dans des environnements de type océaniques riches en HCO_3^- dissous, à pH élevé (pH \sim 8,2). Les α -

cyanobactéries ne possèdent pas le gène *rbcX* codant pour une protéine chaperonne de la RuBisCO et disposent d'un faible nombre de transporteurs constitutifs de CO_2 .

Les β -cyanobactéries portant les β -carboxysomes disposent la forme IB de la RuBisCO, et ont des carboxysomes de type Ccm (K,L,M,N,O). On retrouve les β -cyanobactéries au sein d'habitats divers comme les eaux douces, estuariennes, côtières et des sources d'eaux chaudes à $\text{pH} \approx 7$; des environnements qui affichent des niveaux de carbone inorganique et nutriments très variables, mais souvent limités en carbone dissous (Badger *et al.*, 2002 ; Price *et al.*, 2008). En plus des gènes *rbcL* et *rbcS* codants respectivement pour les grandes et petites sous unités de la RuBisCO, les génomes des β -cyanobactéries possèdent également le gène *rbcX*.

En général, les β -cyanobactéries ont un plus grand nombre de transporteurs et de protéines d'assemblage que les α -cyanobactéries et la structure interne des carboxysomes est de surcroît plus sophistiquée que les α -carboxysomes qui semblent moins ordonnés, plus petits avec une coque plus mince (Dai *et al.*, 2020). En général, les β -cyanobactéries ont un diamètre de cellules ainsi qu'une taille de génome plus élevé que les α -cyanobactéries.

Au sein des β -cyanobactéries, on retrouve les souches modèles de cette étude, des souches d'eaux douces ou saumâtres (dont *Synechocystis* sp. PCC 6803 et *Synechococcus* sp. PCC 7942 font partie) et des souches d'eaux dites marines (comme *Synechococcus* sp. PCC 7002). Les souches d'eaux douces disposent d'une plus grande abondance d'anhydrases carboniques de type β -CA (*CcaA* and *EcaB*), α -CA (*EcaA*), et γ -CA (*CcmM*). Les souches d'eaux marines n'ont pas de transporteur de CO_2 NDH-I₃, elles possèdent uniquement le transporteur constitutif NDH-I₄. (Klanchui *et al.*, 2017).

3) L'organisation des éléments du CCM et leurs mécanismes de régulation au sein des cellules de cyanobactérie

a) Organisation des composants du CCM au sein des cyanobactéries de types α et β

Dû à la faible diffusion du CO_2 dans l'eau (taux de diffusion 10^4 fois plus lent que l'air) (Santos-Merino *et al.*, 2019), la cellule accumule majoritairement le carbone inorganique sous la forme HCO_3^- , chargée et moins soluble dans la membrane. La cellule et le carboxysome des cyanobactéries sont constitués de membranes formées d'une bicouche lipidique qui sont hautement perméables aux molécules non chargées telles que le CO_2 .

Le mécanisme de concentration du carbone inorganique (CCM) des cyanobactéries comprend jusqu'à cinq systèmes d'absorption d' HCO_3^- et de CO_2 , et agit pour élever les concentrations intracellulaires en carbone inorganique. La coque des carboxysomes favorise plutôt l'entrée sélective des molécules chargées de RuBP et de bicarbonate (HCO_3^-) par rapport aux molécules non chargées d' O_2 et de CO_2 (Figure 13.).

- **Trois transporteurs de carbone inorganique** liés à la membrane cytoplasmique : BCT1, SbtA, BicA agissent comme des pompes pour concentrer le bicarbonate HCO_3^- au niveau intracellulaire.
- Le CO_2 entre par diffusion au sein de la cellule et est pris en charge par **deux pompes de conversion du CO_2** en HCO_3^- localisées au niveau des membranes thylacoïdales : NDH-I₃ et NDH-I₄.

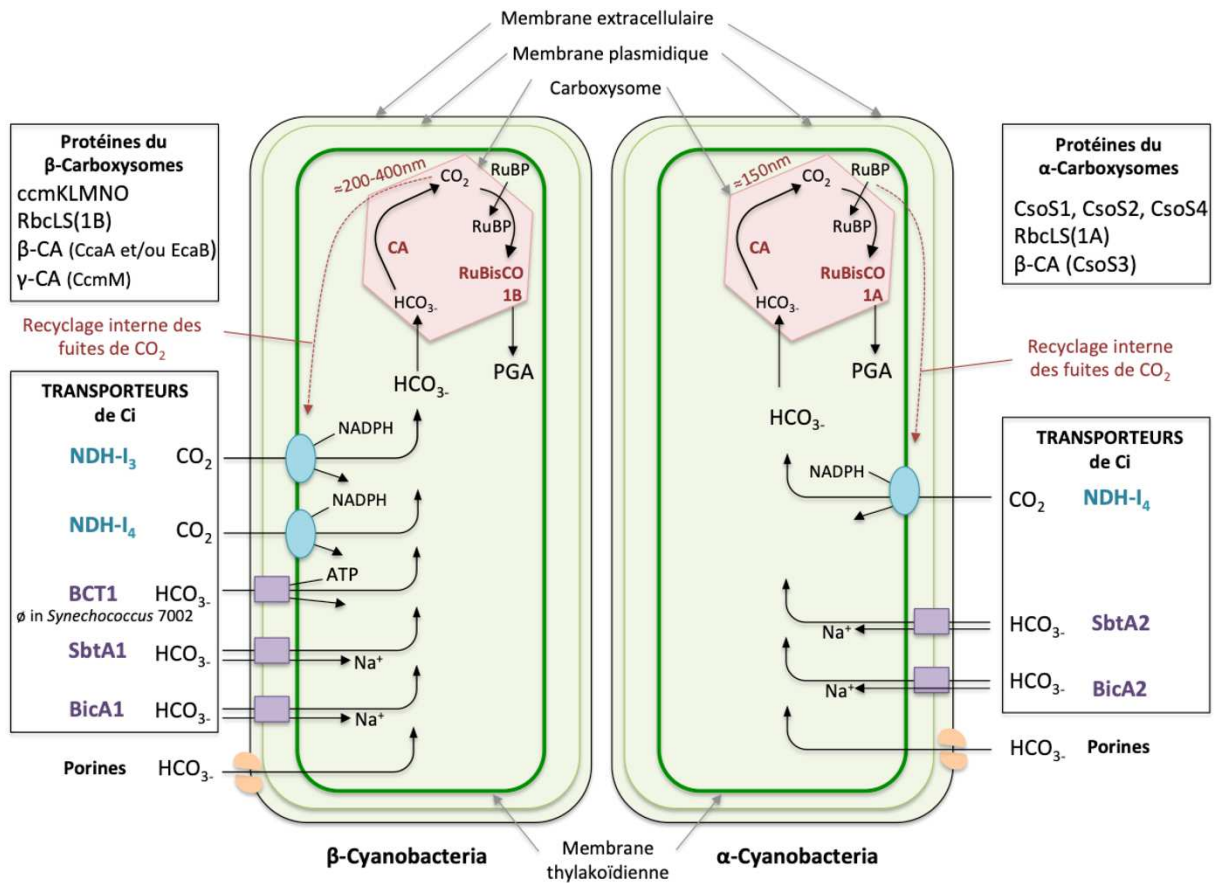


Figure 13. Organisation des composants du CCM des cyanobactéries de types α et β . NDH-14, complexe d'absorption constitutif du CO_2 (à faible affinité); NDH-13, complexe d'absorption inductible de CO_2 (à haute affinité); BCT1, transporteur HCO_3^- de haute affinité de type ABC; SbtA, transporteur HCO_3^- de haute affinité Na^+ -dépendant; BicA, transporteur HCO_3^- de faible affinité Na^+ -dépendant de type SulP; CA, anhydrase carbonique; RuBisCO, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase / oxygénase.

Grâce à ces systèmes, les concentrations de carbone inorganique au sein du carboxysome atteignent des concentrations de 200–300 μM , soit les niveaux requis pour permettre la saturation de la RuBisCO. Il a été observé que ces concentrations en C_i pouvaient atteindre 40 mM autour du site actif relativement inefficace de RuBisCO, c'est-à-dire 1000 à 4000 fois plus élevé que dans le milieu extracellulaire (Kaplan and Reinhold, 1999 ; Badger et Price, 2003, Giordano *et al.*, 2005 ; Woodger *et al.*, 2005 ; Sultemeyer *et al.*, 1995; Price *et al.*, 1998).

Ces systèmes CCM sont très flexibles (transporteurs, nombre de carboxysomes), ils sont inductibles ou constitutifs et diffèrent par leurs propriétés cinétiques, par leurs niveaux d'affinité avec leurs substrats (HCO_3^- et CO_2) et leurs taux de flux. Ainsi, les cyanobactéries se distinguent par une plasticité phénotypique importante de la fixation du carbone (Ji *et al.*, 2020).

b) Les composants physiques et biochimiques majeurs du CCM des cyanobactéries β : protéines et transporteurs de carbone inorganique

Tableau 1. Propriétés des protéines et transporteurs de carbone inorganique (Ci) impliqués dans le CCM ainsi que leur présence ou absence chez chacune des 3 cyanobactéries β modèles.

(Price and Howitt., 2011, Price et al., 2008, Kaplan et al., 2008, Gupta et al., 2020, Kerfeld et al., 2016, Singh et al., 2016).

Les cases en jaune signifient que les composants sont présents dans la ou les souches Scy6803, Sco7942 et Sco7002. Abréviations : Scy6803, *Synechocystis* sp. PCC 6803 ; Sco7942, *Synechococcus* sp. PCC 7942 ; Sco7002, *Synechococcus* sp. PCC 7002.

Composants du carboxysomes β	Gènes impliqués	Mécanismes et spécificités	Scy 6803	Sco 7942	Sco 7002
Transporteurs HCO₃⁻					
BCT1 Transporteur HCO ₃ ⁻ inductible à haute affinité de la famille des transporteurs de type ABC (ATP-binding cassette) (Omata et al., 1999).	<i>cmpABCD</i>	Complexe multimérique de 4 sous-unités protéiques : CmpA, CmpB, CmpC et CmpD) Transport de HCO ₃ ⁻ ATP-dépendant Affinité pour le substrat : Moyenne Taux de flux : Faible à moyen Affinité photosynthétique, K _{0,5} Km : 10-15 μ mol/L HCO ₃ ⁻ BCT1 est codé par l'opéron <i>cmpABCD</i> qui n'est exprimé que lors d'une limitation sévère en Ci (Price et al., 2008).			
SbtA Transporteur HCO ₃ ⁻ inductible à haute affinité (Shibata et al., 2002)	<i>sbtA</i>	Transport de HCO ₃ ⁻ dépendant du sodium (Na ⁺) Affinité pour le substrat : Elevée Taux de flux : Faible Affinité photosynthétique, K _{0,5} Km : <5 μ mol/L			
BicA Transporteur HCO ₃ ⁻ à faible affinité de type SulP (Price et al., 2004)	<i>bicA</i>	Transport de HCO ₃ ⁻ dépendant du sodium (Na ⁺) Affinité pour le substrat : Faible à moyenne Taux de flux : Elevé Affinité photosynthétique, K _{0,5} Km : 74-217 μ mol/L HCO ₃ ⁻ NB : L'expression de BicA est différente selon les souches cyanobactériennes : <ul style="list-style-type: none"> <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002 : expression hautement inductible sous limitation Ci <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 : expression constitutive 			
Porines	<i>porB</i>	Impliquées dans la diffusion passive de HCO ₃ ⁻ au niveau de la membrane externe (Price et al., 2004; Woodger et al., 2007)			
Systèmes d'absorption de CO₂ par les complexes NDH-I modifiés (complexes de plastoquinone oxydoréductase NADPH déshydrogénase de type I)					
NDH-I₃ Complexe d'absorption inductible sous faible concentration de CO ₂	<i>ndhF3D3ChpY, ndhAIGE, ndhB, ndhCJK, ndhH, ndhL</i>	Complexe d'absorption NADPH-dépendant impliqué dans l'assimilation de CO ₂ pour conversion en HCO ₃ ⁻ Localisation : membrane thylakoidienne Affinité pour le substrat : Elevée	CAs-like proteins : CupA et CupB	CAs-like proteins : ChpX et ChpY	

(Klughammer <i>et al.</i> , 1999; Shibata <i>et al.</i> , 2001; Maeda <i>et al.</i> , 2002)			Taux de flux : Faible Affinité photosynthétique, $K_{0,5} K_m$: 1-2 $\mu\text{mol/L CO}_2$			
NDH-I4 Complexe d'absorption constitutif du CO_2 (Shibata <i>et al.</i> , 2001; Maeda <i>et al.</i> , 2002)	<i>ndhF4D4ChpX</i> , <i>ndhAIGE</i> , <i>ndhB</i> , <i>ndhCJK</i> , <i>ndhH</i> , <i>ndhL</i>		Complexe d'absorption NADPH-dépendant impliqué dans l'assimilation de CO_2 pour conversion en HCO_3^- . Localisation : membrane cytoplasmique Affinité pour le substrat : Elevée à moyenne Taux de flux : Elevé Affinité photosynthétique, $K_{0,5} K_m$: 10-15 $\mu\text{mol/L CO}_2$			
Protéines du carboxysome						
Protéine de type BMC-H : CcmK	<i>ccmK</i>	<i>ccmK1</i> <i>ccmK2</i> <i>ccmK3</i> <i>ccmK4</i>	Protéines hexamériques qui s'assemblent en couche compacte pour former l'enveloppe du carboxysome			
Protéine de type BMC-P : CcmL	<i>ccmL</i>		Protéines pentamériques qui forme l'enveloppe du carboxysome			
Protéines core /structurales du carboxysome : CcmN	<i>ccmN</i>		Protéines impliquées dans l'assemblage du carboxysome			
Protéines core/structurales du carboxysome : CcmM	<i>ccmM</i>		La protéine CcmM joue un rôle multiple au niveau du carboxysome : - Les protéines CcmM forme l'enveloppe du carboxysome et participent à leur assemblage. Elles se lient au niveau des sous-unités de la RuBisCO (en agissant comme protéines de nucléation de la RuBisCO via la formation d'agrégats) et assurent une structure interne semi-cristalline au carboxysome. (Burnap <i>et al.</i> , 2015 ; Badger <i>et al.</i> , 2003). - Les protéines CcmM sont également impliquées dans la déshydratation du HCO_3^- pour la formation de CO_2 . - CcmM présente aussi des séquences homologues significatives avec les γ -CA au niveau N-terminal (voir plus bas).			
Protéine de type BMC-T : CcmO	<i>ccmO</i>		Protéines hexamériques qui s'assemblent en couche compacte pour former l'enveloppe du carboxysome			
Protéine de type BMC-T : CcmP	<i>ccmP</i>		Protéines formant l'enveloppe du carboxysome			
Carbonique anhydrase (α-CA, β-CA et γ-CA)	α -CA	<i>ecaA</i>	Anhydrase carbonique de classe alpha <i>ecaA</i> pourrait intervenir dans le maintien de l'équilibre entre le CO_2 et HCO_3^- ainsi que dans la détection ou la signalisation des concentrations en CO_2 dans l'environnement.			
	β -CA	<i>ecaB</i>	Anhydrase carbonique de classe bêta Localisation : extracellulaire			

		<i>ccaA, ifcA</i>	Anhydrase carbonique de classe bêta Localisation : carboxysome (So and Espie 1998)	A les 2 gènes	A les 2 gènes	
	γ -CA	<i>ccmM</i>	Anhydrase carbonique de classe gamma			
Grande sous-unité de la RuBisCO (forme IB)		<i>RbcL</i>	Protéine impliquée dans la fixation du CO ₂			
Protéine de la famille des chaperonnes: RbcX		<i>RbcX</i>	Protéine impliquée dans l'assemblage de la RuBisCO			
Petite sous-unité de la RuBisCO (forme IB)		<i>RbcS</i>	Protéine impliquée dans la fixation du CO ₂			

c) Le transport et la fixation du carbone inorganique au sein de la cellule et du carboxysome

La coque du carboxysome est sélectivement perméable avec, une entrée de Ci (HCO₃⁻ et CO₂) et du substrat RuBP, et une sortie du produit 3-PGA tout en limitant l'efflux de CO₂.

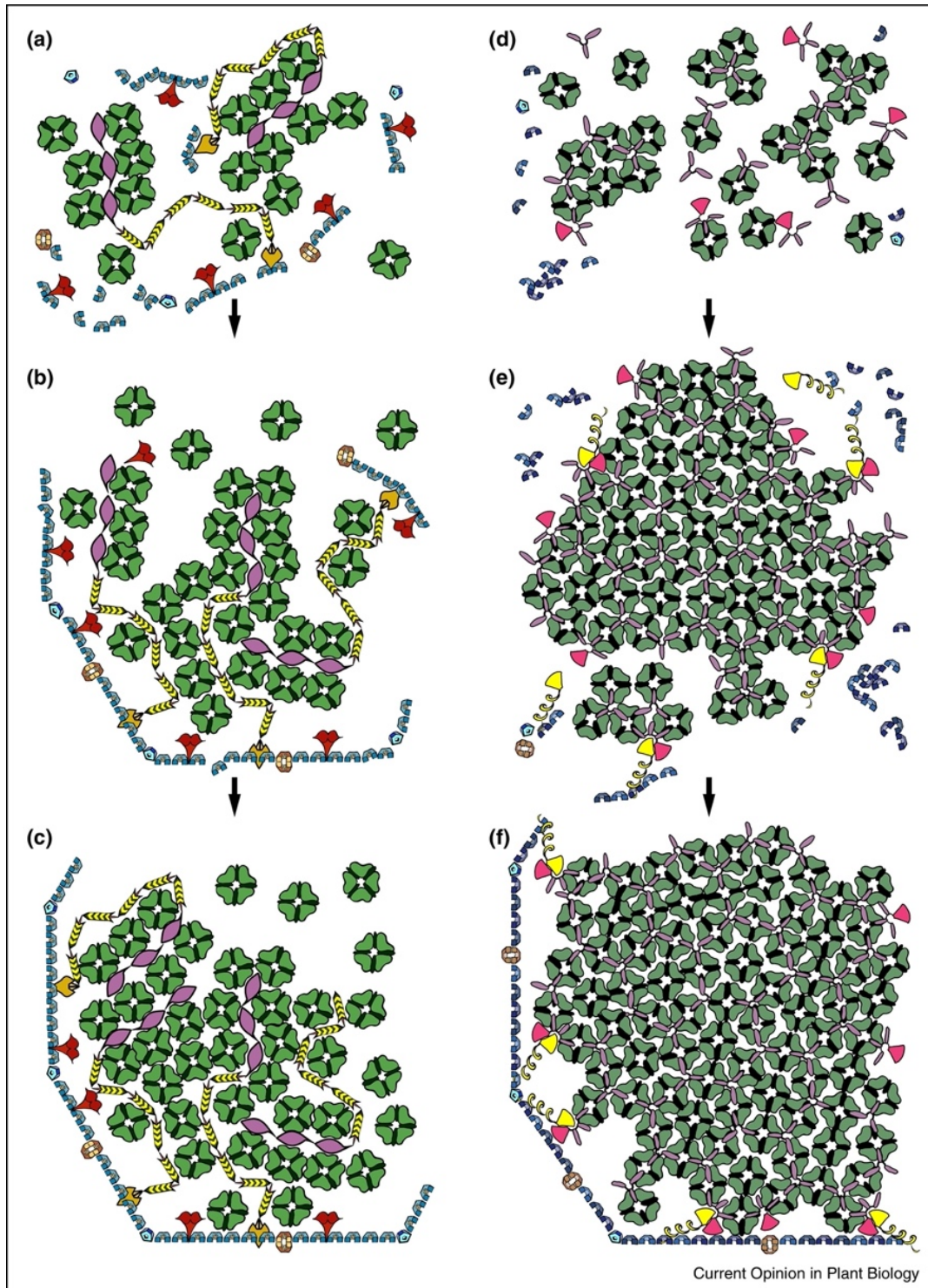
Une fois le pool de bicarbonate intracellulaire augmenté au niveau du cytosol de la cellule, celui-ci est transporté vers les carboxysomes (Figure 13.). L'anhydrase carbonique (CA) convertit le pool de HCO₃⁻ en CO₂ au sein du carboxysome qui génère alors un environnement plus concentré en CO₂ (Kaplan and Reinhold, 1999).

La RuBisCO en présence d'une plus forte concentration en CO₂ permet ainsi la conversion du ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP), au sein du carboxysome, en 3-phosphoglycérate (3-PGA) le premier produit issu de la fixation du CO₂ qui est exporté par diffusion au travers des pores des protéines hexamériques de l'enveloppe vers le cytosol de la cellule pour venir réalimenter le CCB pour la biosynthèse via la production d'hexose. Le 2-phosphoglycolate (2PG) issu de la réaction d'oxygénation de la RuBisCO est également produit, mais ce toxique est recyclé par photorespiration.

d) Assemblage des carboxysomes de type α ou β chez les cyanobactéries

Au sein des α -cyanobactéries, la biogenèse des carboxysomes s'effectue par un assemblage parallèle des protéines d'enveloppe et des protéines cargos. Au sein des β -cyanobactéries, l'assemblage s'effectue au niveau des carboxysomes préexistants et nécessite la présence d'un cluster de protéines RuBisCO avant la mobilisation des protéines enveloppes pour l'assemblage des carboxysomes (Chen *et al.*, 2013 ; Kerfeld *et al.*, 2016) (voir Figure 14.).

La RuBisCO est présente dans deux localisations : au sein du cytosol ainsi que du carboxysome. Chez la souche marine *Synechococcus* sp. WH8109 (α -cyanobactérie) par exemple, il y a beaucoup plus de RuBisCO cytosolique dites « libres » que contenues au sein des carboxysomes (Dai *et al.*, 2019). Une des hypothèses avancées par les auteurs est qu'une quantité élevée de RuBisCO dans le cytosol peut être nécessaire pour réaliser l'assemblage du carboxysome. Une autre hypothèse est qu'il pourrait exister une véritable différence au niveau de la structure et de la fonction des « RuBisCO » suivant leurs localisations dans la cellule (cytosol ou carboxysome).



Current Opinion in Plant Biology

Figure 14. Assemblage du carboxysome de type α et β .

(a)–(c) Assemblage du carboxysome de type α en parallèle de l'agrégation des protéines RuBisCO du cytosol. (d)–(f) Assemblage du carboxysome de type β après que les protéines RuBisCO du cytosol se soient densément agrégés. CcmK1, ; CcmL, ; CcmM, ; CcmN, ; CcmK3, ; CcmP, ; RbcS, ; RbcL, (Extrait de Kerfeld *et al.*, 2016). L'assemblage des β -carboxysomes commence par l'agrégation des protéines solubles RuBisCO formées des petites et grandes sous-unités, par les protéines CcmM.

B. La régulation du mécanisme de concentration du carbone (CCM) chez les cyanobactéries

1) L'influence de certains paramètres physicochimiques sur l'assimilation du carbone inorganique dans la cellule

a) Nature de l'environnement (air ambiant ou milieu aqueux)

La majorité des cyanobactéries vivent dans des habitats de types aquatiques où le carbone inorganique (Ci) sous toutes ses formes est faiblement disponible à cause de sa faible diffusion. Le Ci existe sous des formes variées avec des espèces majoritaires ou minoritaires en fonction du type d'environnement aquatique (eau douce, eau salée). La constante de Michaelis du substrat CO_2 de la RuBisCO cyanobactérienne peut dépasser les $300 \mu\text{M}$ (Tcherkez *et al.* 2006), tandis que la concentration du CO_2 dans l'eau de mer n'est que d'environ $10 \mu\text{M}$. De manière générale les espèces de carbone inorganique diffusent doucement dans des environnements aquatiques. En équilibre avec l'air ambiant, la concentration en Ci peut-être de l'ordre de $1 \mu\text{M}$ dans l'eau douce et de 2mM dans l'eau de mer (Price *et al.*, 2008).

b) Le pH

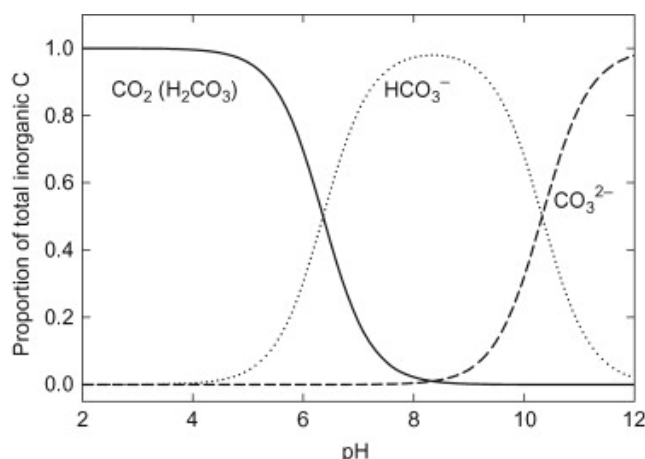


Figure 15. Les différentes formes de carbone inorganique en solution et leurs équilibres et rapports en concentrations en fonction du pH (Extrait de Göldenboth *et al.*, 2006).

De par l'existence de différentes formes de carbone inorganique (CO_2 , H_2CO_3 , HCO_3^- , et CO_3^{2-}) les changements de pH peuvent également affecter directement l'efficacité énergétique du mécanisme de concentration du carbone (CCM) cyanobactérien et la sélectivité de la RuBisCO envers son substrat CO_2 par rapport à l' O_2 (Mangan *et al.*, 2016). Ainsi, il est observé que l'augmentation du pH cytosolique de la cellule réduit les flux de Ci nécessaires à une assimilation efficace du CO_2 et qu'un carboxysome acide serait bénéfique pour le CCM ; le taux de carboxylation maximum de la RuBisCO étant atteint au niveau d'un pH proche de 7,5.

À des pH plus élevés (entre 7,5 et 8,5), les coûts énergétiques réduits du transport de HCO_3^- dans le cytosol permettent également de réduire ceux pour la fixation du carbone (Zhang *et al.*, 2017). Pour la souche *Synechococcus* sp. PCC 7942, ces valeurs de pH sont observées lorsque la souche est à l'obscurité (pH \approx 7,3) ou la lumière (pH \approx 8,4) (Mangan *et al.*, 2019).

Toujours chez le châssis cyanobactérien *Synechococcus* sp. PCC 7942, la figure 16. représente l'intensité des flux de Ci en fonction du pH cytosolique de la cellule au cours d'une expérience,

où la perméabilité des carboxysomes est fixée à 3×10^{-5} cm/s et le flux de transport de HCO_3^- réglé pour assimiler 30 mM de HCO_3^- cytosolique pour chaque unité de pH).

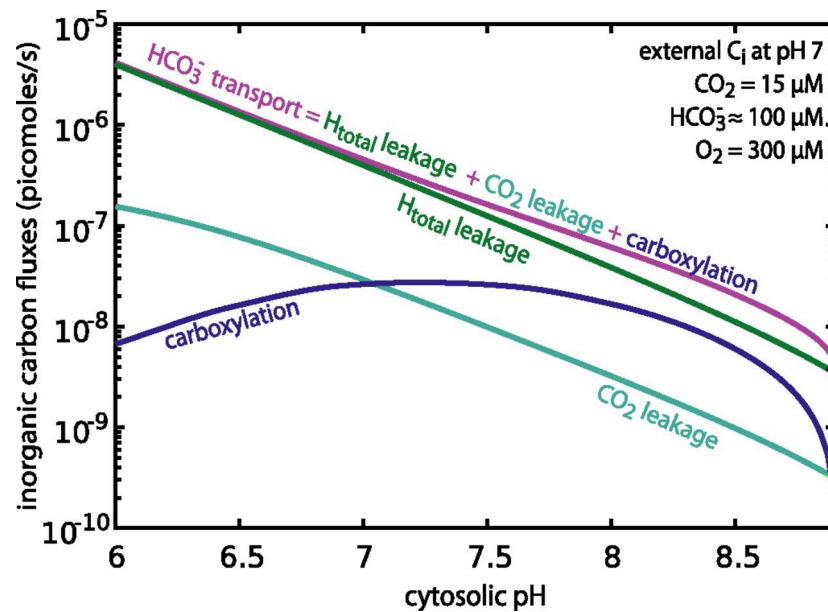


Figure 16. Graphique représentant l'intensité des flux de C_i en fonction du pH cytosolique de la cyanobactérie *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Extrait de Mangan *et al.*, 2016).

À un pH de 8,0 à 8,4, le C_i de l'eau de mer est composé d'environ 90% de HCO_3^- et 10% de CO_3^{2-} , tandis que le CO_2 dissous ne représente qu'une quantité infinitésimale (Tachky *et al.*, 2006).

c) La température

Les valeurs de solubilité et constantes de dissociation des différentes formes de carbone inorganique étant dépendantes de la température, celle-ci peut également affecter leurs concentrations et donc le métabolisme du carbone.

Il a en effet été observé que lorsque la température augmente certaines espèces de carbone inorganique peuvent former des carbonates insolubles en milieu aqueux ; leurs solubilités diminuant avec l'augmentation de la température (Figure 17. pour l'exemple du $\text{C}_i \text{CO}_2$).

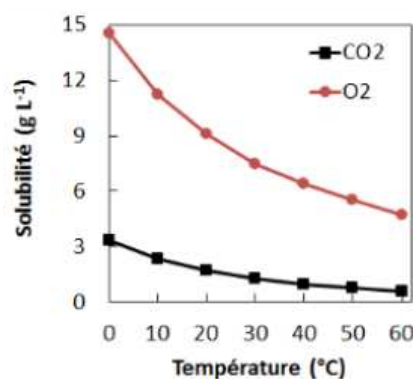


Figure 17. La solubilité de l' O_2 et du CO_2 dans l'eau en fonction de la température.

d) L'intensité lumineuse

L'absorption de carbone inorganique est lumière-dépendante et est inhibée à l'obscurité (Figure 18. ; Kaplan *et al.*, 1986, Durall and Lindblad, 2015). À la lumière, l'absorption est contrôlée par des réactions d'oxydoréduction suivies de l'activation des composants du CCM : les complexes NDH-I puis les transporteurs HCO_3^- (Liran *et al.*, 2018).

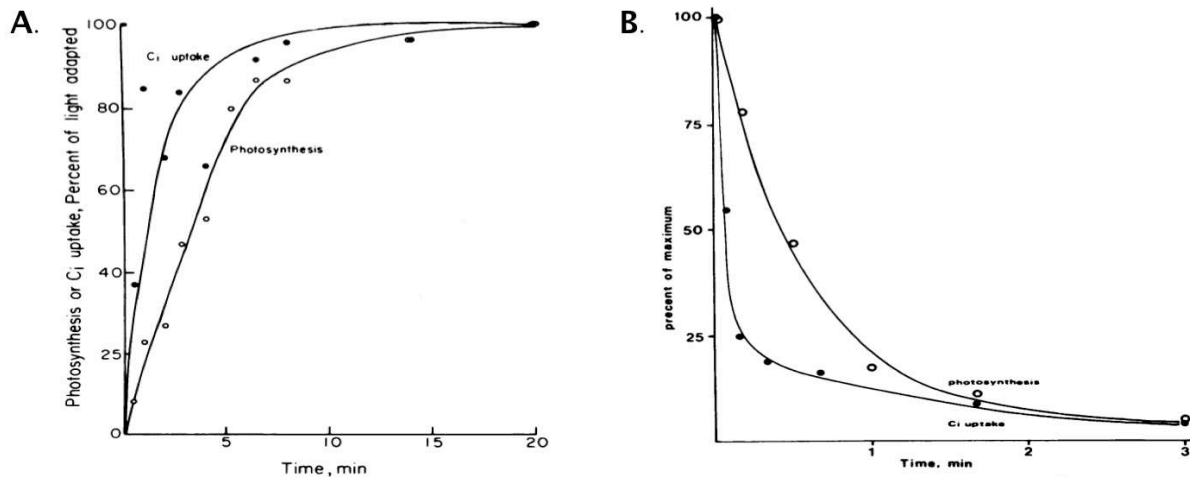


Figure 18. Induction ou inactivation de l'absorption de Ci et de la photosynthèse chez la cyanobactérie *A. variabilis* (Extrait de Kaplan *et al.*, 1986).

Points noirs : Absorption de Ci (en %), points blancs : photosynthèse (en %). La quantité de carbone inorganique concentré dans la cellule peut être suivie directement par la quantité de CO_2 radioactif (marqué au carbone 14) accumulé dans la cellule au fil du temps. **A.** Les cellules sont adaptées à l'obscurité pendant 15 min à 30°C sont illuminées et les mesures établies après 10 s d'exposition au Ci ($\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$). **B.** Les cellules sont illuminées pendant 10 min à 30°C puis la lumière est éteinte et les mesures établies après 10 s d'exposition au Ci ($\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$).

2) Les niveaux multiples de régulation du CCM chez les cyanobactéries

En réponse à divers phénomènes environnementaux (énumérés précédemment tels que des variations d'intensités lumineuses, de pH, de température de niveaux de concentration en Ci, ou de disponibilités de sources en carbone organique), les cyanobactéries opèrent une régulation « en réseau » de nombreux gènes codants pour les composants du CCM.

La régulation du CCM est réalisée à des niveaux multiples via des régulations métaboliques internes notamment au niveau de la concentration intracellulaire de métabolites dits « signaux ». Ces derniers ont une action régulatrice allostérique (ou post-traductionnelle) au niveau de régulateurs transcriptionnels ou post-transcriptionnels qui, à leur tour modulent la cinétique d'expression des gènes codants pour des composants du CCM et donc *in fine* l'activité des transporteurs. L'expression des gènes codants pour des composants du CCM est également modulée par l'action d'ARNm régulateur (non-messagers ou non-codants) contrôlant les niveaux d'ARNm codants et leur traduction en enzymes et transporteurs constituant le CCM (Figure 19.) (Burnap *et al.*, 2015). Par ailleurs, les gènes codants pour des composants du CCM sont souvent organisés en opéron et leur expression peut être réalisée de manière constitutive ou inductible (Burnap *et al.*, 2015).

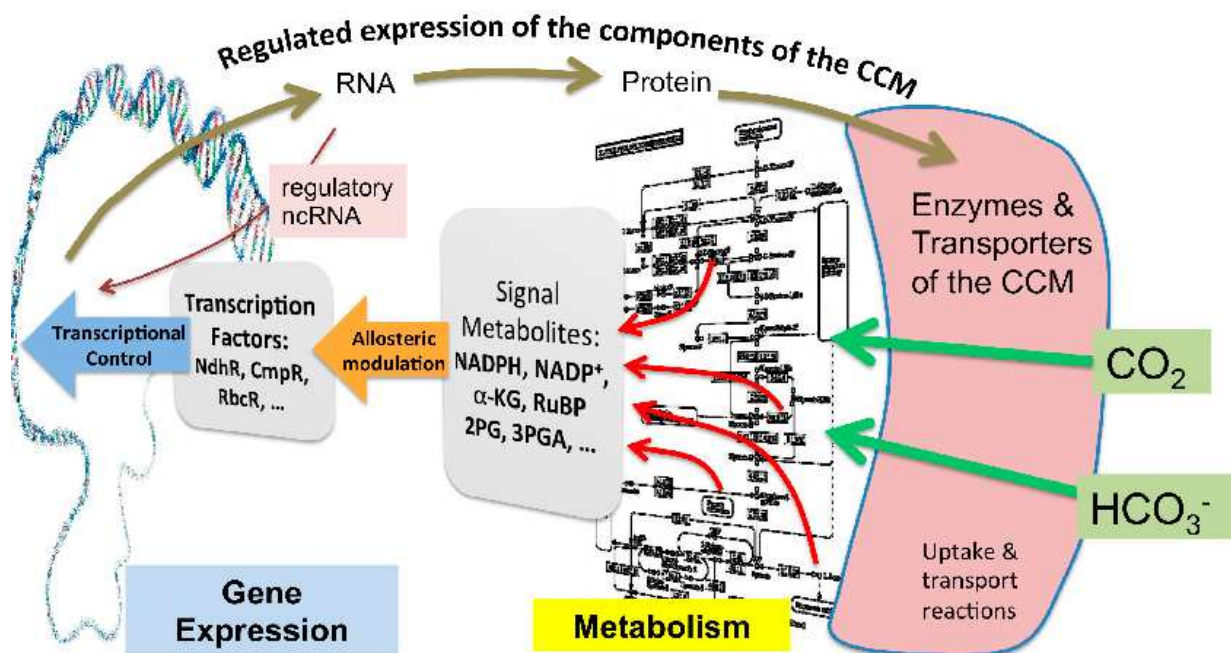


Figure 19. Aperçu des différents niveaux de régulation permettant d'ajuster l'activité des mécanismes de concentration du carbone (CCM) selon les niveaux de carbone inorganique ambiant. (Extrait de Burnap et al., 2015)

Il existe une balance de concentrations en carbone/azote inorganiques régulée par le métabolisme via des régulateurs comme la protéine PII. Celle-ci agit principalement comme une molécule signal des disponibilités en azote, mais aussi des concentrations en Ci dans le milieu, ces dernières contrôlant son état de phosphorylation (Schwarz et Forchhammer, 2005).

3) La régulation du CCM chez les différentes souches modèles de β -cyanobactéries.

Par comparaison avec les α -cyanobactéries, les β -cyanobactéries ont une bien meilleure capacité à réguler génétiquement leurs CCM de par la diversité et l'affinité de leurs transporteurs de Ci ; cette capacité est corrélée avec leurs colonisations d'habitats très divers et variables en concentrations en Ci.

Chez les β -cyanobactéries, l'expression des gènes sensibles au CO_2 est contrôlée par un ou deux régulateurs de transcription de type LysR appelés CcmR (NdhR) et CmpR, eux-mêmes appartenant à la sous-famille de régulateurs du cycle de Calvin CbbR (ou RbcR) (Figge et al., 2001 ; Price et al., 2008).

a) *Synechocystis* sp. PCC 6803

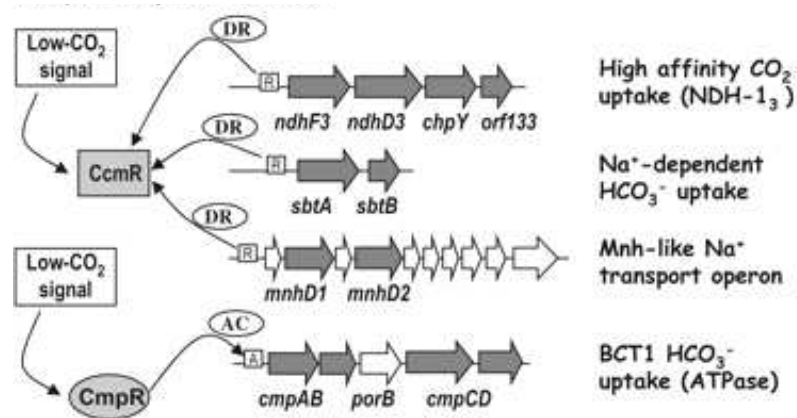


Figure 20. Régulation transcriptionnelle des gènes sensibles au CO₂ chez la souche *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Extrait de Price *et al.*, 2008).

Au sein d'un environnement avec une faible concentration de CO₂, le facteur de transcription CcmR se dissocie de la région de liaison d'un répresseur du promoteur (par interaction avec l'ARN polymérase) entraînant une dérèglement transcriptionnelle de certains gènes. Dans le même environnement, le facteur de transcription CmpR s'associe à la région d'activation du promoteur entraînant une activation transcriptionnelle de certains gènes (Price *et al.*, 2008). Abréviations : DR, dérèglement transcriptionnelle ; AC, activation transcriptionnelle ; R, région de liaison d'un répresseur du promoteur ; A, région de liaison d'un activateur du promoteur.

Chez *Synechocystis* sp. PCC 6803, sous faible concentration en Ci, des métabolites tels que le ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP), l'oxoglutarate (2-OG), le phosphoglycolate (2-PG) ou le NADP⁺ s'accumulent et agissent comme des signaux en se fixant à des facteurs de transcription comme NdhR ou CmpR. Ces derniers activent l'expression régulée de gènes impliqués dans le transport du Ci tels que *sbtAB* (pour le complexe SbtA), *ndhF3/ndhD3/ChpY/orf133* (complexe NDH-I₃), *bicA* (complexe BicA) pour le facteur de transcription NdhR et l'opéron *cmpAB/porB/cmpCD* pour le facteur de transcription CmpR. Chez *Synechocystis* sp. PCC 6803, les transporteurs HCO₃⁻ dépendant du sodium sont régulés de manières diverses : BicA semble être transcrit de façon constitutive (Burnap *et al.*, 2013) tandis que BCT1 et SbtA sont régulés de manière positive par transcription lorsque les cellules sont exposées à des niveaux de CO₂ limitants (Wang *et al.*, 2004).

Il existe d'autres régulateurs impliqués dans le CCM comme CyAbrB2 (appartenant à la famille de régulateurs AbrB) qui contribue à la régulation transcriptionnelle du CCM à l'acclimatation à de faibles concentrations en CO₂ (Orf *et al.*, 2016) ou encore LexA, un régulateur essentiel à la viabilité cellulaire en photoautotrophie, pour qui plupart des gènes sensibles au régulateur LexA sont impliqués dans l'assimilation du carbone ou bien contrôlés par les disponibilités en carbone inorganique (Domain et Chauvat., 2004).

b) *Synechococcus* sp. PCC 7942

La régulation des gènes sensibles au CO₂ chez *Synechococcus* sp. PCC 7942 n'est pas encore claire, car cette souche n'a pas de gène *ccmR* identifiable. En revanche, la souche dispose du facteur de transcription CmpR qui lui régule l'expression de gènes impliqués dans le transport du Ci tels que l'opéron *cmpAB/porB/cmpCD* (transporteur BCT1) en agissant comme un activateur transcriptionnel (Omata *et al.*, 2001).

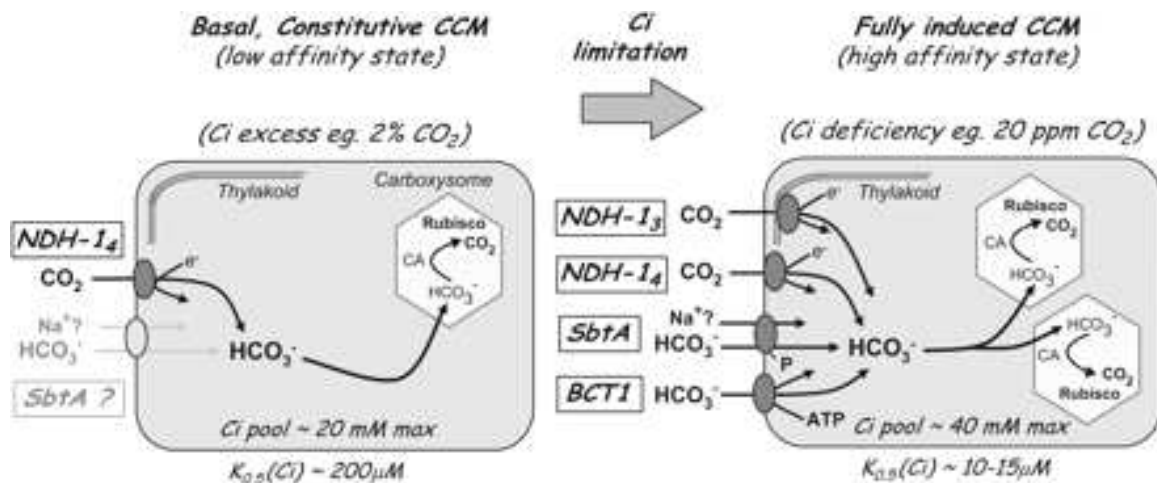


Figure 21. Représentation des composants CCM présents lors des deux états extrêmes du CCM chez la souche *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Extrait de Price *et al.*, 2008).

Dans des conditions où le carbone inorganique est en excès (2% CO₂) dans l'environnement, le CCM est dans un état de faible affinité pour le substrat Ci et celui-ci est partiellement induit ; seul le système d'absorption de CO₂ NDH-I₄ est alors constitutivement activé. Dans des conditions où le carbone inorganique est déficient (20 ppm de CO₂), le CCM est dans un état de haute affinité pour le substrat Ci et celui-ci est entièrement induit ; cela se traduit par l'activation de 3 autres systèmes que sont : NDH-I₃, SbtA et BCT1.

c) *Synechococcus* sp. PCC 7002

Chez *Synechococcus* sp. PCC 7002, NdhR agit comme un régulateur négatif pour tous les gènes sensibles au CO₂ connus (des complexes NDH-I₃, SbtA et BicA entre autres) (Burnap *et al.*, 2015).

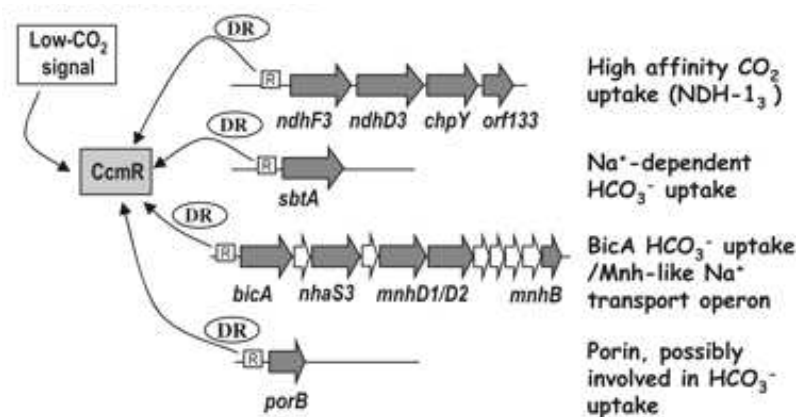


Figure 22. Régulation transcriptionnelle des gènes sensibles au CO₂ chez la souche *Synechococcus* sp. PCC 7002 (Extrait de Price *et al.*, 2008).

Au sein d'un environnement avec une faible concentration de CO₂, le facteur de transcription CcmR se dissocie de la région de liaison d'un répresseur du promoteur (par interaction avec l'ARN polymérase) entraînant une dérégulation transcriptionnelle de certains gènes. Dans le même environnement, le facteur de transcription CmpR s'associe à la région d'activation du promoteur entraînant une activation transcriptionnelle de certains gènes (Price *et al.*, 2008). Abréviations : DR, dérégulation transcriptionnelle ; R, région de liaison d'un répresseur du promoteur.

Lors d'un signal faible en CO₂, Le facteur de transcription CcmR se dissocie de la région de liaison d'un répresseur du promoteur entraînant une dérégulation transcriptionnelle des gènes impliqués dans le transport du Ci tels que *sbtA* (pour le complexe SbtA), *ndhF3/ndhD3/ChpY/orf133* (complexe NDH-I₃), *bicA/nhaS3/mnhD1D2/mnhB* (complexe BicA) et *porB* (Porines formants des protéines membranaires). Lors d'un signal élevé de CO₂, les gènes impliqués dans le transport de Ci des complexes NDH-I sont exprimés ainsi que ceux impliqués dans le transport de Ci du complexe BicA, à moindre niveau. PorB (Price *et al.*, 2004 ; Woodger *et al.*, 2007).

CHAPITRE 2. Le cycle de Calvin-Benson et les stratégies d'ingénierie pour l'optimisation de la capture du CO₂

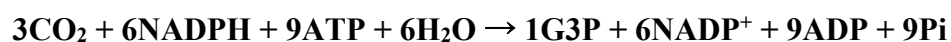
I. Le cycle de Calvin Benson-Bassham

A. Qu'est-ce que le cycle de Calvin-Benson ?

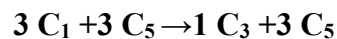
Le cycle de Calvin-Benson (CCB) est une voie métabolique qui est impliquée dans une grande partie de la fixation biologique du CO₂ sur terre, environ 250 gigatonnes par an (Field *et al.*, 1998). Le CCB est la voie anabolique passerelle du CO₂, puisque son assimilation et sa pénétration dans la biosphère sont réalisées par des organismes autotrophes pour la génération de leur biomasse et la transformation du CO₂ en une vaste panoplie de composés métaboliques d'intérêt. Le CCB est la voie qui consomme le plus d'énergie sous la forme d'ATP et de pouvoir réducteur fourni par la photosynthèse : la synchronisation entre le CCB et l'activité photosynthétique est donc essentielle afin de maintenir les balances énergétiques et redox.

Les réactions enzymatiques « indépendantes » de la lumière du CCB sont composées de 11 enzymes catalysant 13 réactions différentes divisées en 3 étapes majeures : la première est la fixation du CO₂ ou de l'O₂ par la carboxylation ou l'oxygénation du substrat ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP) puis la réduction du 3-phosphoglycérate (PGA) en 3-phosphate de glycéraldéhyde (G3P) et enfin la régénération du ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP) (Figure 23.).

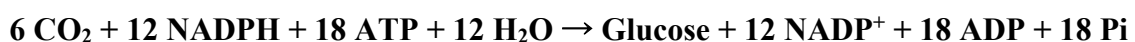
La réaction nette de trois cycles du CCB est la suivante :



En tenant compte uniquement des squelettes carbonés produits après 3 cycles du CCB avec l'entrée et l'assimilation de trois molécules C₁ (3 CO₂), au total une molécule C₃ (1 G3P) et trois molécules C₅ (3 RuBP) sont régénérées :



Afin de générer une molécule de glucose, 6 CO₂ sont fixés au sein du CCB en utilisant 12ATP et 12NADPH, et 6RuBP sont régénérés à partir de 6 ATP, soit la réaction nette de six cycles du CCB égale à :



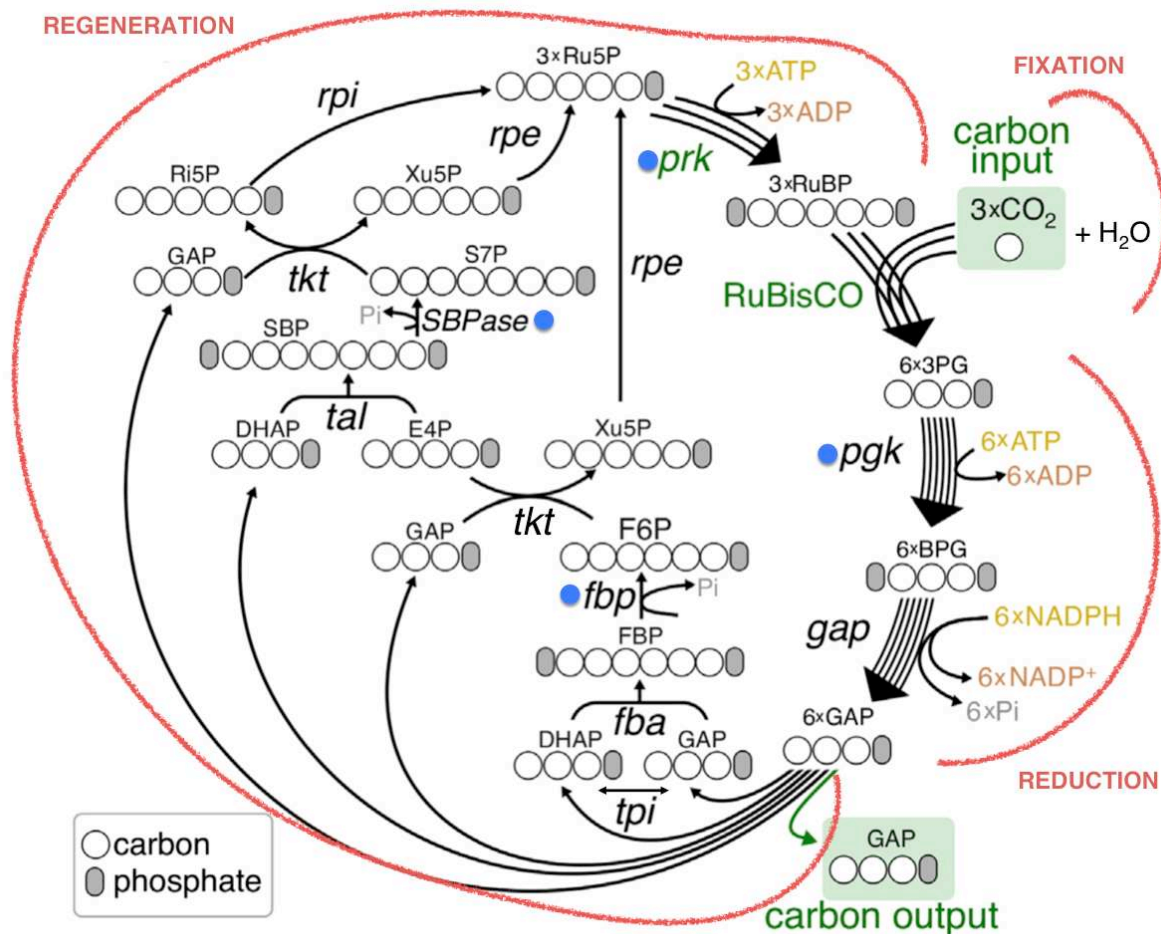


Figure 23. Le cycle de Calvin-Benson-Bassham

Les noms des enzymes du CCB sont abrégés : *prk*, phosphoribulokinase ; RuBisCO, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase ; *pgk*, phosphoglycérate kinase ; *gap*, glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase ; *tpi*, triose phosphate isomérase ; *fba*, fructose-1,6-bisphosphate aldolase ; *fbp*, fructose-1,6-bisphosphatase ; *tkt*, transkétolase ; *tal*, aldolase ; SBPase, sédoheptulose-1,7-bisphosphatase ; *rpi*, ribose-5-phosphate isomérase ; *rpe*, ribulose-5-phosphate 3-épimérase. Les noms des métabolites du CCB sont abrégés ; RuBP, ribulose-1,5-bisphosphate ; 3-PGA, 3-phosphoglycérate ; 1,3-PGA, 1,3-bisphosphoglycérate ; G3P, glycéraldéhyde-3-phosphate ; DHAP, dihydroxyacétone phosphate ; F1,6P, fructose-1,6-bisphosphate ; F6P, fructose-6-phosphate ; X5P, xylulose-5-phosphate ; E4P, erythro-4-phosphate ; S1,7P, sédoheptulose-1,7-bisphosphate ; S7P, sédoheptulose-7-phosphate ; R5P, ribose-5-phosphate ; RuP, ribulose-5-phosphate ; *trx*, thiorédoxine. Les points bleus correspondent à la régulation rédox des *trx* sur certaines enzymes du CCB.

Le CCB implique des intermédiaires phosphorylés (ovales gris sur la figure 23) à trois, quatre, cinq, six et sept atomes de carbone (spécifiés par le nombre de ronds blanc sur la figure 23). En plus de jouer un rôle métabolique pour le CCB, ces intermédiaires sont également partagés avec les voies métaboliques du pentose phosphate oxydatif (OPP) et de la glycolyse, et servent également de précurseurs à d'autres éléments constitutifs de la cellule (acides nucléiques, acides aminés et métabolites secondaires). Comme ces voies métaboliques fonctionnent en sens inverse, le CCB étant impliqué dans la synthèse des carbones organiques, tandis que les voies OPP et la glycolyse dans leur catabolisation, elles sont régulées de manière opposée et diurne (Kaiser, 1979).

Le CCB possède trois enzymes uniques, la RuBisCO, qui est l'enzyme catalysant la fixation du CO₂ sur la molécule accepteur de cinq carbones, le ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP) ; la phosphoribulokinase, qui régénère le RuBP ; et la fructose-1,6-bisphosphatase/sédoheptulose-1,7-bisphosphatase (BiBPase ou SBPase/FBPase) bifonctionnelle chez les cyanobactéries.

1) La fixation du CO₂ par la carboxylation du ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP)

Au sein du cytoplasme, les réactions indépendantes de la lumière sont initiées par la ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase (RuBisCO) qui possède une double activité enzymatique soit de carboxylation, soit d'oxygénation. En fonction de l'activité mise en jeu, les deux molécules à 3 carbones formées seront respectivement deux molécules de 3-phosphoglycérate (3-PGA) à partir d'un substrat CO₂ ou une molécule de 3-PGA et une molécule de phosphoglycolate à partir d'un substrat O₂ (Figure 24.).

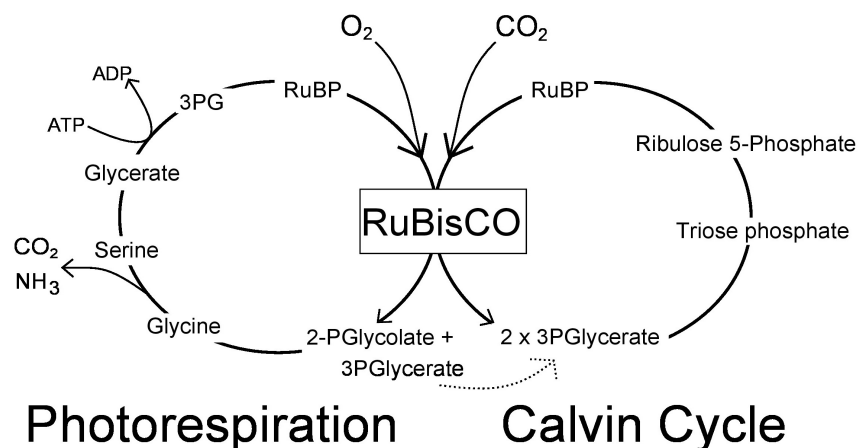


Figure 24. Représentation simplifiée des deux activités oxygénase et carboxylase de la RuBisCO

a) L'activation de la RuBisCO

Les processus d'activation et de catalyse de la RuBisCO sont complexes : en effet, afin que le site actif de la RuBisCO soit prêt à se lier aux substrats CO₂ ou O₂, puissent avoir lieu, plusieurs réactions catalytiques se succèdent (Figure 25. ci-dessous). La carboxylation par un CO₂ non-substrat, d'un acide aminé spécifique (la Lys201) présent dans le domaine N-terminal de la grande sous-unité RbcL de la RuBisCO, appelée réaction de carbamylation est amorcée et suivie de la liaison d'un ion magnésium Mg²⁺ permettant la stabilisation du carbamate et rendant l'enzyme catalytiquement active. Enfin, le substrat à 5 carbones RuBP vient se lier au site actif de la RuBisCO, où il est alors énoilé en un énediol, impliquant un changement structural de la boucle 6 et de la queue flexible du domaine C-terminal.

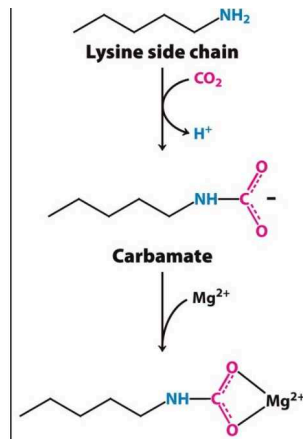


Figure 25. Les réactions impliquées dans le processus d'activation de la RuBisCO (Biochemistry : A Short Course, Second Edition, 2013 W. H. Freeman and Company).

Si le substrat RuBP des réactions de carboxylation ou d'oxygénation, se lie avant la formation du carbamate, l'enzyme devient inactive. Elle doit être réactivée par l'activase qui consomme de l'ATP et change la conformation de l'enzyme pour libérer le RuBP et permettre la formation du carbamate (Kellogg et Juliano 1997 ; (Parry 2013, Mueller-Cajar *et al.*, 2014). L'activité de l'activase est déterminée par le ratio ATP/ADP et par l'état rédox des thiorédoxines et donc le niveau d'activité de l'activase dépend de l'intensité lumineuse.

b) L'activité de carboxylation de la RuBisCO

À chaque cycle du CCB, la carboxylation par la RuBisCO permet la formation d'un groupement carboxyle (COOH) sur une molécule organique RuBP via la fixation d'une molécule de CO₂ comme substrat pour la synthèse de 2 molécules de 3-PGA. La réaction de la RuBisCO est très exergonique, c'est-à-dire qu'elle réalise une réaction chimique spontanée et irréversible qui libère une forte quantité d'énergie libre (variation de son enthalpie libre de Gibbs (ΔG) négative). La réaction se décompose en plusieurs étapes : tout d'abord la formation d'un intermédiaire énédiolate, suivi de sa carboxylation par une attaque nucléophile du CO₂ et la formation de 2-carboxy-3-céto-D-arabinitol-1,5-bisphosphate, l'hydratation de ce dernier en un intermédiaire hydraté très instable, qui vient former par clivage aldolique deux molécules de 3-PGA (Figure 26).

Pour 3 CO₂ fixés par carboxylation de 3 molécules RuBP (3 C₅), six molécules de 3-G3P sont générées (6 C₃).

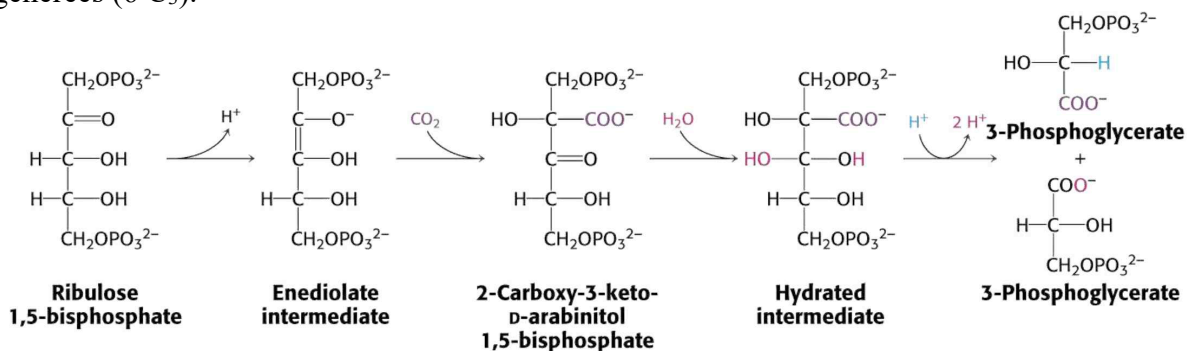


Figure 26. Les étapes et intermédiaires de réaction de la réaction de carboxylation par la RuBisCO (Biochemistry : A short course, Second edition © 2013 W.H Freeman and company).

c) L'activité d'oxygénation délétère de la RuBisCO

L'efficacité de l'assimilation du CO₂ par la RuBisCO est néanmoins compromise par une réaction concurrentielle avec le dioxygène atmosphérique (substrat de l'activité oxygénase) appelée photorespiration qui implique la consommation de 2 ATP. La photorespiration est considérée comme une réaction de gaspillage, car le carbone organique est converti en CO₂ sans production d'ATP, de NADPH ou d'un autre métabolite riche en énergie. Cette réaction à un coût réel en termes de déplétion des substrats énergétiques et de perte de la capacité de séquestration du carbone et produit une molécule toxique qui doit donc être détoxifiée

La réaction d'oxygénation par la RuBisCO se décompose en plusieurs étapes : tout d'abord la formation d'un intermédiaire énediolate qui réagit avec l'O₂ pour former un intermédiaire hydroperoxyde, qui se décompose ensuite en une molécule de 3-PGA et une molécule à deux carbones, le 2-phosphoglycolate (2-PG) qui est toxique pour la cellule et inhibe le CCB via l'isomérase TPI (Husic *et al.*, 1987). Le 2-PG ne pouvant être utilisé pour la synthèse de glucides, est recyclé et métabolisé au sein du cycle photorespiratoire du glycolate (ou cycle C2) en une molécule de CO₂ et une molécule de sérine, en consommant NADPH et ATP.

Les cyanobactéries ont développé des stratégies pour recycler deux molécules de 2-PG en une molécule de 3-PGA, tout en libérant du CO₂. Ainsi, 75% du carbone organique fixé est récupéré et utilisé pour synthétiser le RuBP et recharger le CCB (Forchhammer *et al.*, 2019). Chez *Synechocystis* sp. PCC 6803, la mesure du flux photorespiratoire (mesuré par marquage au ¹³C) est plutôt faible, et représente entre 0,5 et 1 % de l'assimilation du carbone (Eisenhut *et al.*, 2008b).

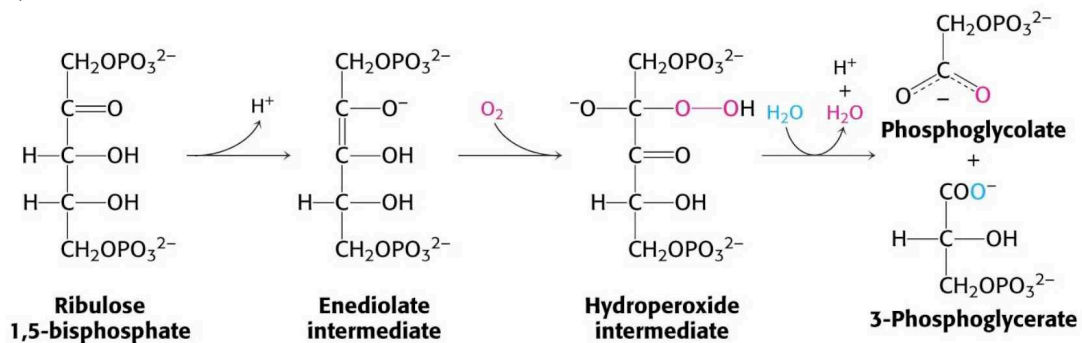


Figure 27. Les étapes et intermédiaires de réaction de la réaction d'oxygénation par la RuBisCO (Biochemistry : A short course, Second edition © 2013 W.H Freeman and company).

2) La réduction du 3-phosphoglycérate (PGA) en glycéraldéhyde 3-phosphate (G3P).

La deuxième étape du CCB consiste en la réduction du 3-PGA en 1,3-biphosphoglycérate (BPG) lui-même réduit en glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P). Ces deux réactions impliquent deux enzymes : la phosphoglycérate kinase (PGK) et la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) qui nécessitent respectivement de l'ATP (environ 2/3 de la consommation totale du CCB) et du NADPH générés au niveau de la phase photochimique. Ces réactions sont appelées réactions de réduction, car elles permettent un gain d'électrons (via le NADPH) par le 3-PGA.

La fixation de 3 molécules de CO₂ résulte en la synthèse de 6 molécules de PGA qui sont converties en 6 molécules de triose phosphate G3P, dont seule 1 molécule est fournie à la cellule pour divers processus de biosynthèse, et où les 5 autres sont nécessaires pour régénérer 3

molécules de RuBP et dont une partie peut être isomérisée en dihydroxyacétone phosphate (DHAP) par la triose phosphate isomérase (TPI) (Figure 28.).

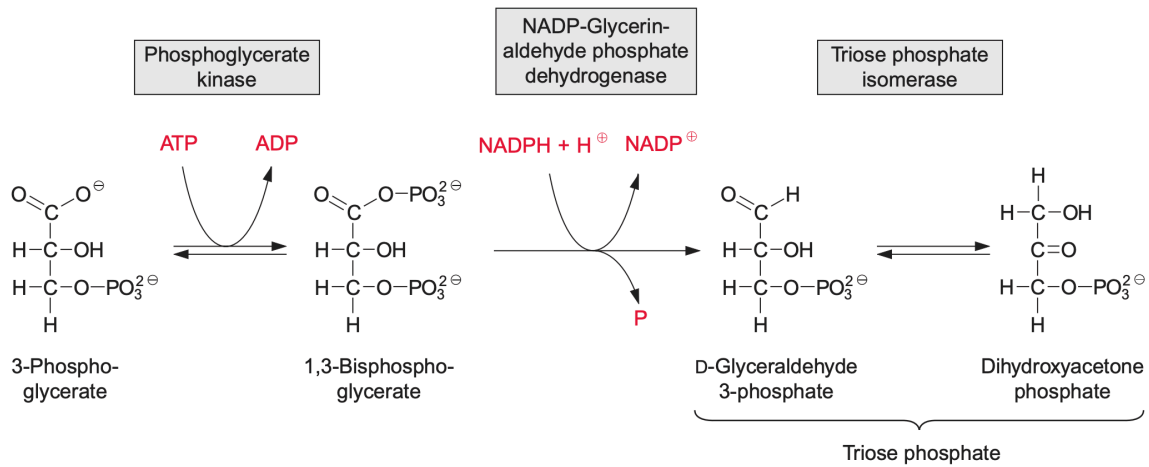


Figure 28. La réduction du 3-phosphoglycérate (PGA) en glycéraldéhyde 3-phosphate (G3P). (Extrait de Heldt & Piechulla, 2011)

3) La régénération du ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP)

Dans cette troisième et dernière étape du CCB, une série de réactions enzymatiques convertit cinq molécules C₃ (G3P ou DHAP) en trois molécules C₅ (RuBP) pour reconstituer le pool de la molécule accepteur de CO₂ qui est nécessaire pour la réaction de la RuBisCO. Dans une optique de réarrangement des atomes de carbone pour la régénération du RuBP à partir des trioses phosphates, des molécules en C₃, C₄, C₅, C₆ et C₇ (trioses, tétroses, pentoses, hexoses et sédoheptulose) sont interconverties par les deux enzymes du CCB la transkétolase et la transaldolase (Figure 29.).

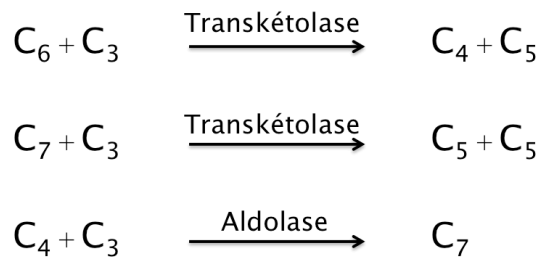


Figure 29. Les réactions enzymatiques impliquées dans la régénération du RuBP et l'interconversion des molécules carbonées

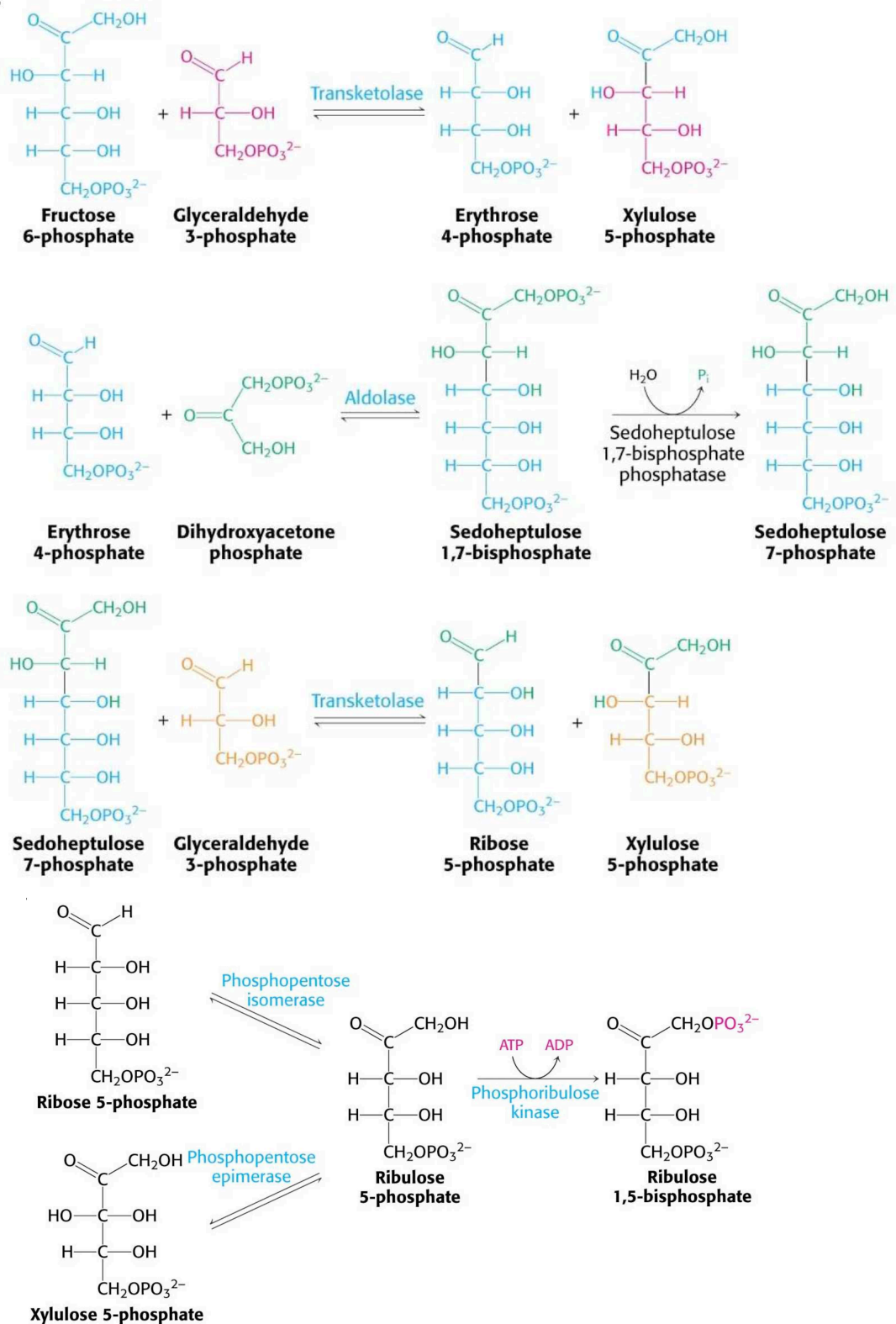


Figure 30. Détails de la suite de réactions enzymatique pour la régénération du RuBP
 La transkétolase intervient dans le transfert d'une unité à deux carbones ($\text{O}=\text{C}-\text{CH}_2\text{OH}$) d'un cétose à un aldose, tandis que l'aldolase catalyse une condensation aldolique entre le phosphate de dihydroxyacétone et un aldéhyde (Biochemistry : A short course, Second edition © 2013 W.H Freeman and company).

La réaction nette de régénération du RuBP après six cycles du CCB est la suivante :



B. Les 11 enzymes du cycle de Calvin-Benson-Bassham

Le CCB est assuré par 11 enzymes qui catalysent 13 réactions. Chez les cyanobactéries, toutes les enzymes du CCB sont localisées au niveau du cytosol à l'exception de la RuBisCO située au niveau du carboxysome. Les enzymes "clés" sont la RuBisCO, la FBPase, la SBPase (ou BiBPase pour les cyanobactéries) et la PRK. Ces enzymes jouent un rôle majeur, car elles déterminent le taux de fixation du CO₂.

1) La Phosphoribulokinase (PRK)

La phosphoribulokinase (PRK) est une enzyme soluble qui appartient à la famille des transférases. Elle catalyse la phosphorylation ATP-dépendante du Ru5P (au niveau d'un groupe hydroxyle), en RuBP ; l'ATP interagissant avec la région positivement chargée de l'enzyme.

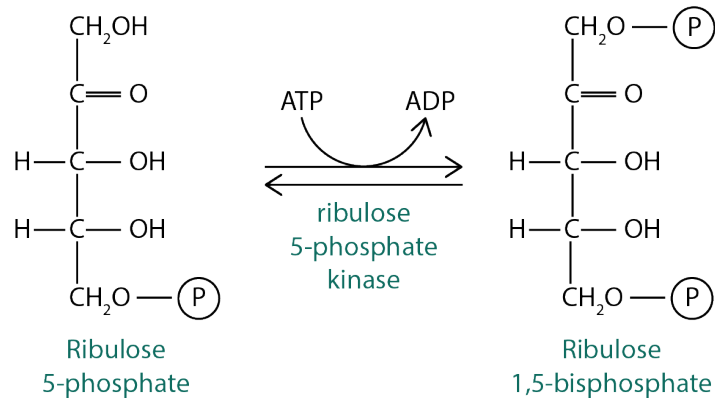


Figure 31. La réaction de la PRK

Jusqu'à présent, deux classes de PRK ont été identifiées (Read et Tabita, 1994 ; Brandes *et al.*, 1996). La classe la plus étudiée est un octamère de sous-unités d'environ 30 kDa présent chez les protéobactéries photosynthétiques. Chez les cyanobactéries et les plantes supérieures, la PRK se présente respectivement sous la forme d'un tétramère et d'un dimère, chaque sous-unité étant d'environ 40 kDa (Tabita, 1988, Read et Tabita, 1994).

La PRK possède 2 ponts disulfures conservés aux deux extrémités N- et C-terminales de sa séquence. La PRK est rédox-réglée notamment par l'association réversible avec deux enzymes que sont : la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) et la protéine oxydée CP12, résultant de la formation d'un complexe GAPDH/CP12/PRK permettant la régulation du CCB (pour plus de détails, voir chapitre 5). Il a été observé que la formation d'un pont disulfure en N-terminal inactive la plupart de l'activité de l'enzyme (Hackenberg *et al.*, 2018 ; Tamoi *et al.*, 2005 ; Marri *et al.*, 2005), mais peut être réversiblement réduit chez les plantes par la thiorédoxine f (Brandes *et al.*, 1996). L'activité de la PRK est également régulée par deux effecteurs allostériques, le NADH (activateur) et l'AMP (inhibiteur) qui sont en compétition pour occuper le site de fixation de l'enzyme (Marsden et Codd, 1984).

2) La Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygénase (RuBisCO)

a) La structure et l'assemblage de la RuBisCO

La RubisCO cyanobactérienne est une holoenzyme formée d'un complexe hexadécamérique (L8S8) d'environ 550 kDa composé de huit grandes sous-unités RbcL d'environ 50–55 kDa au cœur de l'enzyme entourées de huit petites sous-unités RbcS d'environ 12–18 kDa qui fonctionnent pour stabiliser le complexe et probablement pour augmenter l'activité enzymatique.

L'assemblage de la RubisCO implique les grandes sous-unités RbcL avec ou sans des petites sous unités RbcS, ainsi que l'action de protéines chaperonnes identifiées comme la RuBisCO activase (RbcX) indépendante de l'ATP, GroEL/ES, Raf1 et Raf2 (Gruber et Feiz, 2018).

- La grande et la petite sous-unités de la RuBisCO : RbcL et RbcS

La grande sous unité de la RuBisCO (RbcL) codée par *rbcL* porte le site actif de l'enzyme et est ainsi directement responsable de la fixation du CO₂ au sein du CCB. Environ 30% des acides aminés de RbcL sont impliqués dans des associations intermoléculaires. Le rôle de la petite sous unité (RbcS) joue un rôle au niveau de la conformation globale de l'holoenzyme.

- Les protéines chaperonnes et leurs rôles dans la structure et l'assemblage de la RuBisCO

Des systèmes auxiliaires constitués de protéines chaperonnes sont impliqués dans le repliement et l'assemblage des sous-unités RuBisCO sont nécessaires.

- Protéines chaperonnes GroEL/GroES

Chez les cyanobactéries, le repliement de la grande sous-unité RbcL est dans un premier temps médié par la protéine chaperonne GroEL associée au complexe protéique GroES conduit à la formation d'un dimère de RbcL (Hayer-Hartl *et al.*, 2016). Chez les plantes supérieures, les protéines homologues à GroEL/GroES impliquées dans le repliement sont Cpn60 et Cpn20.

Chez les cyanobactéries, deux gènes *groEL*, (*groEL1* et *groEL2*) sont présents généralement dans leurs génomes. L'impossibilité d'inactiver *groESL1* de la souche *Synechococcus* sp. PCC 7942 indique que cet opéron est indispensable à la croissance en conditions de culture standard (Sato *et al.*, 2007) tandis que la protéine GroEL2 est non essentielle sauf dans des conditions de stress (Sato *et al.*, 2008).

- Protéines chaperonnes RbcX : la RuBisCO activase

La stabilisation du dimère RbcL et la poursuite de l'assemblage de RbcL8 est médiée par la RuBisCO activase (RbcX), une protéine AAA+ (ATPase Associée à diverses Activités cellulaires) qui existe sous une forme hexamérique (Mueller-Cajar *et al.*, 2011). Elle joue un rôle dans l'assemblage du carboxysome et sa distribution subcellulaire, mais également dans l'activation de la RuBisCO, en modifiant les structures de son site actif et en libérant ses différents inhibiteurs (Sun *et al.*, 2019). Chez la plupart des cyanobactéries avec la forme IB de RuBisCO (β -cyanobactéries), la RuBisCO activase est le produit du gène *rbcX* généralement

situé dans un opéron entre les gènes *rbcL* et *rbcS*, suggérant la relation structurelle et/ou fonctionnelle de la protéine avec la RuBisCO (Bracher *et al.*, 2017). Cependant, il y a quelques exceptions notamment chez la cyanobactérie modèle *Synechococcus* sp. PCC 7942 où le gène *rbcX* est situé à plus de 100 kb de l'opéron *rbcLS*. En revanche, selon les souches de cyanobactéries le rôle de RbcX est plus ou moins essentiel : chez *Synechococcus* sp. PCC 7002, l'analyse structurale de RbcX a montré que la protéine a un rôle prééminent dans la stabilisation et la facilitation de l'assemblage de la RuBisCO (Saschenbrecker *et al.*, 2007 ; Liu *et al.*, 2010) ; de plus, l'inactivation partielle de *rbcX* entraîne une réduction significative de la solubilité et de l'activité de la RuBisCO (Onizuka *et al.*, 2004). En revanche, chez les souches *Synechocystis* sp. PCC 6803 et *Synechococcus* sp. PCC 7942, RbcX est non essentielle (Kolesinski *et al.*, 2017 et Bracher *et al.*, 2017), mais interagit aussi avec RbcL (Saschenbrecker *et al.*, 2007 ; Liu *et al.*, 2010). Cette interaction est l'une des raisons avancées concernant les limites de l'évolutivité de la RuBisCO de par notamment la pression contraignante et exigeante de la RbcX avec de larges régions conservées de la RuBisCO (Durao *et al.*, 2015). Certaines études montrent également que chez les organismes dépourvus de RbcX, comme les algues rouges, la RuBisCO a évolué de meilleures propriétés catalytiques (Andrews *et al.*, 2003 ; Durao *et al.*, 2015).

➤ Protéines chaperonnes Raf1/ Raf 2

La protéine Raf1 (pour Facteur d'assemblage de la RuBisCO) est présente chez toutes les cyanobactéries qui possèdent la protéine chaperonne RbcX. Les deux protéines RbcX et Raf1 stabilisent les deux l'unité RbcL2 en utilisant différents sites d'interaction avec RbcL (Hauser *et al.*, 2015). Chez *Synechococcus* sp. PCC 7942, une étude a révélé par cryo- microscopie que Raf1 facilite l'assemblage de la RuBisCO en médiant la formation du dimère RbcL et les interactions dimère-dimère. Les cellules dépourvues de Raf1 présentent une réduction de la teneur en RuBisCO, de l'activité de fixation du CO₂ et de la croissance cellulaire (Huang *et al.*, 2020).

Une autre chaperonne, Raf2, conservée chez les bactéries autotrophes, les cyanobactéries, les algues et les plantes, a été identifiée et sa structure résolue, mais pour l'instant son rôle et sa fonction physiologique n'ont pas encore été totalement élucidés (Weatley, 2014).

b) *Les différentes formes structurelles de la RuBisCO*

Il existe quatre formes structurelles de RuBisCO dans la nature, dont 3 formes catalytiques actives :

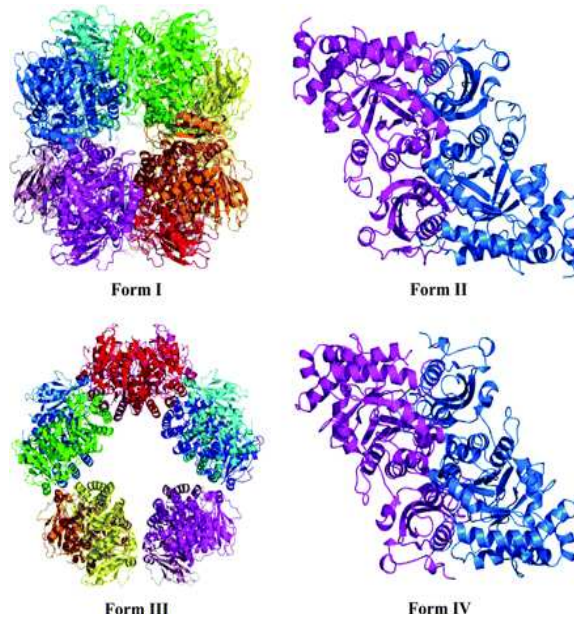


Figure 32. Structures représentatives des formes I, II, III, IV de la RuBisCO (Extrait de Tabita et al., 2008).

Elles sont toutes composées de dimères des grandes sous-unités catalytiques.

Tableau 2. Les diverses formes de RuBisCO présentes dans le vivant (adapté de Tabita et al., 2008). RLP pour RuBisCO-like-protein.

Forme de la RuBisCO	Espèces	Structure	Présence d'un site actif de la RuBisCO
RuBisCO-IA	α , β , γ -Protéobactéries, cyanobactéries	L ₈ S ₈	+
RuBisCO-IB	Plantes supérieures, algues vertes, bactéries autotrophes et cyanobactéries		+
RuBisCO-IC	α , β -Protéobactéries, Chlorobactéries		+
RuBisCO-ID	α , β , γ -Protéobactéries, Straménopiles, haptophytes rhodophytes		+
RuBisCO-II	α , β , γ -Protéobactéries, Dinoflagellés	L ₂ à L ₈ (selon l'espèce)	+
RuBisCO-III	Archées	L ₂ ou (L ₂) ₅	+/-
RuBisCO-IV (RLP)	Protéobactéries, Chlorobactérie, archées et algues	L ₂	-

Les RuBisCO de forme I hexadécamérique trouvées dans la plupart des plantes, algues, cyanobactéries et bactéries autotrophes appartiennent à la seule forme qui possède des petites sous-unités (RbcS). Elles sont composées de huit grandes sous-unités (55 kDa) formant le noyau catalytique ($4L_2$) et de huit petites sous-unités (entre 12 à 15 kDa) coiffantes au-dessus et en dessous (soit un complexe L_8S_8 d'environ 550 kDa). Le site catalytique est formé par l'extrémité N-terminale d'une grande sous-unité et l'extrémité C-terminale de la grande sous-unité voisine, totalisant 8 sites catalytiques au sein de l'holoenzyme. Les RuBisCO de formes II, III et IV sont des dimères de grandes sous-unités $(L_2)_n$ qui s'assemblent en oligomères. Sur le plan fonctionnel, les RubisCO de forme I, II et III catalysent à la fois la carboxylation et l'oxygénation du RuBP tandis que les RuBisCO de forme IV sont dépourvues de la capacité de carboxylation, mais sont cependant considérées comme des protéines similaires à la RuBisCO (également appelée forme RLP pour RuBisCO-like-protein) (Tabita *et al.*, 2008).

c) La spécificité de la RuBisCO selon les espèces

On considère que la RuBisCO est présente dans le monde vivant depuis environ 2 à 3 milliards d'années (Nisbet *et al.*, 2007), et de par son rôle pivot dans le métabolisme photosynthétique, elle est responsable de l'assimilation de plus de 90% du carbone inorganique qui constitue la biomasse sur Terre (Tobias *et al.*, 2018). C'est l'enzyme la plus abondante de la biosphère, mais elle en revanche également parmi les plus lentes et inefficaces (Feller *et al.*, 2008a,b). En fonction des organismes, le renouvellement catalytique ou taux de rotation est d'environ 2 à 10 carboxylations par site catalytique par seconde (k_{cat}^C) et par son aspécificité pour ses substrats ; son affinité pour le CO_2 est faible et relative à la concentration en CO_2 dans l'atmosphère (Marcus *et al.*, 2011).

La production de niveaux importants de RubisCO est donc nécessaire afin de compenser son inefficacité et peut alors atteindre des niveaux allant jusqu'à 50% des protéines solubles de feuilles (Bracher *et al.*, 2017).

Il y a plus de 3 milliards d'années, l'atmosphère terrestre était très différente et possédait une forte teneur en CO_2 . Cependant, la photosynthèse oxygénique a fait évoluer l'atmosphère en augmentant le taux en di-oxygène et en diminuant celle du CO_2 .

Néanmoins, l'activité carboxylase de la RuBisCO, en dépit de la forte pression de sélection qui s'exerce dans l'environnement (pression partielle actuelle de l' O_2 (210 mbar) beaucoup plus élevée que celle du CO_2 (0,4 mbar)), est restée peu efficace.

Dans la littérature, l'activité enzymatique de la RuBisCO a été largement discutée et comparée dans de nombreux organismes à partir des paramètres cinétiques communément utilisés suivants : k_{cat}^C et k_{cat}^O , K_M^C et K_M^O et $S_{C/O}$:

- **Les constantes de Michaelis-Menten K_M^C et K_M^O qui représentent les affinités pour le CO_2 et l' O_2 , respectivement (en μM)**

La constante K_M correspond à la concentration en substrat pour laquelle la vitesse de la réaction enzymatique est égale à la moitié de la vitesse maximale.

Donc plus K_M est élevé, plus la concentration en RuBP nécessaire à une activité importante de la RuBisCO doit être élevée : traduisant en général une faible affinité de l'enzyme pour son substrat. Inversement, plus K_M est faible, plus l'activité enzymatique maximale est atteinte pour un faible niveau de concentration de substrat : l'affinité de l'enzyme pour le substrat plus forte.

▪ **Les taux de rotation de carboxylation k_{cat}^C et d'oxygénation k_{cat}^O (en min^{-1} ou s^{-1})**

Les taux de rotation de carboxylation (k_{cat}^C et k_{cat}^O) correspondent aux vitesses à laquelle la RuBisCO fixe le CO_2 ou l' O_2 en RuBP dans des conditions de saturation du substrat par unité de temps.

▪ **Le facteur de spécificité $S_{C/O}$ (en mol/mol)**

$$S_{C/O} = \frac{k_{cat}^C K_O}{k_{cat}^O K_C}$$

Les RuBisCOs de diverses espèces présentent des capacités variables de distinction entre ses substrats CO_2 ou O_2 ; cette propriété est quantifiable et résulte de l'expression ci-dessus $S_{C/O}$ ou facteur de spécificité. Une valeur élevée de $S_{C/O}$ signifie que l'activité carboxylase d'une RuBisCO est supérieure à son activité oxygénase.

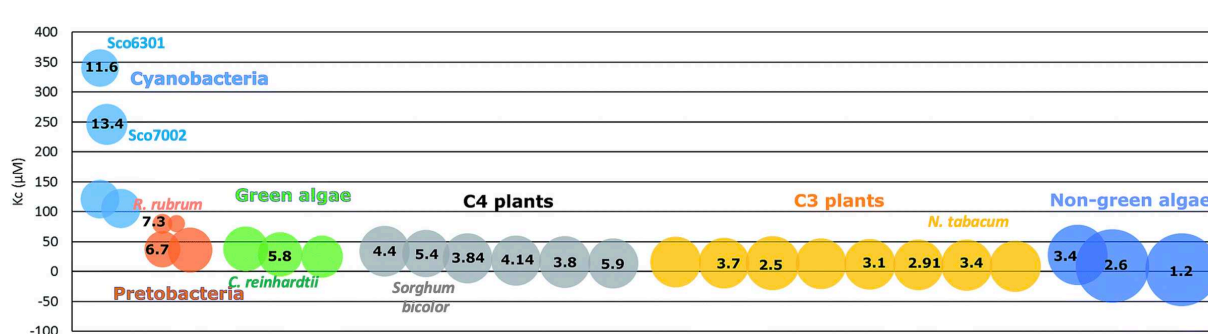


Figure 33. Variation des paramètres cinétiques de la RuBisCO selon les types d'organismes photosynthétiques

La taille d'un cercle individuel représente la spécificité $S_{C/O}$, allant de 9 à 167. K_C et K_O représentent l'affinité pour le CO_2 et l' O_2 , respectivement (en μM). k_{cat}^C et k_{cat}^O indiquent le taux catalytique de carboxylation et d'oxygénation, respectivement. Le nombre dans le cercle individuel représente k_{cat}^C (en s^{-1}). Adapté de Savir *et al.*, 2010 et de Liang *et al.*, 2018

Le facteur de spécificité $S_{C/O}$ de RuBisCO de différentes espèces varie de 9 chez les bactéries sulfureuses pourpres à plus de 230 chez certaines algues marines. (Cummins *et al.*, 2018 ; Read et Tabita, 1994 ; Uemura *et al.*, 1997). Pour les cyanobactéries *Synechococcus* sp. PCC 6301 et *Synechococcus* sp. PCC 7002, ces valeurs s'élèvent à 43 et 52, respectivement (Andrew *et al.*, 1985 ; Kane *et al.*, 1994). Les RuBisCO d'origine cyanobactérienne montrent donc une plus faible affinité pour le CO_2 , au regard de la spécificité relative $S_{C/O}$ plus faible que d'autres microorganismes photosynthétiques (Figure 33.)

Cela s'explique au vu des valeurs des constantes de Michaelis K_M^C pour le CO_2 des RuBisCO cyanobactériennes, qui varient entre 100-350 μM , traduisant une plus faible affinité des RuBisCO cyanobactériennes pour le substrat CO_2 que l'ensemble des autres espèces de protéobactéries, algues vertes, plantes C4, plantes C3 et autres algues, dont les K_M^C sont en moyenne autour de 0-50 μM (Figure 33.).

En revanche les taux de rotation de carboxylation k_{cat}^C chez les RuBisCOs cyanobactériennes sont en moyenne bien plus élevés que les autres espèces, et ceci, car les cyanobactéries utilisent un mécanisme de concentration du carbone (CCM) qui leur permet ainsi de compenser leur plus faible spécificité relative pour le CO_2 en limitant ainsi la photorespiration (Cummins *et al.*, 2018).

Chez les cyanobactéries, la RuBisCO représente entre 2-10% du contenu cellulaire en protéines solubles totales principalement en raison de la saturation du substrat CO₂ et d'une RuBisCO au taux catalytique plus élevé (Price *et al.*, 2008) ; aussi, la teneur en RuBisCO estimée à partir de l'activité totale de RuBisCO est 10 à 20 fois inférieure à la teneur en enzymes des plantes supérieures sur la base de la chlorophylle.

Les plantes les plus utilisées dans l'agriculture (comme le riz, blé et la pomme de terre) sont classées parmi les plantes C3. Les propriétés catalytiques de la RuBisCO dans la plupart des plantes C3 sont caractérisées par une spécificité S_{C/O} plus élevée pour le CO₂ que les plantes C4, même si leurs taux de rotation de carboxylation k_{cat}^C sont plus faibles, les constantes de Michaelis K_M^C pour le CO₂ sont plus faibles (+ grande affinité pour le substrat) que les plantes C4. Ainsi pour compenser les faibles k_{cat}^C , les plantes C3 accumulent de grandes quantités de RuBisCO dans leurs feuilles.

Les travaux de Savir *et al* montrent que la convergence des données sur les taux d'assimilation du CO₂ et les paramètres cinétiques de la RuBisCO sont quasi optimaux en considérant l'environnement dans lequel l'enzyme évolue, l'atmosphère terrestre et ses 0,03% CO₂. Ainsi les optiques d'amélioration qualitatives de la RuBisCO par des moyens génétiques restent limitées (Mohammad Pessarakli, 2016). D'autres stratégies d'amélioration quantitative de la teneur en RuBisCO (surexpression des gènes homologues ou hétérologues codants pour la RuBisCO) pour augmenter l'assimilation en CO₂ restent à prouver...

3) La phosphoglycérate kinase (PGK)

La PGK est un monomère d'environ 44 kDa qui catalyse réversiblement le transfert d'un groupe phosphate selon la réaction : 3-phospho-D-glycérate + ATP \rightleftharpoons ADP + 1,3-bisphospho-D-glycérate

La structure de la PGK est très conservée parmi les organismes photo-autotrophiques. La PGK de *Synechocystis* sp. PCC 6803 est inactivée par oxydation (formation de pont disulfure) et réactivée par l'action d'une thiorédoxine notamment au niveau de la paire de cystéines (Cys314 et Cys340) critique du domaine C-terminal (Tsukamoto *et al.*, 2013).

4) La glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH)

Chez la cyanobactérie *Synechocystis* sp. PCC 6803, il existe deux types de glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), GAPDH1 (Gap1) et GAPDH2 (Gap2) qui ont une identité de séquence de seulement 15 à 20 %. Gap2 est celle qui opère dans le CCB. C'est un tétramère (A2B2) de sous-unités de 37 kDA qui utilise le NADPH ou le NADH pour convertir le 1,3-BPG en G3P la principale sortie de carbone du CCB.

Chez les plantes supérieures, 2 isoformes de la GAPDH existent également : Gap-A et Gap-B formant un tétramère. Gap-A étant similaire à Gap2 de cyanobactéries.

5) La triose phosphate isomérase (TPI)

La triose phosphate isomérase TPI agit à la fois au sein du CCB et de la glycolyse, et catalyse l'interconversion du G3P et du DHAP.

Dans la plupart des organismes, la TPI est un homodimère d'environ 27 kDa (Walden *et al.*, 2001) ; en revanche, la localisation cellulaire et le nombre d'enzymes diffèrent selon les organismes. Pour les plantes supérieures, il existe deux types de TPI, une étant localisée dans le cytosol et l'autre dans le chloroplaste. Chez les algues vertes, il n'y a qu'une seule TPI qui se trouve au sein du chloroplaste. Les cyanobactéries, possèdent également une seule TPI localisée au sein du cytoplasme (Johnson et Alric, 2013).

6) La Fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FBA)

La FBA est présente à la fois dans le cycle CCB et dans la voie des pentoses phosphate. Au sein du CCB, la FBA catalyse deux réactions : la production de sédoheptulose 1,7-bisphosphate à partir de DHAP et d'érythrose 4-phosphate (E4P) ainsi que la production de fructose-1,6-bisphosphate à partir des trioses phosphate G3P et DHAP.

L'enzyme se compose de deux classes, les FBA de classe I (homotétramères) et les FBA de classe II (homodimères). Les monomères des deux classes de FBA n'ont pas de similarité de séquences, mais leur poids moléculaire est similaire (40 kDa).

La FBA-I est principalement présente chez les eucaryotes supérieurs (comme les algues) et les plantes, tandis que la FBA-II est plutôt présente chez les eucaryotes inférieurs ou encore les cyanobactéries (Maurady *et al.*, 2002). Chez *Synechocystis* sp. PCC 6803, les deux classes de FBA n'ont pas la même importance : 90% des FBA sont des FBA-II, tandis que FBA-I peut être inactivée (Nakahara *et al.*, 2003).

7) La fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase), la sédoheptulose-1,7-bisphosphatase (SBPase) et l'enzyme bifonctionnelle la fructose-1,6/sédoheptulose-1,7-bisphosphatase (BiBPase)

Les cyanobactéries présentent deux isozymes FBPase. La FBPase-I, la fructose-1,6-bisphosphatase/sédoheptulose-1,7-bisphosphatase bifonctionnelle (FBP/SBPase ou désignée BiBPase) hydrolyse à la fois le fructose 1,6-bisphosphate et le sédoheptulose 1,7-bisphosphate ; elle est essentielle aux réactions du CCB et catalyse également des réactions de la gluconéogenèse. La FBPase-II est spécifique au fructose-1,6-bisphosphate, mais aussi critique pour la photosynthèse (Tamoi *et al.*, 1999 ; Feng *et al.*, 2014 ; Cotton *et al.*, 2015). Chez les cyanobactéries, la fonction métabolique de la SBPase est donc assurée par la BiBPase (Tamoi *et al.*, 1999).

Chez les eucaryotes photosynthétiques, deux enzymes indépendantes : la fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) et la sédoheptulose-1,7-bisphosphatase (SBPase), accomplissent le même rôle que la BiBPase chez les cyanobactéries (Tamoi *et al.*, 1996). L'enzyme FBPase est un homotétramère d'environ 160 kDa et catalyse la déphosphorylation du fructose-1,6-bisphosphate (FBP) en fructose-6-phosphate (F6P) en libérant du phosphate inorganique (Pi). L'enzyme SBPase est un homodimère d'environ 70 kDa, unique au CCB, n'ayant aucun

équivalent cytosolique et qui catalyse la déphosphorylation du sédoheptulose-1,7-bisphosphate (SBP) en sédoheptulose-7-phosphate (S7P) en libérant du phosphate inorganique (Pi).

8) La transkétolase (TK)

La TK agit à la fois dans le CCB et dans la voie oxydative du pentose phosphate, mais également dans les voies métaboliques secondaires comme les voies de l'acide shikimate, le métabolisme des phénylpropanoïdes et la biosynthèse de la thiamine. Sa fonction nécessite le pyrophosphate de thiamine comme co-substrat (Willige *et al.*, 2009) les produits formés sont des précurseurs pour la synthèse des acides nucléiques, des acides aminés aromatiques et des vitamines (Kochetov, 2001).

Au sein du CCB, la TK appartient à la famille des transférases et catalyse deux réactions réversibles entre le sédoheptulose-7-phosphate (S7P) et le glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P) en pentoses phosphates, les ribose-5-phosphate (R5P) et xylulose-5-phosphate (X5P) qui sont importants pour la régénération du RuBP.

9) La Ribulose-5-phosphate 3-épimérase (RPE)

La RPE peut se trouver sous la forme d'un homodimère ou d'un hexamère de sous-unités d'environ 23-25 kDa chez les animaux (Karmali *et al.*, 1983), les plantes (Nowitzki *et al.*, 1995) et les cyanobactéries (Wise *et al.*, 2004). C'est une métalloprotéine qui catalyse l'épimérisation entre le ribulose 5-phosphate (Ru5P) et le xylulose 5-phosphate (X5P). Elle est synthétisée majoritairement au sein du chloroplaste (sauf celle du riz qui est cytosolique).

10) La Ribose-5-phosphate isomérase (RPI)

La RPI appartient à la classe des isomérases qui catalysent l'interconversion d'isomères. Au sein du CCB, la RPI catalyse l'interconversion de la ribulose-5-phosphate (Ru5P), et de la ribulose-5-phosphate (Ru5P). Dans la plupart des organismes, l'enzyme est un homodimère de sous-unité d'environ 23-25 kDa (Jung *et al.*, 2000). La RPI en concert avec la RPE, facilite la répartition des pools de pentoses phosphates en fonction des besoins métaboliques et du statut rédox des cellules.

C. La régulation du cycle de Calvin-Benson

L'activation du CCB nécessite la combinaison de plusieurs facteurs au sein de la cellule : du CO₂, des ions Mg²⁺, un pH du stroma plutôt alcalin (l'activité enzymatique maximale étant à 8), qui sont régulés par les réactions dépendantes de la lumière dont découle l'approvisionnement des substrats du CCB : ATP et pouvoir réducteur.

La régulation du CCB s'effectue également au niveau de l'ensemble des éléments et mécanismes impliqués dans l'import du carbone dans la cellule et les carboxysomes grâce notamment aux mécanismes de concentrations du carbone (CCM). Chaque enzyme est également contrôlée par la présence de métabolites spécifiques, mais également, plus généralement, par des modifications rédox post-traductionnelles réversibles comme l'oxydo-réduction des ponts disulfures, la nitrosylation et la glutathionylation qui permettent un fin ajustement du CCB en fonction de conditions environnementales variables.

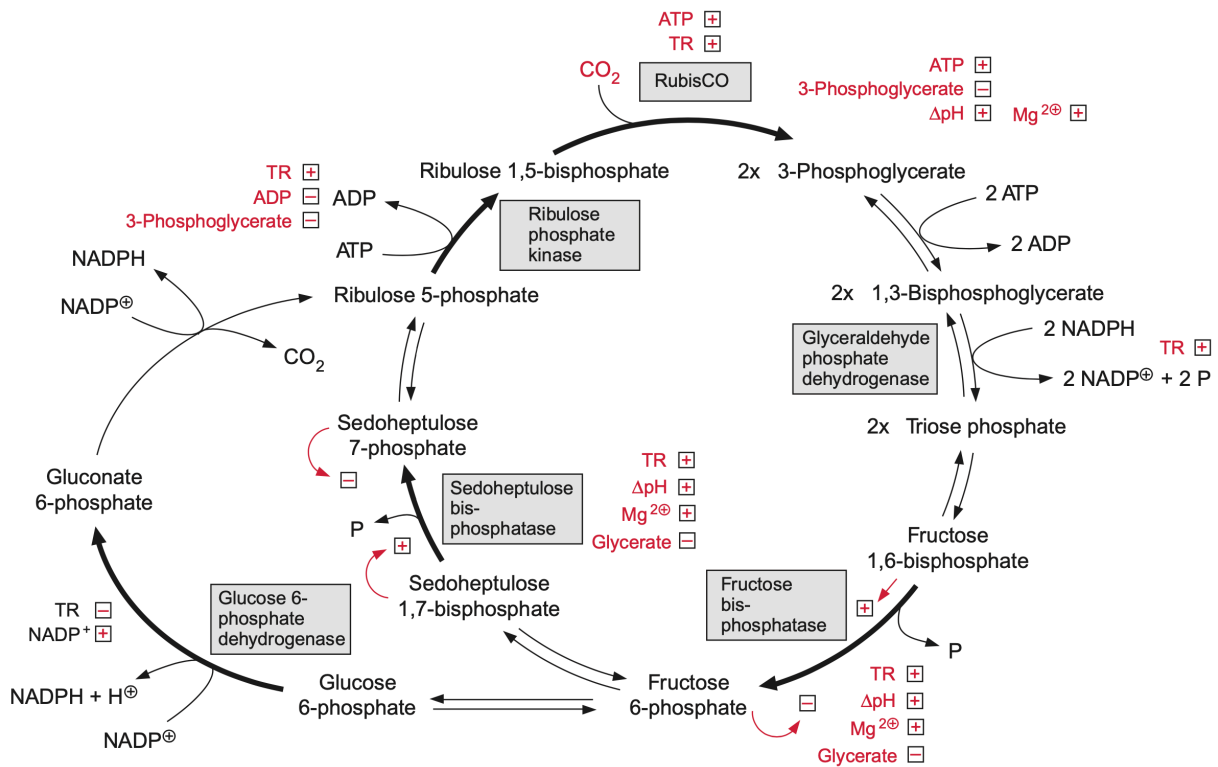


Figure 34. Schéma non exhaustif des régulations des enzymes du CCB et de la voie OPP. L'augmentation et la diminution des effets de la régulation sont respectivement marqués par un + ou un -, TR = thiorédoxine réduite, ΔpH = alcalinisation dépendante de la lumière (Extrait de Heldt & Piechulla 2011).

1) Intensité lumineuse, pH et concentration en Mg²⁺ au sein du cytosol

L'activité du CCB dépend des conditions environnementales. Ainsi l'activation des enzymes du CCB est stimulée dans un environnement où le pH est alcalin (≈8) et où les concentrations en ions Mg²⁺ sont élevées dans le cytosol. C'est le cas par exemple pour la RuBisCO ou la FBPase, où ces conditions s'associent à des activités maximales de l'enzyme.

En effet, la lumière entraîne l'activation de la chaîne photosynthétique et donc d'une accumulation de protons H⁺ dans le lumen des thylacoïdes, associé à une élévation du pH dans le cytosol. Cet afflux d'H⁺ dans les thylacoïdes entraîne un efflux de cations Mg²⁺ dans le cytosol afin de rétablir l'équilibre de charges.

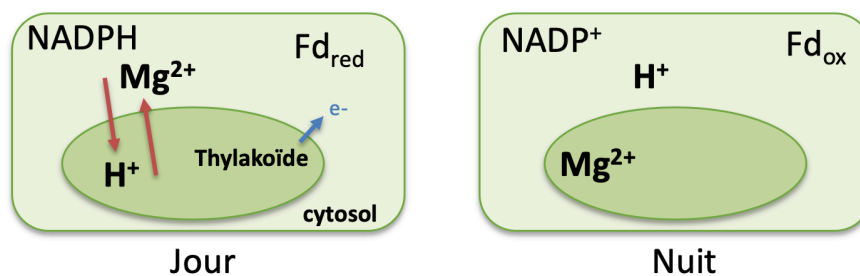


Figure 35. Représentation schématique des influx et des efflux en Mg²⁺ et H⁺ dans les thylacoïdes et le cytosol en fonction de la présence ou non de lumière

2) Les interactions protéines-protéines et les modifications post-traductionnelles

a) Le système ferrédoxine-thiorédoxine impliqué au niveau de l'état rédox de protéines du CCB (présence de ponts disulfures)

La régulation des activités enzymatiques du CCB est réalisée en partie via les thiorédoxines (Trx), de petites protéines rédox (12 kDa) permettant l'activation de certaines enzymes du CCB par la réduction des ponts disulfures ($S=S \rightarrow SH-SH$) au niveau de leurs résidus cystéines. Les enzymes du CCB sont activées lorsque les Trx réduites (état maintenu sous la lumière) sont présentes au sein du stroma des thylacoïdes. À l'obscurité en revanche, ces protéines s'oxydent spontanément impliquant l'inactivation des enzymes du CCB (Figure 36.).

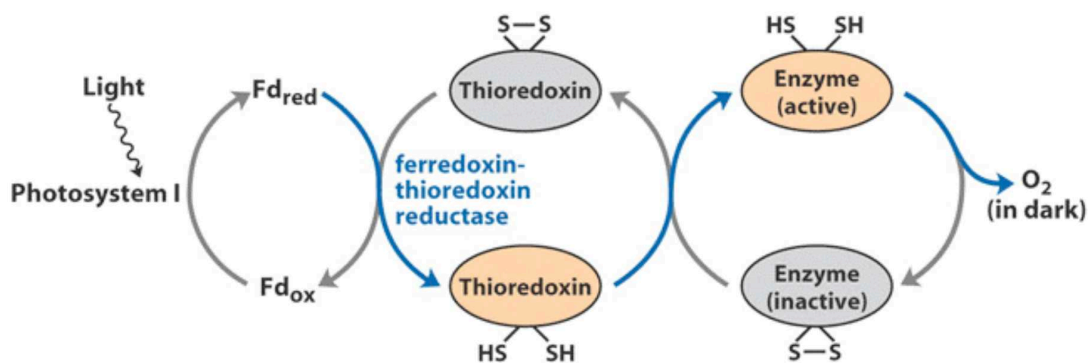


Figure 36. Le système ferrédoxine/thiorédoxine réductase

Les Trx (chloroplastiques chez les plantes) sont réduites par le photosystème I (PSI) lors de l'exposition à la lumière via la ferrédoxine et le système de ferrédoxine/thiorédoxine réductase. Ces Trx réduites sont à leur tour capable de réduire et d'activer certaines enzymes du CCB des plantes C3 et C4, des algues et des cyanobactéries comme : la phosphoglycérate kinase (PGK), la fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase), la sédoheptulose-1,7-bisphosphatase (SBPase), la phosphoribulokinase (PRK) et la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) (Michelet *et al.*, 2013).

b) Glutathionylation

Le glutathion est considéré comme un antioxydant cellulaire majeur à faible poids moléculaire chez de nombreuses espèces et peut exister sous deux formes : une forme réduite (GSH) et une forme oxydée (GSSG). La forme réduite GSH est la forme la plus abondante ; elle est réduite constamment par la glutathione réductase (GR) aux dépens du NADPH. La réaction inverse appelée déglutathionylation est principalement catalysée par les glutarédoxines (GRX).

En réponse à des conditions de stress oxydatif notamment, la modification post-traductionnelle de glutathionylation est déclenchée, et permet la formation d'un pont disulfure mixte entre les groupes thiol d'une molécule de glutathion et d'un résidu cystéine d'une protéine.

De nombreuses données suggèrent que la glutathionylation inhibe l'activité de nombreuses enzymes du CCB, et qu'elle constitue également un mécanisme de protection contre les ROS, au niveau des cystéines hautement réactives des enzymes (en évitant la formation de formes sulféniques) (Michelet *et al.*, 2013). Il a été constaté que toutes les enzymes CCB étaient glutathionylables chez *Chlamydomonas reinhardtii* (Zaffagnini *et al.*, 2012a, 2013a) ainsi que la plupart chez *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Chardonnet *et al.*, 2015).

c) Nitrosylation

La nitrosylation consiste en la formation de nitrosothiols par réaction des thiols des protéines avec l'oxyde nitrique (NO) ou d'autres espèces azotées réactives (RNS). La dénitrosylation, c'est-à-dire la réduction des nitrosothiols sur les protéines implique deux mécanismes possibles dépendant des GSH ou des TRX réduites (Benhar *et al.*, 2009 ; Sengupta et Holmgren, 2013). Par des approches de protéomiques, toutes les enzymes du CCB chez *Chlamydomonas reinhardtii* ont été identifiées comme des protéines nitrosylées, même si cela n'a pas été confirmé par voie biochimique (voir tableau 1 Michelet *et al.*, 2013).

3) L'association-dissociation de complexes supramoléculaires impliquant CP12

Cette partie sera détaillée dans le Chapitre 5.

Il est important que le CCB soit régulé, car si la glycolyse, la voie des pentoses phosphates et le CCB étaient actifs simultanément à l'obscurité, alors la dégradation simultanée de l'amidon et la biosynthèse des glucides appauvriraient rapidement les pools d'ATP et de NADPH, et l'organisme photosynthétique mourrait rapidement de perte d'énergie. Ainsi la régulation du CCB au niveau de deux de ses enzymes est réalisée par une petite protéine rédox intrinsèquement désordonnée : la protéine CP12.

II. Les stratégies d'ingénierie du CCB pour l'optimisation de la capture du CO₂, avec ou sans la production de molécules d'intérêt biotechnologique

« On estime qu'au cours des 40 prochaines années, il sera nécessaire d'augmenter de 50 % le rendement des cultures céréalières telles que le blé et le riz pour répondre aux demandes de nourriture et de carburants de la population mondiale croissante » (Simkin *et al.*, 2015).

Les organismes photoautotrophes apparaissent comme une matière première prometteuse à exploiter pour leur biomasse et la production durable de bioproduits à valeur ajoutée. Ces derniers utilisent le CCB comme principale voie d'assimilation du CO₂ pour constituer leur biomasse et la production d'une vaste panoplie de métabolites. Afin d'améliorer la fixation photosynthétique du CO₂, différentes stratégies peuvent être mises en place. Le tableau 3 rassemble ces différentes stratégies développées dans la littérature en mettant l'accent sur les stratégies de (sur)expression des gènes codants pour des enzymes natives ou hétérologues du CCB. Les enzymes du CCB sélectionnées ont été surexprimées dans divers organismes photosynthétiques (plantes supérieures, algues ou cyanobactéries) et des organismes hétérotrophes comme les bactéries ou levures. Les effets observés, ainsi que l'impact sur la production de molécules d'intérêt biotechnologique ont été variables en fonction des enzymes exprimées, des espèces, des stades de croissance et des conditions environnementales et de culture.

A. Introduction d'enzymes natives ou hétérologues supplémentaires plus actives et efficaces

1) La RuBisCO

Les gènes codants pour des RubisCOs natives, hétérologues ou hybrides ont été exprimés au sein de différentes espèces eucaryotes ou procaryotes comme *E. coli* (Greene *et al.*, 2007 ; Cai *et al.*, 2014 ; Durao *et al.*, 2015 ; Wilson *et al.*, 2018) ; les cyanobactéries *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Amichay, 1993 ; Liang et Lindblad, 2016 ; Liang et Lindblad, 2017 ; Liang et Lindblad, 2018 ; Durao *et al.*, 2015 ; Zhang *et al.*, 2017), *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Iwaki *et al.*, 2006 ; Atsumi *et al.*, 2009 ; Ruffing, 2013a Lee *et al.*, 1993 ; Madgwick *et al.*, 1997), *Synechococcus* sp. PCC 7002 (Ruffing, 2013b ; De Porcellinis *et al.*, 2018), *Synechococcus* sp. PCC 6301 (Satagopan *et al.*, 2019) ; l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* (Genkov *et al.*, 2010), ou bien les plantes supérieures comme le riz *Oryza sativa* (Suzuki *et al.*, 2007 ; Ishikawa *et al.*, 2011 ; Suzuki *et al.*, 2017, Matsumura *et al.*, 2020), et le tabac *Nicotiana tabacum* (Withney and Andrews, 2001 ; Lin *et al.*, 2014 ; Occhialini *et al.*, 2016). Le système de régulation complexe de la RuBisCO peut rendre difficile l'expression homologue, mais également l'expression hétérologue. Quelques exemples d'études décrites ci-dessous sont parvenus à contourner les différents niveaux de régulation de la machinerie native de l'hôte.

➤ Enzymes natives

L'introduction d'une copie endogène additionnelle de l'opéron *rbcLXS* chez *Synechocystis* sp. PCC 6803 a permis l'augmentation du nombre de transcrits, mais n'a pas entraîné d'augmentation du niveau de protéines RuBisCO (Liang *et al.*, 2016).

Pour le riz *Oryza sativa*, la surexpression des gènes des deux enzymes RuBisCO et TK avec leurs promoteurs entraîne une augmentation de la teneur en RuBisCO et TK, en revanche les taux d'assimilation du CO₂ restent similaires à la souche sauvage (Suzuki *et al.*, 2017).

➤ Enzymes hétérologues

Une autre stratégie est le remplacement de certaines enzymes du CCB d'un châssis donné par des enzymes hétérologues phylogénétiquement éloignées, plus efficaces au niveau de leurs propriétés catalytiques afin d'exploiter leurs caractéristiques photosynthétiques. Certaines formes de RuBisCO (plantes C4, cyanobactéries qui disposent de CCM) ont une affinité pour le CO₂ plus faible, mais des taux catalytiques plus élevés et inversement pour les plantes en C3 ne disposant pas de CCM. L'introduction d'un CCM a été proposée comme moyen d'améliorer les performances de la RuBisCO dans les chloroplastes des plantes C3 (Lin *et al.*, 2014). D'autre part, l'augmentation de l'activité de la RuBisCO avec des enzymes de forme I plus performantes provenant d'algues non vertes ne fonctionne pas dans les chloroplastes du tabac, bien que l'enzyme de forme I ait la même structure de sous-unités que la RuBisCO de forme I du tabac constituée de 8RbcL et de 8RbcS (Whitney *et al.*, 2001).

La RuBisCO est un catalyseur faible, et les plantes C3 et C4 doivent consacrer respectivement jusqu'à 50% et 30% de leurs protéines solubles dans les feuilles à cette seule enzyme pour atteindre des taux de photosynthèse acceptables (soit respectivement 20-30% et 5-9% de l'azote total des feuilles) (Feller *et al.*, 2008).

Certaines substitutions de gènes codants pour la RuBisCO de forme I de *Synechocystis* sp. PCC 6803 ou *Nicotiana tabacum* de forme II *Rhodospirillum rubrum* nécessitent une plus forte concentration de CO₂ pour assurer la croissance (Amichay, 1993 ; Whitney and Andrews, 2001). Chez *Nicotiana tabacum*, le remplacement du gène natif *rbcL* par l'opéron *rbcLS* de la cyanobactérie *Synechococcus* sp. PCC 7942 (RuBisCO de forme I également) entraîne, une plus grande assimilation de CO₂ en conditions de culture standard (air atmosphérique) et une plus grande activité carboxylase en conditions de culture sous forte concentration en CO₂ (Lin *et al.*, 2014).

➤ Enzymes hybrides

Il a été suggéré que la petite sous-unité de la RuBisCO, RbcS, pourrait jouer un rôle dans l'efficacité de la carboxylation et de la spécificité pour le CO₂. Des études ont ainsi orienté leurs travaux sur la construction de RuBisCO chimériques, en remplaçant la RbcS native avec celle d'une autre espèce (Genkov *et al.*, 2010; Matsumura *et al.*, 2020). Les enzymes hybrides obtenues ont montré des améliorations significatives au niveau du k_{cat} des protéines ou de la S

c/o.

2) La phosphoribulokinase (PRK)

Peu d'études publiées portent sur la phosphoribulokinase (PRK) et une seule sur la surproduction de l'enzyme au sein de la cyanobactérie *Synechococcus* sp. PCC 7002 (Kanno *et al.*, 2017). Elles se concentrent sur l'expression hétérologue du gène *prk* codant pour la PRK issue de cyanobactéries comme *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Kobayashi, 2003), de plantes supérieures comme l'épinard (Milanez *et al.*, 1991 ; Brandes *et al.*, 1996 ; Guadalupe-Medina

et al., 2013) ou de bactéries photosynthétiques comme *Rhodobacter sphaeroides* (Hallenbeck et Kaplan, 1987) dans *E. coli* ou des levures (*S. cerevisiae* ou *Pichia Pastoris*). Ces études ont permis d'en apprendre plus sur la protéine (son activité catalytique, les résidus cystéines conservés de sa séquence et leur rôle rédox et sa régulation).

Les études montrent que la production de PRK d'espèces différentes (de plante supérieure ou de cyanobactérie) exprimée au sein d'*E. coli*, entraîne des « phénotypes » variés notamment en raison de la toxicité connue de la PRK et également à cause du biais de codon utilisé. Par exemple : la surexpression du gène *prk* de *Synechococcus* sp. PCC 7942 dans *E. coli* entraîne une augmentation de l'activité spécifique de la PRK d'un facteur 3 par rapport à l'activité endogène de l'organisme d'origine (Kobayashi, 2003). En revanche, la surexpression du gène *prk* de l'épinard entraîne une très faible production de PRK (moins de 0,05% des protéines totales) ainsi qu'une croissance très ralentie (Milanez *et al.*, 1991).

3) Autres enzymes du CCB impliquées dans la régénération du substrat RuBP de la RuBisCO

Pour la FBPase par exemple, l'activité enzymatique de l'enzyme chloroplastique du blé est plus efficace pour stimuler la fonction photosynthétique que la FBPase cyanobactérienne, et pourrait augmenter l'assimilation du CO₂ lorsqu'elle est produite de manière hétérologue. Ma *et al.* 2005 ont montré par exemple que l'expression hétérologue de la FBPase chloroplastique du blé chez la cyanobactérie *Anabaena* PCC 7120 augmentait la croissance et les taux d'évolution de l'oxygène photosynthétique, et donc que la FBPase cyanobactérienne était une enzyme limitant la vitesse du cycle de Calvin.

Également, les surexpressions de la SBPase de plantes supérieures (*A. thaliana*), de la FBPase-II (*Synechococcus* sp. PCC 7942) ou de la FBP/SBPase cyanobactériennes (*Synechococcus* sp. PCC 7942) dans les plantes (tabac) ou algues (*E. gracilis*) ont entraîné une augmentation de la croissance et de la photosynthèse, même si des conditions de croissance particulières étaient parfois nécessaires (Tamoi *et al.*, 2006 ; Lefebvre *et al.*, 2005 ; Miyagawa *et al.*, 2001 ; Ogawa *et al.*, 2015 ; Rosenthal *et al.*, 2011).

La surexpression de la Fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FBA) d'une plante supérieure au sein de la plante de tabac a permis, sous concentration élevée de CO₂, une augmentation de l'activité de l'aldolase, de la croissance et de la fixation photosynthétique du CO₂ (Uematsu *et al.*, 2012).

La surexpression de la transkétolase (TK), enzyme également impliquée dans la régénération du RuBP, chez *Synechocystis* sp. PCC 6803 a permis d'améliorer sa croissance quelle que soit l'intensité lumineuse (Liang and Lindblad, 2016) et également d'augmenter la production d'éthanol (Liang *et al.*, 2018).

4) Co(sur)expression de plusieurs gènes codants pour des enzymes du CCB

Certaines études se sont intéressées également aux effets combinés de co(sur)expression de plusieurs gènes codants pour les enzymes du CCB avec ou sans la production de molécules en aval. Roussou *et al.*, 2021 par exemple, démontrent clairement que la surexpression de deux enzymes du CCB entre la FBA, la TK ou la FBP/SBPase entraîne une augmentation significative de la production d'éthanol (production d'éthanol par volume multiplié par un facteur 9,6X pour la co-surexpression des gènes codants pour les enzymes FBA et TK) par

rapport à la surexpression d'une seule enzyme du CCB chez *Synechocystis* sp. PCC 6803. Également, la surexpression des gènes codants pour enzymes FBA et TPI de plantes supérieures chez *Anabaena* PCC 7120 ont entraîné de très nets effets phénotypiques : augmentation de leurs activités enzymatiques (177% à 259%), de l'évolution de l'O₂ photosynthétique de 130% à 198%, et du poids sec des cellules de 122% à 171% (Ma *et al.*, 2006). Aussi, la surexpression des gènes codants pour les enzymes RPE et RPI chez *Synechocystis* sp. PCC 6803 ont permis une augmentation des rendements de production en terpènes d'un facteur 1,3 (Lin *et al.*, 2017). Pour plus de détails, se référer au tableau 3.

B. Choix des paramètres de cultures

Plusieurs études soulignent que la surexpression de gènes codants pour des enzymes du CCB ont un impact plus important dans des conditions de culture sous hautes concentrations en CO₂ (Lin *et al.*, 2014 ; Ma *et al.*, 2006 ; Uematsu *et al.*, 2012 ; Miyagawa *et al.*, 2001 ; Otori *et al.*, 2017 ; Köhler *et al.*, 2017 ; voir tableau 3.). En revanche, sous une faible intensité lumineuse, la surexpression entraîne moins de différences significatives au niveau des phénotypes (par rapport aux souches contrôles), par rapport à une intensité lumineuse élevée (Liang *et al.*, 2016 ; Liang *et al.*, 2018).

C. Stratégies d'utilisation de systèmes performants l'analyse computationnelle des flux métaboliques

En plus des approches d'ingénierie expérimentale, une stratégie d'ingénierie non intuitive basée sur des techniques d'analyse computationnelle des flux métaboliques peut être utilisée pour développer des souches mutantes performantes pour la production de molécules d'intérêt. Lin *et al.*, 2017 par exemple ont conçu une souche de la cyanobactérie *Synechocystis* sp. PCC 6803 pour une production de limonène améliorée en utilisant le design computationnel et la procédure de prédiction OptForce pour identifier les interventions génétiques (régulations ascendantes/descendantes...) minimales pour améliorer le rendement en limonène. Le logiciel a prédit la régulation à la hausse de deux gènes codants pour la RPI (la ribose 5-phosphate isomérase) et la RPE (ribulose 5-phosphate 3-épimérase) afin de détourner le flux de carbone vers la voie MEP et la production de limonène. Cette stratégie a ensuite été testée dans un cadre expérimental et a réellement entraîné une augmentation d'un facteur 1,3 du rendement en limonène (3,7 mg/L).

D. Mutagenèse par ingénierie rationnelle.

Plusieurs études ont tenté d'améliorer l'activité de la RuBisCO par de l'ingénierie rationnelle en ciblant des acides aminés au niveau de positions stratégiques de la séquence de l'enzyme (dans ou près des sites actifs en majorité) : les résidus au niveau de la boucle 6 (car impliqués dans la spécificité du CO₂ par rapport à l'O₂ de l'enzyme) et de l'extrémité C-terminale de RbcL (car impliqués dans le changement de conformation de la RuBisCO lors de la catalyse), l'interface entre RbcL et RbcS, la boucle β A- β B et le remplacement de la petite sous-unité entière. Cependant la mutagenèse de ces régions a systématiquement généré des mutants de la RuBisCO dont l'activité et/ou la spécificité ont été compromises. Ceci illustre que nous avons une compréhension encore insuffisante des relations structure-fonction de la protéine (Cai *et*

al., 2014, Lee *et al.*, 1993). Seule quelques études ont permis d'augmenter l'efficacité catalytique de la carboxylation (*k_{cat}*) ou la spécificité CO₂/O₂ (Ishikawa *et al.*, 2011 ; Madgwick *et al.*, 1997)

E. Évolution dirigée des enzymes du CCB basée sur de la mutagenèse aléatoire et des systèmes de sélection alternatifs (sélection sur l'expression, l'activité...)

La stratégie d'évolution dirigée consiste en la génération d'une bibliothèque de mutants suivie d'un processus de sélection, pour identifier les protéines mutantes ayant les propriétés souhaitées.

De nombreux efforts en matière de design et d'évolution dirigée ont été déployés, notamment par mutagenèse dirigée sur des gènes codants pour la RuBisCO (spécifiquement de *Rhodospirillum rubrum* ou de la cyanobactérie *Anacystis nidulans*) clonées chez *E. coli*, mais l'amélioration de l'activité de carboxylation était limitée (Lee *et al.*, 1993).

Une autre étude s'est penchée sur l'utilisation de la bactérie pourpre *Rhodobacter capsulatus* dépourvue de sa propre RubisCO comme châssis pour la sélection de variants de la RubisCO de *Synechococcus* sp. PCC 6301. Des substitutions d'acides aminés ont alors permis d'augmenter les capacités de croissance (dépendantes du CO₂) ou l'activité carboxylase de RubisCO d'un facteur 2 par rapport à l'enzyme WT (Satagopan *et al.*, 2019).

L'efficacité de carboxylation extrêmement faible de la RuBisCO en fait la cible la plus intéressante pour améliorer l'efficacité de la photosynthèse ; elle est en effet une protéine la plus abondante et importante sur terre, mais probablement la plus difficile à ingénierier.

Certaines études comme celles de Durao *et al.*, 2015 ou Bracher *et al.*, 2017 ont élaboré un système de sélection basé sur une souche *E. coli* dépendante d'une RuBisCO fonctionnelle pour sa croissance, pour la mise au point de mutation ponctuelles. Toutes les protéines mutantes de la « bibliothèque » ont une solubilité accrue, sans pour autant produire une amélioration des activités catalytiques et de la photosynthèse chez des cyanobactéries (Bracher *et al.*, 2017). Durao *et al.*, 2015 ont montré en parallèle, les effets opposés de différentes protéines chaperonnes sur l'évolutivité de la RuBisCO. Ils montrent ainsi que la protéine chaperonne très spécifique RbcX, tend à agir comme un goulot d'étranglement pour l'évolution dirigée (positive) de la RuBisCO, en restreignant la gamme de mutation compatibles avec l'assemblage spécifique de l'holoenzyme. Tandis que la protéine chaperonne non spécifique GroEL/ES tend à augmenter le taux d'évolution en augmentant le nombre de variants qui peuvent atteindre l'état fonctionnel d'holoenzyme.

L'évolution dirigée basée sur la mutagenèse aléatoire et la sélection offre une stratégie alternative pour l'ingénierie de la RuBisCO. Pour cela, un système de sélection utilisant la phosphoribulokinase (PRK) exprimée dans *E. coli* a été utilisé (Greene *et al.*, 2007 ; Mueller-Cajar *et al.*, 2007 ; Mueller-Cajar et Whitney, 2008 ; Parikh *et al.*, 2006). L'accumulation de RuBP par la PRK étant toxique pour *E. coli* (car ne pouvant être métabolisé), les variants de RuBisCO convertissent efficacement ce produit afin de rétablir la croissance. Les mutants ensuite sélectionnés par le système sont testés phénotypiquement. Greene *et al.*, 2007 par exemple ont montré que l'évolution dirigée de la RuBisCO de *Synechococcus* sp. PCC 6301 dans *E. coli* peut conduire à des améliorations de ses paramètres biophysiques et cinétiques. Une mutation M259T sur RbcL entraîne une augmentation de 28% de l'efficacité catalytique de carboxylation.

En retour, Cai *et al.*, 2014 ont proposé un système de sélection qu'ils présentent comme meilleur car il est basé sur l'amélioration de l'activité plutôt que sur l'expression de la RuBisCO. Le système vient ainsi corréler l'activité de la RuBisCO à la croissance de l'hôte *E. coli*. Pour optimiser son activité, le système intervient via une pré-saturation de l'expression de la RuBisCO par la surexpression de la protéine chaperonne RbcX, ainsi l'évolution dirigée par la mutagenèse est canalisée vers l'amélioration de l'activité de carboxylation. Sur un total de 15000 mutants, deux substitutions sélectionnées sur la RbcS de *Synechococcus* sp. PCC 7002 ont ainsi permis une augmentation de 85% de l'activité spécifique de carboxylation de la RuBisCO.

Des cycles successifs de mutation et de sélection de la RubisCO de *Thermosynechococcus elongatus* BP1 dans *E. coli* ont également permis d'identifier deux mutations de RbcL et six mutations de RbcS qui ont augmenté la solubilité et l'efficacité de carboxylation de la RubisCO : de 3 à 14 et ~40 fois, respectivement (Wilson *et al.*, 2018).

La solubilité des enzymes surproduites est un paramètre important à considérer. En effet, des enzymes (homologues ou hétérologues) surproduites, mais insolubles, forment des corps d'inclusions en s'agréant, qui peuvent les rendre inactives, en affectant alors la production de métabolites secondaires.

F. Outils génétiques

1) Choix des promoteurs

Certaines études ont choisi d'utiliser des promoteurs dont l'activité transcriptionnelle est plus forte que ceux endogènes comme les promoteurs : *psbAI*, *psbAII* ou *Ptrc*.

La production (mesurée par activité enzymatique) de la RuBisCO de la bactérie sulfureuse pourpre *Allochrochromatium* au sein du châssis cyanobactérien *Synechococcus* sp. PCC 7942 varie en fonction du promoteur choisi ; pour l'expression de l'opéron *cvrbc*, elle est augmentée de 2,5-4X si le promoteur utilisé est *psbAI* et de 1,5-2X pour *psbAII* (Iwaki *et al.*, 2006).

Le remplacement du promoteur natif par le promoteur fort *Ptrc* en amont de l'opéron *rbcLXS* de *Synechococcus* sp. PCC 7002 a permis une augmentation d'un facteur 3,8 de l'activité de la RuBisCO native, d'un facteur 5 de la quantité de protéine RuBisCO, et a eu également une répercussion sur le métabolisme, en augmentant le nombre de protéines impliquées dans le métabolisme du pyruvate, le cycle TCA, le catabolisme des glucides et la biosynthèse des acides gras. En revanche, il n'y a pas eu de changements mesurables au niveau physiologique : sur la croissance, la taille des cellules et la production d'O₂ par la photosynthèse (De Porcellinis *et al.*, 2018)

2) Stabilisation des protéines par marquage

Au lieu d'essayer d'augmenter l'activité des enzymes du CCB, la surexpression et le marquage FLAG des enzymes peut être également une stratégie pour améliorer la stabilité des protéines et donc l'assimilation du carbone ; il a été montré en effet que ces marquages pouvaient améliorer le rendement des protéines recombinantes (Walls et Loughran, 2011, Lan et Liao, 2011 ; Akhtar *et al.*, 2013), aussi le marquage offre la possibilité d'étudier plus en détail l'expression et la stabilité des enzymes.

Liang et Lindblad, 2017 ont démontré que l'introduction d'une étiquette FLAG sur l'extrémité N-terminale de la LSU ou l'extrémité C-terminale de la SSU de la RuBisCO, permet une augmentation de la stabilité de l'ARNm (efficacité de la transcription améliorée) et potentiellement de la stabilité de l'ADN polymérase (au niveau de l'initiation de la traduction, de la stabilité de l'enzyme et/ou de la stabilité de la fixation des ribosomes).

Le tag peptidique court peut ainsi avoir des effets positifs en augmentant la stabilité (post)transcriptionnelle ou (post)traductionnelle, la solubilité, l'efficacité ou même le repliement des protéines (Kosobokova *et al.*, 2016). En N-terminal d'un gène, l'ajout d'une séquence codant pour un tag peut avoir un effet sur la liaison de l'ADN polymérase, la stabilité de l'ARNm (modification de la structure secondaire) peut également influencer le niveau relatif de l'ARNm, mais également la liaison du ribosome (le tag pourrait également inhiber sa dégradation (Waugh, 2005 ; Mutalik *et al.*, 2013). L'ajout d'une séquence tag FLAG ajoutée à la RubisCO produite au sein de la cyanobactérie *Synechocystis* sp. PCC 6803 a permis d'augmenter l'abondance de RubisCO et d'améliorer la fixation du CO₂ d'un facteur 2 (Zhang *et al.*, 2017). En revanche, aucun effet similaire n'est observé avec un marquage Streptavidin-tag-II dans l'étude de Liang et Lindblad, 2017 bien qu'étant de longueur similaire, 8 aa, et en même position.

G. Stratégies d'ingénierie parallèles participant à l'augmentation de l'assimilation du CO₂ et de l'activité enzymatique des enzymes du CCB.

1) Stratégie d'ingénierie des mécanismes de concentration du carbone (CCM)

Chez les cyanobactéries, des mécanismes de concentration du carbone de 5 types impliquant des transporteurs de carbone inorganique (de CO₂ ou HCO₃⁻) permettent d'alimenter le flux de carbone vers la RuBisCO. Seul l'un d'entre eux, BicA, a été surproduit chez *Synechocystis* sp. PCC 6803, ce qui a permis de multiplier par 2 le taux de croissance et l'accumulation de biomasse en conditions standard (CO₂ de l'air) et une augmentation encore plus importante dans des conditions de croissance en présence de forte concentration en CO₂ (Kamennaya *et al.*, 2015). Le transporteur du carbone BicA a une faible affinité pour le CO₂ ; une autre stratégie intéressante pour accroître la croissance dans des conditions de CO₂ ambiant serait donc de surexprimer de manière constitutive (pas le cas des gènes natifs) les transporteurs à affinité plus élevée pour le CO₂ (et donc induits par une faible concentration de Ci), comme SbtA, BCT1 et NDH-I3 (Liang *et al.*, 2018).

Dans l'optique d'augmenter l'assimilation de Ci par la RuBisCO, le carboxysome étant plus perméable à l'HCO₃⁻ qu'au CO₂, des gènes codants pour les anhydrases carboniques (CA) hétérologues (codées par les gènes *cynT* et *can*) de *E. coli* ont été exprimés au sein du site neutre NSII chez *Synechococcus* sp. PCC 7942. Les châssis exprimant ces CA avaient un taux de fixation du carbone 1,4 fois plus élevé et produisait 1,3 fois plus de biomasse (Chen *et al.*, 2012).

Néanmoins, l'une des limites de l'augmentation de la teneur en HCO₃⁻ est l'augmentation du pH intracellulaire des cellules pouvant favoriser la précipitation du calcium en carbonate de calcium (CaCO₃), et la biominéralisation et donc une moindre disponibilité du carbone inorganique pour la cellule (Han *et al.*, 2017).

2) L'influence des protéines chaperonnes sur l'activité de la RuBisCO

Les RuBisCO de cyanobactéries ou d'algues possèdent des efficacités supérieures à celles des plantes supérieures et sont considérées comme des alternatives pour augmenter le rendement des cultures. Plusieurs études récentes ont tenté de les exprimer au sein de plantes supérieures et chacune de ces études soulignent l'importance ou non des protéines chaperonnes et d'autres protéines accessoires pour les processus complexes de repliement et d'assemblage, ainsi que la performance de leur activité enzymatique au sein d'espèces eucaryotes ou procaryotes. En outre, l'activation et le maintien de l'activité de la RuBisCO nécessitent la présence de la RuBisCO activase.

Lin *et al.*, 2014 et Occhialini *et al.*, 2016 montrent que les protéines cyanobactériennes chaperonnes RbcX et carboxysomales CcmM35 ne sont pas essentielles pour l'assemblage de RuBisCO cyanobactériennes fonctionnelles au sein des chloroplastes de *Nicotiana tabacum*, les protéines assemblées via le système d'assemblage des plantes ont la masse moléculaire et les paramètres cinétiques prédits pour l'holoenzyme hexadécamérique cyanobactérienne. En revanche, la lignée transformante portant la RuBisCO cyanobactérienne ne pouvait croître en autotrophie que sous une concentration élevée de CO₂ (3% v/v CO₂/air). *Rhodobacter capsulatus* dépourvue de sa propre RubisCO a été utilisée comme châssis pour la sélection de variants de la RubisCO de *Synechococcus* sp. PCC 6301. L'intégration de l'opéron *rbcLS* sans RbcX n'a pas empêché l'expression de l'enzyme (Satagopan *et al.*, 2019).

Durao *et al.*, 2015 montre que la surexpression des gènes codants pour GroEL/ES (protéines chaperonnes non spécifiques importantes pour le repliement) a des effets positifs sur l'augmentation de la solubilité observée de la RuBisCO et la croissance des souches mutées (notamment en réduisant le temps d'apparition des colonies d'une souche surexprimant l'opéron *rbcLXS*).

Chez la cyanobactérie *Synechocystis* sp. PCC 6803 en revanche, la surexpression de *ccmM* impliqué dans l'assemblage et la stabilité de la RuBisCO a permis l'augmentation de la teneur en RuBisCO (sous 15 et 100 $\mu\text{mol de photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$), la vitesse de croissance ainsi que l'accumulation de biomasse (+22%) sous 100 $\mu\text{mol de photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Aussi, le taux d'évolution de l'O₂ *in vivo* augmente de +53% et de +22% respectivement sous 15 et 100 $\mu\text{mol de photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Liang *et al.*, 2016).

Les eucaryotes tels que *S. cerevisiae* disposent de protéines chaperonnes Hsp60/Hsp10 (qui ressemble structurellement et fonctionnellement à GroEL/GroES) mais localisées dans les mitochondries. Guadalupe-Medina *et al.*, 2013 montre que la co-expression GroEL/GroES (au niveau du cytosol) permet une expression fonctionnelle de la RuBisCO chez *S. cerevisiae* (sans quoi impossible).

H. Stratégie d'ingénierie du CCB pour l'optimisation des rendements de production de molécules d'intérêt biotechnologique.

Le cycle de Calvin permet la synthèse de nombreux intermédiaires carbonés qui sont ensuite redirigés au niveau de nombreuses voies de synthèses centrales du métabolisme. Dans la littérature, la surexpression de diverses enzymes du CCB combinée à l'intégration de voie de synthèses hétérologues, pour la production de bioproduits d'intérêt (voir ci-après), est une

stratégie de plus en plus utilisée pour augmenter et détourner le flux de carbone afin de maximiser les rendements de production.

➤ Production d'éthanol

Plusieurs études ont combiné la surexpression des enzymes pyruvate décarboxylase (PDC) et alcool déshydrogénase (ADH) pour la conversion du pyruvate en éthanol, avec la surexpression de différentes enzymes du CCB provenant de *Synechocystis* sp. PCC 6803 et *Synechococcus* sp. PCC 7002 : FBP/SBPase, TK, RuBisCO, FBA, qui ont permis jusqu'à +69% de production d'éthanol en plus et jusqu'à +15% de biomasse totale en plus chez *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Liang *et al.*, 2016 ; Liang *et al.*, 2018), la surexpression de plusieurs enzymes du CCB sélectionnées parmi FBA, TK, FBP/ SBPase, ont permis une augmentation de la production d'éthanol par volume de 9,6 fois, avec un titre à 20 jours de production de 1,2 mg/L (Roussou *et al.*, 2021). Une autre étude a montré que la fixation du CO₂ par la co-expression d'enzymes du CCB : PRK et RuBisCO fonctionnelles chez la levure, et issue d'un autotrophe, améliore de 10% le rendement en éthanol (Guadalupe-Medina *et al.*, 2013).

➤ Production de 2,3-butanediol

La co-surexpression de l'opéron *rbcLXS* de *Synechococcus* sp. PCC 7002 et du gène *prk* de *Synechococcus* sp. PCC 7942, ainsi que la surexpression des gènes des enzymes de la voie OPP et du transporteur du galactose permettent d'utiliser efficacement à la fois le CO₂ et le glucose (supplémenté) et entraîne la production de 12,6 g.L⁻¹ de 2,3-butanediol avec un rendement de 1,1 g.L⁻¹d⁻¹ chez *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Kanno *et al.*, 2017).

➤ Production de sorbitol

La production de sorbitol par les cyanobactéries via l'expression de la S6PDH a montré être hautement toxique pour les cellules. Mais la co-expression avec une FBPase a permis une réduction considérable de l'inhibition de la croissance et la production de sorbitol a été multipliée par 20 chez *Synechocystis* sp. PCC 6803. La surexpression d'un troisième gène *pnt* codant pour transhydrogénase membranaire PntAB impliquée dans la génération de NADPH à partir de NADH permet une production durable de sorbitol par la souche *s6pdh/fbp/pnt* de 312 mg/L (après 360h), soit près de 27 fois plus que le rendement de la souche surexprimant seulement *s6pdh*. Chez la souche surexprimant *s6pdh/fbp-I(slr2094)*, l'activité enzymatique de la FBPase est 5 fois plus élevée par comparaison avec la souche de référence (Chin *et al.*, 2018).

➤ Production de limonène

Une seule étude s'est penchée sur la production de terpènes combinée à la surexpression d'enzymes du CCB pour détourner les flux de carbone vers la voie MEP et la production de limonène. La surexpression des gènes codants pour RPE et RPI chez la souche productrice de limonène (provenant de *Mentha spicata*) entraîne une augmentation de 1,3X du rendement en limonène (3,7 mg/L) après 7 jours de culture, ainsi qu'une augmentation du pool de métabolites de X5P (Lin *et al.*, 2017).

➤ Production d'esters de cires

La surexpression de la FBP/SBPase provenant de l'algue *Euglena gracilis* au sein du châssis *Synechococcus* sp. PCC 7942 a permis l'augmentation de l'activité photosynthétique, l'accumulation de biomasse de 1,3-2X et du précurseur des esters de cire, le paramylon, de +29-35%. En anaérobiose, par comparaison avec la souche WT, la productivité des esters de cire est environ 13 à 100 X (selon la lignée) plus importante, la teneur en acides gras totaux (C12, C14, C16) accrue, en particulier l'acide myristique (C14:0) qui est 2,5-5 X plus abondant (Ogawa *et al.*, 2015).

➤ Production d'iso-butyraldéhyde

La surexpression de l'opéron *rbcLS* provenant de *Synechococcus* sp. PCC 6301 au sein du châssis *Synechococcus* sp. PCC 7942 exprimant des gènes hétérologues de synthèse de l'isobutyraldéhyde a amélioré l'activité RubisCO (~1,5 X) et la production (~2 X) d'isobutyraldéhyde (1,1g/L pendant 8 jours) (Atsumi *et al.*, 2009). Il s'agit d'un exemple réussi d'expression hétérologue de RuBisCO, même si le génome de *Synechococcus* sp. PCC 6301 est presque identique au génome de *Synechococcus* sp. PCC 7942, à l'exception d'une inversion de 188,6 kb (Sugita *et al.*, 2007).

➤ Production d'acides gras libres

La surexpression de l'opéron *rbcLS* provenant de la souche *Synechococcus* sp. PCC 7942 au sein du châssis *Synechococcus* sp. PCC 7002 combiné à l'expression de *tesA* codant pour l'expression de la thioestérase d'*E. coli* tronquée a permis une production d'acides gras libres 3X supérieure à la souche parentale avec des concentrations en acides gras libres excrétés > 130 mg/L (Ruffing *et al.*, 2013b). Au sein du châssis *Synechococcus* sp. PCC 7942 en revanche, la surexpression du même opéron *rbcLS* provenant de la souche *Synechococcus* sp. PCC 7942, combiné à l'expression de *fat1* codant pour l'acyl-ACP thioestérase de *C. reinhardtii* n'a pas amélioré la production d'acides gras libres ni l'évolution de la production/consommation d'O₂ ni n'a eu d'impact sur la physiologie de la souche (Ruffing *et al.*, 2013a).

Chez les cyanobactéries, une autre stratégie a été basée sur la diminution de l'activité de la voie de photorespiration qui produit le métabolite toxique 2-PG. L'expression hétérologue d'un bi-cycle 3-hydroxypropionate insensible à l'oxygène chez *Synechococcus* sp. PCC 7942, conçu pour fonctionner à la fois comme un by-pass du cycle de la photorespiration et comme une voie supplémentaire de fixation du CO₂, en complément du CCB, a permis de réduire la synthèse de 2-PG. Le cycle à 6 enzymes permet la redirection glyoxalate vers la synthèse du pyruvate, en fixant deux molécules supplémentaires de HCO⁻ (Shih *et al.*, 2014).

Tableau 3. Tableau récapitulatif des différentes études et stratégies sur la (sur)expression des gènes codants pour des enzymes natives ou hétérologues du cycle de Calvin, au sein de différents châssis (autotrophes ou hétérotrophes), les différents phénotypes observés, avec ou sans production de molécules d'intérêt biotechnologique.

Les conditions de cultures sont indiquées en *italiques*. Abréviations : PRK = Phosphoribulokinase, RuBisCO = ribulose-1,5-diphosphate carboxylase/oxygénase, FBPase = fructose-1,6-bisphosphatase, SBPase = sédoheptulose-bisphosphatase, FBA = Fructose-1,6-bisphosphate aldolase, FBP/SBPase = enzyme bifonctionnelle fructose-1,6/sédoheptulose-1,7-bisphosphatase, TK = transkétolase, TPI = triosephosphate isomérase, RPE = Ribulose-5-phosphate 3-épimérase, RPI = Ribose-5-phosphate isomérase. LSU = Grande sous-unité de la RuBisCO, SSU = Petit sous-unité de la RuBisCO, HDC = système de culture à forte densité cellulaire. *Ptrc* = promoteur hybride fort inductible par l'IPTG ; *Ptac* = promoteur hybride fort inductible par l'IPTG ; *Plac* = promoteur faible non inductible ; *Ptrc10* = promoteur hybride du promoteur *trp* d'*Escherichia coli* et du promoteur *lacUV5* ; *Pcab* = chlorophyll a/b-binding protein (*cab*) ; *PAOX1* = promoteur de l'alcool oxydase 1 (AOX1) de *Pichia pastoris* est couramment utilisé pour l'expression à haut niveau de protéines recombinantes ; *PGAL1* = promoteur fort inductible par le galactose ; *PTDH3* = promoteur constitutif issu de *Saccharomyces cerevisiae* ; *PnrsB* = promoteur inductible au nickel ; *Pcisy-flt36* = promoteur du caulimovirus (PCISV FLt36) ; *PCaMV35S* = Cauliflower mosaic virus 35S ; *POsU6* = promoteur U6 du riz *Oryza sativa* ; *Pubi* = promoteur de l'ubiquitine du maïs ; *Ptrc10* = *Ptrc* avec un opérateur *lac* ; *PpsbAI* = *PpsbAI* est un promoteur fort et inductible par la lumière issue de *Synechococcus* ; *PpsbAII* = promoteur fort induit par la lumière régulant chez les cyanobactéries l'expression du gène codant pour la protéine D1 du photosystème II ; *Ptic2op* = promoteur induit par l'IPTG ; *PrbcL* = promoteur constitutif régulant l'expression du gène codant pour la grande sous-unité de la RuBisCO ; *PrbcS3C* = promoteur constitutif régulant l'expression du gène codant pour la grande sous-unité de la RuBisCO de la tomate ; *PrbcS2B* = promoteur constitutif régulant l'expression du gène codant pour la grande sous-unité 2B de la RuBisCO ; *PrbcS* = promoteur constitutif régulant l'expression du gène codant pour la petite sous-unité de la RuBisCO ; *Ptk* = promoteur constitutif régulation l'expression du gène codant pour la transkétolase ; *PnrsB* = promoteur inductible au Nickel régulant l'activité de l'opéron *nrsBACD* (résistance au nickel).

Enzyme(s) du CCB	Châssis d'expression	Origine de la protéine	Mode(s) de surexpression	Phénotypes observés	Couplage à la production de molécules d'intérêt	Référence
PRK	<i>E. coli</i>	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> (Bactérie photo-synthétique)	Plasmidique pPRK12b Promoteur : <i>Plac</i>	Surproduction de PrkA (33kDa) dont l'activité est dépendante de la présence d'ATP et de Ru5P (les substrats connus de la PRK) et dont le produit RuBP est détecté par HPLC. L'enzyme recombinante PrkA correspond à 25% de la totalité des protéines solubles chez <i>E. coli</i> .	Non	Hallenbeck et Kaplan, 1987
PRK	<i>E. coli</i>	<i>Spinacia oleracea</i> (Épinard)	Plasmidique pSM100 Promoteur : <i>Plac</i>	L'activité spécifique de l'enzyme recombinante est similaire à celle obtenue à partir de l'épinard. Son rendement est très faible ($\leq 0,5$ % des protéines solubles totales) ; Hypothèse : la susceptibilité de l'enzyme à la protéolyse et toxicité inhérente pour l'hôte.	Non	Milanez <i>et al.</i> , 1991
PRK	<i>E. coli</i>	<i>Synechococcus</i> PCC 7942	Plasmidique pET-S7PRK Promoteur : <i>Plac</i>	L'enzyme recombinante correspond à 6-13% de la totalité des protéines solubles de <i>E. coli</i> ; 12-20 mg de PRK recombinante ont pu être purifiés à partir d'un litre de culture cellulaire. Activité spécifique de l'enzyme : $230 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg protéine})^{-1}$, soit une valeur 3 fois plus importante que l'enzyme native $72,6 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg protéine})^{-1}$.	Non	Kobayashi, 2003
PRK	<i>Pichia Pastoris</i>	<i>Spinacia oleracea</i>	Chromosomique	L'enzyme recombinante correspond à 4-6% de la totalité des protéines solubles de la levure ;	Non	Brandes <i>et al.</i> , 1996

	(Levure)	(Épinard)	(remplacement du gène <i>AOX1</i>) Promoteur : <i>PAOX1</i>	25 mg de PRK (sauvage ou mutante) purifiés à partir d'un litre de culture.		
PRK /RuBisCO	<i>S. cerevisiae</i> (Levure)	<i>Spinacia oleracea</i> <i>Prk</i> <i>Thiobacillus denitrificans</i> <i>cbbM</i> RuBisCO forme II (biais de codon adapté)	<i>prk</i> Chromosomique Locus : <i>CAN1</i> Promoteur : <i>PGAL1</i> <i>cbbM</i> Plasmidique pUDC075 Promoteur : <i>PTDH3</i>	Expression fonctionnelle de la PRK et de la RuBisCO pour l'incorporation de CO ₂ comme co-substrat pour l'ingénierie métabolique d'un eukaryote hétérotrophe industriel dans une optique d'amélioration des rendements de bioéthanol industriel (réduction du sous-produit glycérol). L'expression fonctionnelle de la RuBisCO de <i>T. denitrificans</i> dans <i>S. cerevisiae</i> n'a été observée que lors de la co-expression des chaperonnes (biais de codon optimisé) d' <i>E. coli</i> GroEL/GroES ; tandis que la co-expression de <i>CbbO2/CbbQ2</i> n'a pas entraîné d'augmentation supplémentaire de l'activité de la RuBisCO. L'activité enzymatique de la PRK recombinante est élevée : ~ 15 µmol mg de protéine ⁻¹ min ⁻¹ dans les extraits cellulaires de <i>S. cerevisiae</i> . Dans les cultures enrichies en azote et par rapport à la souche de référence, le rendement en glycérol de la souche exprimant les deux enzymes du CCB diminue de 68 %, mais les rendements en éthanol augmentent de +11% et la biomasse de +12% (sur milieu supplémenté en glucose et galactose). En culture discontinue anaérobique, supplémentée en CO ₂ (dans une optique de mise à l'échelle industrielle), l'expression des 2 enzymes du CCB diminue de -60 % la formation de glycérol et augmente les rendements en éthanol de 8 % (sur milieu supplémenté en galactose).	Éthanol	Guadalupe-Medina <i>et al.</i> , 2013
PRK/ RuBisCO	<i>Synechococcus</i> PCC 7942	<i>Synechococcus</i> PCC 7002 (<i>rbcLXS</i>) <i>Synechococcus</i> PCC7942 (<i>prk</i>)	Chromosomique Disruption du locus <i>cp12:: prk-rbcLXS</i> Promoteur <i>Ptrc</i>	Couplage du métabolisme du glucose avec le CBB pour améliorer la fixation du CO ₂ et la production de 2,3-butanediol. <i>En lumière continue en milieu BG11 supplémenté en glucose</i> , une souche co-surexprimant l'opéron <i>rbcLXS</i> et le gène <i>prk</i> ainsi que les gènes des enzymes de la voie OPP et du transporteur du galactose utilise efficacement à la fois le CO ₂ et le glucose et produit 12,6 g.L ⁻¹ de 2,3-butanediol avec un taux de 1,1 g.L ⁻¹ d ⁻¹ (avec 18,5 g.L ⁻¹ de glucose) <i>en 12 jours</i> , et lors d'alternance 12h/12h (conditions diurnes), la production est d'autant plus efficace : 5,7g.L ⁻¹ (à partir de 6,1 g.L ⁻¹ de glucose) <i>en 8 jours</i> . Il n'y a pas d'effets observés sur la croissance, mais l'activité de PRK est augmentée d'un facteur 1,3 dans la souche $\Delta cp12::prk-rbcLXS$ par rapport à la souche parentale, en revanche il n'y a pas de différence significative au niveau de l'activité de la RuBisCO.	2,3-butanediol	Kanno <i>et al.</i> , 2017

RuBisCO/ PRK	<i>E. coli</i>	<i>Synechocystis</i> PCC 6301 (<i>rbcLS</i>) RuBisCO de forme I	Mutations ponctuelles de l'enzyme native par mutagenèse aléatoire	La mutation ponctuelle M259T de la LSU améliore l'efficacité catalytique en augmentant la carboxylation de 28% et l'affinité au CO ₂ de 15%, en revanche aucunes modifications de l'affinité de la RuBP, de la sélectivité CO ₂ /O ₂ , des niveaux l'ARNm ou de la protéine LSU n'a été observé. Cette mutation améliore d'un facteur 4 à 9 le rendement en LSU correctement repliée dans <i>E. coli</i> en diminuant sa propension naturelle à se replier anormalement, mais aussi son interaction avec le complexe de chaperons GroES-GroEL. Pour les deux enzymes mutées M259T/A8S et M259T/F342S, des améliorations sont visibles au niveau de leur K _M ^C et K _M ^{RuBP} . D'autres mutations telles que F342V, I174V, Q212L, M262T, F345L et F345I permettent d'augmenter l'affinité pour RuBP. <u>M259</u> est positionné près de la surface de la protéine, <u>Ala8</u> se trouve dans la région N-ter hautement divergente de la LSU à l'interface avec la SSU, qui a une influence significative sur l'activité catalytique de la RuBisCO des végétaux et bactéries et <u>Phe342</u> est un acide-aminé très conservé (positionné en aval de la région hautement conservée de la boucle 6).	Non	Greene <i>et al.</i> , 2007
RuBisCO	<i>E. coli</i>	<i>Synechococcus</i> PCC 7002 (<i>rbcLXS</i>) RuBisCO de forme I	Mutations ponctuelles sur la base d'un système de sélection par l'activité basé sur <i>E. coli</i>	Les mutations E49V ou D82G de la SSU de la RuBisCO ont permis une augmentation de 85% de l'activité spécifique de carboxylation (en U/mg) et de 45% de l'efficacité catalytique du CO ₂ (K _{cat} ^C /K _M ^C en s ⁻¹ (mmol/L) ⁻¹). L'amélioration de l'activité est le résultat d'une augmentation significative du taux de rotation du CO ₂ (+120% du K _{cat} ^C en s ⁻¹), d'une diminution de l'affinité envers le CO ₂ (+51% du K _M ^C en μmol/L) et d'une affinité presque inchangée pour le substrat RuBP (K _M ^{RuBP} en μmol/L).	Non	Cai <i>et al.</i> , 2014
RuBisCO	<i>Rhodobacter capsulatus</i> <i>Δrbc</i> (bactérie pourpre)	<i>Synechococcus</i> PCC 6301 RuBisCO de forme I	Mutagenèse aléatoire et dirigée de l'opéron <i>rbcLS</i> puis Conjugaison	<i>Rhodobacter capsulatus</i> dépourvue de sa propre RubisCO a été utilisé comme châssis pour la sélection de variants de la RubisCO de <i>Synechococcus</i> PCC 6301. Des substitutions d'acides aminés ont permis d'augmenter les capacités de croissance (dépendantes du CO ₂) par rapport à l'enzyme de type sauvage. L'une de ces mutations a amélioré (X2) l'activité carboxylase de RubisCO. Dans les autres cas, l'amélioration de la performance de croissance était attribuable à des interactions différentielles des enzymes mutantes avec le CO ₂ et l'O ₂ .	Non	Satagopan <i>et al.</i> , 2019
RuBisCO	<i>Synechocystis</i> PCC 6803	<i>Rhodospirillum rubrum</i> (<i>alpha-protéobacterium</i>)	Chromosomique	Remplacement de l'opéron <i>rbcLXS</i> par le gène <i>rbcL</i> de <i>R. rubrum</i> . Transformants obtenus en conditions [CO ₂] 5%. Ségrégation de toutes les copies chromosomiques : <i>ie.</i> uniquement la production de l'enzyme de <i>R. rubrum</i> . Mutants incapables de produire des carboxysomes et de croître sous	Non	Amichay, 1993

		RuBisCO de forme II		conditions atmosphérique (0,03% de CO ₂) la faible affinité et spécificité de l'enzyme pour le CO ₂ ne lui permettant pas de soutenir la photosynthèse		
RuBisCO	<i>E. coli</i> et <i>Synechocystis</i> PCC 6803	<i>Synechococcus</i> PCC 6301 <i>rbcLS</i> RuBisCO de forme I	Évolution dirigée	Évolution dirigée de la RuBisCO cyanobactérienne via l'utilisation d'un système de sélection amélioré basé sur une souche d' <i>E. coli</i> dépendante de la RuBisCO. La surexpression de GroEL/ES (protéine chaperonne non spécifique importante pour le repliement) a permis d'augmenter la solubilité de la RuBisCO et a eu tendance à élargir la gamme des mutations permises. En revanche, la protéine chaperonne spécifique RbcX (importante pour l'assemblage) a eu un effet négatif sur l'évolutivité en empêchant un sous-ensemble de mutants de former l'holoenzyme. Une seule mutation dans la LSU RbcL ^{F1401} (isolée en l'absence de RbcX, mais en la présence de GroEL/ES) entraîne une amélioration de la croissance et une augmentation d'un facteur 2,9 de l'efficacité de la carboxylation, tout en réduisant légèrement la spécificité du CO ₂ (-9%). L'introduction de ce mutant chez l'hôte <i>Synechocystis</i> a permis d'améliorer le taux de photosynthèse ~55%.	Non	Durao <i>et al.</i> , 2015
RuBisCO et ccmM impliqué dans son assemblage	<i>Synechocystis</i> PCC 6803	<i>Synechocystis</i> PCC 6803 <i>rbcLXS</i> <i>Synechocystis</i> PCC 6803 <i>ccmM</i> (<i>slr1031</i>) RuBisCO de forme I	Plasmidique pPMQAK1 Promoteur <i>PpsbA2</i>	L'introduction d'une copie endogène additionnelle de l'opéron <i>rbcLXS</i> n'a pas entraîné d'augmentation du niveau de protéines RuBisCO et a même ralenti la croissance par rapport à la souche contrôle. En revanche, l'augmentation du nombre de transcrits a été confirmé par RT-PCR. Chez une souche surexprimant <i>ccmM</i> (impliqué dans l'assemblage et la stabilité de la RuBisCO), le niveau de protéines RuBisCO (<i>sous 15 et 100 μmol de photon m⁻²s⁻¹</i>), la vitesse de croissance ainsi que l'accumulation de biomasse (+22%) <i>sous 100 μmol de photon m⁻²s⁻¹</i> sont augmentés. Aussi, le taux d'évolution de l'O ₂ <i>in vivo</i> augmente de +53% <i>sous 15 μmol de photon m⁻²s⁻¹</i> et de +22% <i>sous 100 μmol de photon m⁻²s⁻¹</i> .	Non	Liang et Lindblad, 2016
RuBisCO	<i>Synechocystis</i> PCC 6803	<i>Synechocystis</i> PCC 6803 RuBisCO de forme I	Chromosomique Site neutre : <i>slr0168</i> FL50G (FLAG- <i>rbcLXS</i>) FL52G (<i>rbcLXS</i> -FLAG) <u>ET</u>	<i>Conditions de culture : 30°C, milieu BG11 et 100 μmol de photons m⁻²s⁻¹</i> L'opéron <i>rbcLXS</i> étiqueté (FLAG-tag ou strep-tagII) soit sur l'extrémité N-ter de la LSU, soit sur l'extrémité C-ter de la SSU (voir détails souches ci-contre) a été surexprimé au sein d'un site neutre chromosomique ou d'un plasmide chez <i>Synechocystis</i> . L'analyse de l'activité photosynthétique par la mesure du taux maximal d'évolution de l'O ₂ <i>in vivo</i> (normalisé par rapport à la teneur en chl.a), a augmenté dans les souches FL50 et FL52 de 54 et 42 % respectivement, et en normalisant par OD ₇₅₀ , de 63 et 49%	Non	Liang et Lindblad, 2017

			<p>Plasmidique pPMQAK1</p> <p>FL50 (FLAG-rbcLXS) FL52(rbcLXS-FLAG) FL50C (rbcL-FLAG-rbcXS)</p> <p>Promoteur : PpsbA2</p>	<p>respectivement.</p> <p>Chez les souches FL50 et FL52, les niveaux relatifs de RuBisCO ont augmenté d'un facteur 2,1 et 1,4 respectivement et l'activité totale de la RuBisCO a augmenté de 52 et 8,6%, respectivement.</p> <p>L'utilisation d'une autre séquence tag (strep-tag II), n'a pas montré de phénotypes similaires.</p> <p>La surexpression de l'opéron marqué au sein du site neutre chromosomique n'a pas entraîné de changement de phénotype par rapport à la souche parentale.</p> <p>La présence du tag FLAG a ainsi permis une augmentation de la stabilité de l'ARNm (efficacité de la transcription améliorée) et potentiellement de la stabilité de l'ADN polymérase (au niveau de l'initiation de la traduction, stabilité de l'enzyme, stabilité de la fixation des ribosomes).</p>		
RuBisCO	<i>Synechocystis</i> PCC 6803	<i>Synechocystis</i> PCC 6803 <i>rbcSC</i> (soit <i>rbcLXS</i>) sous le contrôle de <i>PpsbA2</i> avec la SSU taguée FLAG. RuBisCO de forme I	<p>Plasmidique (pPMQAK1)</p> <p>Souche EtOH-rbcSC :</p> <p><i>EtOH</i> codant pour la pyruvate décarboxylase (PDC) et l'alcool déshydrogénase (ADH) sous le contrôle de <i>PnrsB</i>.</p>	<p><i>Milieu BG11, 30°C, 65 μmol de photon/m²/s, ajout de NaHCO₃ (à J3 et J5) jusqu'à [50 mM]_f. Induction de la voie de biosynthèse de l'éthanol contrôlée par PnrsB avec l'addition de 2,5 μM de Ni²⁺.</i></p> <p>Au dernier jour de culture (J7), la production d'éthanol dans la souche EtOH-rbcSC a augmenté de 55% et la biomasse totale (poids sec de cellules + éthanol) de 7,7% par rapport à la souche parentale (EtOH). Soit le rapport éthanol/masse totale a été augmenté de 43,6%, contre 30,2% pour la souche EtOH, par rapport à la souche contrôle.</p> <p><i>Dans les mêmes conditions, sous 15 μmol de photon/m²/s :</i></p> <p>Pas de différence significative de croissance avec la souche EtOH. En revanche, au dernier jour de culture (J7), la production d'éthanol de la souche EtOH-rbcSC a été augmentée de 36% par rapport à l'EtOH.</p>	Éthanol	Liang et Lindblad, 2018
RuBisCO	<i>Synechococcus</i> PCC 7942	<i>Synechococcus</i> PCC 7942 (<i>rbcLS</i>) RuBisCO de forme I	Mutations ponctuelles de l'enzyme native par mutagenèse dirigée	<p>Le résidu L332 de la LSU a été remplacé par de nombreux acides aminés A, I, M, T, V entraînant une diminution de la spécificité Sc/o. La L332 joue donc un rôle important dans le maintien de la spécificité Sc/o relativement élevée de la RuBisCO de <i>Synechococcus</i> PCC 7942, mais dans d'autres organismes également où ce résidu est conservé.</p>	Non	Lee <i>et al.</i> , 1993
RuBisCO	<i>Synechococcus</i> PCC 7942	<i>Synechococcus</i> PCC 7942 (<i>rbcLS</i>) RuBisCO de forme I	Mutations ponctuelles de l'enzyme native par mutagenèse dirigée	<p>Le résidu 340 de la LSU a une influence sur la spécificité Sc/o de la RuBisCO.</p> <p>Le remplacement de A340Y et A340H a permis une augmentation de 12-13% de la spécificité de l'enzyme accompagnée d'une diminution de 25-33% du taux de fixation du CO₂ respectivement.</p> <p>A340N a permis une augmentation de 9% de la spécificité de l'enzyme et de 33% du taux de fixation du CO₂.</p>	Non	Madgwick <i>et al.</i> , 1997

RuBisCO	<i>Synechococcus</i> PCC 7942	<i>Allochromatiium vinosum</i> (bactérie pourpre sulfureuse) RuBisCO de forme I (<i>cvrbc</i>)	Chromosomique Promoteurs <i>psbAI</i> et <i>psbAII</i>	L'activité enzymatique totale de la RuBisCO est augmentée de 2,5-4X (<i>psbAI</i>) et 1,5-2X (<i>psbAII</i>) et le taux d'assimilation du CO ₂ et de production d'O ₂ de 50% par rapport à la souche sauvage. <i>Sous une lumière continue de 400 μmol m⁻² s⁻¹ à 30°C, et avec 20 mM bicarbonate dans le milieu, le rendement photosynthétique est augmenté d'un facteur 1,6 par rapport à la souche WT.</i>	Non	Iwaki <i>et al.</i> , 2006
RuBisCO	<i>Synechococcus</i> PCC 7942	<i>Synechococcus</i> PCC 6301 (<i>rbcLS</i>) RuBisCO de forme I	Chromosomique Intégration en aval de l'opéron endogène (<i>rbcLS</i>) Promoteur P _{lac}	<i>En milieu BG-11 modifié avec 50 mM NaHCO₃ sous 55 μE s⁻¹m⁻² de lumière et 30 °C</i> L'activité enzymatique de la RuBisCO est augmentée d'un facteur 1,4. La production photosynthétique d'O ₂ reste inchangée. Pour la production d'isobutyraldéhyde, intégration du gène de la kétoacid décarboxylase <i>kivd</i> (P _{trc}) au sein du site neutre NSI, et des gènes <i>alsS</i> , <i>ilvC</i> and <i>ilvD</i> (P _{Llac01}) pour augmenter la synthèse du précurseur 2-kétoisovalérate, au sein du NSII. La production d'isobutyraldéhyde est 2X plus importante que la souche parentale (1.1g/L pendant 8 jours) par rapport à la souche parentale.	Iso-butyraldéhyde	Atsumi <i>et al.</i> , 2009
RuBisCO	<i>Synechococcus</i> PCC 7942	<i>Synechococcus</i> PCC 7942 (<i>rbcLS</i>) RuBisCO de forme I	Chromosomique Promoteur <i>psbAI</i>	Expression de l'opéron synthétique <i>P_{trc}-fat1-PpsbAI-rbcLS</i> composé des gènes d'expression <i>fat1</i> codant pour l'acyl-ACP thioestérase de <i>C. reinhardtii</i> et <i>rbcLS</i> codant pour la RuBisCO native. La surexpression de l'opéron <i>rbcLS</i> n'a pas d'impact sur la physiologie de la souche. La production et consommation d'O ₂ est inchangée. La production d'acides gras libres n'est pas améliorée par la surexpression de l'opéron <i>rbcLS</i> .	Acides gras libres	Ruffing, 2013a
RuBisCO	<i>Synechococcus</i> PCC 7002	<i>Synechococcus</i> PCC 7942 (<i>rbcLS</i>) RuBisCO de forme I	Chromosomique Promoteur <i>psbAI</i>	Expression de l'opéron synthétique <i>P_{trc}-tesA-PpsbAI-rbcLS</i> composé des gènes d'expression <i>tesA</i> codant pour l'expression de la thioestérase d' <i>E. coli</i> tronquée et <i>rbcLS</i> codant pour la RuBisCO de S7942. La surexpression de l'opéron <i>rbcLS</i> permet une production d'acides gras libres (FFA) 3 fois supérieure à la souche parentale avec des concentrations de FFA excrétés > 130 mg/L.	Acides gras libres	Ruffing, 2013b
RuBisCO	<i>Synechococcus</i> PCC 7002	<i>Synechococcus</i> PCC 7002 (<i>rbcLXS</i>) RuBisCO de forme I	Chromosomique Remplacement du promoteur natif par le <i>P_{trc}</i> en amont de l'opéron	La surexpression de RuBisCO a permis une augmentation de son activité enzymatique d'un facteur 3,8, et le niveau de la LSU a montré une augmentation d'un facteur 5. En revanche, la surexpression de la RuBisCO n'a pas entraîné de changements mesurables au niveau physiologique sur la croissance, la taille des cellules et l'évolution de l'O ₂ photosynthétique. Mais elle a eu un impact marqué au niveau protéomique, avec une	Non	De Porcellinis <i>et al.</i> , 2018

				augmentation des protéines impliquées dans le métabolisme du pyruvate, le cycle TCA, le catabolisme des glucides et la biosynthèse des acides gras, mais a également entraîné une diminution des protéines du PSI (PsaB, PsaC et PsaL) et des protéines du PSII (PsbE, PsbU et PsbW), ainsi que de plusieurs protéines du phycobilisome.		
RuBisCO	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Δrbc	Plantes Épinard, Arabidopsis et tournesol <i>rbcS</i> (biais de codon adapté à <i>C.reinhardtii</i> + transit peptide fusionné à <i>rbcS</i>)	Chromosomique (transformation par électroporation) Promoteur natif : <i>Prbc</i>	Pour étudier l'influence de <i>RbcS</i> étrangères sur la fonction de la RuBisCO chez <i>Chlamydomonas</i> , la <i>RbcS</i> native a été substituée par celle des plantes épinard, Arabidopsis ou du tournesol. Les enzymes hybrides obtenues présentent une augmentation S_{CO_2/O_2} de 3-11%, conservent des valeurs V_{max} similaires et leur teneur en RuBisCO. En revanche, elles présentent une diminution de leur croissance photosynthétique et manquent de pyrénoides chloroplastiques suggérant que les <i>RbcS</i> contiennent les éléments structuraux responsables du ciblage de la RuBisCO vers le pyrénoides algal, qui est le site où le CO_2 est concentré pour une photosynthèse optimale.	Non	Genkov <i>et al.</i> , 2010
RuBisCO	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Rhodospirillum rubrum</i> RuBisCO de forme II	ADN chloroplastique/ plastome (par biolistique)	Substitution de la RuBisCO <i>N. tabacum</i> par celle de <i>R. rubrum</i> (sans SSU et sans exigences d'assemblage particulières). Les plantes transplastomiques sont autotrophes et reproductrices, mais nécessitent une plus forte concentration de CO_2 pour croître.	Non	Withney and Andrews, 2001
RuBisCO	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Synechococcus</i> PCC 7942 (<i>rbcLS</i>) RuBisCO de forme I	Chromosomique (par biolistique) Promoteur : <i>PrbcL (N.tabacum)</i>	Génération de deux lignées transplastomiques par remplacement du gène natif <i>rbcL</i> , par l'expression de <i>rbcLS</i> de <i>S. elongatus</i> simultanément avec <i>RbcX</i> ou <i>CcmM35</i> . <i>Sous 3% de CO₂</i> , les deux lignées sont : photosynthétiquement compétentes, et la croissance autotrophique repose uniquement sur l'activité de RuBisCO cyanobactérienne. Les deux formes de RuBisCO ont des taux plus élevés de fixation du CO_2 par unité d'enzyme que la RuBisCO de la souche contrôle <i>N. tabacum</i> (probablement dû au niveau plus faible de protéines solubles totales et de concentrations en chlorophylle). <i>Sous 3% de CO₂</i> , l'enzyme cyanobactérienne présente une plus grande activité carboxylase que l'enzyme du tabac, avec des activités cinétiques (taux et K_m) de $3s^{-1}$ (10,7 μM), et $12s^{-1}$ (200 μM), respectivement. <i>RbcX</i> n'est pas essentielle pour l'assemblage de RuBisCO cyanobactériennes fonctionnelles au sein des chloroplastes.	Non	Lin <i>et al.</i> , 2014
RuBisCO	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Synechococcus</i> PCC 7942 (<i>rbcLS</i>)	Génome du chloroplaste (par biolistique)	Les protéines chaperonnes <i>RbcX</i> et carboxysomales <i>CcmM35</i> cyanobactériennes ne sont pas nécessaires à l'assemblage d'une RuBisCO S7942 active : les protéines assemblées via le système d'assemblage des plantes ont la masse moléculaire et possèdent les	Non	Occhialini <i>et al.</i> , 2016

		RuBisCO de forme I	Promoteur Nt <i>PrbcL</i>	paramètres cinétiques prédits pour l'holoenzyme hexadécamérique cyanobactérienne.		
RuBisCO	<i>Oryza sativa</i> (Riz)	<i>Oryza sativa rbcS-sens</i>	Chromosomique Promoteur natif	L'introduction supplémentaire d'un gène <i>rbcS</i> en orientation sens (d'un des membres de la famille multigénique RBCS du riz) conduit à la surexpression de <i>rbcS</i> , une forte augmentation des niveaux d'ARNm du transgène, sans augmentation des niveaux d'ARNm des autres membres du multigène mais en régulant légèrement à la hausse l'expression de <i>rbcL</i> et la quantité de la RuBisCO. Cependant, même sous forte intensité lumineuse et faible [CO ₂], la surproduction de la protéine RuBisCO n'a pas entraîné d'amélioration significative de l'assimilation du CO ₂ .	Non	Suzuki <i>et al.</i> , 2007
RuBisCO	<i>Oryza sativa</i> (Riz)	<i>Sorghum bicolor</i> RuBisCO de forme I	Chromosomique (transformation médiée par <i>A. tumefaciens</i>) Promoteur : <i>Pcab</i>	Production de la SSU entière (RbcS) de la RuBisCO à k_{cat} élevée de la plante herbacée (C ₄) sorgho chez <i>Oryza sativa</i> . Le gène <i>rbcS</i> du Sorgho chez les lignées transgéniques a été exprimé à un niveau élevé : 30 %, à 79 % de la RbcS totale. Par rapport à la souche sauvage, les lignées transgéniques présentaient également une k_{cat} de 1,32 à 1,50 X supérieure, une teneur en RuBisCO significativement plus importante, une Km plus élevée pour le CO ₂ et une spécificité légèrement inférieure pour le CO ₂ .	Non	Ishikawa <i>et al.</i> , 2011
RuBisCO (SSU) et TK	<i>Oryza sativa</i> (Riz)	<i>Oryza sativa</i> (Riz)	Chromosomique (transformation médiée par <i>A. tumefaciens</i>) Promoteurs endogènes de TK et RBCS	La surexpression des gènes des deux enzymes entraîne une augmentation de la teneur en RuBisCO et TK, en revanche les taux d'assimilation du CO ₂ restent similaires à la souche WT.	Non	Suzuki <i>et al.</i> , 2017
RuBisCO	<i>Oryza sativa</i> (Riz) $\Delta rbcS$	<i>Sorghum bicolor</i> <i>SbRbcS</i> RuBisCO de forme I	Chromosomique (transformation médiée par <i>A. tumefaciens</i>) Promoteur : <i>POsU6</i>	Remplacement de la RbcS du riz par celle de Sorghum et obtention d'une RuBisCO hybride avec des propriétés catalytique très proches des plantes C ₄ avec un k_{cat} et K_c plus élevés et une $S_{c/o}$ moins importante. Les lignées transgéniques ont montré une teneur moindre en RuBisCO, mais leur capacité photosynthétique était significativement plus élevée, et dans des conditions de CO ₂ élevé une production de biomasse similaire par rapport à la souche sauvage. L'analyse de la structure cristalline à haute résolution des RuBisCO révèle des différences structurelles autour du pore central de la RuBisCO et du hairpin $\beta C-\beta D$ dans la RbcS, qui pourrait avoir un impact sur la flexibilité du site catalytique de la RuBisCO et sur ses propriétés catalytiques.	Non	Matsumura <i>et al.</i> , 2020

Chloro- plastic FBPase	<i>Anabaena</i> PCC 7120	Blé	Plasmidique pDC-fbp Promoteur : <i>PpsbA</i>	<i>Sous conditions atmosphériques</i> Chez les cyanobactéries transgéniques, l'expression de la protéine FBPase est 126,5% plus importante, l'activité enzymatique 1,4 fois plus élevée et l'efficacité photosynthétique améliorée de 122,5%. De plus leur capacité de croissance (taux de croissance et teneur en <i>chla</i>) sont plus importantes. L'introduction du gène hétérologue codant pour la FBPase d'une plante supérieure augmente la photosynthèse et croissance cellulaire chez la cyanobactérie.	Non	Ma <i>et al.</i> , 2005
FBA / TPI	<i>Anabaena</i> PCC 7120	FBA cytosolique de riz TPI chloroplastique d'épinard	Plasmidique pRLFT1 : exprimant les gènes en tandem FBA- TPI (souche TS1) pRLFT2 : exprimant 2 tandem des gènes FBA-TPI (TS2) Promoteur : <i>Ptrc</i>	<i>Sous une lumière continue de 60 μmol photons m⁻²s⁻¹, en milieu BG-11 bullé avec 2% (v/v) de CO₂ à 30°C</i> La co-expression de deux enzymes du CCB non régulée, FBA et TPI a permis une augmentation de leurs activités enzymatiques de 177% et 259% pour TS1 et TS2 respectivement. L'évolution de l'O ₂ photosynthétique a montré une augmentation de 130% pour TS1 et 198% pour TS2, et le poids sec des cellules à lui montré une augmentation de 122% et de 171% respectivement. Ces résultats suggèrent que l'activité endogène des enzymes FBA et TPI n'est pas suffisante pour soutenir un rendement photosynthétique accru.	Non	Ma <i>et al.</i> , 2006
FBPase	<i>Synechocystis</i> PCC 6803 (GT)	Spinach <i>fbp</i> (sans la séquence ciblant le chloroplaste et séquence optimisée pour le biais de codon de <i>Synechocystis</i>) <i>Synechocystis</i> PCC 6803 <i>fbp-I</i> <i>fbp-II</i>	Chromosomique Les régions flanquantes de <i>IS203c</i> , <i>slr0846</i> et <i>carA</i> ont été utilisées comme sites neutres Promoteur : <i>Ptrc</i>	La production de sorbitol par les cyanobactéries via l'expression de la S6PDH a montré être hautement toxique pour les cellules. Mais la co-expression avec une FBPase a permis une réduction considérable de l'inhibition de la croissance. Les auteurs suggèrent que le manque de G6P ou de F6P est la raison sous-jacente de la toxicité de la production de sorbitol : notamment à cause de la diminution du rapport NADPH/NADP ⁺ qui suggère que la demande de réducteurs est augmentée ; ainsi les auteurs ont montré que la surexpression de la transhydrogénase membranaire PntAB impliquée dans la génération de NADPH à partir de NADH a permis l'amélioration des taux de production sorbitol. La surexpression des trois enzymes (souche <i>s6pdh/fbp/pnt</i>) permet une production durable de sorbitol 312 mg/L (après 360h), soit près de 27 fois plus que le rendement de la souche surexprimant seulement <i>s6pdh</i> . Les souches <i>s6pdh/fbp</i> et <i>s6pdh/fbp-I</i> ont permis respectivement la production de 250 et 200mg/L au même temps de cultivation. Aussi, les activités enzymatiques de la FBPase, par comparaison avec la souche sauvage est 5X plus élevée chez la souche surexprimant <i>s6pdh/fbp-I</i> (<i>slr2094</i>), 3X plus chez <i>s6pdh/fbp-II</i> (<i>slr0952</i>) et 1,5 X plus chez <i>s6pdh/fbp</i> .	Sorbitol	Chin <i>et al.</i> , 2018

Chloroplast ic FBPase	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii (fbp1)</i>	Génome du chloroplaste (région intergénique entre les gènes <i>psbA</i> et <i>5S rRNA</i>)	<p><i>Conditions de culture : lumière continue 120 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sous 24 °C et dans un milieu à concentration en sel élevé, pH 7.0.</i></p> <p>La surexpression de l'enzyme entraîne une augmentation des niveaux de protéines FBPases (4X) par rapport à la souche WT. L'activité FBPase est 1,4 X plus élevée mais la croissance photoautotrophique est plus lente (taux de croissance et accumulation de biomasse) avec ou sans niveaux élevés de CO₂. La FBPase ne catalyse donc probablement pas une étape limitante du CCB chez <i>C. reinhardtii</i> et possiblement dans d'autres algues (contrairement aux plantes supérieures).</p>	Non	Dejtisakdi and Miller, 2016
FBPase (Form II)	Tobacco <i>Nicotiana tabacum</i> cv. <i>Xanthi</i>	<i>Synechococcus</i> PCC 7942 (<i>fbp-II</i>)	Chromosomique Promoteur : <i>PrbcS3C</i> de la tomate + un peptide transit	<p><i>Sous des conditions standard : Souches cultivées sous un cycle de 12 h de lumière (25°C) et 12 h d'obscurité (20°C) avec une intensité lumineuse de 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 360 ppm de CO₂ et 60 % d'humidité relative.</i> La surexpression de la FBPase permet d'augmenter son activité enzymatique (2,3X), la teneur en matière sèche (1,3X). Augmentation des concentrations d'hexose, de saccharose et d'amidon dans les feuilles supérieures et inférieures.</p> <p><i>Sous des conditions saturantes en CO₂ :</i> Augmentation d'un facteur 1,3X de l'activité photosynthétique de l'enzyme.</p> <p><i>Sous une lumière saturante de 1500 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$:</i> Augmentation de l'activité photosynthétique (1,15X), de la quantité de substrat RuBP (1,4X), et de l'état d'activation <i>in vivo</i> de la RuBisCO</p>	Non	Tamoi <i>et al.</i> , 2006
SBPase	<i>Nicotiana tabacum</i> (Tabac)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Chromosomique (transformation de disques foliaires via <i>A. tumefaciens</i>) Promoteur <i>CaMV35S</i>	Les plantes présentant une activité SBPase accrue : augmentation des taux de photosynthèse, de la capacité de régénération du RuBP, accumulation d'amidon et de saccharose pendant la photopériode, augmentation de la fixation du CO ₂ (6–12%) et augmentation de la surface foliaire et de la biomasse jusqu'à +30%. L'analyse de l'assimilation du CO ₂ a révélé que l'augmentation de la photosynthèse pouvait être attribuée à une augmentation de la capacité de régénération du RuBP.	Non	Lefebvre <i>et al.</i> , 2005
SBPase	<i>Nicotiana tabacum</i> <i>Xanthi</i> (Tabac)	<i>Chlamydomonas reinhardtii (sbp)</i>	Chromosomique Promoteur : <i>PrbcS3C</i> de la tomate + un peptide transit	<p><i>Sous des conditions standard : Souches cultivées sous un cycle de 12 h de lumière (25°C) et 12 h d'obscurité (20°C) avec une intensité lumineuse de 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 360 ppm de CO₂ et 60 % d'humidité relative.</i> Augmentation de l'activité enzymatique (entre 1,6X-4,3X), du poids sec (1,5X), du rendement de fixation photosynthétique du carbone, du taux de croissance, du niveau de RuBP et de l'état d'activation <i>in vivo</i> de la RuBisCO par rapport à la souche WT. Augmentation de la hauteur des plantes (1,4X).</p> <p><i>Sous des conditions saturantes en CO₂ :</i> Augmentation d'un facteur 1,3 de l'activité photosynthétique de l'enzyme. Augmentation des</p>	Non	Tamoi, <i>et al.</i> , 2006

				concentrations d'hexose, de saccharose et d'amidon dans les feuilles supérieures et inférieures. <i>Sous une lumière saturante de 1500 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$: Augmentation de la quantité de substrat RuBP (1,4X). L'activité photosynthétique est augmentée (jusqu'à 1,27X) tandis que sous 200 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de lumière, il n'y a pas de différences significatives.</i>		
SBPase	<i>Nicotiana tabacum</i> (Tabac)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Chromosomique Promoteur <i>CaMV35S</i>	<i>Conditions de culture : 585 ppm, [CO₂]atm = 383ppm (donc concentration en carbone élevée)</i> La surexpression de l'ADNc codant pour la SBPase entraîne une augmentation de la teneur et de l'activité de l'enzyme permettant l'amélioration de l'assimilation du carbone, du taux de transport d'électrons (J et J _{Max}), de la capacité de régénération du RuBP et ainsi l'augmentation des rendements de cultures par rapport à la souche WT.	Non	Rosenthal <i>et al.</i> , 2011
SBPase	<i>Nicotiana tabacum</i> (Tabac)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Chromosomique (Transformation médiée par <i>A.tumefaciens</i> (Horsch <i>et al.</i> , 1985))	La surexpression de la SBPase permet l'augmentation de l'efficacité de fixation du CO ₂ , du transport des électrons et de la photosynthèse. Sous faible et haute intensité lumineuse respectivement, il est observé une augmentation de la hauteur de la plante (+16% et +23%), de l'aire des feuilles (+ 35% et +36%), du nombre de feuille (+21% et +22%) et de la biomasse (+52% et +34%) par rapport à la souche WT.	Non	Simkin <i>et al.</i> , 2015
SBPase	<i>Oryza sativa</i> (Riz)	<i>Oryza sativa</i> (Riz)	Transformation médiée par <i>A.tumefaciens</i> (Toki 1997). Promoteur : <i>PUBi</i>	Les résultats suggèrent que la surexpression de l'ADNc codant pour la SBPase pourrait être une méthode efficace pour améliorer la tolérance des plantes aux températures élevées. En effet, les plantes transgéniques montrent une accumulation de la SBPase dans les chloroplastes, une tolérance accrue au stress (dû aux températures élevées pendant la croissance des jeunes plantules) et une assimilation du CO ₂ plus tolérante aux températures élevées que la souche WT, permettant une augmentation de la photosynthèse dans ces conditions.	Non	Feng <i>et al.</i> , 2007
SBPase	Tomate <i>Solanum lycopersicum</i>	Tomate <i>Solanum lycopersicum</i> SISBPase	Chromosomique (transformation médiée par <i>A.tumefaciens</i>) Promoteur <i>CaMV35S</i>	La SISBPase est exprimée dans les feuilles, les tiges et les fruits, mais pas dans les racines (en accord avec ses fonctions biologiques dans le chloroplaste). Des niveaux d'activité différents de la SBPase affectent la croissance et le développement des plantes en modifiant la capacité photosynthétique et l'accumulation de glucides. Cette dernière couplée avec l'augmentation du taux de régénération de la RuBP et l'amélioration de l'efficacité quantique du photosystème II confère aux plants de tomates transgéniques une meilleure tolérance au froid. La surexpression de la SISBPase a donc un intérêt biotechnologique au vu de son impact sur la production et la tolérance au stress des plantations.	Non	Ding <i>et al.</i> , 2016

SBPase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Chromosomique (trappage floral médiée par <i>A. tumefaciens</i>) Promoteur : <i>PrbcS2B</i>	<i>L'alternance de cycle de 8-h lumière/16-h nuit, sous faible intensité lumineuse (130 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) ou forte intensité lumineuse (390 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) entraîne respectivement une augmentation de +53% et +39% du rendement en graines. Sous faible intensité lumineuse, il y a augmentation de l'activité enzymatique, du rendement de fixation photosynthétique du CO_2, de la capacité photosynthétique (F_q'/F_m', efficacité quantique maximale de PSII), de la masse sèche (+ 42%) et de l'aire des feuilles (+40%) par rapport à la souche WT.</i>	Non	Simkin <i>et al.</i> , 2017
FBA	<i>Synechocystis</i> PCC 6803	<i>Synechocystis</i> PCC 6803 FBA-classe I <i>fbaI (slr0943)</i> FBA-classe II <i>fbaA (sll0018)</i>	Plasmidique <i>pPMQAK1</i> Promoteur <i>PpsbA2</i>	<i>Milieu BG11, 30°C, sous agitation, $[\text{CO}_2]_{\text{atm}}$ Sous lumière continue de 15 μmol de photon $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$: +50% sur le ratio d'évolution de l'O_2 <i>in vivo</i>, pour les FBA classe I et II, diminution de la vitesse de croissance pour la FBA de classe II. Sous lumière continue de 100 μmol de photon $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$: +50% sur le ratio d'évolution de l'O_2 <i>in vivo</i>, +50% de vitesse de croissance et plus grande accumulation de biomasse pour les FBA de classe I et II.</i>	Non	Liang et Lindblad, 2016
FBA	<i>Synechocystis</i> PCC 6803	<i>Synechocystis</i> PCC 6803 <i>fbaA (sll0018)</i> sous le contrôle de <i>PpsbA2</i> .	Plasmidique (<i>pPMQAK1</i>) Souche EtOH- <i>fbaA</i> : <i>EtOH</i> codant pour la pyruvate décarboxylase (PDC) et l'alcool déshydrogénase (ADH) sous le contrôle de <i>PnrsB</i> .	<i>Milieu BG11, 30°C, 65 μmol de photon/m^2/s, ajout de NaHCO_3 (à J3 et J5) jusqu'à [50 mM]_f. Induction de la voie de biosynthèse de l'éthanol contrôlée par <i>PnrsB</i> avec l'addition de 2,5 μM de Ni^{2+}. Au dernier jour de culture (J7), la production d'éthanol dans la souche EtOH-<i>fbaA</i> a augmenté de 69% et la biomasse totale (poids sec de cellules + éthanol) de 10,1% par rapport à la souche parentale (EtOH). Soit le rapport éthanol/masse totale a été augmenté de 47,4%, contre 30,2% pour la souche EtOH, par rapport à la souche contrôle. <i>Dans les mêmes conditions sous 65 μmol de photon/m^2/s :</i> Pas de différence significative de croissance avec la souche EtOH. En revanche, au dernier jour de culture (J7), la production d'éthanol de la souche EtOH-<i>fbaA</i> a été augmentée de 55% par rapport à l'EtOH.</i>	Éthanol	Liang <i>et al.</i> , 2018
FBA	<i>Chlorella vulgaris</i> (Algue)	<i>Synechocystis</i> PCC 6803 (avec le transit peptide cTP de <i>rbcS</i> de <i>C. vulgaris</i>)	Chloroplastique Promoteur <i>CaMV35S</i>	<i>Milieu BBM, 25 °C, 150 rpm d'agitation, sous lumière continue de 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La surexpression de la FBA entraîne une augmentation de l'activité enzymatique (1,3X), du rendement de fixation du CO_2 (1,2X), du taux d'évolution de l'O_2 (+20%), des taux de croissance et de l'accumulation de biomasse. Des analyses moléculaires et physiochimiques suggèrent que la surexpression de la FBA entraînerait une plus forte régénération de RuBP au sein du CCB ainsi qu'un impact au niveau du transfert d'énergie (augmentation du transfert d'e^-) dans les photosystèmes.</i>	Non	Yang <i>et al.</i> , 2017
FBA	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Chromosomique	<i>Cycle jour/nuit (16h/8h) 400 μmol de photon/m^2/s Les plantes transgéniques ont une activité aldolase plastidiale</i>	Non	Uematsu <i>et al.</i> , 2012

	(Tabac)	(aldolase plastidiale)	(chloroplaste)	augmentée d'un facteur 1,4-1,9 ainsi qu'une croissance accrue sous concentration élevée de CO ₂ (700 ppm), avec une biomasse multipliée par un facteur 2, ainsi qu'une augmentation d'un facteur 1,5 de la fixation photosynthétique du CO ₂ par rapport aux plantes de type sauvage. La surexpression de l'aldolase a également stimulé la régénération du RuBP et de ses précurseurs, engendré une diminution du 3-PGA, en revanche l'activité de la RuBisCO reste inchangée.		
FBA	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> (FBA1)	Chromosomique Promoteur <i>CaMV35S</i>	<i>Lumière continue 100 µE/m²/s</i> L'augmentation de l'activité enzymatique par la surproduction de FBA1 permet une augmentation de la production de biomasse notamment en renforçant l'assimilation photosynthétique du CO ₂ de par une augmentation de la surface foliaire (+ de biomasse aérienne). Le rendement de production de graines est également augmenté.	Non	Hatano-Iwasaki and Ogawa., 2012
FBA	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Chromosomique (tramage floral via <i>A. tumefaciens</i>) Promoteur : <i>PrbcS2B</i>	<i>L'alternance de cycle de 8-h lumière/16-h nuit, sous faible intensité lumineuse (130 µmol/m²/s) ou forte intensité lumineuse (390 µmol/m²/s) entraîne respectivement une augmentation de +35% et +36% du rendement en graines. Sous faible intensité lumineuse, il y a augmentation de l'activité enzymatique, du rendement de fixation photosynthétique du CO₂, de la capacité photosynthétique (Fq'/Fm', efficacité quantique maximale de PSII), de la masse sèche (+ 32%) et de l'aire des feuilles (+44%) par rapport à la souche WT.</i>	Non	Simkin et al., 2017
TK	<i>Synechocystis</i> PCC 6803	<i>Synechocystis</i> PCC 6803 <i>tktA</i> (<i>sll1070</i>)	Plasmidique pPMQAK1 Promoteur <i>PpsbA2</i>	<i>Conditions de culture : Milieu BG11, 30°C, [CO₂]_{atm}</i> <i>Sous lumière continue de 15 µmol photons m⁻²s⁻¹ : Pas de phénotype chlorotique, +85% de production d'O₂ in vivo, +24% d'accumulation de biomasse, vitesse de croissance inchangée par rapport à la souche contrôle.</i> <i>Sous lumière continue de 100 µmol photons m⁻²s⁻¹ : Phénotype chlorotique (similaire à celui observé chez la plante de tabac par Khozaei et al., 2015), -32%, de production d'O₂ in vivo, +42% d'accumulation de biomasse, croissance ralentie par rapport à la souche contrôle.</i>	Non	Liang and Lindblad, 2016
TK	<i>Synechocystis</i> PCC 6803	<i>Synechocystis</i> PCC 6803 <i>tktA</i> (<i>sll1070</i>) sous le contrôle de <i>PpsbA2</i>	Plasmidique (pPMQAK1) Souche EtOH-tktA : <i>EtOH</i> codant pour la pyruvate décarboxylase	<i>Milieu BG11, 30°C, 65 µmol de photon/m²/s, ajout de NaHCO₃ (à J3 et J5) jusqu'à [50 mM]_f. Induction de la voie de biosynthèse de l'éthanol contrôlée par <i>PnrsB</i> avec l'addition de 2,5 µM de Ni²⁺.</i> Au dernier jour de culture (J7), la production d'éthanol dans la souche EtOH-tktA a augmenté de 37% et la biomasse totale (poids sec de cellules + éthanol) de 8,8% par rapport à la souche parentale (EtOH). Soit le rapport éthanol/masse totale a été augmenté de 38,4%, contre 30,2% pour la souche EtOH, par rapport à la souche contrôle.	Éthanol	Liang et al., 2018

			(PDC) et l'alcool déshydrogénase (ADH) sous le contrôle de <i>PnrsB</i> .	<i>Dans les mêmes conditions sous 15 μmol de photon/m²/s :</i> Pas de différence significative de croissance avec la souche EtOH. En revanche, au dernier jour de culture (J7), la production d'éthanol de la souche EtOH-tktA a été augmentée de 38% par rapport à l'EtOH.		
TK	<i>Nicotiana tabacum</i> (Tabac)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Chromosomique (Transformation via <i>A. tumefaciens</i> (Horsch <i>et al.</i> , 1985)). Promoteur <i>CaMV35S</i>	<i>Conditions de culture : cycle jour/nuit (16h/8h) sous une intensité lumineuse de 200 μmol de photon/m²/s.</i> Augmentation de l'activité enzymatique, croissance ralentie, phénotype chlorotique, diminution des niveaux de thiamine et de la surface des feuilles. Les résultats suggèrent que la surexpression de la TK a un impact sur l'homéostasie de la thiamine chez les plantes.	Non	Khozai <i>et al.</i> , 2015
FBP/ SBPase	<i>Synechocystis</i> PCC 6803	<i>Synechocystis</i> PCC 6803 fbpI (<i>slr2094</i>) <i>Synechococcus</i> PCC 7942 79glpX (<i>Synpcc7942_0505</i>) <i>Synechococcus</i> PCC 7002 70glpX (<i>SYNPCC7002_A1301</i>)	Plasmidique pPMQAK1 Promoteur <i>PpsbA2</i>	<i>Milieu BG11, 30°C, sous agitation, [CO₂]_{atm}</i> <i>Sous lumière continue de 15 μmol de photon m⁻² s⁻¹ :</i> Pour la souche fbpI, + 66% sur l'évolution de l'O ₂ <i>in vivo</i> , pas d'effets sur la biomasse, croissance ralentie. <i>Sous lumière continue de 100 μmol de photon m⁻² s⁻¹ :</i> Pour la souche fbpI, + 40% sur l'évolution de l'O ₂ <i>in vivo</i> , + 52% de biomasse, vitesse de croissance inchangée. <i>Sous lumière continue de 15 et 100 μmol de photon m⁻² s⁻¹ :</i> Pour les souches 79glpX et 70glpX, l'expression exogène de séquences codant pour des FBP/ SBPases hétérologues a permis l'induction de phénotypes similaires à la souche fbpI, mais avec des différences au niveau de l'évolution de l'O ₂ .	Non	Liang <i>et Lindblad</i> , 2016
FBP/ SBPase	<i>Synechocystis</i> PCC 6803	<i>Synechococcus</i> PCC 7002 70glpX (<i>SYNPCC7002_A1301</i>) sous le contrôle de <i>PpsbA2</i> .	Plasmidique (pPMQAK1) Souche EtOH-70glpX : - <i>EtOH</i> codant pour la pyruvate décarboxylase (PDC) et l'alcool déshydrogénase (ADH) sous le contrôle de <i>PnrsB</i> .	<i>Milieu BG11, 30°C, 65 μmol de photon/m²/s, ajout de NaHCO₃ (à J3 et J5) jusqu'à [50 mM]_f. Induction de la voie de biosynthèse de l'éthanol contrôlée par PnrsB avec l'addition de 2,5 μM de Ni²⁺.</i> Au dernier jour de culture (J7), la production d'éthanol dans la souche EtOH-70glpX a augmenté de 67% et la biomasse totale (poids sec de cellules + éthanol) de 15,1% par rapport à la souche parentale (EtOH). Soit le rapport éthanol/masse totale a été augmenté de 45,2%, contre 30,2% pour la souche EtOH, par rapport à la souche contrôle. <i>Dans les mêmes conditions sous 15 μmol de photon/m²/s :</i> Pas de différence significative de croissance avec la souche EtOH. En revanche, au dernier jour de culture (J7), la production d'éthanol de la souche EtOH-70glpX a été augmentée de 39% par rapport à l'EtOH.	Éthanol	Liang <i>et al.</i> , 2018
FBP/ SBPase	<i>Synechococcus</i> PCC 7002	<i>Synechocystis</i> PCC6803	Plasmidique	<i>Milieu A+, 37°C, sous 3% [CO₂], 250 μmol photon m⁻² s⁻¹ et notamment sous 1500 μmol photon m⁻² s⁻¹,</i> la surexpression de la	Non	De Porcellinis

		<i>slr2094</i>	pDFtrc Promoteur <i>Ptrc</i>	BiBPase a entraîné une augmentation d'un facteur 1,7 de son activité enzymatique, du volume cellulaire, du taux de croissance, et de l'évolution photosynthétique de l'O ₂ (+150%) par rapport à la souche WT. La surexpression de la BiBPase a entraîné une augmentation de l'activité enzymatique de la fructose-1,6-bisphosphate adolase (FBA) d'un facteur 1,6, et de la RuBisCO d'un facteur 2,4, mais une réduction d'un facteur 4 de la glucose-6-phosphate déhydrogénase (GAPDH). Par immunodétection le niveau de RbcL a montré une augmentation d'un facteur 3. La surexpression de l'enzyme entraîne également une reprogrammation globale du métabolisme du carbone favorisant la fixation du carbone photosynthétique et le partage du carbone vers les glucides non stockés (diminution des niveaux en glycogène et de la teneur totale en sucre intracellulaire).		<i>et al.</i> , 2018
FBP/ SBPase	<i>Euglena gracilis</i> (Algue)	<i>Synechococcus</i> PCC 7942 (+ un peptide transit rbcS3C de la tomate)	Chloroplastique (transformation par bombardement de nanoparticules) Promoteur <i>CaMV35S</i>	<i>Conditions de culture : milieu Cramer- Mayers, agitation : 120rpm, 26°C, lumière continue 100 μmol photons m²s⁻¹ et 0,04% de CO₂</i> Dans ces conditions, le volume cellulaire des souches transgéniques est plus important que la souche WT. <i>Sous lumière continue de 350 μmol photons m²s⁻¹ et 0,3% de CO₂ :</i> L'activité photosynthétique et l'accumulation de biomasse (1,3-2X) et de paramylon (précurseurs des esters de cire) (+29-35%) sont améliorées. Lorsque ces souches transgéniques sont placées en anaérobiose, la productivité des esters de cire est ~ 13 à 100 fois (selon la lignée) plus élevée que dans la souche WT. Également, la teneur en acides gras totaux (C12, C14, C16) est accrue dans les lignées transgéniques, en particulier l'acide myristique (C14:0), avec une teneur 2,5-5 fois plus élevée que la souche WT.	Esters de cire	Ogawa <i>et al.</i> , 2015
FBP/ SBPase	<i>Nicotiana tabacum</i> (Tabac)	<i>Synechococcus</i> PCC 7942 BiBPase (+ peptide transit de la tomate rbcS)	Chromosomique (transformation médiée par <i>A. tumefaciens</i>) Promoteur <i>PrbcS</i>	<i>Sous conditions atmosphériques (360 ppm CO₂)</i> , par rapport à la souche WT les lignées transgéniques observent une augmentation de l'activité enzymatique de la FBPase (1,2-1,8X) et de la SBPase (2,3-1,7X), de la fixation photosynthétique du CO ₂ (1,25X), de l'activité photosynthétique (1,2X et jusqu'à 1,5 <i>sous [CO₂] élevées</i>), de matière sèche finale (1,5X), de la croissance (hauteur des plants 1,4-1,5X), des concentrations en RuBP et G3P et de l'activité enzymatique de la RuBisCO (1,2X), des intermédiaires métaboliques du CCB ainsi qu'une plus grande accumulation de carbohydrates (amidon, sucrose, hexose) et une activité du PSII (Fv/Fm) égales.	Non	Miyagawa <i>et al.</i> , 2001
FBP/ SBPase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Synechococcus</i> PCC 7942	Chromosomique	<i>Cycle jour/nuit de 12h/12h, à 23 °C avec une intensité lumineuse de 100-150 μmol photons m⁻² s⁻¹, 400 ppm (ambient) ou 1000 ppm (élevé) de CO₂, et 60% d'humidité relative.</i>	Non	Otori <i>et al.</i> , 2017

		FBPase-II	(transformation médiée par <i>A. tumefaciens</i>) Promoteur <i>CaMV35S</i>	L'activité enzymatique totale de la FBPase chez les lignées transgéniques est 1,27-1,35X plus importante que pour la souche WT. <i>Sous [CO₂] ambiant</i> , aucunes différences de croissance n'ont été observées. <i>Sous [CO₂] élevées</i> , l'activité photosynthétique de la lignée transgénique est accrue, le nombre de pousses latérales sont plus nombreuses et les branches sont 1,6 à 2X plus larges, enfin les niveaux de production en glucose, sucrose et fructose plus importants que la lignée WT (en revanche les niveaux d'amidon sont équivalents). Aussi, les niveaux d'expression de MAX1, MAX4, YUCCA8, YUCCA9 et BRC1 impliqués dans la biosynthèse et les voies de signalisation hormonales de l'auxine et ou strigolactones sont plus faibles pour les lignées transgéniques.		
FBP/SBPase	<i>Glycine max</i> Soja	<i>Synechococcus</i> PCC 7942 FBP1	Chromosomique (transformation médiée par <i>A. tumefaciens</i>) Promoteur <i>Pcisv-ft36</i>	<i>Sous l'ensemble des conditions de cultures testées ([CO₂] et T° ambiantes (400ppm) ou élevées (600ppm et +2,7 °C le jour, +3,4 °C la nuit)</i> , la surexpression de la FBP/SBPase entraîne une augmentation de l'assimilation de carbone (4-14%), du taux maximal de carboxylation de la RuBisCO ($V_{c,max}$) entre 5-8% et la capacité de régénération du RuBP (J_{max}) entre 4-8%. <i>Sous [CO₂] ambiant et T° élevée</i> , des réductions significatives (de 19-31%) des rendements en graines de la souche transgénique et WT. <i>Sous [CO₂] élevé et T° élevée</i> , les plantes transgéniques ont maintenu les niveaux de rendement en graines par comparaison avec la souche WT sous <i>T° ambiante</i> (entre -11% et -22%). Il est observé également une augmentation de la capacité de régénération de la RuBP (4-8%) et des taux de carboxylation de la RuBisCO (5-8%). Ces résultats ont un intérêt biotechnologique dans le sens où le génie génétique sur le CCB pourrait avoir un rôle à jouer dans l'atténuation des effets futurs sur les rendements de soja d'environnement à forte teneur en CO ₂ et à T° élevée.	Non	Köhler <i>et al.</i> , 2017
RPI	<i>E. coli</i>	<i>Epinard</i>	Plasmidique Promoteur : <i>Ptac</i>	Trois résidus du site actif ont été identifiés par mutagenèse dirigée : D87A, K100A, et D90A ; mais les mutants ont présenté des valeurs de k_{cat} fortement diminuées (0,0012, 0,074 et 0,38 %) de celles de la souche sauvage respectivement. Seule la substitution E91A conserve l'activité de la souche sauvage.	Non	Jung <i>et al.</i> , 2000
RPE/RPI	<i>Synechocystis</i> PCC 6803	<i>Synechocystis</i> PCC 6803	RPE/RPI Plasmidique Plasmide dérivé de RSF1010 (Taton <i>et al.</i> , 2014)	<i>Conditions de culture : milieu BG-11 à 30 °C en lumière blanche continue de 50 μmoles de photons m⁻²s⁻¹ (pour la production : 130 μmoles m⁻²s⁻¹ avec 10 % (v/v) de dodécane)</i> Expression des limonènes synthases (LS) de <i>Mentha spicata</i> et <i>Citrus limon</i> ; la production de limonène par la LS de <i>M. spicata</i> est 2X plus	Limonène	Lin <i>et al.</i> , 2017

			<p>Promoteur : <i>PrbcL</i></p> <p>LS (lims et licl) Site neutre plasmide endogène PCC5.2. Promoteur : <i>Ptrc10</i></p>	<p>importante, et donc cette dernière a une meilleure activité catabolique ou niveau d'expression des protéines et est donc sélectionnée pour tester les stratégies d'ingénierie suivantes.</p> <p>La surexpression de <i>rpe</i> et <i>rpi</i> chez la souche productrice de limonène entraîne une augmentation de 1,3X du rendement en limonène (3,7 mg/L) après 7 jours de culture, aussi le pool de métabolites de X5P s'est avéré être augmenté.</p>		
<p>FBA - TK - FBP/ SBPase</p>	<p><i>Synechocystis</i> PCC 6803</p>	<p><i>Synechocystis</i> PCC 6803 <i>fbaA</i> (<i>sll0018</i>), <i>tktA</i> (<i>sll1070</i>),</p> <p><i>Synechococcus</i> PCC 7002 <i>70glpX</i> (<i>SYNPCC7002</i> <i>_A1301</i>)</p> <p>Toutes les enzymes du CCB sous le contrôle de <i>PpsbA2</i>.</p>	<p>Plasmidique (pPMQAK1)</p> <p>Souches : EtOH-<i>fbaA</i> EtOH-<i>tktA</i> EtOH-<i>fbaA-tktA</i> EtOH-70<i>glpX-fbaA</i> EtOH-70<i>glpX-tktA</i></p> <p><i>EtOH</i> codant pour la pyruvate décarboxylase (PDC) et l'alcool déshydrogénase (ADH) sous le contrôle de <i>PnrsB</i>.</p>	<p><i>Conditions de culture: Milieu BG11 + 50 mM NaHCO₃, 30°C, sous 50 μmol photon m⁻²s⁻¹. Induction de la voie de biosynthèse de l'éthanol contrôlée par PnrsB avec l'addition de 2,5 μM de Ni²⁺.</i></p> <p>Les effets de la surexpression combinée de deux enzymes CBB avec l'expression de la voie de biosynthèse de l'éthanol ont été examinés dans cette étude.</p> <p>La souche EtOH-<i>fbaA-tktA</i> surexprimant les deux enzymes FBA et TK a montré une augmentation de la production d'éthanol par volume de 9,6X, avec un titre de 1,2 mg/L d'éthanol atteint à 20 jours de production.</p> <p>La production de la souche EtOH-70<i>glpX-fbaA</i> surexprimant la FBP/SBPase et la FBA était, elle 2,5 X plus importante que la souche EtOH-<i>fbaA</i>. La production normalisée par le nombre de cellules suit la même tendance.</p> <p>Les productions des souches EtOH-<i>fbaA-tktA</i> et de EtOH-70<i>glpX-tktA</i>, surexprimant les deux enzymes FBP/SBPase et TK, étaient respectivement 4 X et 2 X plus importants que la souche EtOH-<i>tktA</i> à 20 jours de production.</p>	Éthanol	Roussou <i>et al.</i> , 2021

CHAPITRE 3. La production de molécules d'intérêt à haute valeur ajoutée : les terpènes

I. La diversité et la classification des terpènes

A. Les terpènes

Le terme « terpènes » provient de la térébenthine (lat. *balsamum terebinthinae*) un baume visqueux à la senteur très agréable et caractéristique aussi appelée « résine de Pin » et trouvée chez plusieurs espèces de pins (*Pinaceae*). Elle se compose d'acides résineux ainsi que de terpènes. La térébenthine est de loin la principale source de terpènes, dont la production mondiale annuelle mondiale s'élève à quelque 350 000 tonnes (Gandini, 2011).



En termes de nomenclature, les terpènes constituent une grande famille d'hydrocarbures, linéaires ou cycliques, de formule générale $(C_5H_8)_n$ tandis que les terpénoïdes sont des terpènes modifiés avec des groupes fonctionnels supplémentaires ou un réarrangement structurel. Les terpènes et les terpénoïdes sont considérés comme la famille de produits naturels la plus grande et la plus diversifiée au niveau structurel et stéréochimique et sont produits par une très grande variété de plantes marines et terrestres, de bactéries, champignons, insectes, et animaux.

Plus de 55 000 à 80 000 composés terpéniques ont pu être isolés (Bretmaier *et al.*, 2006, Gershenzon *et al.*, 2007). En outre, au regard des innombrables propriétés précieuses formant ces composés bioactifs pour de nombreux domaines d'applications, ainsi que de l'avancée de nouvelles techniques (méthodes génétiques et moléculaires), un grand nombre de nouvelles structures et fonctions sont sans cesse décrites chaque année dans la littérature.

Les terpènes et les terpénoïdes peuvent servir à une myriade de fonctions dans toutes les formes de vie, et ont de nombreuses applications comme parfums dans les cosmétiques (principaux constituants des huiles essentielles d'une grande variété de plantes et de fleurs), en agriculture comme antifongiques, herbicides ou insecticides, dans l'agroalimentaire comme additifs aromatiques naturels ou comme antibiotiques, agents anticancéreux, hormones ou agents contraceptifs en médecine et ainsi qu'en médecines douces comme l'aromathérapie.

B. La classification des terpènes et des terpénoïdes

La diversité fonctionnelle de la famille des terpénoïdes est caractérisée par plusieurs facteurs : la longueur de la chaîne carbonée, le degré de saturation, mais aussi les réarrangements structurels de celui-ci.

1) Longueur de la chaîne carbonée et règle de l'isoprène

Les terpènes sont de formule générale $(C_5H_8)_n$ (unités isopréniques : des résidus de 2-méthyl-1,3-butadiène) qui constitue leur squelette et qui peut être arrangé de façon linéaire ou cyclique selon la règle de l'isoprène établie par Ruzicka (prix Nobel 1939) et Wallach (Ruzicka, 1953). Les combinaisons issues de cet arrangement ainsi que les différentes pressions de sélection sous lesquelles les organismes producteurs de terpènes ont évolué sont la conséquence de la large diversité de leurs structures.

Malgré leur diversité structurale, tous les terpénoïdes se distinguent par l'origine commune de la voie de biosynthèse des isoprénoïdes, à partir de deux molécules chimiquement apparentées, l'isopentényl-pyrophosphate (IPP) et le diméthylallyl-pyrophosphate (DMAPP) (observation réalisée pour la première fois par le chimiste allemand Otto Wallach (prix Nobel 1910) et de par la nature lipophile de leurs structures.

Selon leur nombre d'unités « isoprène », les terpènes sont classés en hémiterpènes C5 (une unité), monoterpènes C10 (deux unités), sesquiterpène C15 (trois unités), diterpènes C20 (quatre unités), sesterterpènes C25 (cinq unités) unités), les triterpènes C30 (six unités), les tétraterpènes C40 (huit unités) et les polyterpènes $C5_n$ avec $n > 8$ (plus de huit unités). La partie isopropyle du 2-méthylbutane est définie comme la tête et le résidu éthyle comme la queue (Figure 37.). Dans les mono-, sesqui-, di- et sesterterpènes, les unités isoprène sont liées les unes aux autres de la tête à la queue, tandis que pour les tri- et tétraterpènes la liaison s'effectue au niveau d'une connexion queue à queue au centre.

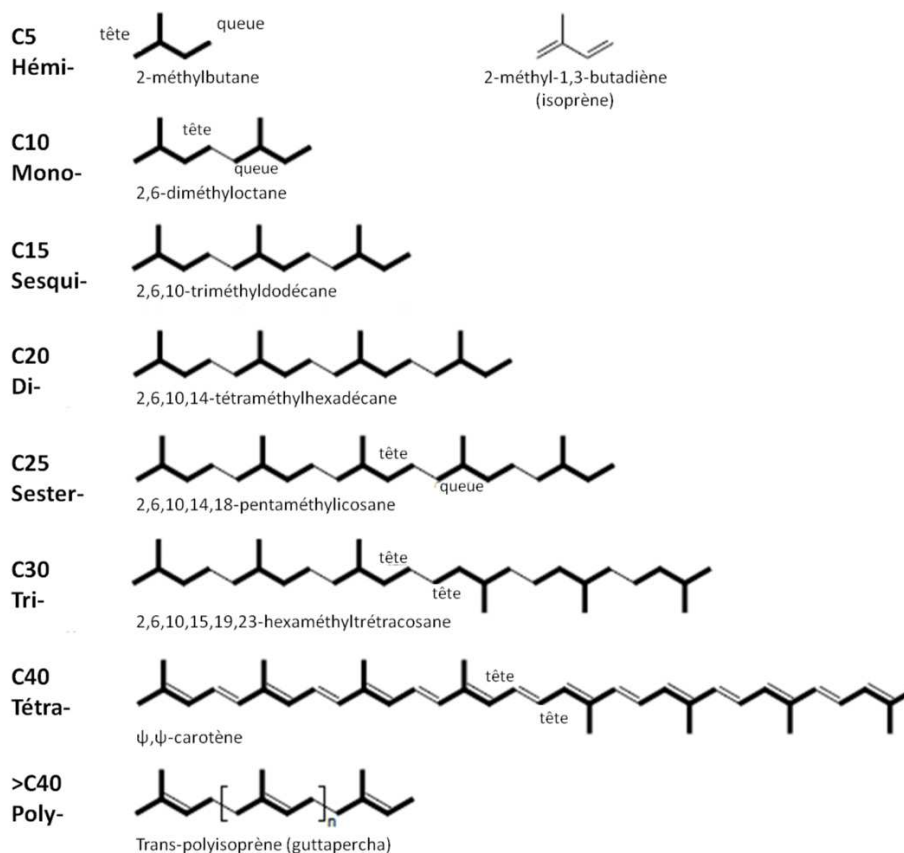


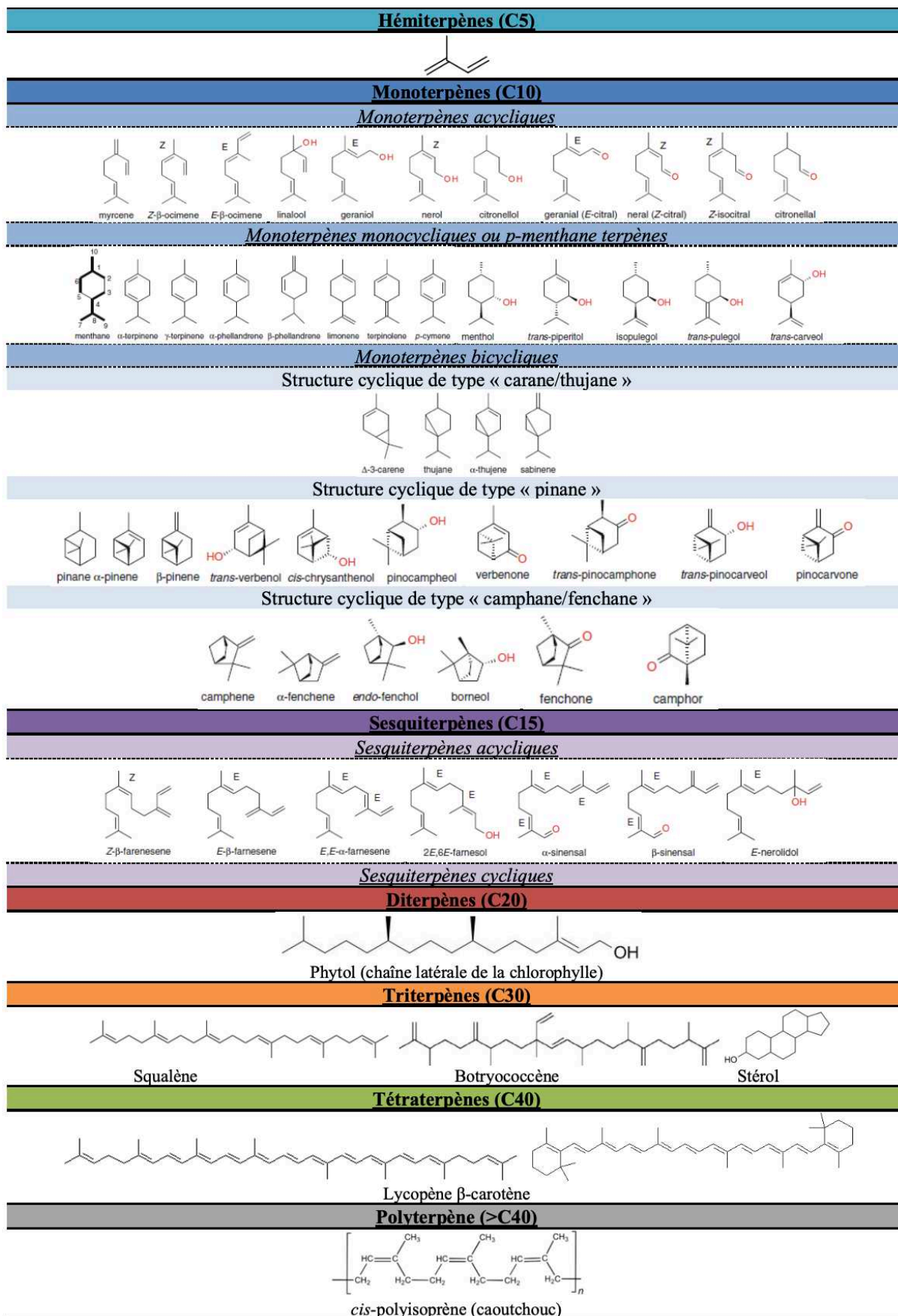
Figure 37. Représentation schématique de la classification selon la règle de l'unité isoprène (Thèse de Xavier Kammersheit)

Ainsi, les hémiterpènes sont constitués d'une seule unité isoprène synthétisée à partir du diméthylallyl diphosphate (DMAPP) par élimination du groupement pyrophosphate. Suivant la règle biogénique de l'isoprène, les autres terpènes sont synthétisés par additions successives d'isopentenyl diphosphate (IPP) au précurseur DMAPP pour la synthèse d'un squelette carboné au nombre de molécules de carbone plus important. Le cis-1,4-polyisoprène (le caoutchouc) est le plus long terpénoïde à chaîne et peut-être composé de plus de 100 000 unités d'isoprène.

2) Les réarrangements structuraux du squelette carboné

Au sens strict, les terpènes sont des hydrocarbures et leurs diversités fonctionnelles inclut divers degrés de saturation (par exemple entre le farnésane et le α -farnésène), et réarrangements structuraux du squelette carboné qui incluent la linéarisation, la cyclisation, l'isomérisation (par exemple entre le L-limonène et D-limonène) et la ramification, mais il existe de nombreux dérivés de structures apparentées qui sont considérés comme des composés terpéniques (terpénoïdes ou isoprénoïdes) qui peuvent fournir une diversité fonctionnelle supplémentaire, car modifiés par l'addition de groupes fonctionnels, sous la forme d'alcools (par exemple les (-)-menthol, farnésol, phytol et stérol) et de leurs glycosides, éthers, aldéhydes, cétones ((S-(+)-carvone), acides carboxyliques et esters (Tableau 4.).

Tableau 4. Classification des terpènes et des terpénoïdes
(Figure issue de la Thèse de Xavier Kammersheitt)



C. Les nombreuses fonctions et rôles des terpènes dans la nature

Les terpénoïdes sont omniprésents dans la quasi-totalité des organismes vivants (mêmes phylogénétiquement éloignés) et jouent un rôle dans certaines fonctions physiologiques essentielles, soulignant l'implication de ces molécules de structures similaires dans une variété de rôles au niveau de leur métabolisme primaire ou secondaire (médiation d'interactions).

1) Rôles importants des terpènes dans le métabolisme primaire

Les terpénoïdes se retrouvent comme des éléments constitutifs majeurs de la biosynthèse et ont des rôles essentiels et vitaux au niveau des diverses fonctions cellulaires du métabolisme primaire des végétaux notamment la photosynthèse (Goldstein et Brown 1990 ; Ungerer *et al.*, 2019 ; Davies *et al.*, 2014 ; Thulasiram *et al.*, 2007 ; Ajikumar *et al.*, 2018 ; Sharkey *et al.* 2008 ; Behnke *et al.*, 2007) :

- la récolte de la lumière (queue phytol de la chlorophylle),
- les transporteurs d'électrons (ubiquinone, plastoquinone)
- les pigments photosynthétiques, antioxydants et agents photoprotecteurs (phytol, caroténoïdes)
- la composition des membranes cellulaires : régulation de la structure et de la fluidité des membranes (stérols, triterpène cholestérol)
- la synthèse des glycoprotéines (dolichol)
- la régulation du développement des végétaux (phytohormones : acide abscissique, gibbérellines)
- les mécanismes de réponses à des stress abiotiques : thermotolérance c'est à dire la protection du stress thermique (isoprène) pour l'amélioration de l'intégrité de la membrane thylacoïde et ainsi la non-altération de l'efficacité de la photosynthèse ou bien comme mécanisme pour éliminer l'excès de carbone cellulaire chez une variété de plantes herbacées, à feuilles caduques et de conifères

Même si certains terpénoïdes sont essentiels au métabolisme primaire, la plupart sont produits (notamment par les plantes) comme métabolites secondaires.

2) Rôles importants des terpènes comme métabolites secondaires via la médiation d'interactions mutualistes (effet attractif) et antagonistes (effets dissuasifs ou répulsifs)

Les organismes vivants (plantes, animaux et micro-organismes) faisant partie d'un système biologique ont subi le processus d'évolution en utilisant notamment leur métabolisme 'secondaire' pour la synthèse et l'utilisation de différentes molécules terpénoïdes dans le cadre d'interactions antagonistes (répulsifs) ou mutualistes (attractifs) entre espèces (concurrentes, prédatrices) ou agents pathogènes, comme composés de signalisation, régulateurs de croissance, moyen de défense, reproduction, réponses aux stress, *etc.* (Langenheim 1994).

Ces molécules naturelles portent de nombreux rôles écologiques établis dans la nature en agissant au niveau de moyen de communication par la transmission de message entre espèces (sur de très longues distances parfois), par la production de terpènes volatils (par exemple pour la reproduction afin d'attirer d'insectes spécifiques pour la pollinisation et autres agents de dispersion de graines), pour la signalisation de la présence de nourriture, ou bien la présence d'espèces prédatrices aux alentours (agents de défense), ou encore pour les insectes comme phéromones à multiples « fonctions » (détaillé plus bas) (Ungerer *et al.*, 2019).

Ces diverses méthodes de signalisation sont essentielles aux plantes (qui sont immobiles) pendant la majeure partie de leur cycle de vie.

De plus, la grande variété de propriétés des terpènes dans la nature garantit la transmission d'informations importantes et spécifiques à des organismes : propriétés très odoriférantes (odeurs émises par les fleurs et fruits) et de pigmentation (jaune/orange/rouge des caroténoïdes notamment).

Également, des mixtures de molécules de terpènes peuvent être associées pour transmettre plusieurs messages à la fois, ou bien décupler l'effet du message, ou encore contourner la résistance d'espèces s'étant déjà adaptées (Gershenson *et al.*, 2007). Les monoterpènes et sesquiterpènes de par leurs propriétés (faible poids moléculaire, lipophile et volatile) sont considérés comme de bons vecteurs d'informations à distances.

Aussi, les espèces végétales peuvent libérer des terpénoïdes avec une forte odeur et/ou toxicité pour se protéger des herbivores ou des agents pathogènes. Des terpènes moins volatils, mais au goût fortement amer ou toxique peuvent protéger certaines plantes contre la consommation par certains animaux (Bretmaier *et al.*, 2006 ; Ungerer, *et al.*, 2019). Par exemple, l'arbre à caoutchouc (*Hevea brasiliensis*) adopte une stratégie défensive envers différents pathogènes ou espèces par la sécrétion de latex (contenant du cis-1,4- polyisoprène) et les pins et les conifères libèrent un mélange toxique de terpénoïdes à effet dissuasif qui se transforme ensuite en une résine formant une barrière mécanique (Puskas *et al.*, 2006 ; Davies *et al.*, 2014).

D'autres terpènes peuvent également jouer un rôle important dans la résistance aux maladies causées par les champignons et les bactéries : les glycosides terpéniques saponines triterpénoïdes aux propriétés détergentes sont toxiques du fait de leur capacité à se complexer avec les stérols des membranes fongiques, entraînant la perte de l'intégrité de la membrane de ces agents pathogènes (Morrissey & Osbourn, 1999).

Pour les insectes, les terpènes peuvent être métabolisés via la nourriture végétale reçue, et leur métabolisation en hormones de croissance ou phéromones impliquées dans des signaux/informations pouvant être de plusieurs natures : sociohormone (communication avec leurs pairs), phéromones d'alarme (pour avertir d'un événement) comme le sesquiterpène (E)- β -farnésène chez les pucerons, phéromones de traçage (pour indiquer leurs localisations ou bien celles de denrées), phéromones d'agrégation (pour se rassembler), ou encore phéromones sexuelles (attraction de partenaires) (Kunert *et al.*, 2005 ; Bretmaier *et al.*, 2006).

Il a été montré également que l'alimentation des herbivores sur le feuillage induit l'émission de mélanges de substances volatiles dont les terpènes sont les principaux composants (monoterpènes et sesqui-terpènes), et qui permettent d'attirer certains prédateurs ou parasites de ces espèces (Kessler *et al.*, 2001).

Certains organismes marins peuvent également utiliser les terpènes aux puissantes propriétés antifongiques et antibactériennes afin que leurs surfaces ne soient pas colonisées par des microorganismes (bactéries, champignons, diatomées), comme par exemple, les terpènes halogénés typiques des algues rouges (Bhadury *et al.*, 2004) Gershenson *et al.*, 2007). Dans une optique de défense, certaines espèces du règne animal peuvent sécréter des terpènes comme substances protectrices par pulvérisation sur des insectes par exemple.

Au regard de la diversité des organismes végétaux riches en métabolites secondaires naturels, ceux-ci sont considérés comme des réservoirs incontournables pour la découverte de ressources d'intérêt potentiel. Les recherches sur les fonctions biologiques, écochimiques et fonctionnelles des terpènes dans la nature sont tout de même bien moins avancées que celles concernant leur

synthèse chimique ou biosynthèse dans le but d'applications biotechnologiques et de la production de molécules d'intérêt pour diverses industries. De nouveaux rôles biologiques restent encore à découvrir, car un très faible pourcentage a été étudié jusqu'à maintenant, et pour une grande majorité des terpènes ces rôles restent encore inconnus et pourraient être exploités pour la conception future de produits biotechnologiques dérivés de produits naturels.

II. Les applications biotechnologiques des terpènes au sein d'industries très hétéroclites

En plus de leur rôle évolutif dans les organismes producteurs, les terpènes naturels, leurs dérivés terpénoïdes ainsi que les variations synthétiques élargissent considérablement le champ des propriétés d'intérêt biotechnologiques et commerciales de ces composés. Les terpènes et terpénoïdes peuvent être commercialisés au niveau de marchés et d'industries diversifiées de la parfumerie, des cosmétiques, des produits agricoles et industriels, de l'agroalimentaire, des biocarburants, de la pharmacie et de la médecine (Ajikumar *et al.*, 2008; Bohlmann et Keeling 2008 ; Immethun *et al.*, 2013; Tippmann *et al.*, 2013,).

Les différentes applications des terpénoïdes seront détaillées dans cette partie en mettant l'accent sur les terpènes produits dans cette étude : E- α -bisabolène, α -farnésène, α -pinène et S-(-)-limonène β -santalène, de l'épi- β -santalène et de l' α -exo-bergamotène.

A. Industrie des parfums et des cosmétiques

Depuis peu, le « consumérisme vert » et la tendance au « retour à la nature » via l'utilisation des « naturels » ont donné un nouvel élan prometteur au secteur de production d'huiles essentielles à base de plantes et leurs myriades d'applications et de bienfaits. De nombreuses industries utilisent des parfums synthétiques développés en laboratoire pour imiter les huiles naturelles à base de plantes, dont la fabrication est plus coûteuse, mais où sont retrouvés des perturbateurs endocriniens (phtalates) ainsi que des substances cancérigènes (dérivés du benzène) (Cavanaugh, 2013 ; Olujimi *et al.*, 2010).

Les monoterpènes et des sesquiterpènes tels que le menthol (odeur de la menthe), le D-limonène (odeur de la peau d'orange), l' α -farnésène (odeur de la pomme verte) et la nootkatone (odeur du pamplemousse) sont utilisés dans l'industrie de la parfumerie et des arômes, de par la variété de leurs senteurs caractéristiques.

De très légers changements au niveau structurels du squelette carboné peuvent modifier leurs propriétés, comme par exemple le cas des énantiomères de limonène : l'odeur du D-(+)-limonène ressemble à celle de l'orange-citron, tandis que celle du L(-)-limonène est semblable à la térébenthine (Ungerer *et al.*, 2019 ; Davies *et al.*, 2014). Les énantiomères R-(-) et S-(+) du monoterpène carvone diffèrent également : la S-(+)-carvone a une saveur aromatique, tandis que la R-(-)-carvone a une saveur mentholée. Les énantiomères du menthol ont une odeur de menthe poivrée, mais le (-)-menthol a un effet rafraîchissant beaucoup plus fort que le (+)-menthol.

Parmi les huiles essentielles d'intérêt utilisées comme parfums figurent les huiles d'agrumes, de lavande, d'eucalyptus, d'arbre à thé et d'autres huiles florales, entre autres, tandis que le

linalool, le géraniol, le limonène, le citronellol et le citral sont des composants parfumés très appréciés utilisés dans différents cosmétiques. Le tableau 5. décrit les caractéristiques olfactives de certains composés individuels de ces huiles essentielles.

Tableau 5. Caractéristiques olfactives de certains composés individuels des huiles essentielles (Extrait de Sharmeen et al., 2021).

Essential Oil Compounds	Odor Description
Anethole	Pleasant odor of anise oil
Bisabolol	Sweet floral odor
Bornyl acetate	Woody, camphor, mentholic, spicy
Carvone	Minty herbaceous
Citral	Lemony
Citronellol	Strong floral, rose, sweet like
Cuminal	Spicy harsh
Decanal	Sweet, aldehydic, orange, waxy, citrus rind
Farnesol	Flowery, weak-citrus odor
Geraniol	Fresh, sweet, rose-like
Geranyl acetate	Pleasant, floral rose, herbal
Germacrene D	Woody, spice
Limonene	Strong odor of orange
Linalool	Floral, grassy, pleasant, citrus
Linalyl acetate	Floral, sweet citrus
Menthol	Sweet minty, cooling and fresh scent
Myrcene	Pleasant floral
Myristicin	Spice, warm, balsam, woody
Neral	Citric, green
<i>p</i> -Cymene	Fresh, citrus, terpene, woody, spice
Sabinene	Woody, terpene, citrus, pine, spice
Terpineol	Sweet, lilac odor
Terpinolene	Fresh, woody, sweet, pine, citrus
α -Pinene	Fresh, camphor, sweet, pine, earthy, woody
β -Phellandrene	Mint, turpentine
β -Pinene	Woody, turpentine
γ -Terpinene	Woody, terpene, lemon, lime, tropical, herbal

Les huiles essentielles obtenues à partir d'une variété de fruits du genre *Citrus* (orange, citron, pamplemousse, mandarine...) sont les plus populaires et représentent la plus grande partie des arômes et parfums naturels commerciaux (Sawamura, 2011). Par exemple, l'énantiomère (R)-limonène constitue 90-96% de l'huile d'écorce d'agrumes et sa production mondiale dépasse 70 000 tonnes par an (Firdaus et al., 2011). D'autres huiles sont commercialisées à des prix très élevés (l'huile de rose (6000-10000 €/kg) et donc à une échelle beaucoup plus restreinte au vu de la rareté des matières premières, des rendements obtenus lors de l'extraction, ou bien de la dépendance climatique (Sharmeen et al., 2021).

L'huile essentielle de bois de santal principalement obtenue par distillation à la vapeur d'eau à partir du bois de cœur de santal adulte (*Santalum album*, *Santalum austrocaledonicum* et *Santalum spicatum*) a de nombreuses applications dans les industries des cosmétiques et des parfums, comme note de fond, pour sa fragrance boisée ainsi que ses propriétés fixatrices permettant de capturer les arômes de tête d'autres huiles essentielles (Jones, Plummer & Barbour, 2007). En Inde par exemple, des temples construits avec du bois de santal conservent leur senteur depuis des siècles.

L'huile de bois de santal est composée de nombreux sesquiterpènes avec une fonction alcool « les santalols » (majoritairement l' α -, β - et épi- β -santalol ainsi que de l' α -exo-bergamotol), mais aussi de sesquiterpènes « les santalènes » (α -, β - et épi- β -santalène ainsi que de l' α -exo-bergamotène) dont la voie de biosynthèse dans les plantes est montrée dans la figure 38.

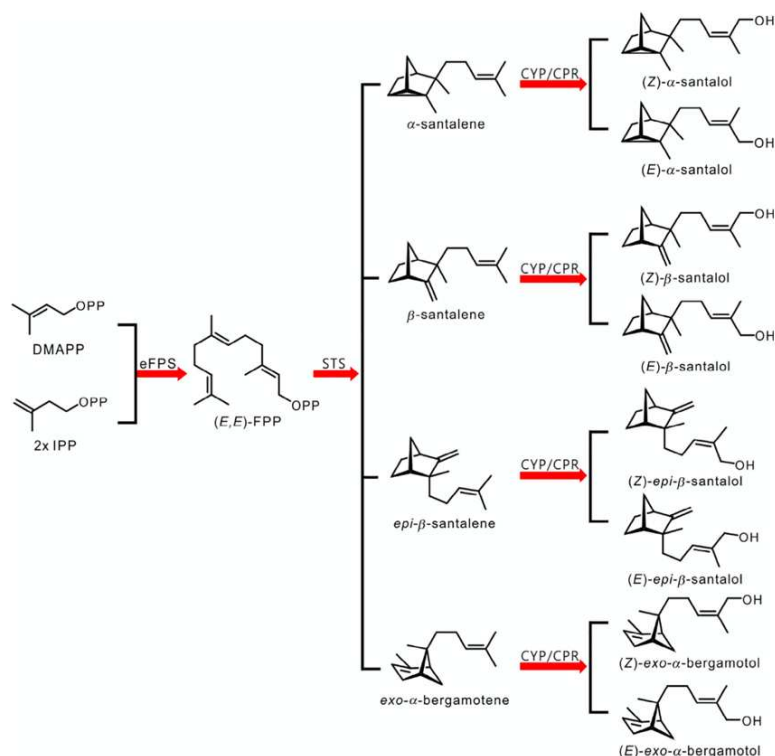


Figure 38. Voie de biosynthèse des santalènes et des santalols.

IPP : isopentényl diphosphate ; DMAPP : diméthylallyl diphosphate ; eFPS : (E,E)-farnesyl diphosphate synthase ; (E,E)-FPP : (E,E)-farnesyl diphosphate ; STS : santalène synthase ; CYP : cytochrome P450 monooxygénase ; CPR : cytochrome P450 réductase (Extrait de Zha et Zi *et al.*, 2021).

Pour ses propriétés, l'huile de bois de santal est devenue l'une des huiles essentielles les plus précieuses au monde, elle est également très onéreuse (environ 1500 euros/L) (Subasinghe, Gamage, & Hettiarachchi, 2013 ; Zha et Zi *et al.*, 2021), néanmoins au vu de la demande croissante du marché et de la surexploitation des arbres *Santalum* (aux longues périodes de croissance), certaines espèces comme *Santalum album* ont été listées comme plantes protégées (Flora and Fauna Protection Ordinance Act 2009) et leurs récoltes et transports ont été strictement interdits au Sri Lanka.

Dans l'industrie des cosmétiques, les terpènes sont également très utilisés comme antimicrobiens, pour la protection solaire, agents bioactifs anti-âge (de par leurs effets comme antioxydant, assouplissant, hydratant, émoullient et sur l'éclaircissement de la peau), et comme anti-acné (tea tree oil), mais aussi pour leur habilité à faciliter la pénétration d'autres agents bioactifs dans la peau.

L'arbre à thé *Melaleuca alternifolia* contient une huile essentielle (tea tree oil) essentiellement composée de monoterpènes (en majorité le terpinène-4-ol (+ de 30%), ainsi que γ -terpinène (10-2%), l' α -terpinéol (5-13%) et le 1,8-cinéole (- de 15%)) aux propriétés antifongiques et antibactériennes incorporée en tant que principe actif dans de nombreuses formulations cosmétiques utilisées comme anti-acné et pour traiter les infections cutanées (Webb *et al.*, 2013). L'huile est extraite de l'arbre à thé par distillation à la vapeur des feuilles et branches terminales, puis après condensation l'huile est séparée du distillat aqueux. Cette méthode donne un rendement en huile d'environ 1 à 2 % du poids de la matière végétale humide (Carson *et al.*, 2006).

B. Industrie alimentaire et nutraceutiques

Certains terpènes sont utilisés dans l'industrie alimentaire comme agents colorants (β -carotène, lycopène et autres caroténoïdes), ou comme additifs alimentaires et agents aromatisants comme le limonène (agent odorant essentiel du jus d'orange), le linalool, le β -bisabolène pour son odeur balsamique) et α -pinène, carvone, menthol (dans les chewing-gums) (Caputi et Aprea, 2011 ; Behr and Johnen, 2009 ; Schempp *et al.*, 2018).

Le sesquiterpène farnésène peut être utilisé en additif alimentaire comme surfactant, émulsifiant et stabilisant, mais également comme intermédiaire pour préparer des produits à haute valeur ajoutée tels que le solanesol, la coenzyme Q10 et la vitamine K2 (Lv *et al.*, 2019).

De nombreux terpénoïdes comme le lycopène et l'astaxanthine sont également utilisés comme nutraceutiques en raison de leurs effets sur la santé humaine comme antioxydants particulièrement efficaces, capable de contrer l'action des radicaux libres (ROS) et de protéger les cellules du stress oxydatif. La lutéine sert notamment pour prévenir la dégénérescence de la rétine) (Koushan *et al.*, 2013).

C. Agriculture

Les terpènes et terpénoïdes ont des propriétés antifongiques, herbicides ou insecticides intéressants pour l'agriculture.

L'utilisation d'insecticides d'origine naturelle comme les pyréthrinés issues du pyrèthre de Dalmatie (*Tanacetum cinerariifolium*) sont très efficaces et respectueuses de l'environnement, en raison notamment de leurs persistance limitée dans le temps et l'environnement (se dégradant à la lumière) ; ce sont des composés très intéressants par rapport à de nombreux insecticides synthétiques (Olkowski, 1989). Également certaines phéromones peuvent remplacer les insecticides classiques pour piéger les insectes nuisibles tout en étant inoffensives pour l'environnement.

Une étude récente combinant l'ingénierie génétique chez *Arabidopsis thaliana* pour augmenter les rendements de production d'un alcool monoterpénique, le linalool (normalement produit en concentration traces) a été réalisée dans une optique d'application biotechnologique comme pesticide naturel. Les plantes transgéniques surexprimant la terpène synthase correspondante ont permis de repousser de manière significative les pucerons *Myzus persicae*, par rapport aux plantes sauvages (Aharoni *et al.*, 2003).

Des composés comme les terpinen-4-ol, carvone, eugénol, 1,8-cinéole (eucalyptol) et thymol ont des effets toxiques sur la croissance du mycélium de 10 espèces différentes de champignons mycotoxigènes impliqués dans plusieurs maladies des plantes (Morcia *et al.*, 2012).

D. Produits chimiques industriels

Les propriétés des terpènes et terpénoïdes ont un bon nombre d'applications au niveau industriel comme produits chimiques naturels. L'unité principale du terpène, l'isoprène est une biobrique importante de polymère dans l'industrie de la chimie synthétique, des matières premières et de la chimie de synthèse. C'est par exemple, le principal composant du caoutchouc synthétique et naturel tandis que le sesquiterpène farnésène peut être polymérisé pour la préparation du caoutchouc de pneus (Sandoval *et al.*, 2014). Les terpènes et terpénoïdes pourraient être exploités comme éléments constitutifs des biopolymères et fournir une alternative renouvelable aux

plastiques et polymères dérivés du pétrole (voir la revue détaillée de Wilbon *et al.*, 2013, pour une synthèse des progrès dans le domaine des polymères renouvelables à partir de terpènes et terpénoïdes).

Les terpènes ont également des propriétés antifouling, un phénomène d'encrassement biologique (bactéries, diatomées, macro-algues, invertébrés) dans le milieu marin, entraînant de grandes pertes économiques dans le secteur. Maintenant interdites en raison de leur fort impact sur l'environnement, des peintures antifouling contenant des matières toxiques comme le cuivre, le plomb, le mercure ou l'arsenic étaient utilisées comme revêtement pour empêcher ce phénomène biologique. De nombreuses études, citées dans la revue de Qi et Ma, (2017), se sont penchées sur la recherche de composés naturels utilisés par les invertébrés marins qui, au cours de l'évolution, ont développé des systèmes antifouling efficaces avec peu ou pas de toxicité pour l'environnement, tel que : les isocyanoterpénoïdes, les sesquiterpènes, les diterpènes, les sesterterpènes, les triterpénoïdes.

E. Biocarburants

Plus récemment, les hydrocarbures terpéniques ont retenu l'attention en tant qu'alternative durable et renouvelable, entièrement dérivés de photosynthèse, donc de la lumière du soleil, du CO₂ et de l'eau, à l'égard des combustibles fossiles que sont les carburants dérivés du pétrole. Ces derniers observent des prix de plus en plus élevés, dû à leur raréfaction et à une consommation de plus en plus soutenue ; ils sont également en cause d'une intensification du changement climatique, au vu de leur impact environnemental de plus en plus sévère, de par notamment les rejets de CO₂ et de gaz à effet serres.

Les hydrocarbures terpéniques naturels sont donc fortement envisagés comme substitut aux carburants dérivés du pétrole, notamment car leur production par des espèces végétales, permettrait de fermer le cycle du carbone : ces espèces fixent le CO₂ de l'atmosphère pour produire les hydrocarbures terpéniques qui après combustion, rejettent la quantité de CO₂ initialement fixée lors de leur biosynthèse (Figure 39.). Par opposition, il n'y a pas de cycle naturel pour reformer les combustibles « fossiles » comme le pétrole ou le charbon, qui lors de leur combustion relarguent un surplus de CO₂ dans l'atmosphère donc sans fermeture du cycle de carbone.

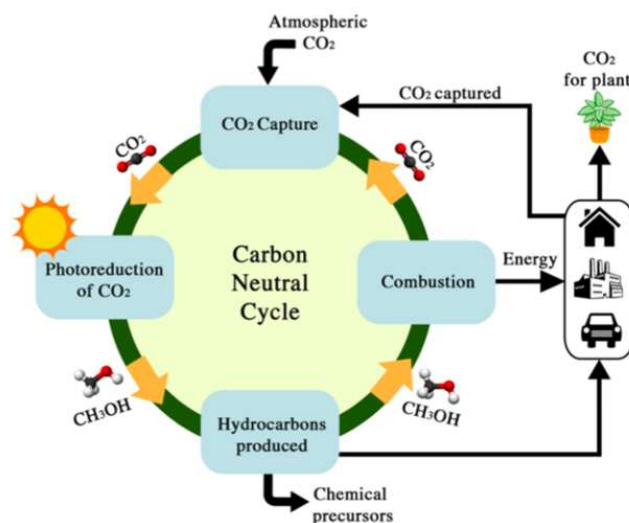

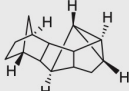
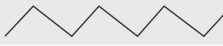
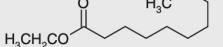
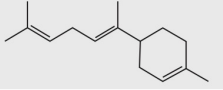

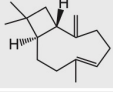




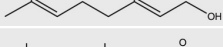
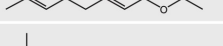

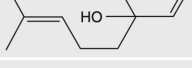



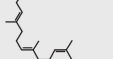


Figure 39. Cycle neutre du carbone (Extrait de Tjandra et Huang, 2018)

Les hydrocarbures terpéniques naturels sont également fortement envisagés comme substitut aux carburants dérivés du pétrole, au regard de leurs propriétés physiques et chimiques similaires (Zhao *et al.*, 2011). En effet, les terpènes sont particulièrement attrayants en raison de leurs propriétés hydrophobes, de leurs grandes densités énergétiques, de leurs faibles viscosités (même à basse température), de leur indice cétane élevé (la capacité d'un carburant à s'enflammer), de leurs plus faibles hygroscopicités (capacité à retenir l'humidité), et de leurs diversités structurelles dans le but d'imiter les alcanes et les aromatiques (à des longueurs de chaîne carbonées, souhaitées) (Davies *et al.*, 2014). Ainsi, ils peuvent facilement être mélangés aux carburants dérivés du pétrole (essence, diesel, carburants d'aviation) ou biocarburants (alcools, esters d'acide gras) et donc être utilisés rapidement comme biocarburants « drop-in » sans voie de transition puisqu'utilisés dans les infrastructures de transport existantes (avion, voitures), sans nécessiter de changement de pièces moteur, ou de conception de nouveaux lieux de stockage.

Les terpènes peuvent être utilisés en tant que biocarburant, soit directement ou soit mélangé au carburant pour avion existant (Jet-A, JP-5 et JP-8), au propergol pour missiles (par exemple JP-10), aux carburants diesel ou à l'essence (voir Tableau 6. ci-dessous).

Tableau 6. Terpènes identifiés dans la littérature pouvant remplacer ou faire partie d'un mélange avec les carburants actuels dérivés du pétrole (Essence, biodiesel, JP-10, RJ-5). Adapté de (Mewalal et al., 2016).

Composé	Structure chimique	Densité (g/mL)	Refs
JP-10		0.94	Meylemans et al., 2012
RJ-5		1.08	Meylemans et al., 2012
Essence		0.74	Meylemans et al., 2012
Biodiesel		0.88	Meylemans et al., 2012
Bisabolene		0.82	Peralta-Yahya et al., 2011
Camphene		0.84	Meylemans et al., 2012
Caryophyllene		0.90	Harvey et al., 2015
1,8-Cineole		1.01	Meylemans et al., 2014 ; Saad et al., 2013
(-)-β-Citronellene		0.76	Hellier et al., 2013
Farnesene		0.84–0.88	Hellier et al., 2013
Geranial		0.89	Hellier et al., 2013
Geraniol		0.88	Saad et al., 2013
Geranyl acetate		0.92	Hellier et al., 2013
Limonene		0.85	Filley et al., 2013
Linalool		0.87	Hellier et al., 2013
α-Pinene		0.86	Meylemans et al., 2012 ; Harvey et al., 2009
β-Pinene		0.86	Meylemans et al., 2012 ; Harvey et al., 2009
Sabinene		0.84	Beller et al., 2015
Squalene		0.86	Hellier et al., 2013

Aussi plus récemment, d'autres terpènes comme le limonène, le pinène, le myrcène et le farnésène (ainsi que leurs formes hydrogénées) ont été jugés compatibles avec le diesel (Tracy *et al.*, 2009) et les carburants d'aviation (Chuck et Donnelly, 2014 ; Yang *et al.*, 2013a).

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

Le sesquiterpène farnésène et sa version hydrogénée farnésane entièrement saturée (permettant une qualité de carburant supérieure en réduisant les émissions d'oxyde de carbone (CO) et de particules fines, sont des candidats prometteurs pour remplacer les dérivés de pétrole au vu de leurs propriétés chimiques et physiques (viscosité, densité, point d'inflammabilité) assez similaires à celles au carburant diesel (Tableau 7. et (Kung *et al.*, 2012). En effet, des expériences ont montrées que le farnésène en composant unique (en prenant en compte les caractéristiques de combustion et d'émission) fait concurrence au diesel ; aussi, l'incorporation de farnésane dans un diesel ULSD (Diesel à très faible taux en soufre) à hauteur de 30% n'en change pas les propriétés (Hellier *et al.*, 2013).

Le farnésène et son équivalent hydrogéné pourraient donc être utilisés comme alternatives appropriées aux carburants pour moteurs à réaction en raison de leurs excellentes performances cryogéniques (point de congélation bas), de leur pouvoir calorifique (PCI) également bas, de leurs indices de cétane plus élevés et de leurs plus faibles émissions de gaz à effet de serre (absence de soufre et d'aromatiques entraînant une diminution de fumée et de particules) (Tableau 7. et (Leavell *et al.*, 2015 ; Millo *et al.*, 2014 ; Hellier *et al.*, 2013).

Le bisabolène et son équivalent réduit, le bisabolane (obtenu par hydrogénation) ont des propriétés similaires à celles du diesel D2 (composé d'alcane linéaires, ramifiés et cycliques) : une longueur de chaîne carbonée (C15), proche de la longueur moyenne de carbone du diesel (C16), des ramifications sur leur chaîne linéaire donnant lieu à de très bonnes performances cryogéniques pour le carburant et des formes cycliques permettant d'augmenter la densité énergétique par volume de carburant et le pouvoir calorifique (Figure 40. et Tableau 7.).

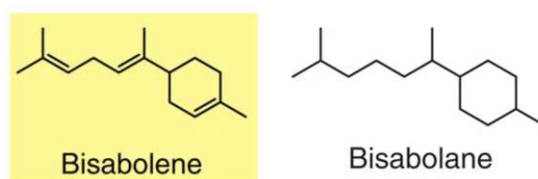


Figure 40. Structures chimiques du bisabolène et bisabolane

Le mélange du dérivé hydrogéné du limonène en tant qu'additif « écologique et renouvelable » à hauteur de 10% dans le Diesel, a permis d'en améliorer les propriétés (viscosité, indice cétane notamment) et ainsi de se satisfaire aux normes minimales de la norme ASTM D975 (Tableau 7. et Tracy *et al.*, 2009).

Tableau 7. 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. Extrait de la thèse de Célia Chenebault.

	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

Le bisabolène précurseur immédiat du bisabolane a pu être produit par ingénierie métabolique via l'expression hétérologue d'une bisabolène synthase d'*Abies grandis* au sein de *S. cerevisiae* et d'*E. coli*. Le bisabolène a ensuite pu être converti en bisabolane par hydrogénation chimique et utilisé comme alternative biosynthétique au diesel D2 (Peralta-Yahya *et al.*, 2011).

2) Certains terpènes peuvent être utilisés comme alternatives au carburant d'aviation commercial (Jet-A, JP-5 et JP-8) ou militaire (JP-10 et RJ-5)

Les carburants d'aviation (Jetfuel) ont des spécifications exigeantes sur le pouvoir calorifique, le point d'inflammabilité, la viscosité à basse température et la densité permettant d'obtenir des performances optimales à haute altitude où les températures et pressions de l'air sont faibles.

Plusieurs études ont montré que certains terpènes avaient des caractéristiques similaires au carburant d'aviation JetA et pouvaient être utilisés comme alternatives (Tableau 8).

Tableau 8. 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 et du brevet (Harvey, 2018) pour l' α -bisabolène et bisabolane. Extrait de la thèse de Célia Chenebault.

	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 -bisabolène		10		870	134 150 btu/gal = 43
Bisabolane		17,2		814	127 500 btu/gal = 43,7

Une étude de Chuck et Donnelly démontre que le limonène en apport unique (100%) et en mélange Jet-A1, rentre aisément dans les standards ATSM et améliore nettement les propriétés du carburant d'aviation ; concernant le farnésène, ses propriétés ne satisfont pas les standards au vu de la viscosité et du point d'ébullition très élevé (voir Tableau 8. et (Chuck and Donnelly, 2014, Figure 3).

Néanmoins, son dérivé hydrogéné, 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, a pu être utilisé en vols commerciaux pour différentes compagnies aériennes : la Lufthansa (vol de Francfort à Berlin) et AirFrance (avec 1 vol par semaine entre Paris et Toulouse). Le procédé a été développé par Total en coopération avec Amyris (États-Unis) à partir de la biomasse (canne à sucre) par une combinaison d'étapes de fermentation et d'hydrotraitement.

Également, une stratégie de dimérisation catalytique de l' α -pinène, du camphène, du limonène et de la térébenthine brute (dominée par l' α - pinène) a permis la production de biocarburants à haute densité comparables au JP-10, un carburant très dense de l'aviation militaire ; les propriétés de ces monoterpènes sans cette intervention chimique ne satisfaisaient pas les standards ATSM (Meylemans *et al.*, 2012). Aussi, Meylemans *et al.*, 2013 montre que le mélange de dimères de terpènes avec le carburant d'aviation améliore certaines propriétés (pouvoir calorifique et densité énergétique) tout en évitant les viscosités élevées associées aux molécules C20.

F. Industrie pharmaceutique

L'Organisation mondiale de la santé (OMS) a estimé qu'environ 80% de la population mondiale dépendait de la médecine traditionnelle pour ses soins primaires de santé, avec des thérapies impliquant l'utilisation d'extraits de plantes ou de leurs composants actifs, comme les terpénoïdes (Craig *et al.*, 1999). En effet, les terpènes et les terpénoïdes présentent une gamme étendue d'activités biologiques applicables au domaine de la médecine et à l'industrie pharmaceutique : des activités antibactériennes, antifongiques, antivirales, antiparasitaires, anti-inflammatoires, antiallergéniques, antihyperglycémiques, antispasmodiques, antitumorales et immunomodulatrices dont certains exemples seront détaillés ci-après (Wagner et Elmadfa, 2003 ; Paduch *et al.*, 2007 ; Ajikumar *et al.*, 2008).

1) Activités anti-parasitaires

Pour le traitement du paludisme causé par le parasite *Plasmodium falciparum*, des thérapies combinées à base d'artémisinine (ACTs) étaient recommandées par l'OMS au vu du nombre de cas et de décès (en 2010, 200 millions de cas et 655 000 décès).

Produit par *Artemisia annua*, une plante Asteraceae originaire de Chine, l'artémisinine est le médicament parasitaire le plus utilisé dans le monde. L'artémisinine est un endopéroxyde sesquiterpénique qui détient de puissantes propriétés antipaludiques. Ces propriétés sont attribuées à la présence d'un pont peroxyde au sein de sa structure.

La production naturelle de l'artémisinine par *Artemisia annua* étant instable, faiblement disponible et à bas rendement, celle-ci a été substituée et permise par la biologie synthétique et l'ingénierie de la levure *Saccharomyces cerevisiae* pour une production commerciale biologique à haut rendement d'acide artémisinique, précurseur de l'antipaludique sesquiterpène artémisinine (Paddon *et al.*, 2013, Paddon et Keasling, 2014).

D'autres peroxydes de sesquiterpène, tels que le yingzhaosu A et le yingzhaosu C, ont également montré une activité antiparasitaire, en particulier contre *Plasmodium berghei* un parasite protozoaire qui provoque le paludisme chez certains rongeurs (Kayser *et al.*, 2003).

2) Activités antimicrobiennes (antibactériennes et antifongiques)

Certains terpénoïdes présentent également une activité antifongique. Dès 1979, une liste de 13 monoterpènes présentant des propriétés antifongiques a été répertoriée contre 14 souches fongiques : les (+)-terpinen-4-ol, γ -terpinène, α -terpinène, terpinolène, α -pinène 1,8-cinéole, ρ -cymène, (+)-limonène, β -myrcène, (+)- β -pinène, (\pm)-linalool, α -phellandréne et α -terpinoel (Kurita *et al.*, 1979).

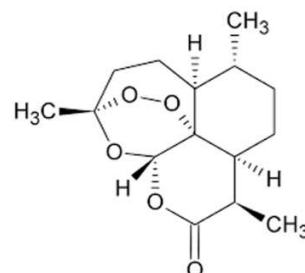


Figure 41. L'herbe chinoise *Artemisia annua* (haut) produit la molécule bioactive artémisinine (bas).

Il a été montré que les monoterpènes carvone et le périllaldéhyde, deux isomères optiques actifs contre de nombreux types de champignons pathogènes humains, étaient impliqués dans l'inhibition de la transformation de *Candida albicans* en une forme filamenteuse associée à sa pathogénicité (Mc Geady *et al.*, 2002).

Les terpènes et terpénoïdes présentent également une activité antibactérienne, qui a été répertoriée contre 25 souches bactériennes. La liste comporte les bornéol, d-3-carène, carvacrol, l'ester méthylique de carvacrol, le citral cis/trans, l'eugénol, le géraniol, l'acétate de géranyle, le cis-hex-3-en-1-ol, le R(+)-limonène, le (2)-linalool, le menthone, le nérol, l' α -pinène, le β -pinène, le (+)-sabinène, l' α -terpinène, le terpinen-4-ol, l' α -terpineole, le (-)-thujone et le thymol (Liu *et al.*, 2008).

La majorité des terpénoïdes sont capables d'inhiber deux processus cruciaux qui sont essentiels à la survie microbienne, entraînant une altération de la respiration cellulaire chez les microbes aérobiques : l'absorption de l'oxygène et de la phosphorylation oxydative (Griffin *et al.*, 1999). Les monoterpènes tels que le carvacrol, le thymol, le menthol et le géraniol sont capables d'agir contre les bactéries Gram-positives et Gram-négatives. La figure 42. ci-dessous schématise certains modes d'action des terpénoïdes sur les pathogènes.

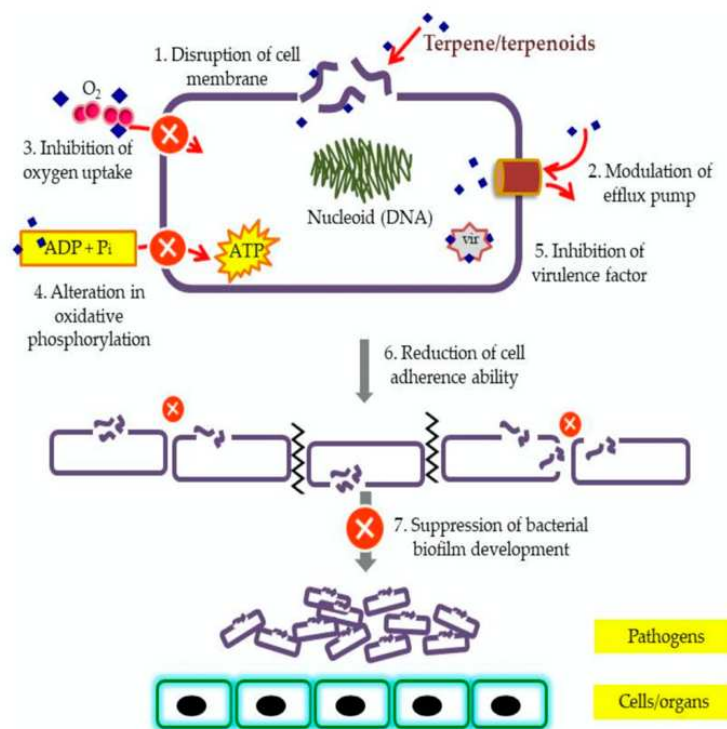


Figure 42. Représentation schématique de certains modes d'action des terpènes/ terpénoïdes sur des pathogènes. Extrait de (Mahizan *et al.*, 2019).

Pour l'OMS, la résistance aux antibiotiques pourrait devenir la première cause de mortalité dans le monde. Certains terpènes et leurs dérivés, sont de puissants agents antimicrobiens contre des agents pathogènes résistants aux médicaments, et pourraient donc être intéressants en thérapies combinées (Dadgostar, 2019, www.who.int).

Il a également été montré que l'activité antimicrobienne des terpénoïdes est déterminée par leur groupe fonctionnel, spécifiquement le groupement hydroxyle des terpénoïdes phénoliques est un des facteurs déterminants de leurs propriétés antimicrobiennes (Mahizan *et al.*, 2019).

3) Activités antivirales

Des recherches entreprises à l'issue de l'épidémie de SRAS (2002-2004) ont montré que des composés bioactifs terpénoïdes (comprenant dix diterpènes de type abiétane et labdane, deux sesquiterpènes : cédrane-3 β ,12-diol et α -cadinol, deux triterpènes de type lupane : acides betulinique et betulonique) possèdent de puissantes activités antivirales contre le coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère (SARS-CoV) et ceci à des concentrations de l'ordre du μ M (Wen *et al.*, 2007).

L'activité d'une formulation (mentionnée comme « NT-VRL-1 ») composée de trente terpènes (notamment les bêta-caryophyllène, l'eucalyptol et le citral) contre HCoV-229E (la souche 229E du Coronavirus humain (HCoV)) - avec et sans l'ajout de cannabidiol (CBD) a présenté un effet antiviral lorsqu'elle a été pré-incubée avec les cellules hôtes avant l'infection virale et la combinaison de la formulation avec le CBD a renforcé cet effet (Chatow *et al.*, 2021).

Des substances triterpénoïdes telles que l'acide ganodérique et l'acide lucidénique provenant d'un champignon utilisé en médecine, le *Ganoderma lucidum* (Reishi), ont montré une activité antivirale sur le virus d'immunodéficience humaine (VIH) en inhibant les effets de la progression du VIH (Cör *et al.*, 2018).

4) Activités anti-inflammatoires

Certains terpénoïdes présentent également des propriétés anti-inflammatoires, tels que les monoterpènes : acétate de linalyle, le 1,8-cinéole, (-)-linalol, et ses esters, le terpène pentacyclique R-amarine ou encore terpénoïde naturel dérivé de l'éponge contignastérol et les triterpénoïdes dérivés de plantes, le lupane, l'oléane, l'ursane et leurs dérivés naturels et synthétiques (Otuki *et al.*, 2005 ; Recio *et al.*, 1995). En particulier, le 1,8-cinéole (eucalyptol), le principal constituant des espèces d'eucalyptus s'est avéré utile pour guérir les affections chroniques : bronchite, la sinusite et l'asthme stéroïdien (Juergen *et al.*, 2020).

L'huile essentielle extraite des graines de nigelle tunisienne présente des activités biologiques puissantes qui soutiennent son utilisation en médecine traditionnelle au niveau de pathologies inflammatoires chroniques, et cela grâce à ses principes actifs terpéniques tels que les carvacrol, p-cymène, β -pinène, γ -terpinène et longifolène (Bourgou *et al.*, 2009).

5) Activités anticancéreuses

Les produits naturels exercent une forte influence sur l'industrie pharmaceutique, notamment dans le domaine du cancer et des chimiothérapies ; en outre, sur 155 petites molécules utilisées comme agents chimiothérapeutiques entre 1940-2006, 73% étaient issues, dérivées, ou des imitations de produits naturels, 47% étant directement issues de produits naturels. Les techniques utilisées de chimie combinatoire dans le but de découverte et d'optimisation de structures et fonctions de molécules chimiques ont permis, dans le domaine public pendant cette période, le signalement d'une seule et unique nouvelle entité chimique (NCE) (ou composé combinatoire *de novo*) et ayant pu être approuvé en 2005 par la FDA (l'Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux) comme médicament anticancéreux : le Nexavar (Sorafenib) de Bayer© (Newman *et al.*, 2007).

Plusieurs monoterpènes utilisés dans l'alimentation (D-limonène et ses métabolites, l'acide périllique ou la carvone) ont des activités anticancéreuses efficaces via un mécanisme

d'inhibition de l'isoprénylation post-traductionnelle des protéines régulant la croissance des cellules (Kris-Etherton *et al.*, 2002 ; Ajikumar *et al.*, 2008).

In vitro, plusieurs triterpènes végétaux (l'acide ursolique et l'acide oléanolique) présentent également des activités anticancéreuses avec des effets antiprolifératifs et l'inhibition de la croissance et l'induction d'apoptose de cellules leucémiques (Cipak *et al.*, 2006).

Il a été approuvé par la FDA que les diterpénoïdes d'origine végétale sont les agents anticancéreux les plus efficaces. L'ester diterpénique hydrophobe 3-ingényl angélate isolé de la plante *Euphorbia peplus*, a été identifié comme agent chimiothérapeutique topique pour le traitement du cancer de la peau (Ogbourne *et al.*, 2004). Également, le diterpène glycosylé éléuthérobine isolé de *Eleutherobia sp.*, un corail mou marin collecté dans les eaux au large de l'ouest de l'Australie est un puissant agent cytotoxique actif contre les cellules cancéreuses (Long *et al.*, 1998).

Produit et purifié à partir de l'if du Pacifique (*Taxus brevifolia*), le diterpène taxol (paclitaxel) est un puissant anticancéreux (agent antimitotique) en traitement par chimiothérapie. Néanmoins, la production industrielle par extraction de l'écorce de l'arbre étant très faible (entre 0,01-0,02% du poids sec), elle ne peut répondre à la demande du marché et n'est de plus pas soutenable, car elle entraîne la destruction de nombreux if (Hezari *et al.*, 1995 ; Ciddi *et al.*, 1995). Le manque de connaissances sur la voie de biosynthèse complexe du taxol (19 étapes) qui reste encore incomplète (quatre enzymes impliquées encore inconnues), ne permet pas, pour le moment, de concevoir la biosynthèse du taxol par ingénierie métabolique d'un hôte châssis hétérologue avec une productivité suffisante (Ajikumar *et al.*, 2010). Des études chez la levure présente l'expression d'une portion de la voie de synthèse du Taxol chez *S. cerevisiae* avec néanmoins de faibles rendements en taxadiène (l'intermédiaire du taxol) (Dejong *et al.*, 2006), qui ont pu être augmentés jusqu'à 8,7 mg/L avec la stratégie d'introduction de la GGPP de *S. acidocaldarius* et d'une taxadiène synthase optimisée pour les codons de *Taxus chinensis* (Engels *et al.*, 2008).

Des méthodes alternatives existent et ont permis d'améliorer sa production : la découverte du champignon producteur de taxol *Taxomyces andeanae* et l'utilisation de la fermentation fongique à grande échelle pour sa fabrication à un coût moindre et des rendements plus élevés (Stierle *et al.*, 1993), par synthèse chimique (Holton *et al.*, 1994), ou semi-synthèse des précurseurs du taxol (Baloglu and Kingston, 1999, Danishefsky, S. J. *et al.*, 1996).

III. Les voies de biosynthèse des terpènes

A. La synthèse des précurseurs des terpènes (FPP, GPP et GGPP) à partir du pyruvate et du G3P.

1) Les voies de biosynthèse de l'IPP et du DMAPP

La synthèse des précurseurs des terpènes l'isopentényl-pyrophosphate (IPP) et le diméthylallyl-pyrophosphate (DMAPP) peut-être réalisée par deux voies métaboliques distinctes : la voie du mévalonate (MVA) découverte la première (McGarvey and Croteau 1995) et la voie du méthylérythritol phosphate (MEP), également appelée voie du MEP/DOXP pour 2-C-méthylérythritol-4-phosphate (MEP) / 1-désoxy-D-xylulose-5-phosphate (DOXP) appelée aussi « voie non-mévalonique (voir la Figure 43 et Lichtenthaler 1999 ; Rohmer *et al.* 1993 ; Zhao *et al.* 2013).

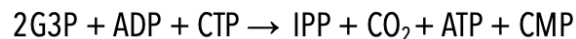
La voie MVA cytosolique est la seule voie des terpénoïdes que l'on trouve chez les archées, les animaux et les champignons. Les plantes et les algues utilisent également la voie MVA cytosolique ancestrale, mais disposent en outre de la voie MEP « bactérienne » pour la production de terpénoïdes dans le plaste (Davies *et al.*, 2014).

La voie MEP bactérienne a été acquise par des organismes eucaryotes photosynthétiques via une endosymbiose cyanobactérienne, les gènes de la voie MEP étant ensuite transférés dans le génome nucléaire (Lange *et al.*, 2000 ; Lichtenthaler 1999).

Les cellules végétales qui contiennent à la fois les voies MVA et MEP génèrent des pools cytosoliques et plastidiaux des deux précurseurs des terpènes, l'isopentényl-pyrophosphate (IPP) et le diméthylallyl-pyrophosphate (DMAPP), permettant une certaine flexibilité de biosynthèse au niveau des différents tissus, en réponse à divers signaux. Chacune des voies utilise des substrats différents : la voie MVA qui fonctionne exclusivement dans le cytosol chez les eucaryotes utilise l'acétyl-CoA pour former les sesquiterpénoïdes et triterpénoïdes tandis que la voie MEP qui fonctionne dans les plastes utilise le G3P et le pyruvate pour former les monoterpénoïdes, diterpénoïdes et tétraterpénoïdes.

Les voies MEP et MVA diffèrent également en termes d'utilisation d'énergie et de rendement en carbone. Les réactions nettes des deux voies de synthèse de l'IPP à partir de G3P sont résumées ci-dessous :

Voie MEP



Voie MVA



La voie MEP a un rendement de conversion du carbone en IPP plus important que la voie MVA, avec respectivement 5/6 du substrat de carbone utilisé pour la production d'IPP (soit 83%), contre 5/9 (soit 56%). En revanche, la voie MVA a un rendement d'énergie plus important que la voie MEP, en produisant 3 ATP et 3 NAD(P)H à partir de 3 G3P, alors que voie MEP génère 2 ATP à partir de 2 G3P (Ungerer *et al.*, 2019).

La voie MEP est une cascade enzymatique comprenant 7 étapes pour transformer deux substrats : le pyruvate (généré par la glycolyse) et le G3P (généré par la glycolyse ainsi que le CCB chez les organismes photosynthétiques) en IPP et DMAPP :

- Condensation du pyruvate et du G3P en 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate (DXP) catalysée par l'enzyme **DXP synthase (DXS)**.
- Réarrangement et réduction (isomérisation réductrice) du DXP pour former du 2-C-méthylérythritol-4-phosphate (MEP) catalysés par la **DXP réductoisomérase (DXR, IspC)**.
- Couplage du MEP au CTP (cytidine triphosphate) pour la formation du méthylérythritol-cytidyl-diphosphate (CDP-ME) catalysé par la **2-C-méthyl-D-érythritol-4-phosphate cytidyltransférase (MCT, IspD)**
- Phosphorylation du CDP-ME en 4-diphosphocytidyl-2-C-méthyl-d-érythritol (CDP-MEP) catalysée par la **4-(cytidine-5'-diphospho)-2- C-méthyl-D-érythritol kinase (CMK, IspE)**.
- Cyclisation du CDP-MEP en 2-C-méthyl-D-érythritol 2,4-cyclodiphosphate (MEcPP) par la **2-C-méthyl-D-érythritol-2,4-cyclodiphosphate synthase (MDS, IspF)**.
- Réduction du MEcPP en 4-hydroxy-3-méthyl-but-2-ényl diphosphate (HMBPP) par la **4-hydroxy-3-méthyl-but-2-ényl diphosphate synthase (HDS, IspG)**.
- Réduction du HMBPP en une mixture d'IPP et de DMAPP catalysé par la **4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényle diphosphate réductase (HDR, IspH)**.
L'enzyme isopentényl diphosphate isomérase (IDI) permet l'interconversion de l'IPP et du DMAPP.

La voie MVA est également une cascade enzymatique comprenant 7 étapes : deux molécules d'acétyl-CoA sont condensées pour de l'acétoacétyl-CoA, puis une troisième molécule d'acétyl-CoA est condensée pour former le 3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl-CoA (HMG-CoA), qui est converti en mévalonate, puis phosphorylé deux fois pour former du mévalonate pyrophosphate. L'IPP est généré par décarboxylation du pyrophosphate de mévalonate et l'interconversion entre l'IPP et le DMAPP est catalysée par une isopentényl diphosphate isomérase (IDI) (Ungerer *et al.*, 2019).

2) Processus en aval de la synthèse des terpènes

A partir de la « mixture » d'IPP et de DMAPP générée par les voies MEP ou MVA des enzymes appelées **prényltransférases** viennent catalyser, *via* des réactions de condensation séquentielle tête-à-queue (par addition répétée d'unités IPP au précurseur DMAPP), la formation de molécules linéaires prényls-pyrophosphates (par multiple de 5 atomes de carbones) : le géranyl pyrophosphate (GPP, C10), le farnésyl pyrophosphate (FPP, C15), et le géranylgéranyl pyrophosphate (GGPP, C20). Puis des **terpènes synthases** viennent convertir ces intermédiaires en divers terpènes : ainsi, le GPP est le précurseur de tous les monoterpènes (C10), le FPP celui de tous les sesquiterpènes (C15) et le GGPP celui de tous les diterpènes (C20), des caroténoïdes, *etc* (voir Figure 43.). La synthèse du limonène requiert une limonène synthase (Davies *et al.*, 2014) tandis que celle du pinène requiert une pinène synthase (Sarria, *et al.*, 2014) et ainsi de suite.

En fonction des besoins de l'organisme en différents terpènes, le pool d'IPP et de DMAPP peut être ajusté par interconversion par l'enzyme isopentenyl diphosphate isomérase (IDI) ; en effet, plus celui-ci nécessite des terpènes à longue chaîne carbonée, plus le nombre d'unités d'IPP requis sera important et inversement. Selon les organismes, les terpènes synthases ont également des propriétés catalytiques qui diffèrent (activité enzymatique, stéréospécificité) : par exemple, certaines terpènes synthases peuvent synthétiser des mélanges de terpènes ou bien différents isomères d'un terpène (la santalène synthase de *Santalum album* et ses isomères α -santalène, β -santalène α -bergamotène et épi- β -santalène) comme on le verra dans le chapitre 4, partie 2 où j'expose mes résultats obtenus en exprimant la terpène synthase dans divers châssis cyanobactérien.

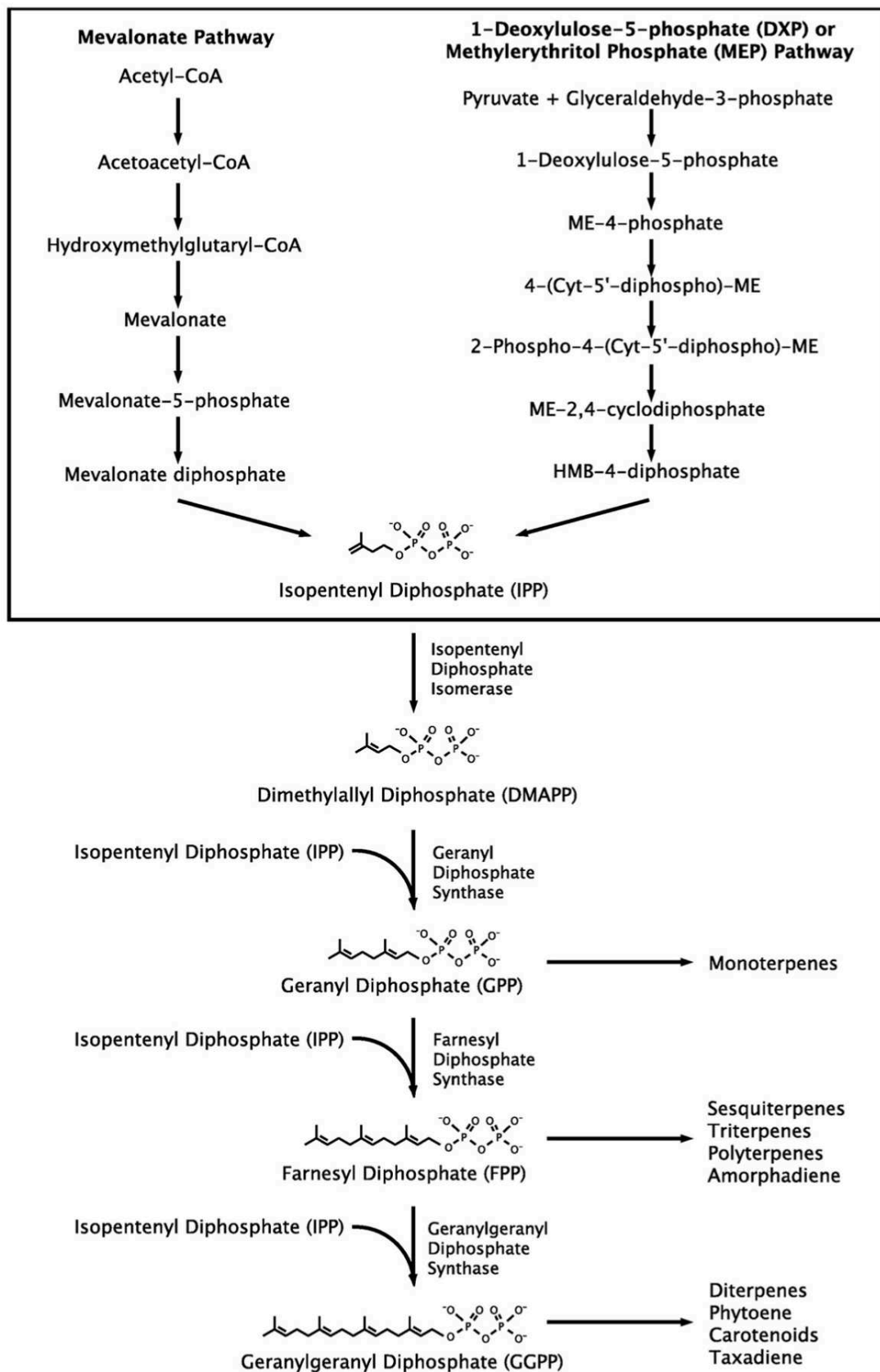


Figure 43. Les voies de biosynthèse des isoprènes (Extrait de Immethun et al., 2013).

En fonction de l'organisme hôte la production des composés précurseurs IPP et DMAPP peut-être réalisée par l'une ou l'autre des voies MVA ou MEP, en revanche le processus en aval de la synthèse des terpènes est conservé.

B. La régulation de la voie MEP

La biosynthèse des terpènes à partir de la voie MEP est fortement régulée de sorte que le flux de carbone issu des voies du CCB ou de la glycolyse ne leur soit pas entièrement dédié.

La production en terpénoïdes peut-être régulée au niveau d'un contrôle transcriptionnel des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse. Par exemple, le contrôle des rendements en huiles essentielles issues de feuilles (constituée de mono- et de sesquiterpènes) dans une population de plantes médicinales sauvages de l'arbre à thé (*Melaleuca alternifolia*), est régulé au niveau de l'abondance de transcripts de gènes au sein de la voie MEP. La variation de l'expression des gènes de la voie MEP comptant jusqu'à 87% de la variation des concentrations en huiles (Webb *et al.*, 2013).

Chez les cyanobactéries, une analyse quantitative révèle que les concentrations d'IPP et de DMAPP et d'autres intermédiaires de la voie MEP sont inférieures de trois ordres de grandeur à celles du pyruvate (Dempo *et al.*, 2014 ; Ungerer *et al.*, 2019).

La régulation de la biosynthèse des terpènes par des modifications post-traductionnelles (PTM) est importante. Dans certaines études d'ingénierie métabolique, la génération de protéines de fusion synthétiques à différentes terpènes synthases, ont permis d'améliorer efficacement la production de terpènes : Albertsen *et al.*, en fusionnant la FPP synthase de levure avec une sesquiterpènes synthase de la plante tropicale *Patchouli* (patchoulol synthase) a permis d'augmenter d'un facteur 2 les rendements en patchoulol chez la levure, notamment grâce à ce détournement physique du flux (réduction du temps de transit) vers le produit souhaité (Albertsen *et al.*, 2011).

IV. Les progrès récents dans la production de terpènes par les microorganismes

A. Extraction de la biomasse végétale et synthèse chimique des terpènes

1) Extraction de la biomasse végétale

Les hôtes naturels produisant des terpènes et terpénoïdes sont généralement des plantes qui ont une croissance lente, dépendante du climat, et pouvant entraîner des modifications au niveau des rendements et des propriétés du produit (Chang et Keasling, 2006). L'extraction de la biomasse végétale est également très énergivore, pour des rendements obtenus souvent très faibles.

Les terpènes et terpénoïdes naturels à haute valeur ajoutée sont généralement présents en très faible quantité au sein des espèces botaniques (Kesselmeier et Staudt 1999). Le taxol, par exemple, extrait de l'écorce de l'if du Pacifique, ne représente qu'entre 0,01 et 0,02 % du poids sec de l'écorce (Hezari *et al.*, 1995). Les plantes herbacées, à feuilles caduques et les conifères produisent de l'isoprène, cependant la récolte du produit n'a jamais été décrite, et ceci peut-être en raison de la volatilité du produit ou encore des petits rendements de ces espèces végétales au vu de la faible efficacité de conversion de l'énergie solaire. Pour ces terpénoïdes, il serait donc abusif d'utiliser l'extraction à partir des plantes au vu des très faibles rendements, de l'impact écologique et du gâchis d'importantes ressources naturelles.

Certains terpénoïdes sont obtenus par des procédés de distillation à forte intensité énergétique (pressurisation suivie d'une distillation mécanique) : le limonène depuis les huiles d'écorces d'agrumes, le pinène depuis la térébenthine de gomme, le latex à partir de caoutchouc naturel provenant de l'*Hevea brasiliensis* (qui fournit 40 à 45 % de l'approvisionnement mondial en caoutchouc). D'autres techniques d'extraction végétale existent : la distillation à la vapeur, l'écrasement physique des glandes à huile essentielle situées dans l'écorce ou la couche cireuse de la peau du fruit, l'extraction assistée par micro-ondes, extraction par solvant ou enfleurage (transfert de l'huile essentielle des pétales de fleurs vers la graisse) (Sharmeen *et al.*, 2021).

2) Synthèse chimique

La synthèse chimique des terpénoïdes est extrêmement difficile en raison de leur complexité structurale (leurs propriétés variant significativement) et nécessite une grande quantité d'énergie, tout en produisant des sous-produits toxiques. Par exemple, le caoutchouc dérivé synthétiquement est produit de manière non renouvelable par la polymérisation de monomères dérivés du pétrole (Davies *et al.*, 2014).

B. La production de terpènes via une usine cellulaire microbienne

Les approvisionnements actuels de terpènes et terpénoïdes à base d'extraction de plantes ou de produits chimiques sont donc limités, et pour répondre à la demande croissante de ces nouveaux composés comme agents bioactifs pour différentes industries, de nouvelles stratégies de production sont nécessaires. La production durable de terpènes et terpénoïdes via une usine cellulaire microbienne est une alternative très intéressante, qui offre de très nombreux avantages (Stephanopoulos, 2007).

1) Production durable de terpènes via une usine cellulaire microbienne et l'utilisation de matières premières de différentes générations

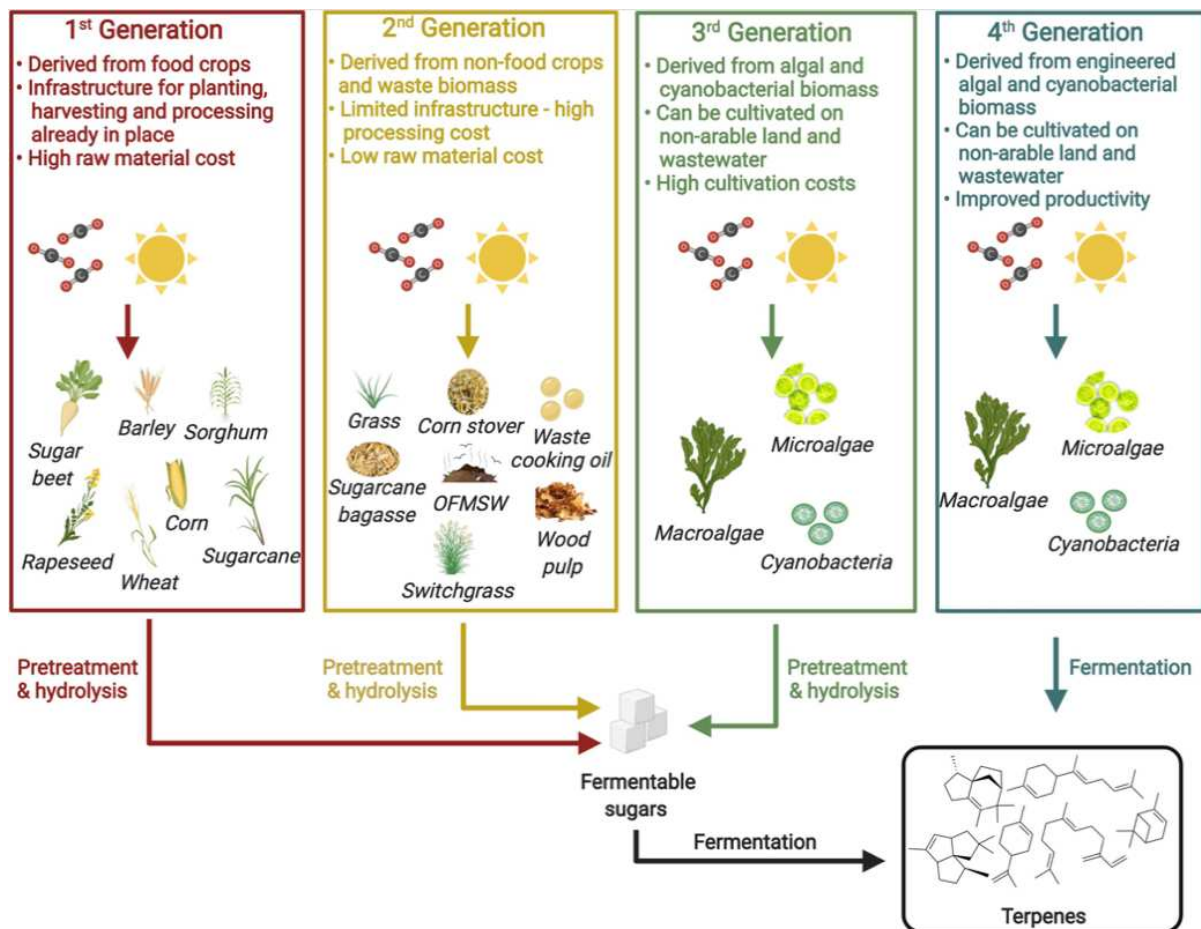


Figure 44. Matières premières potentielles pour la production de biocarburants à partir d'hôtes microbiens. Extrait de (Walls et Rios-Solis, 2020)

Une stratégie très intéressante pour la production de carburants dérivés d'isoprénoïdes est l'ingénierie de châssis microbiens utilisés comme usines cellulaires (*S. cerevisiae*, *E. coli*, etc.) pour la biosynthèse hétérologue d'isoprénoïdes, à partir de matières premières renouvelables de différentes générations (Figure 44.). Les isoprénoïdes produits auront ainsi des propriétés leur permettant d'être utilisés comme carburants d'aviation tout en restant compatibles avec l'ensemble des infrastructures existantes Walls et Rios-Solis, 2020).

- L'utilisation de matières premières de **première génération**, même si elles restent très appréciées des hôtes microbiens, n'est pas soutenable au vu de leurs coûts élevés et de la concurrence avec les terres arables (et donc le marché alimentaire). Ces plantes terrestres qui produisent des sucres ont une faible efficacité énergétique pour convertir l'énergie solaire en biomasse (< 0,5 %) (Brenner *et al.*, 2006),
- Les matières premières de **deuxième génération**, qui sont dérivées de sources de biomasse non comestibles telles que la biomasse ligno-cellulosique, constituent la matière première la plus abondante disponible pour la production de biocarburants

microbiens, mais les coûts de prétraitement restent importants de même que la présence de composés inhibiteurs.

- Les matières premières de **troisième génération** (algues et cyanobactéries) constituent la biomasse fournie à l'hôte microbien ingénieré, comme source de carbone.
- La production de biocarburant terpénique de **quatrième génération** implique des algues ou cyanobactéries ingénierées pour synthétiser directement le terpène en question.

Le développement d'un bioprocédé économiquement et écologiquement durable nécessitera probablement l'utilisation de matières premières dérivées de déchets, et puis particulièrement des matières de troisième et quatrième génération qui sont très intéressantes au vu de leurs propriétés de séquestration du CO₂.

2) Les avantages de la production de terpènes par une usine cellulaire cyanobactérienne

Ces dernières années, les progrès considérables de la biologie synthétique ont permis des percées importantes au niveau de l'ingénierie microbienne hétérotrophe (essentiellement avec la levure *S. cerevisiae* et *E. coli*), et la réorganisation des flux métaboliques. Notamment au niveau de la production de molécules carbonées d'intérêt par excrétion dans le milieu, évitant ainsi l'accumulation de substances toxiques dans la cellule, tout en contournant la nécessité de récolte et d'extraction des composés d'intérêt (Dunlop *et al.*, 2011). Néanmoins, ces microorganismes hétérotrophes se développent aux dépens de sucres issus de différentes matières premières carbonées (nutriments, plantes sucrières ou biomasses ligno-cellulosiques) et ont un coût monétaire et écologique (Figure 44. ci-dessus).

Les larges connaissances et l'application des méthodes d'ingénierie acquises avec ces microorganismes, permettent à présent d'utiliser des usines cellulaires photoautotrophes (algues et cyanobactéries), utilisant des ressources illimitées : la lumière du soleil comme source d'énergie, la conversion directe du CO₂ comme seule source de carbone, des minéraux et de l'eau (même polluée), pour augmenter l'efficacité globale de la production de molécules d'intérêt et de terpènes, de manière durable et soutenable.

Les cyanobactéries sont les châssis les plus attrayants pour une telle ingénierie métabolique, au vu de leur croissance rapide (efficacité de 3-9% d'utilisation de l'énergie solaire (Dismukes *et al.*, 2008)), de leur tolérance aux stress abiotiques (température, intensité lumineuse, concentrations en sel élevées), de leur génétique et de leur physiologie simple (voir revues détaillées du laboratoire que je cosigne Cassier-Chauvat *et al.*, 2021 ; Veaudor *et al.*, 2020 (voir annexes 17 et 18).

La biosynthèse microbienne avec les cyanobactéries offre donc la possibilité d'une méthode de production de terpènes plus fiable, bien plus économe en énergie, et ce de manière durable et renouvelable.

Dans un premier temps, les voies métaboliques nécessaires à la production du terpène ciblé sont sélectionnées. Puis de l'ingénierie génétique et métabolique des flux peut être réalisée afin d'optimiser la production du composé d'intérêt (orientation du carbone photosynthétique vers les produits souhaités), pour laquelle deviennent commercialement pertinente (détaillées dans les perspectives ci-après). En effet, les rendements obtenus restent pour le moment très faibles par comparaison avec ceux des microorganismes hétérotrophes (*E. coli*, *S. cerevisiae*).

C. La production de terpènes chez les cyanobactéries dans la littérature

Les cyanobactéries comme usines cellulaires appelées également « Cyanofactories » (Zhou *et al.*, 2016) sont capables de produire des terpènes : les souches modèles : *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Synechococcus* sp. PCC 7942, *Synechococcus* sp. PCC 7002, mais également *Anabaena* sp. PCC 7120, (pluricellulaire) *Synechococcus elongatus* UTEX 2973 (à très forte croissance), *Cyanothece* sp. PCC 7425 (fixatrice d'azote atmosphérique N₂), *etc.*

Le tableau 9. ci-après créé à partir des 30 articles parus depuis le premier publié en 2010 (Lindberg *et al.*, 2010) fait un état des lieux sur la production de terpènes lorsque seul le gène codant pour une terpène synthase est exprimé.

Différentes stratégies ont été utilisées par les auteurs pour la production de terpènes : le choix des gènes codants pour les terpènes synthases (provenant de différentes espèces végétales), l'adaptation au biais de codon du châssis hôte (OBC) ou non, le choix du système d'expression (plasmidique ou chromosomique *via* l'intégration au sein de sites neutres), le choix d'un promoteur permettant de conférer une expression constitutive ou induite, le choix de la méthode de piégeage de terpènes (solvant, résine ou récupération des terpènes dans l'espace supérieur des photobioréacteurs (headspace), le choix des méthodes de culture (volume plus ou moins important, en erlens-meyers ou photobioréacteur de plus grands volumes et/ou en utilisant des procédés permettant d'obtenir de forte biomasse), la durée de mesure des rendements 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 unités d'expression peuvent-être en mg/L, mg/nombre de cellules ou mg/DO.

Ces multiples variations de paramètres pour le choix de chacune des méthodes rendent les résultats de rendement de production des diverses publications difficiles à comparer.

Tableau 9. Tableau récapitulatif des différentes études de photo-production de terpènes par les cyanobactéries. Ici les rendements obtenus sont ceux obtenus en présence du gène codant pour une terpène synthase sans autre modification génétique (Thèse de Célia Chenebault).

TPS = terpène synthase ; OBC = Optimisée au biais de codon de la cyanobactérie ; 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 cyanobactérien constitutif contrôlant l'expression du gène codant pour la nitrate réductase ; PpsbA1 et PpsbA2 = promoteur cyanobactérien fort induit par la lumière régulant l'expression du gène codant pour la protéine D1 du photosystème II ; PpetE = promoteur cyanobactérien inductible au cuivre qui régule la synthèse de la plastocyanine ; Ptic2op = promoteur induit par l'IPTG ; PrbcL = promoteur cyanobactérien constitutif régulant l'expression du gène codant pour la grande sous-unité de la RubisCO ; Pcp = 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* sp. PCC 6803 ; S7002 = *Synechococcus* sp. PCC 7002 ; S7942 = *Synechococcus elongatus* sp. 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 (<i>A. annua</i> , POBC)	Ptrc (I)	Site neutre II	Culture de 100 mL avec 5% de CO ₂	Hexadecane	Non indiqué	(Choi <i>et al.</i> , 2016)
α-farnésène (C ₁₅ H ₂₄)	A7120	E-α-farnésène synthase (<i>Picea abies</i> , OBC)	Double promoteur Pnir (C) / PpsbA1 (I)	Plasmide pZR1188	Erlenmeyers	Résine	305,4 µg/L (15 j)	(Halfmann <i>et al.</i> , 2014a)
	S7942	E-α-farnésène synthase (<i>Picea abies</i> et <i>Malus domestica</i> , OBC)	Ptrc (I)	Site neutre II	Bouteille Duran avec bullage CO ₂	Dodécane	Non quantifiable (7 j)	(Lee <i>et al.</i> , 2017)
(-) patchoulol (C ₁₅ H ₂₆ O)	S6803	patchoulol synthase (<i>Pogostemon cablin</i> , 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 <i>et al.</i> , 2020)
(-)-α-bisabolol (C ₁₅ H ₂₆ O)	S6803	(-)-α-bisabolol synthase (<i>Matricaria recutita</i> , 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 <i>et al.</i> , 2020)

E- α - Bisabolène (C ₁₅ H ₂₄)	S6803	E-a-bisabolène synthase (<i>Abies grandis</i> , 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 <i>et al.</i> , 2020)
	S6803	E-a-bisabolène synthase (<i>Abies grandis</i> , 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 (<i>Abies grandis</i> , OBC)	PcpcBA (C)	Site neutre (A0935 - A0936)	Erlenmeyers	Dodécane	De 0,5 à 0,7 mg/L selon clones (4 j)	(Davies <i>et al.</i> , 2014)
Limonène (C ₁₀ H ₁₆)	S7002	4S-limonène synthase (<i>Mentha spicata</i> , OBC, sans peptide signal)	PcpcBA (C)	Site neutre (A0935 - A0936)	Erlenmeyers	Dodécane	4 mg/L (4 j)	(Davies <i>et al.</i> , 2014)
	A7120	Limonène synthase (<i>Picea sitchensis</i> , POBC)	Double promoteur Pnir (I) / PpsbA1 (I)	Plasmide pZR1188	Erlenmeyers	Résine	114 μ g/L (14 j)	(Halfmann <i>et al.</i> , 2014b)
	S6803	Limonène synthase (<i>Mentha spicata</i> et <i>Citrus limon</i> , 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 <i>et al.</i> , 2017)
	S6803	Limonène synthase (<i>Schizonepeta tenuifolia</i> , OBC, sans peptide signal)	Ptrc (I)	Site neutre slr203	Erlenmeyers	Piégeage à froid en utilisant de l'octane	250 μ g/L (7 j)	(Kiyota <i>et al.</i> , 2014)

	S7942	4S-limonène synthase (<i>Mentha spicata</i> , 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 <i>et al.</i> , 2016)
(+)- α -pinène (C ₁₀ H ₁₆)	S6803	(+)- α -pinene synthase (<i>Pinus taeda</i> , 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 <i>et al.</i> , 2016)
Linalool (C ₁₀ H ₁₈ O)	S6803	Linalool synthase (<i>Actinidia arguta</i>)	Ptac (C)	Site neutre entre <i>slr0846</i>	Culture en tube à essai	Myristate d'isopropyle (IPM) 20% (v/v)	9,4 mg/L (7j)	(Matsudaira <i>et al.</i> , 2020)
Isoprène (C ₅ H ₈)	S6803	Isoprene synthase (<i>Pueraria montana</i> , OBC, sans peptide signal)	Ptrc (I)	Plasmide pPMQAK1	Erlenmeyers puis transfert dans des tubes fermés	Echantillonnage dans le headspace	23 µg/ g DCW	(Englund <i>et al.</i> , 2018)
	S6803	Isoprene synthase (<i>Pueraria montana</i> , OBC, sans peptide signal)	PrbcL (C), Ptac-lac (I)	Plasmide pVZ325	Flasques Schott	Echantillonnage dans le headspace	De 0,25 à 1,16 ng/mL/h/OD750 selon le promoteur	(Pade <i>et al.</i> , 2016)
	S6803	Isoprene synthase (<i>Pueraria montana</i> , OBC, sans peptide signal)	PpsbA2 (I)	Site neutre slr0168	Photobioréacteur de 1 L avec bullage CO ₂	Echantillonnage dans le headspace	140 µg/L (8 j)	(Bentley <i>et al.</i> , 2014)
	S6803	Isoprene synthase (<i>Pueraria montana</i> , OBC, sans peptide signal)	PpsbA2 (I)	Site de psbA2	Photobioréacteur de 1 L avec bullage CO ₂	Echantillonnage dans le headspace	125 µg/L (4 j)	(Chaves <i>et al.</i> , 2014)
	S7942	Isoprene synthase (<i>Eucalyptus globulus</i> ,	Ptrc (I)	Site neutre II	Erlenmeyers	Echantillonnage dans le headspace	De 0,02 à 7,7 mg/L selon	(Gao <i>et al.</i> , 2016)

		<i>Populus alba</i> , <i>Populus trichocarpa</i> , <i>Populus deltoids</i> , <i>Populus canescens</i> et <i>Pueraria montana</i> , POBC ou OBC)	Pcpc (C) PspbA2 (I)				promoteur et la TPS (3 j)	
	S6803	Isoprene synthase (<i>Pueraria montana</i> , POBC ou OBC)	PspbA2 (I)	Site de psbA2	Non décrit	Echantillonnage dans le headspace	Non quantifié	(Lindberg <i>et al.</i> , 2010)
β – caryophyllène (C ₁₅ H ₂₄)	S6803	β -Caryophyllene synthase (QHS1) (<i>Artemisia annua</i> , POBC)	PspbA2 (I)	Site de psbA2	Non décrit	Séparation basée sur un mélange chloroforme : méthanol	46,4 ng/ mL culture/semaine	(Reinsvold <i>et al.</i> , 2011)
β – phellandrene (C ₁₀ H ₁₆)	S6803	Fusion cpcB avec β - phellandrène synthase (<i>Lavandula angustifolia</i> , OBC)	Pcpc	Site de cpc (délétion ou non de cpcB et cpcA)	Photobioreacteur de 1 L	Echantillonnage dans le headspace et extraction dans l'hexane	Analyse qualitative par UV puis GC-FID	(Formighieri and Melis, 2015)
	S6803	β -phellandrene synthase (<i>Lavandula angustifolia</i> , OBC)	PspbA2 (I) promoter Ptrc-lacO1 (I) Pcpc (C)	Site de psbA2 Site de cpc	Erlenmeyers et photobioreacteur de 1 L	Héxane	De 11 à 259 μ g/g DCW selon site insertion (2 j)	(Formighieri and Melis, 2014b)
	S6803	β -phellandrène synthase (<i>Lavandula angustifolia</i> , OBC)	Pcpc	Site de cpc Fusion ou non avec cpcB	Photobioreacteur de 1 L	Echantillonnage dans le headspace et extraction dans l'hexane	De 0,33 à 0,5 μ g/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 (<i>Lavandula angustifolia</i> , OBC, sans peptide signal)	Non indiqué	Site de psbA2	Photobioreacteur de 1 L	Echantillonnage dans le headspace	0,2 mg/L culture (8 j)	(Bentley <i>et al.</i> , 2013)

	S6803	Fusion cpcB avec β -phellandrene synthase (<i>Abies grandis</i> , <i>Lavandula angustifolia</i> , <i>Solanum lycopersicum</i> , <i>banksiana</i> , <i>Picea sitchensis</i> , OBC sans peptide signal) neryl-diphosphate synthase (<i>Solanum lycopersicum</i> , , OBC sans peptide signal)	Pcpc	Site de cpc	Photobioreacteur de 1 L	Echantillonnage 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 (<i>C. forskohlii</i>)	PpsbA2 (I) PnrsB (I)	Site de psbA2 Site neutre slr0168 Site de sqs	Erlenmeyers	10% KOH dans le méthanol puis hexane	De 0,1 à 0,24 mg/g poids sec selon site d'insertion (4 j)	(Englund <i>et al.</i> , 2015)
Squalène (C ₃₀ H ₅₀)	S6803	Squalene synthase (<i>B. braunii</i> , OBC, sans signal peptide)	PnrsB (I)	Site de la squalène synthase endogène	Erlenmeyers et photobioreacteur	Heptane et acetonitrile	5,2 mg/L (8j)	(Pattanaik <i>et al.</i> , 2020)
	S7942	Squalene synthase tronquée (<i>S. cerevisiae</i> , POBC)	Ptrc (I)	Site neutre II	Culture de 100 mL avec 5% de CO ₂	Hexadecane	0.0001 mg/L/OD730	(Choi <i>et al.</i> , 2016)

D. Conclusions et perspectives d'ingénierie génétique et métabolique pour accroître la production de terpènes

Au vu des faibles rendements en terpènes par comparaison avec les organismes hétérotrophes, des stratégies d'ingénierie génétique et métabolique doivent être mise en place pour accroître la productivité et s'affranchir de goulots d'étranglement des flux de carbonés vers la production de terpènes. Chez les cyanobactéries, la répartition du flux de carbone vers la synthèse des terpénoïdes est d'environ 5 % (Melis, 2013).

Les taux relativement lents de croissance et de fixation du CO₂ des souches de cyanobactéries standard de laboratoire sont les principales raisons de leurs faibles productivités. Les stratégies d'augmentation de l'assimilation du CO₂ ont été largement détaillées dans le Chapitre 2., mais d'autres méthodes, outils et stratégies sont possibles et disponibles et ont été abordées dans la littérature ; elles peuvent s'associer entre elles, dans le but de maximiser les flux métaboliques vers la production de terpènes, pour générer un mutant cyanobactérien ou « cyanofactorie » ultra-compétitif/ve. Ainsi, une fois l'énergie dépensée pour maintenir la division cellulaire de sa population et sa biomasse, il nous faut nous assurer, par diverses stratégies, que le restant d'énergie disponible et l'assimilation du carbone soient utilisés pour la production des bioproduits désirés :

• Outils génétiques et méthodes :

- Choix du châssis cyanobactérien
- Optimisation de leurs conditions de culture pour la production de terpènes
→ Les systèmes de culture (erlensmeyers, cultivateurs HDC, photobioréacteurs), intensité lumineuse, température, milieu de culture
- Amélioration de leur tolérance aux stress xénobiotiques (Kammerscheit *et al.*, 2019a, 2019b).
- Choix des terpènes synthases
 - Sélection des gènes provenant de différentes espèces végétales
→ Les propriétés des terpènes synthases peuvent en effet différer d'une espèce à l'autre au niveau de leurs activités enzymatiques, de leurs promiscuités enzymatiques et leurs abondances au sein de différents châssis hôtes (Gao *et al.*, 2016 ; Englund *et al.*, 2018 ; Lin *et al.*, 2017 Kiyota *et al.*, 2014)
 - Adaptation du transgène au biais de codon du châssis hôte
→ Le remplacement de codons rares du transgène par d'autres plus fréquemment utilisés dans le châssis hôte. Ils sont définis par une table de codons d'usage dérivée du génome séquencé de l'espèce. (Steele *et al.*, 1998 ; Colby *et al.*, 1993 ; Luckner *et al.*, 2002)
 - Suppression du peptide signal des séquences codantes des terpènes synthases
→ la plupart des monoterpènes synthases utilisées pour la production hétérologue proviennent de plantes ; elles sont codées dans le noyau et possèdent un peptide de transit chloroplastique N-terminal qui leur permet d'être exprimées au sein du chloroplaste. Ce peptide est ensuite clivé au sein du chloroplaste pour l'obtention de la protéine mature. Lorsque ces séquences codantes de terpènes synthases sont extraites des espèces

végétales pour la production hétérologue au sein d'un châssis microbien procaryote, le peptide de transit doit être tronqué, car il peut induire l'insolubilité des protéines conduisant à l'agrégation de protéines ou bien à la formation de corps d'inclusion (Zhou *et al.*, 2012).

- Suppression des introns des séquences codantes des terpènes synthases
Chez les eucaryotes, les séquences sont morcelées d'introns, qu'il faut éliminer pour l'expression hétérologue active des enzymes au sein des châssis cyanobactériens procaryotes.
- Stratégies d'amélioration de l'activité des terpènes synthases
Par exemple les stratégies d'évolution dirigée des protéines ou de mutagenèse aléatoire (Hyatt *et al.*, 2007 ; Koksall *et al.*, 2010 ; Yoshikuni *et al.*, 2008).
- Choix de la méthode de piégeage des terpènes (solvants, résines, échantillonnage dans l'espace vide de tête)
- Choix de promoteurs forts tels que p_R , P_{psbA} , P_{cpcB} , ou P_{trc} pour augmenter l'expression des terpènes synthases (Lin *et al.*, 2017 ; Wang *et al.*, 2016 ; Kiyota *et al.*, 2014 ; Davies *et al.*, 2014 ; Ungerer *et al.*, 2019 ; Marraccini *et al.*, 1993 ; Mermet-Bouvier et Chauvat, 1994)
- Optimisation des séquences RBS (site de liaison des ribosomes)
→ A permis d'augmenter les rendements en bisabolène chez *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Sebesta et Peebles, 2020)
- Les systèmes d'expression : au niveau d'un plasmide répliatif ou au niveau de sites neutres au sein du chromosome ou des plasmides endogènes.
- Les études omiques (transcriptome, protéome, métabolome) pour identifier les goulots d'étranglement (Pade *et al.*, 2016 ; Yang *et al.*, 2013 ; Cheah *et al.*, 2020).
- La modélisation et l'ingénierie des protéines (Tashiro *et al.*, 2016 ; Englund *et al.*, 2018)
- Méthodes de screening pour trouver les meilleures enzymes et les meilleurs rendements de terpènes

- **Stratégies d'ingénierie génétique et métabolique**

- Stratégie de rewiring/rerouting du métabolisme central pour l'augmentation des pools des précurseurs de la voie MEP : le G3P, le pyruvate et l'acétyl CoA
→ par exemple l'ingénierie de la voie des pentoses phosphates OPP. Des études suggèrent que les substrats de la voie MEP chez les cyanobactéries ne se résumerait pas strictement au pyruvate et au G3P et qu'une voie métabolique alternative fournirait des intermédiaires assimilables pour la biosynthèse de terpènes. Chez *Synechocystis* sp. PCC 6803 en outre, sous régime photosynthétique, la biosynthèse des isoprénoïdes ne serait pas linéaire, et n'impliquerait pas uniquement la voie MEP, mais un autre pool de substrats issu de la voie des pentoses

phosphate (OPP) et assimilés un peu plus tardivement au niveau de la voie MEP (Ershov *et al.*, 2002, Poliquin *et al.*, 2004).

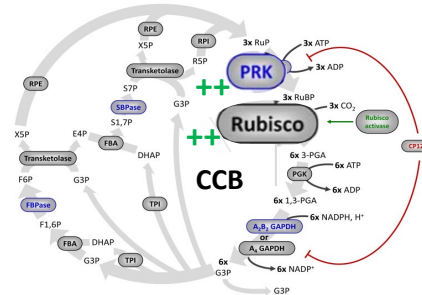
- Stratégies d'ingénierie de la voie MEP pour l'amélioration de l'approvisionnement du pool des précurseurs des terpénoïdes
 - Surexpression des gènes impliqués dans les étapes limitantes de la voie MEP
→ Par exemple les gènes codants pour les enzymes DXS, DXR, IspD, IspG, IDI (Gao *et al.*, 2016 ; (Wang *et al.*, 2016 ; Halfmann *et al.*, 2014b ; Kiyota *et al.*, 2014 ; Englund *et al.*, 2015 ; Englund *et al.*, 2018 ; Choi *et al.*, 2016).
 - Expression de prényl transférases spécifiques aux précurseurs des monoterpènes (GPP) et sesquiterpènes (FPP)
→ Contrairement aux plantes, les cyanobactéries n'ont pas de prényltransférases spécifiques (mais unique IspA/CrtE) les précurseurs prényl diphosphates (GPP, FPP). Une des stratégies est donc de surexprimer les gènes codants pour des prényltransférases spécifiques selon le terpène à produire (Lin *et al.*, 2021 ; Lin *et al.*, 2017 ; Wang *et al.*, 2016 ; Choi *et al.*, 2016 ; Englund *et al.*, 2015).
- Introduction de voies hétérologues (voie MVA) pour contourner la régulation dans le châssis hôte cyanobactérien
→ L'expression hétérologue de la voie MVA chez *Synechocystis* sp. PCC 6803 a permis une augmentation des pools intracellulaires d'IPP/DMAPP et une production d'isoprène multipliée par un facteur 2,5 (Bentley *et al.*, 2014).
- Stratégies d'inactivation/inhibition de voies compétitrices de la voie de biosynthèse MEP des terpènes
→ La stratégie consiste à rediriger le flux de carbone par inactivation (partielle ou complète) de voies concurrentes de la voie de biosynthèse de la molécule d'intérêt. Les substrats acétyl-CoA, G3P et pyruvate nécessaire à la biosynthèse des prényl pyrophosphates (IPP et DMAPP) sont générés à partir des voies métaboliques centrales. L'inactivation de voies compétitrices natives indirectes (stockage du carbone sous forme de glycogène ou PHB) ou au nœuds de ces substrats ou par l'inactivation d'une voie compétitrice directe comme la voie des caroténoïdes pourrait permettre une augmentation de la production d'IPP, de DMAPP et de terpénoïdes d'intérêt en aval La voie de l'acétate
 - La voie du poly-3-hydroxybutyrate (PHB) et la voie du glycogène
Stratégie qui s'est montrée efficace pour améliorer la production d'éthanol, d'acide lactique, de mannitol, d'alcanes et d'acide lactique par *Synechocystis* sp. PCC 6803 et par *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Gao *et al.*, 2012 ; Van der Woude *et al.*, 2014 ; Namakoshi *et al.*, 2016 ; Wang *et al.*, 2013 ; Jacobsen and Frigaard, 2014).
 - La voie des caroténoïdes.
- La fusion de protéines
→ Certaines fusions de protéines avec les terpènes synthases (fusion du gène codant pour la sous-unité β de la phycocyanine (*cpcB*) avec celui codant pour la β -phellandrène synthase (*cpcB-PHLS*) ou avec celui codant pour l'isoprène synthase (*cpcB-IspS*)), ont permis l'amélioration significative de l'abondance des terpènes synthases et de la productivité en terpènes (Chaves *et al.*, 2017 ; Formighieri et Melis, 2016).

- L'atténuation de la toxicité de l'IPP et du DMAPP
 - Bien que l'IPP et le DMAPP soient les conditions essentielles d'une biosynthèse efficace des terpénoïdes, leur accumulation (en particulier l'IPP) peut entraîner une certaine cytotoxicité et diminuer la croissance cellulaire, l'absorption des nutriments, les niveaux d'ATP et perturber le métabolisme des nucléotides. Néanmoins, plusieurs études montrent que l'expression simultanée de l'IPP isomérase, prényl transférase et terpène synthase, dans une souche accumulant des niveaux plus importants de prényl pyrophosphates, canalise ces précurseurs vers une production à haut rendement de terpènes ciblés tout en réduisant l'inhibition de la croissance (George *et al.*, 2018, Martin *et al.* 2003, Sivy *et al.* 2011).

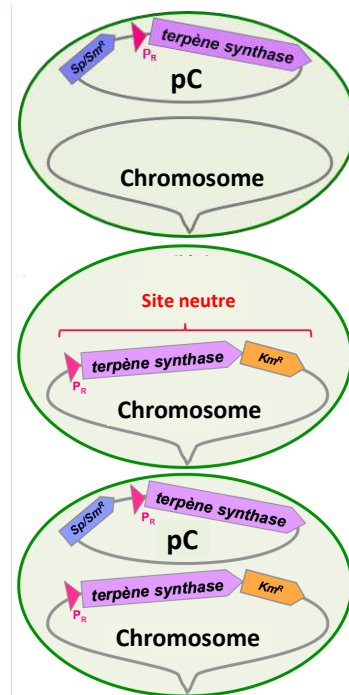
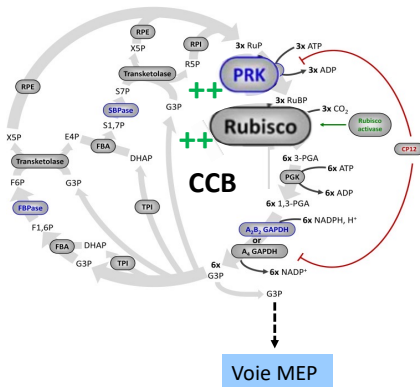
Chapitre 4. RÉSULTATS ET DISCUSSION

Ce chapitre est consacré aux résultats et discussion de mes travaux de thèse concernant l'ingénierie du métabolisme des cyanobactéries en vue de l'optimisation du métabolisme de capture du CO₂ et de la photo-production de terpènes (voir l'Avant-Propos ainsi que la Figure 2 pour une représentation schématique des différentes étapes de mon projet de doctorat).

La Partie 1 du Chapitre 4 détaillera les résultats de la construction et de l'analyse des mutants de surexpression des gènes *prk* et opérons *rbc*, codants pour deux enzymes du CCB au sein de différents châssis cyanobactériens.

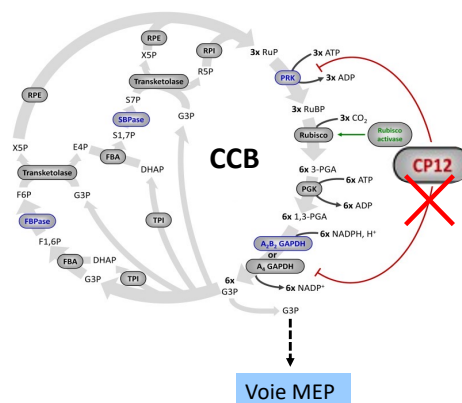


La Partie 2 du Chapitre 4 détaillera les résultats d'ingénierie métabolique pour la redirection du flux de carbone du CCB vers la production de plusieurs terpènes (surexpression des gènes *prk* et opérons *rbc*, influence de la localisation de la cassette d'expression et du nombre de copies de terpènes synthases).



La Partie 3 développera la stratégie d'introduction d'une cassette de surexpression (promoteur fort) dans le chromosome de différentes cyanobactéries en amont des gènes *prk* ou opéron *rbc*.

Des résultats présentés à la fin du Chapitre 5, portent également sur l'ingénierie du métabolisme de capture du CO₂ pour la redirection du flux de carbone et l'augmentation de la production de terpènes, *via* la délétion du gène *cp12* codant pour un régulateur majeur du CCB.



Partie 1. Construction et analyse de mutants de surexpression des gènes *prk* et opérons *rbc*, codants pour deux enzymes du CCB, au sein de différents châssis cyanobactériens.

De nombreuses possibilités existent pour améliorer l'efficacité du CCB. Je me suis concentrée sur l'influence de la modification (au niveau de leur séquence) et de leur quantité (surproduction) de deux enzymes clés du CCB : la RuBisCO et la Phosphoribulokinase (PRK). Afin de tirer pleinement parti de la diversité des cyanobactéries, les gènes et opérons codants pour la PRK et la RuBisCO de 4 souches différentes de cyanobactéries ont été surexprimés dans 3 différents châssis cyanobactériens, et ceci au niveau de deux localisations d'expression différentes.

Au total, 34 mutants cyanobactériens permettant la surexpression des gènes et opérons codants pour la PRK et la RuBisCO ont été construits : 19 mutants ont pu être obtenus à partir d'un système d'expression thermorégulé et 15 mutants à partir d'un système d'expression constitutif.

Afin d'identifier les souches les plus performantes en termes de fixation de carbone, différentes analyses phénotypiques de ces mutants surproducteurs de PRK ou de RuBisCO ont été réalisées : analyse de leurs taux de croissance, accumulation de biomasse, phototolérance, croissance dans des milieux de cultures avec ou sans supplémentation de carbone et d'azote, et croissance à des températures de 30 et 39°C où la solubilité du carbone inorganique varie.

I. Stratégie de sélection des châssis, des biobricks, et de différents systèmes d'expression plasmidique

A. Choix des châssis : les cyanobactéries modèles

Les cyanobactéries sont des procaryotes photosynthétiques très diversifiés qui présentent un grand intérêt pour la recherche fondamentale et appliquée. Jusqu'à présent, les travaux se sont principalement concentrés sur trois espèces unicellulaires modèles : *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Synechococcus* sp. PCC 7942 et *Synechococcus* sp. PCC 7002. Le choix de ces souches est « historique », ce sont les premières souches qui ont été manipulées génétiquement et dont les génomes ont été séquencés. Ces souches sont des hôtes modèles et ont de nombreux intérêts génétiques et physiologiques. Elles sont robustes, leurs temps de génération sont compris entre 3h et 12h ce qui n'est pas le cas pour d'autres cyanobactéries qui ont des temps de génération de 24h à 72h, et sont facilement manipulables en laboratoire grâce aux « outils génétiques qui ont été développés : par transformation naturelle et conjugaison. Une autre souche a également été considérée pour le projet, il s'agit de *Cyanothece* sp. PCC 7425 qui porte également de nombreuses propriétés intéressantes. Ces quatre cyanobactéries ont un potentiel pour servir d'usines cellulaires pour des projets biotechnologiques et la production de molécules d'intérêt.

L'utilisation simultanée de plusieurs modèles permet de prendre en compte la diversité de métabolismes chez les cyanobactéries. On peut alors supposer qu'elles ont des potentiels différents pour la production de molécules d'intérêt et qu'elles présenteront des réponses différentes aux différentes conditions de culture (voir revues largement détaillées sur les propriétés des trois modèles cyanobactériens Cassier-Chauvat *et al.*, 2020, Veaudor *et al.*, 2018, en annexes 17. et 18.).

1) *Synechocystis* sp. PCC 6803

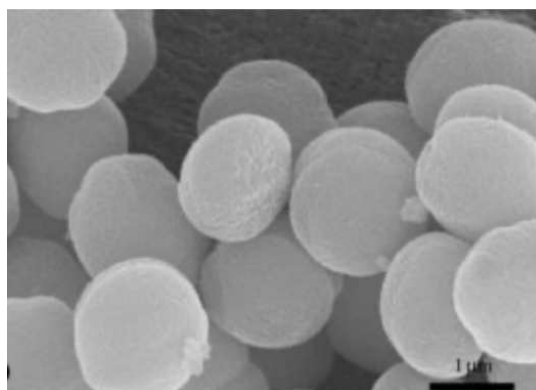


Figure 45. Image de la morphologie cellulaire de *Synechocystis* sp. PCC 6803 au microscope électronique à balayage (MEB) (Lee *et al.*, 2009).

La souche *Synechocystis* sp. PCC 6803 est unicellulaire, sphérique (environ 1 μm de diamètre) appartenant à l'ordre des Chroococcales et à la famille des Nitrospiraceae (elle est aussi appelée *Synechocystis* ATCC 27184). Elle a été isolée en 1968 dans un lac californien à Berkeley par Kunisawa (Stanier *et al.*, 1971), et provient de la collection de l'Institut Pasteur à Paris ('Pasteur Culture Collection', spécifiquement PCC 6803 pour *Synechocystis* sp. PCC 6803). C'est une cyanobactérie euryhaline, c'est-à-dire capable de vivre dans les eaux douces ou saumâtres (jusqu'à trois fois la concentration en NaCl de l'eau de mer) et pouvant supporter un pH très alcalin (Richardson *et al.*, 1983).

La souche est hétérotrophe facultative c'est-à-dire qu'elle peut croître en absence de lumière (si 3 minutes de lumière bleue par jour) en utilisant du glucose. Cette particularité en a fait la première souche modèle la plus étudiée car il est possible de construire des mutants viables de la photosynthèse (Rippka *et al.*, 1979) et son étude a permis une meilleure compréhension du mécanisme de la photosynthèse. Cette souche possède également une uréase, qui lui permet de se développer dans les eaux polluées à l'urée.

Le génome de *Synechocystis* sp. PCC 6803 a été le troisième génome procaryote et le premier génome cyanobactérien entièrement séquencé (Kaneko *et al.*, 1996). Sa taille est de 3,6 Mbp et contient un chromosome circulaire polyploïde (une dizaine de copies par cellules) ainsi que 7 plasmides de 2,3 kb à 119 kb chacun : pSYSA, pSYSG, pSYSM, pSYSX, pCC5.2, pCA2.4, pCB2.4 (numéro d'accès Genbank : GCA_011392055) (Kaneko *et al.*, 1996, 2003 ; Chauvat *et al.*, 1986 ; Xu and McFadden, 1997 ; Yang and McFadden, 1993, 1994).

Synechocystis sp. PCC 6803 sert donc de modèle pour étudier le métabolisme photoautotrophe, l'importance cruciale de l'équilibre métabolique carbone/azote (Forchhammer *et al.*, 2019), les réponses aux stress (Cassier-Chauvat and Chauvat, 2015) car c'est l'une des rares cyanobactéries capables de se développer dans des conditions photoautotrophes, mixotrophes ou hétérotrophes. Elle est également un excellent châssis comme usine cellulaire pour la bio-ingénierie et la production de molécules d'intérêt (Cassier-Chauvat *et al.*, 2020).

2) *Synechococcus* sp. PCC 7942

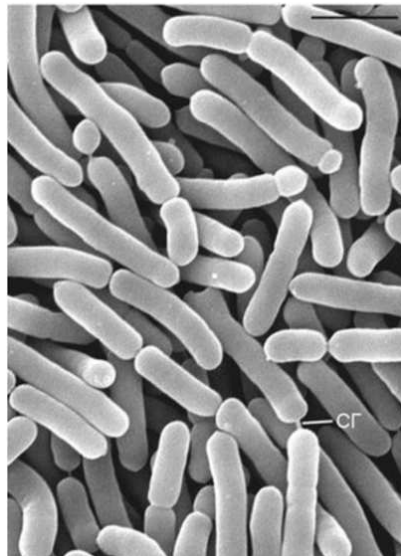


Figure 46. Image de la morphologie cellulaire de *Synechococcus* sp. PCC 7942 au microscope électronique à balayage (MEB) (Gorelova *et al.*, 2013).

Synechococcus sp. PCC 7942 est unicellulaire de forme cylindrique (forme de bâtonnet) de longueur 3-4 μm et de diamètre d'environ 1 μm . Anciennement connue sous le nom d'*Anacystis nidulans*, elle a été isolée en 1973 et appartient à l'ordre des Chroococcales et à la famille des Synechococcaceae.

C'est une cyanobactérie d'eau douce, préférentiellement chaudes ou à température modérée avec un optimum de température se situant autour de 39°C (Ungerere *et al.*, 2018).

Synechococcus sp. PCC 7942 est photoautotrophe stricte et oligotrophe. Contrairement à *Synechocystis* sp. PCC 6803, elle ne possède pas d'uréase et ne peut donc pas pousser dans des milieux avec l'urée pour seule source d'azote.

Au laboratoire la souche est cultivée en conditions standard dans un milieu de culture MM (voir matériel et méthodes).

Son génome est entièrement séquencé (Copeland *et al.*, 2005) il est composé d'un chromosome circulaire de 2,7 Mb ainsi que deux plasmides pANS (8 kb) et pANL (46 kb) (numéro d'accès Genbank: CP000100, CP000101, KT751091.1). L'organisation et la séquence des gènes sont quasi identiques à une autre cyanobactérie d'eau douce *Synechococcus elongatus* PCC 6301 (SYNP6) à l'exception d'une large inversion de 187 kb.

Synechococcus sp. PCC 7942 est la première cyanobactérie à avoir été manipulée génétiquement par introduction d'ADN exogène par transformation naturelle (Shestakov SV, Khyen NT, 1970), ce modèle est également bien utilisé pour étudier la division cellulaire (Zhang *et al.*, 2020), l'équilibre métabolique carbone/azote (Forchhammer *et al.*, 2019), le rythme circadien (Golden, 2020) et la biogenèse du carboxysome (MacCready *et al.*, 2020) et comme usine cellulaire pour la biotechnologie et la production d'alcool, isobutyraldéhyde, entre autres (Anfelt *et al.*, 2015 ; Atsumi *et al.*, 2009 ; Kanno *et al.*, 2017). Il est également possible d'y introduire des plasmides par conjugaison (Marraccini *et al.*, 1993).

3) *Synechococcus* sp. PCC 7002

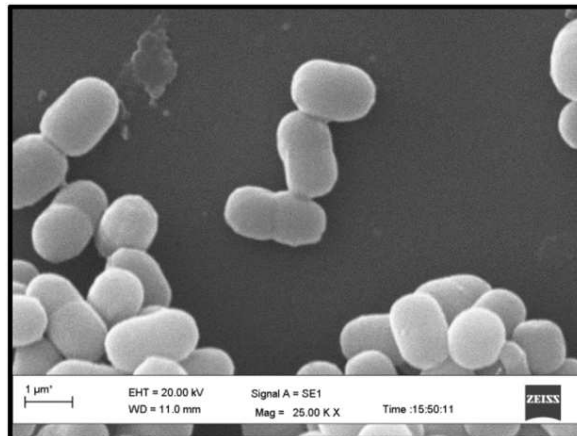


Figure 47. Image de la morphologie cellulaire de *Synechococcus* PCC 7002 au microscope électronique à balayage (MEB) (Ahmad *et al.*, 2020).

La souche *Synechococcus* sp. PCC 7002 est également unicellulaire, de forme coccoïde de diamètre 1-1,5 µm appartenant à l'ordre des Synechococcales, famille des Synechococcaceae, et anciennement connue sous le nom d'*Agmenellum quadruplicatum* (souche PR-6). Elle a été isolée en 1962 à Porto Rico à partir d'un échantillon de boue marine provenant d'enclos à poissons (Van Baalen, 1962), et peut être retrouvée dans des eaux saumâtres (euryhaline) et marines côtières.

L'habitat naturel de *Synechococcus* sp. PCC 7002 est une zone intertidale, qui subit de grandes variations des paramètres comme la salinité, la lumière, la température, et la disponibilité en nutriments. De ce fait, elle est extrêmement tolérante à de nombreuses conditions de croissance comme aux fortes intensités lumineuses (Nomura *et al.*, 2006), aux hautes températures (sa température optimale de croissance est de 38°C), et aux changements importants de salinité (de 0 à 100 g/L) (Batterton and Van Baalen, 1971 ; Ludwig and Bryant, 2012). La souche fait également partie des cyanobactéries avec les plus forts taux de croissance (temps de génération de 3,5 h dans certaines conditions (Ludwig and Bryant, 2012), tous ces paramètres en font un châssis très intéressant en biotechnologie.

Synechococcus sp. PCC 7002 est hétérotrophe facultative et peut pousser en absence d'activité photosynthétique aux dépens du glycérol comme source de carbone (Lambert and Stevens, 1986). Au laboratoire la souche est cultivée en conditions standard dans un milieu de culture salin (supplémenté en NaCl et KCl) appelé milieu A⁺ (voir matériel et méthode). *Synechococcus* sp. PCC 7002 requière de la vitamine B12 pour croître (elle est auxotrophe pour la cobalamine) contrairement à *Synechocystis* sp. PCC 6803 et *Synechococcus* sp. PCC 7942 qui sont capables de la synthétiser.

Son génome entièrement séquencé est composé d'un chromosome circulaire de 3 Mb (numéro d'accès GenBank CP000951) et de 6 plasmides endogènes de 4,8 à 186 kpb (pAQ1, pAQ2, pAQ3, pAQ4, pAQ5, pAQ6 et pAQ7). De nombreux outils génétiques ont été développés pour *Synechococcus* sp. PCC 7002 qui est naturellement transformable et conjugable (Stevens *et al.*, 1980, résultats du laboratoire non publiés).

4) *Cyanothece* sp. PCC 7425

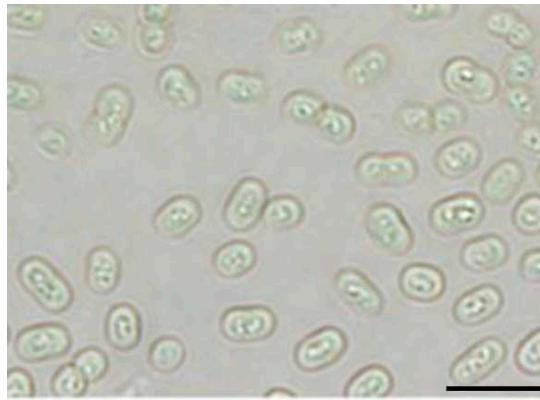


Figure 48. Photomicrographie de la souche *Cyanothece* sp. PCC 7425. Barre (échelle) = 5 μ m.
Extrait de Bandyopadhyay *et al.*, 2011.

La souche *Cyanothece* sp. PCC 7425 (également désignée sous le nom de *Cyanothece* ATCC 29141) est unicellulaire et a été isolée en 1972 dans une rizière au Sénégal (Rippka *et al.*, 1979).

Elle est peu étudiée et présente de nombreuses propriétés intéressantes (Chenebault *et al.*, 2020). Comparée aux autres souches modèles évoquées précédemment, *Cyanothece* sp. PCC 7425 présente des cellules plus grandes (environ 3-4 μ m) (voir Figure 48. et Porta *et al.*, 2000 ; Bandyopadhyay *et al.*, 2011) ainsi qu'un génome plus important avec un chromosome circulaire de 5,79 Mbp et 3 plasmides circulaires (pP742501 : 196 kb ; pP742502 : 179 kb ; pP742503 : 34 kb, (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000022045.1/)).

La souche peut synthétiser des produits d'intérêt biotechnologique comme la cyanophycine, les cyanobactines, l'alcane, le saccharose et les polyhydroxyalcanoates (bioplastiques biodégradables) (Klemke *et al.*, 2016 ; Houssen *et al.*, 2012 ; Porta *et al.*, 2000 ; Bandyopadhyay *et al.*, 2011).

Cyanothece sp. PCC 7425 a également une balance C/N assez différente des autres souches modèles étudiées. Elle peut fixer l'azote atmosphérique en anaérobiose (Bandyopadhyay *et al.*, 2011), et est aussi capable de former des granules de carbonate de calcium intracellulaires séquestrant le CO₂ (Benzerara *et al.*, 2014 ; Li *et al.*, 2016 ; Blondeau *et al.*, 2018).). La souche est également 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)). Cette dernière caractéristique est intéressante à la fois en recherche fondamentale, pour mieux comprendre les mécanismes d'adsorption de l'urée, mais également d'un point de vue plus appliqué en biotechnologies pour la production de molécules d'intérêt couplée à la dépollution des eaux polluées. En effet, l'urée est le principal produit du catabolisme des acides aminés et est également très utilisé comme engrais azoté. Le composé pourrait satisfaire les besoins en azote des filières biotechnologiques pour remplacer les composés azotés nitrate très souvent utilisés, qui sont coûteux et surtout produit à partir de la pétrochimie.

B. Choix des enzymes du CCB à surproduire

En se basant sur des analyses biochimiques, de flux métaboliques et la caractérisation de mutants, Il est largement admis depuis ces dernières décennies que la phosphoribulokinase et la RuBisCO, qui catalysent les réactions irréversibles du CCB, en sont aussi les principaux facteurs limitants (Spreitzer 1993 ; Hartman et Harpel 1994).

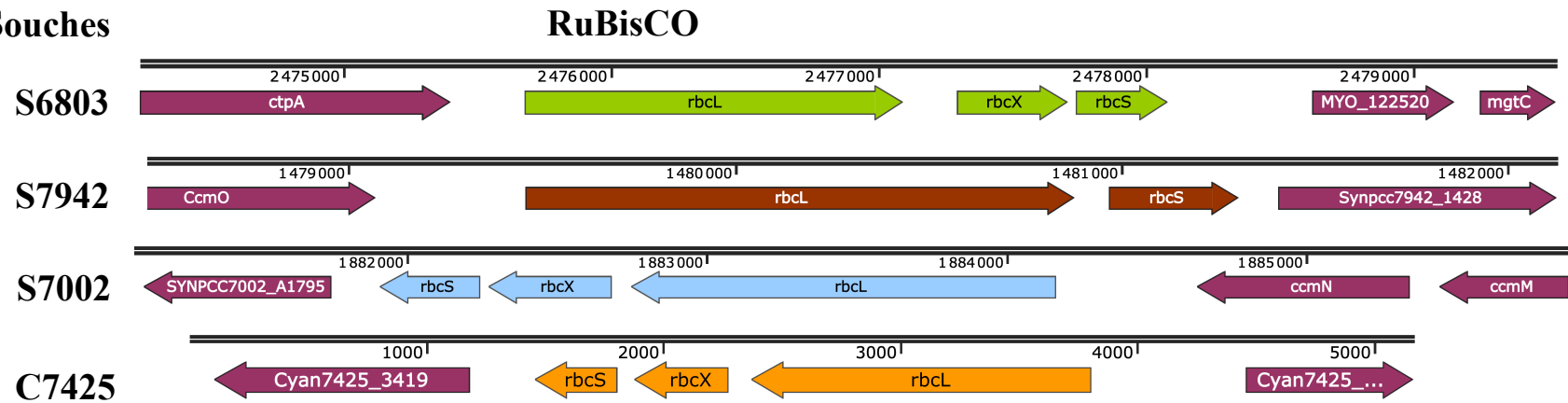
En outre, la principale fonction du CCB consiste en la régénération du RuBP pour un autre cycle de fixation du CO₂, ce qui confère au RuBP un rôle central dans le CCB et donc aux enzymes PRK, dont le RuBP est le produit de la réaction, ainsi qu'à la RuBisCO, dont le RuBP en est le substrat (Raines, 2003).

La **PRK** intervient dans la régénération du substrat de la RuBisCO : RuBP (ribulose 1,5-bisphosphate) par phosphorylation du Ru5P (ribulose 5-phosphate) et consommation d'ATP. La **RuBisCO** est codée par l'opéron *rbc* qui comprend les gènes codants pour les LSU et SSU ainsi que très fréquemment, pour les protéines accessoires nécessaires à leurs assemblages, notamment la protéine (RbcX) indispensable à l'activation de son activité. La RuBisCO est l'une des protéines les plus abondantes sur terre et est notamment impliquée dans la fixation du CO₂, étape majeure du CCB. L'enzyme dispose d'un faible taux de renouvellement de son substrat et les discriminations non favorables entre le CO₂ (réaction de carboxylation) et l'O₂ (réaction d'oxygénation négative pour les bilans d'énergie et de carbone) font de la RuBisCO une enzyme « inefficace », et l'un des goulots d'étranglement de la photosynthèse oxygénique et de l'assimilation du carbone.

Les séquences codantes pour les RuBisCO et les PRK de 4 souches de cyanobactéries du laboratoire ont été ciblées (Figure 49.) afin de les surexprimer au sein de différents châssis cyanobactériens via différents systèmes d'expression.

Les alignements des séquences en acides-aminés des protéines phosphoribulokinase ainsi que celles composant la RuBisCO (RbcL, RbcX, RbcS) de différents châssis cyanobactériens sont présentés respectivement en annexes 15 et 16.

A. Souches



B. Souches

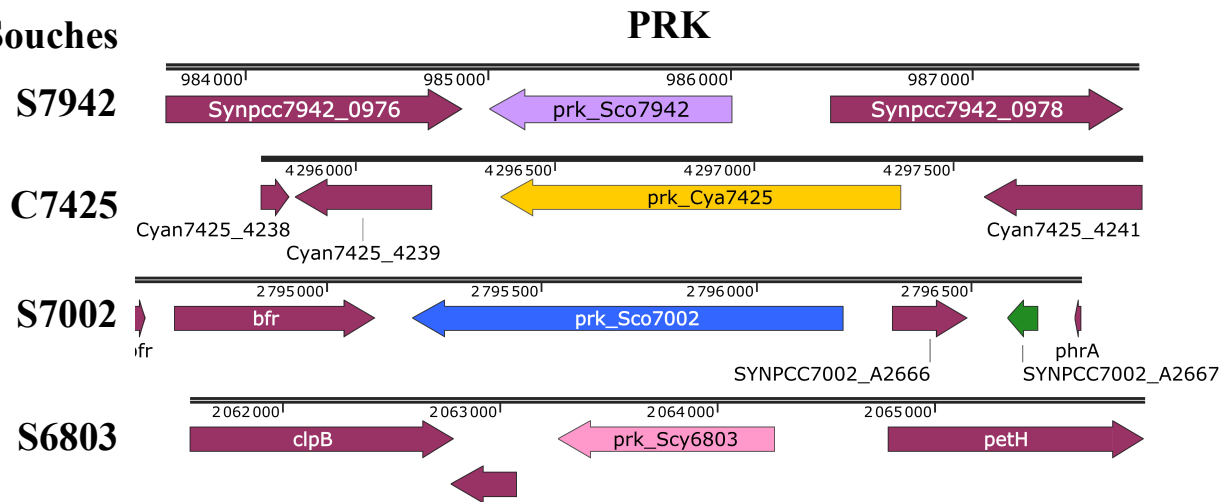


Figure 49. Régions génomiques autour des gènes et opérons codants pour les deux enzymes du CCB : la PRK et la RuBisCO des 4 châssis cyanobactériens *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Synechococcus* sp. PCC 7942, *Synechococcus* sp. PCC 7002 et *Cyanothece* sp. PCC 7425.

(A.) Régions génomiques des opérons codants pour la RuBisCO (de haut en bas) de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (*rbcLXS*, en vert), *Synechococcus* sp. PCC 7942 (*rbcLS*, en marron et *rbcX* environ 100 kpb en aval de l'opéron dans le génome), *Synechococcus* sp. PCC 7002 (*rbcLXS*, en bleu clair) et *Cyanothece* sp. PCC 7425 (*rbcLXS*, en orange). (B.) Régions génomiques des gènes codants pour la PRK (de haut en bas) de *Synechococcus* sp. PCC 7942 (*prk*, en violet), *Cyanothece* sp. PCC 7425 (*prk*, en jaune) *Synechococcus* sp. PCC 7002 (*prk*, en bleu foncé) et *Synechocystis* sp. PCC 6803 (*prk*, en rose).

C. Choix du système d'expression : les vecteurs d'expression pFC1

Les clonages des gènes à surexprimer ont été effectués dans des vecteurs à large spectre d'hôtes, dérivés du plasmide RSF1010 développés au laboratoire : ils permettent une expression constitutive (pC) ou thermorégulée (pFC1, pT) (Mermet Bouvier and Chauvat, 1994 ; Veaudor *et al.*, 2018). Ces deux types de plasmides se répliquent chez les bactéries à gram-négatif ainsi que dans diverses cyanobactéries (Bagdasarian *et al.*, 1981 ; Kues *et al.*, 1989 ; Marraccini *et al.*, 1994 ; Kreps *et al.*, 1990 ; Chenebault *et al.*, 2020). En effet, ils possèdent leurs propres machineries de réplication ainsi qu'une origine de transfert (*oriT*) nécessaire à leurs transferts par conjugaison. Les gènes d'intérêt peuvent être clonés au niveau d'un site de multiple de clonage (comprenant un site unique *NdeI* 5'-CATATG-3') présent à bonne distance du promoteur fort (p_R) du bactériophage lambda et de la séquence Shine Dalgarno.

Le plasmide pFC1 (pT) permet une expression thermorégulée du gène cloné en aval du promoteur fort du phage Lambda p_R . Le p_R est sous le contrôle d'un répresseur thermosensible codé par le gène *ci857* exprimé de façon constitutive et venant se fixer au promoteur p_R (Figure 50. A). Ce répresseur est thermolabile, et permet la régulation fine de l'expression du gène sous contrôle du p_R . En effet, à 30°C, le répresseur est fonctionnel et la répression du p_R est maximale, n'entraînant pas (ou très peu) d'expression des gènes clonés en aval du p_R ; à 33-34°C, la répression est modérée, tandis qu'à 39°C, le répresseur est dénaturé et l'expression des gènes sous le contrôle du p_R est maximale. Le plasmide pC dérivé du plasmide pT permet l'expression forte et constitutive des gènes clonés en aval du p_R (Figure 50. B). Il a été obtenu par délétion d'un fragment d'ADN situé entre 2 sites de restriction *PsiI* au niveau du gène *ci857*, générant une ORF tronquée de 532 pb (Veaudor *et al.*, 2018). Les deux plasmides pFC1 (pT) et pC possèdent 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 par pression de sélection du plasmide dans les souches de *E. coli* et de cyanobactéries.

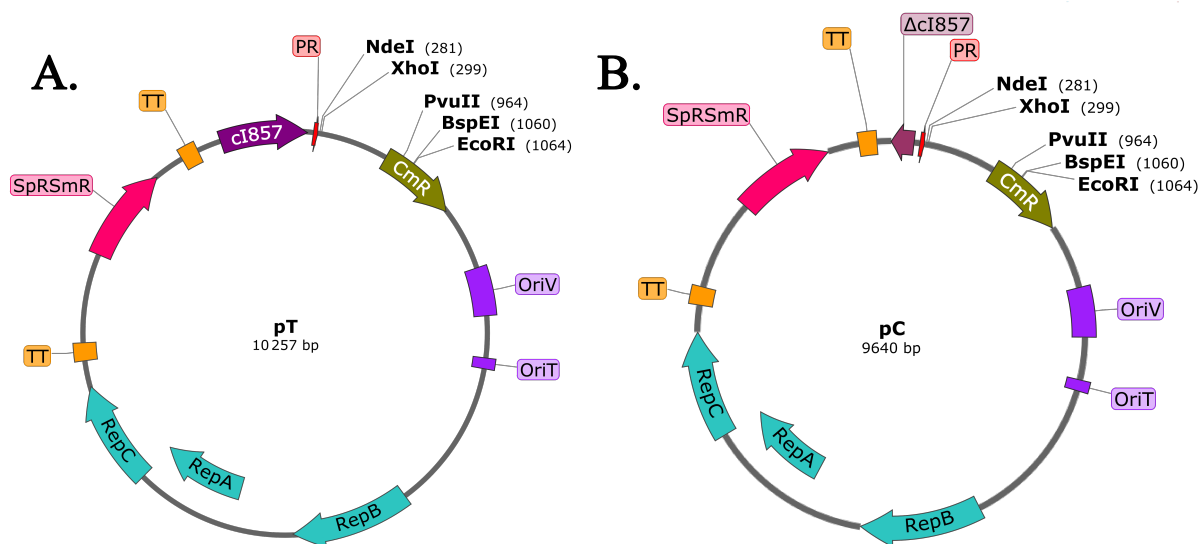


Figure 50. Carte des plasmides pFC1 (pT) et pC

A. Carte du plasmide d'expression forte et thermocontrôlée pT (pFC1). B. Carte du plasmide d'expression forte et constitutive (d'après Mermet-Bouvier and Chauvat 1994 et Veaudor *et al.*, 2018).

II. Surexpression des gènes *prk* ou *rbc* dépendante de la température à partir du plasmide répliatif ‘pT’ (pFC1)

Le vecteur pFC1 (pT) peut être utilisé notamment dans le cas où les gènes à exprimer sont toxiques pour *E. coli* ou les cyanobactéries en permettant de contrôler l’expression par le biais de la température. Il a donc été utilisé car il a été montré à plusieurs reprises que la protéine PRK était toxique (Kobayashi *et al.*, 2003 ; Milanez *et al.*, 1991 ; Brandes *et al.*, 1996).

A. Stratégie de construction des cassettes d’expression

Plusieurs étapes sont nécessaires à la construction des 7 plasmides ‘pT’ permettant la surexpression des gènes codants soit pour les enzymes RuBisCO de 4 versions différentes : *rbc_Scy6803* de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Figure 50.), *rbc_Sco7942* de *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Figure 53.), *rbc_Sco7002* de *Synechococcus* sp. PCC 7002 (Figure 52.) et *rbc_Cya7425* de *Cyanothece* sp. PCC 7425 (Figure 54.) ou de PRK de 3 versions différentes *prk_Scy6803* de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Figure 55.), *prk_Sco7942* de *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Figure 56.) et *prk_Cya7425* de *Cyanothece* sp. PCC 7425 (Figure 57.).

Tout d’abord, la séquence de l’opéron *rbc* ou du gène *prk* cible est amplifiée par PCR à partir du génome d’une des 4 souches de cyanobactéries, et des amorces flanquées des sites de restriction en amont et en aval des fragments synthétisés. Ensuite, les fragments amplifiés ont été digérés par les enzymes de restriction spécifiques et clonés au sein du vecteur pT (lui-même également linéarisé au niveau des mêmes sites de restrictions) et générant par ligation, les différents plasmides pT. Ces plasmides ont été introduits chez *E. coli*, par transformation en sélectionnant les clones résistants à la streptomycine (Sm) et spectinomycine (Sp). Pour chaque construction, les clones ont été vérifiés par « screening des colonies d’*E. coli* et amplification PCR du gène/opéron cible cloné (ou non) dans le pT avec des amorces s’appuyant respectivement en amont du *pR* et au niveau de l’ORF tronquée Cm^S du plasmide pT. Une fois les clones vérifiés par PCR et séquençages ceux-ci ont été introduits au sein de différents châssis cyanobactériens par conjugaison.

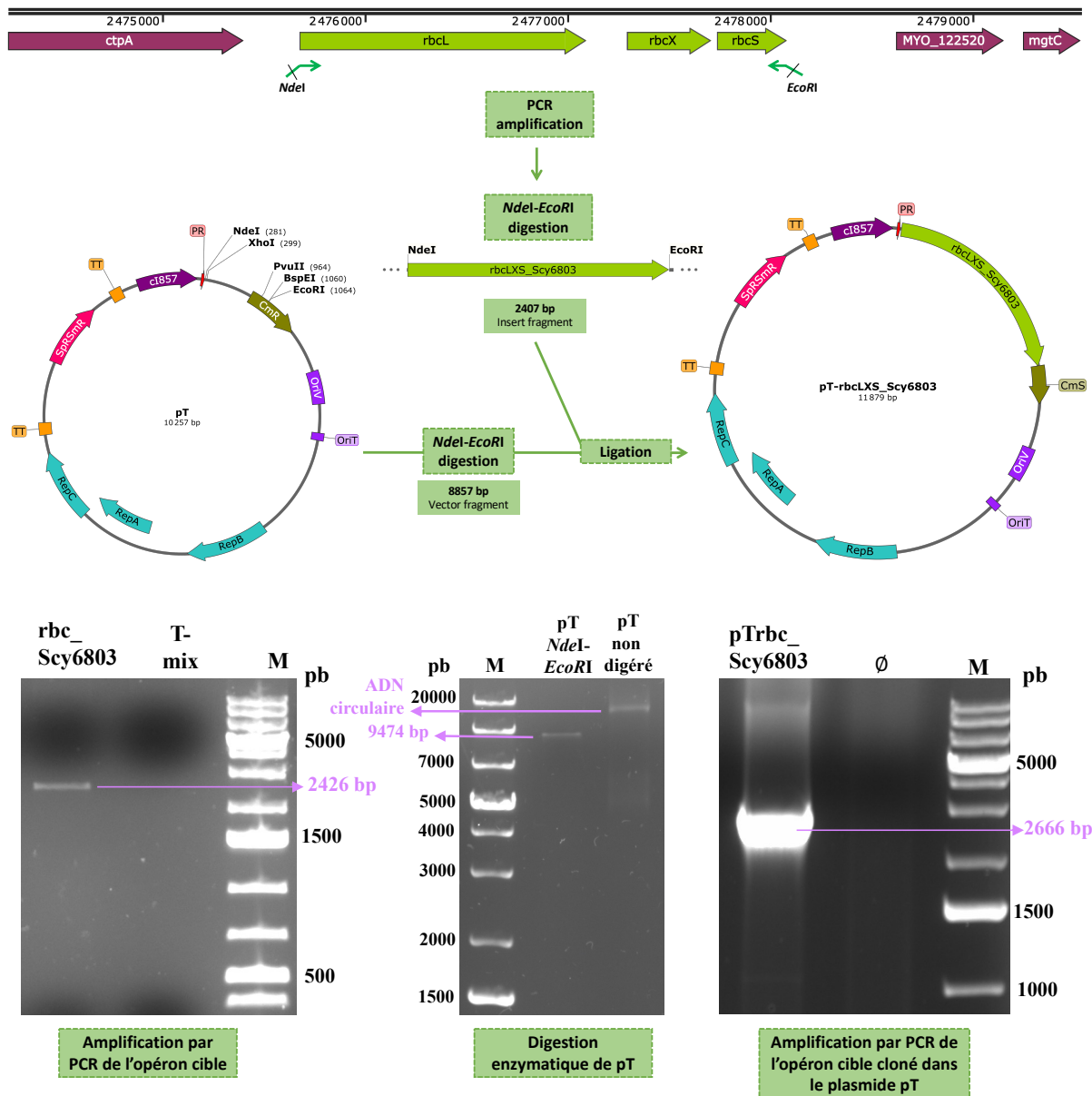


Figure 51. Construction du plasmide pT-rbcLXS_Scy6803 pour l'expression thermorégulée de l'opéron (*rbcLXS_Scy6803*) codant pour RuBisCO de *Synechocystis sp.* PCC 6803.

La séquence de l'opéron *rbcLXS_Scy6803* (en vert) a été amplifiée par PCR à partir du génome de *Synechocystis sp.* PCC 6803 et des amorces (*rbcLXS-S6803_Fw* et *rbcLXS-S6803_Rv*) flanquées par les sites de restriction *NdeI* en amont et *EcoRI* en aval des fragments synthétisés (voir gel correspondant montrant l'amplification par PCR de l'opéron cible). Les fragments amplifiés contenant l'opéron *rbcLXS_Scy6803* ont ensuite été digérés par les enzymes *NdeI* et *EcoRI* et clonés dans le pT préalablement linéarisé au niveau des sites de restrictions *NdeI* et *EcoRI*, (voir gel du milieu) et générant par ligation, le plasmide pT-rbcLXS_Scy6803. L'amplification par PCR colonies d'*E. coli* du gène cible cloné dans le pT avec les amorces pFC1_PraI et pFC1_ReR1, s'appuyant respectivement en amont du *pR* et au niveau de l'ORF tronquée *Cm^S* est montré par le gel de droite. L'opéron *rbcLXS_Scy6803* est exprimé à partir du promoteur fort *pR* du phage λ (en rouge) au sein d'un système d'expression thermocontrôlé sous la dépendance de l'activité du répresseur thermolabile (*cl857*). Les gènes/opérons sont représentés par des flèches colorées pointant dans la direction de leur transcription. Il est à noter que le gène *Cm^R* de pT-rbcLXS_Scy6803 est tronqué, les cellules portant ce plasmide sont donc sensibles au chloramphénicol *Cm^S*, tandis que le gène *Sp^R/Sm^R* (en rose) est flanqué du double terminateur (TT, en orange). Le marqueur de poids moléculaire (M) = 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

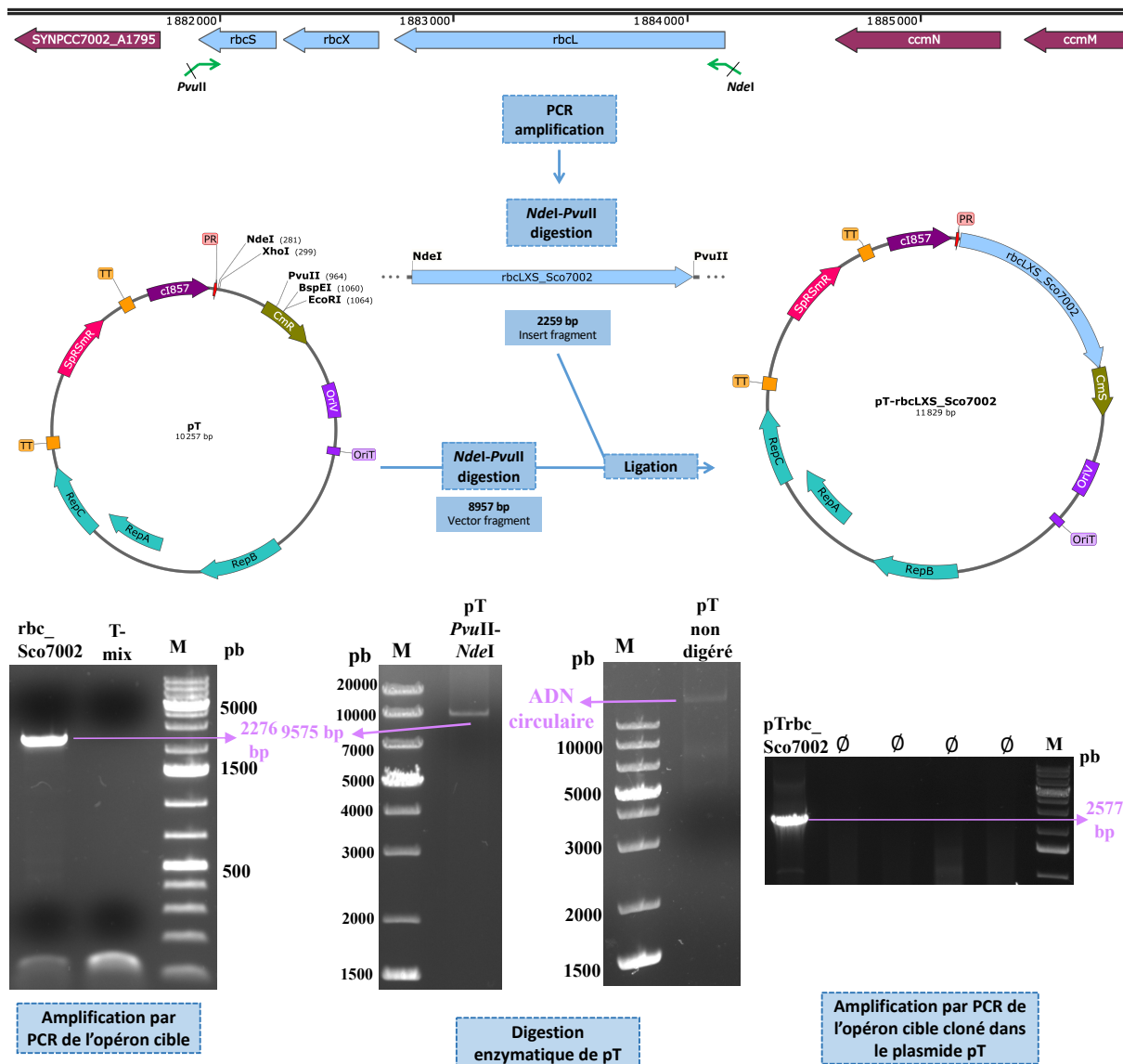


Figure 52. Construction du plasmide pT-rbcLXS_Sco7002 pour l'expression thermorégulée de l'opéron (*rbcLXS_Sco7002*) codant pour RuBisCO de *Synechococcus* sp. PCC 7002.

La séquence de l'opéron *rbcLXS_Sco7002* (en bleu) a été amplifiée par PCR à partir du génome de *Synechococcus* sp. PCC 7002 et des amorces (*rbcLXS-S7002_Fw*, *rbcLXS-S7002_Rv*) flanquées des sites de restriction *NdeI* en amont et *PvuII* en aval des fragments synthétisés (voir gel correspondant montrant l'amplification par PCR de l'opéron cible). Les fragments amplifiés contenant l'opéron *rbcLXS_Sco7002* ont ensuite été digérés par *NdeI* et *PvuII* et clonés dans le pT (lui-même linéarisé par digestion *NdeI* et *PvuII*, voir gel du milieu) et générant par ligation, le plasmide pT-rbcLXS_Sco7002. L'amplification par PCR colonies d'*E. coli* du gène cible cloné dans le pT avec les amorces pFC1_Pra1 et pFC1_ReR1, s'appuyant respectivement en amont du *pR* et au niveau de l'ORF tronquée *Cm^S* est montré par le gel de droite. L'opéron *rbcLXS_Sco7002* est exprimé à partir du promoteur fort *pR* du phage λ (en rouge) au sein d'un système d'expression thermocontrôlé sous la dépendance de l'activité du répresseur thermolabile (*cl857*). Les gènes/opérons sont représentés par des flèches colorées pointant dans la direction de leur transcription. Il est à noter que le gène *Cm^R* de pT-rbcLXS_Sco7002 est tronqué, les cellules portant ce plasmide sont donc sensibles au chloramphénicol *Cm^S*, tandis que le gène *Sp^R/Sm^R* (en rose) est flanqué du double terminateur (TT, en orange). Le marqueur de poids moléculaire (M) = 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

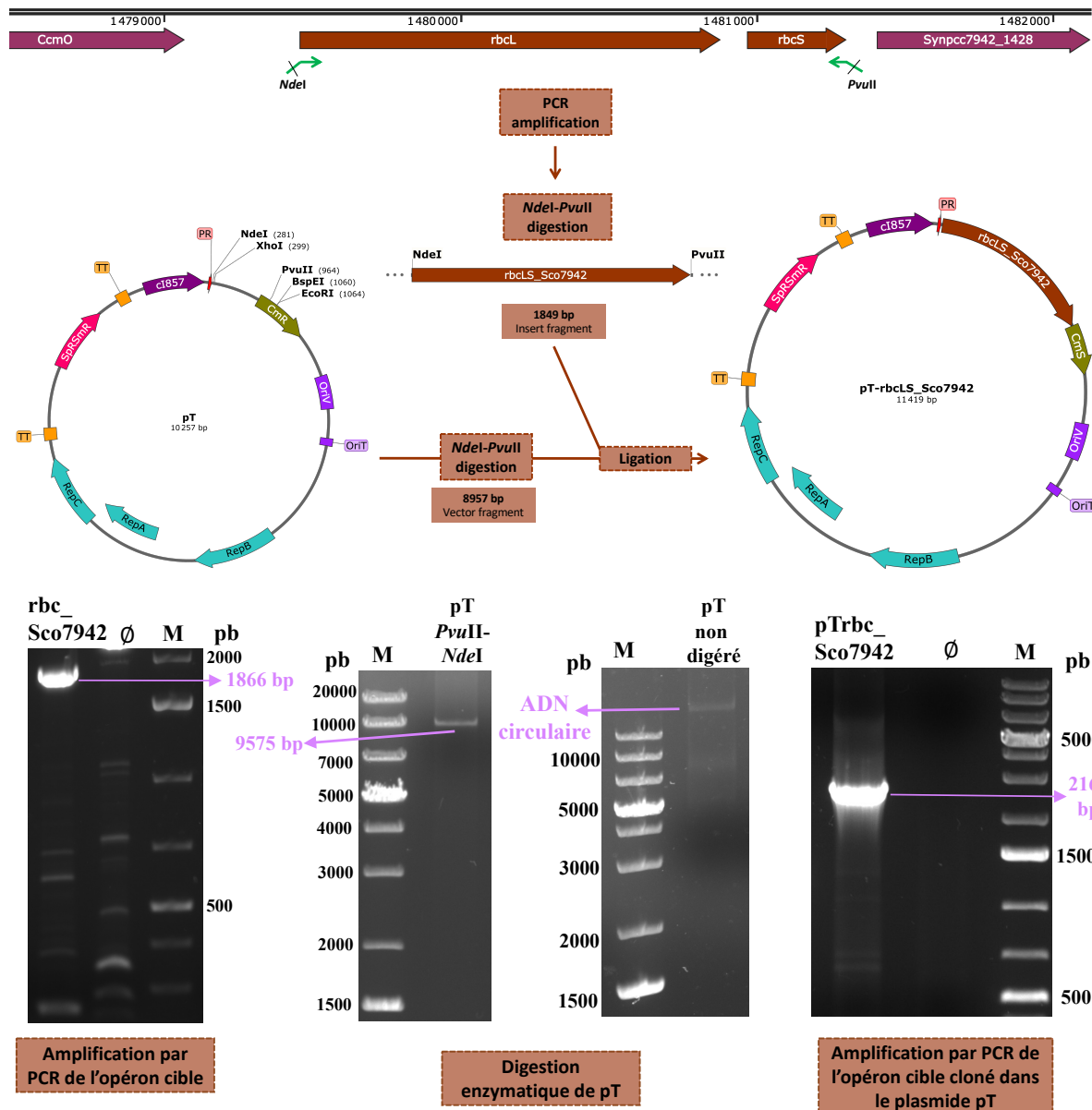


Figure 53. Construction du plasmide pT-rbcLS_Sco7942 pour l'expression thermorégulée de l'opéron (*rbcLS_Sco7942*) codant pour la RuBisCO de *Synechococcus* sp. PCC 7942.

La séquence de l'opéron *rbcLS_Sco7942* (en marron) a été amplifiée par PCR à partir du génome de *Synechococcus* sp. PCC 7942 et des amorces (*rbcLS-S7942_Fw*, *rbcLS-S7942_Rv*) flanquées des sites de restriction *NdeI* en amont et *PvuII* en aval des fragments synthétisés (voir gel correspondant montrant l'amplification par PCR de l'opéron cible). Les fragments amplifiés contenant l'opéron *rbcLS_Sco7942* ont ensuite été digérés par les enzymes *NdeI* et *PvuII* et clonés dans le pT (lui-même également linéarisé au niveau des sites de restrictions *NdeI* et *PvuII*, voir gel du milieu), et générant par ligation, le plasmide pT-rbcLS_Sco7942. L'amplification par PCR colonies d'*E. coli* du gène cible cloné dans le pT est montré par le gel de droite avec les amorces pFC1_Pra1 et pFC1_ReR1, s'appuyant respectivement en amont du *pR* et au niveau de l'ORF tronquée *Cm^S*.

L'opéron *rbcLS_Sco7942* est exprimé à partir du promoteur fort *pR* du phage λ (en rouge) au sein d'un système d'expression thermocontrôlé sous la dépendance de l'activité du répresseur thermolabile (*cI₈₅₇*). Les gènes/opérons sont représentés par des flèches colorées pointant dans la direction de leur transcription. Il est à noter que le gène *Cm^R* de pT-rbcLS_Sco7942 est tronqué, les cellules portant ce plasmide sont donc sensibles au chloramphénicol *Cm^S*, tandis que le gène *Sp^R/Sm^R* (en rose) est flanqué du double terminateur (TT, en orange). Le marqueur de poids moléculaire (M) = 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

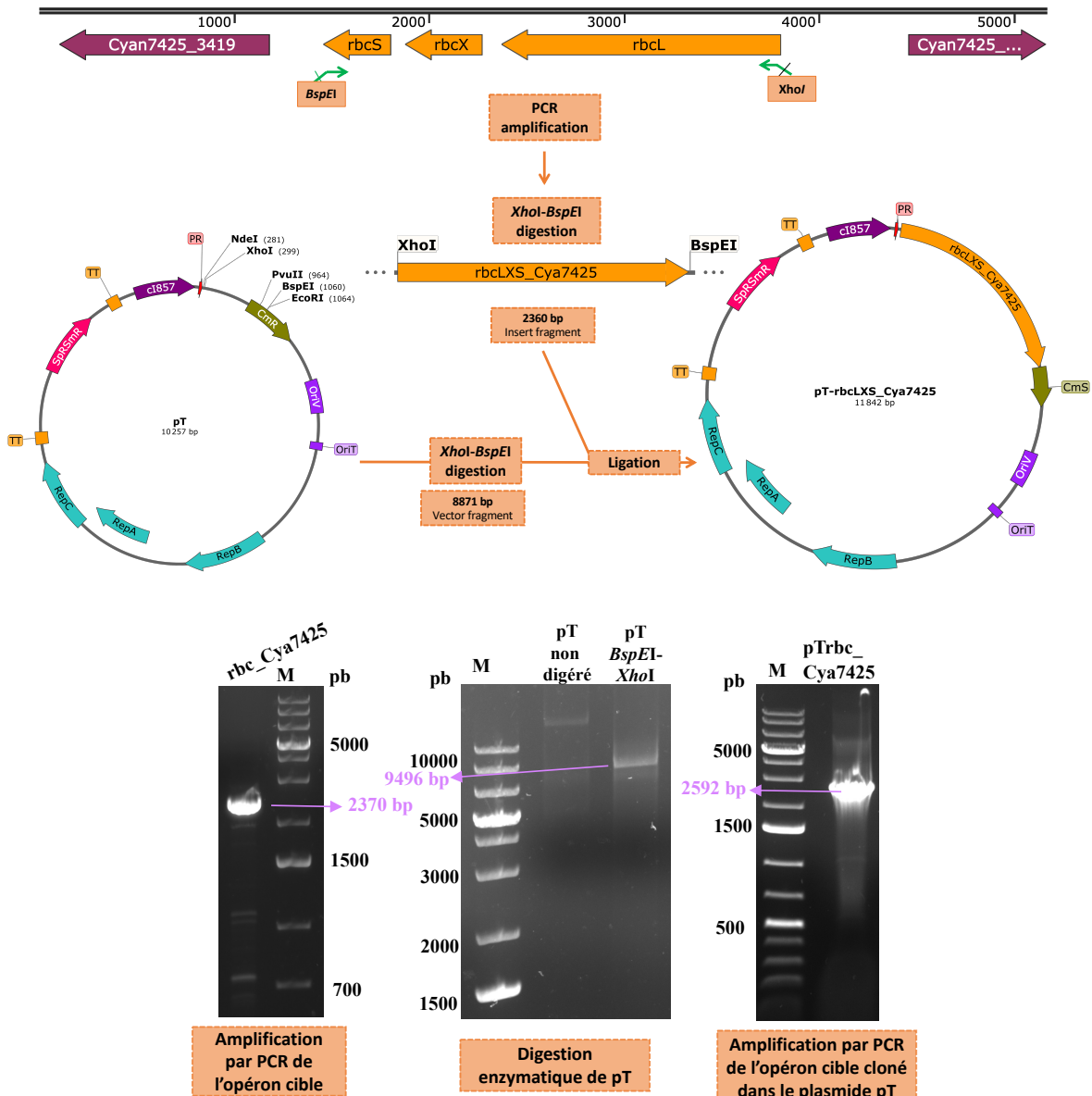


Figure 54. Construction du plasmide pT-rbcLXS_Cya7425 pour l'expression thermorégulée de l'opéron (*rbcLXS_Cya7425*) codant pour la RuBisCO de *Cyanothece* sp. PCC 7425.

La séquence de l'opéron *rbcLXS_Cya7425* (en orange) a été amplifiée par PCR à partir du génome de *Cyanothece* sp. PCC 7425 et des amorces (*rbcLXS-C7425_Fw*, *rbcLXS-C7425_Rv*) flanquées des sites de restriction *XhoI* en amont et *BspEI* en aval des fragments synthétisés (voir gel correspondant montrant l'amplification par PCR de l'opéron cible). Les fragments amplifiés contenant l'opéron *rbcLXS_Cya7425* ont ensuite été digérés par les enzymes *XhoI* et *BspEI* et clonés dans le pT (lui-même également linéarisé au niveau des sites de restrictions *XhoI* et *BspEI*, voir gel du milieu montrant la digestion enzymatique), et générant par ligation, le plasmide pT-rbcLXS_Cya7425. L'amplification par PCR colonies d'*E. coli* du gène cible cloné dans le pT est montré par le gel de droite avec les amorces pFC1_Pra1 et pFC1_ReR1, s'appuyant respectivement en amont du *pR* et au niveau de l'ORF tronquée *Cm^S*. L'opéron *rbcLXS_Cya7425* est exprimé à partir du promoteur fort *pR* du phage λ (en rouge) au sein d'un système d'expression thermocontrôlé sous la dépendance de l'activité du répresseur thermolabile (*cI857*). Les gènes/opérons sont représentés par des flèches colorées pointant dans la direction de leur transcription. Il est à noter que le gène *Cm^R* de pT-rbcLXS_Cya7425 est tronqué, les cellules portant ce plasmide sont donc sensibles au chloramphénicol *Cm^S*, tandis que le gène *Sp^R/Sm^R* (en rose) est flanqué du double terminateur (TT, en orange). Le marqueur de poids moléculaire (M) = 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

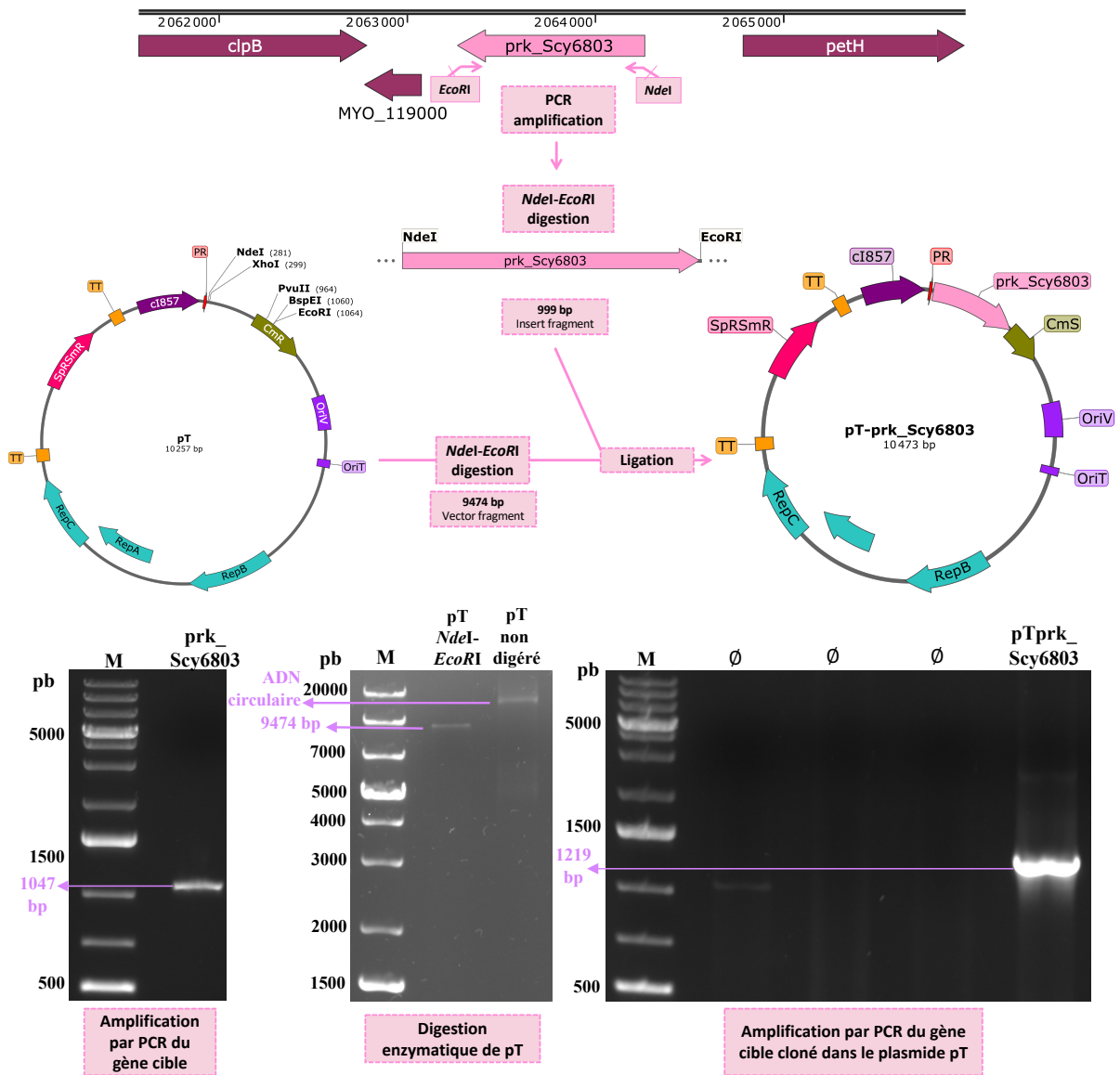


Figure 55. Construction du plasmide pT-prk_Scy6803 pour l'expression thermorégulée du gène (*prk*) codant pour la PRK de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

La séquence du gène *prk_Scy6803* (en rose) a été amplifiée par PCR à partir du génome de *Synechocystis* sp. PCC 6803 et des amorces (*prk*-S6803_Fw, *prk*-S6803_Rv) flanquées des sites de restriction *NdeI* en amont et *EcoRI* en aval des fragments synthétisés (voir gel correspondant montrant l'amplification par PCR du gène cible). Les fragments amplifiés contenant le gène *prk_Scy6803* ont ensuite été digérés par les enzymes *NdeI* et *EcoRI* et clonés dans le pT (lui-même également linéarisé au niveau des sites de restrictions *NdeI* et *EcoRI*, voir gel du milieu montrant la digestion enzymatique), et générant par ligation, le plasmide pT-*prk_Scy6803*. L'amplification par PCR colonies d'*E. coli* du gène cible cloné dans le pT est montré par le gel de droite avec les amorces pFC1_Pra1 et pFC1_ReR1, s'appuyant respectivement en amont du *pR* et au niveau de l'ORF tronquée *Cm^S*. Le gène *prk_Scy6803* est exprimé à partir du puissant promoteur *pR* du phage λ (en rouge) au sein d'un système d'expression thermocontrôlé sous la dépendance de l'activité du répresseur thermolabile (*cl857*). Les gènes/opérons sont représentés par des flèches colorées pointant dans la direction de leur transcription. Il est à noter que le gène *Cm^R* de pT-*prk_Scy6803* est tronqué, les cellules portant ce plasmide sont donc sensibles au chloramphénicol *Cm^S*, tandis que le gène *Sp^R/Sm^R* (en rose) est flanqué du double terminateur (TT, en orange). Le marqueur de poids moléculaire (M) = 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

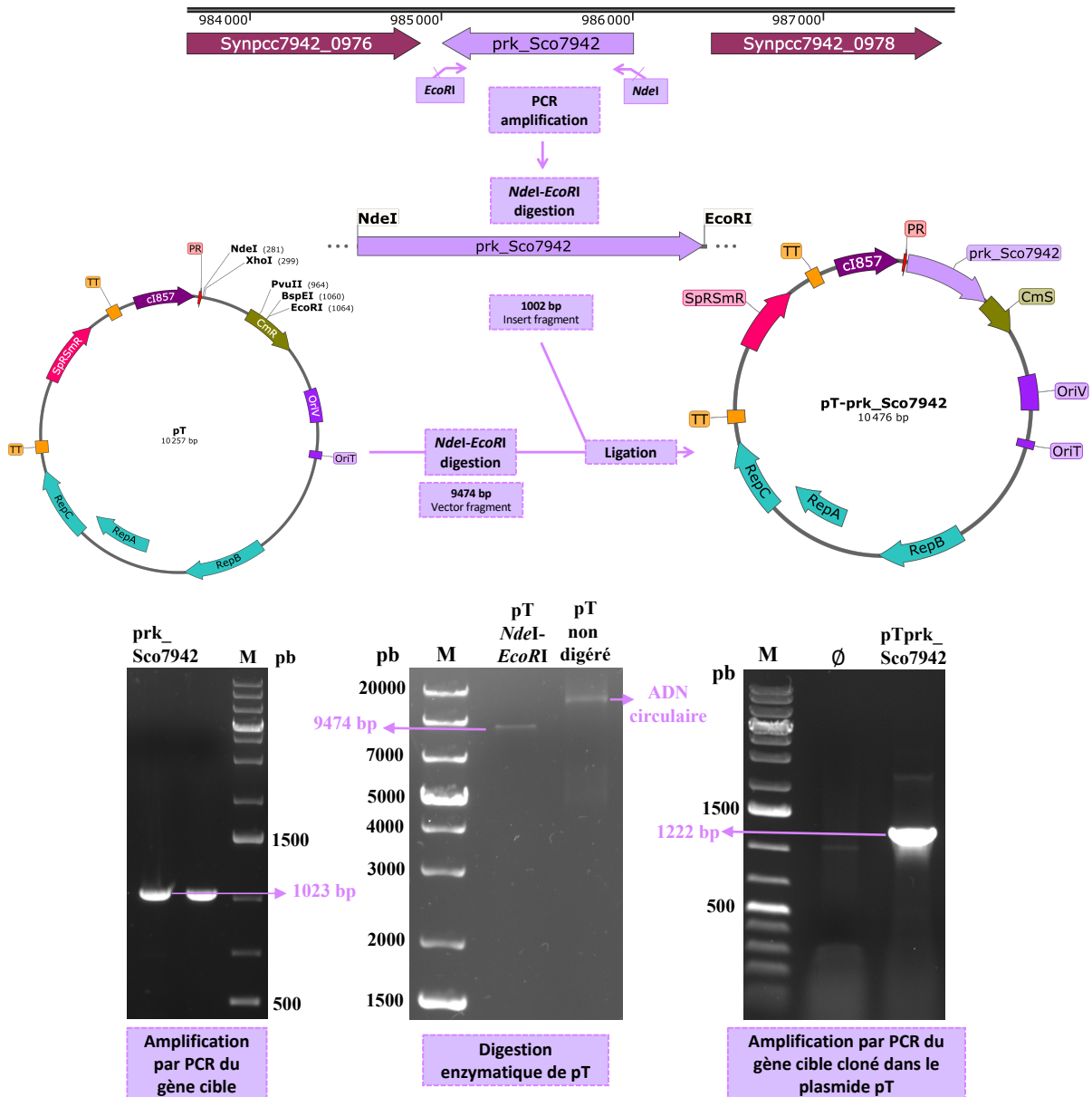


Figure 56. Construction du plasmide pT-prk_Sco7942 pour l'expression thermorégulée du gène (*prk*) codant pour la PRK de *Synechococcus* sp. PCC 7942.

La séquence du gène *prk_Sco7942* (en violet) a été amplifiée par PCR à partir du génome de *Synechococcus* sp. PCC 7942 et des amorces (*prk*-S7942_Fw, *prk*-S7942_Rv) flanquées des sites de restriction *Nde*I en amont et *Eco*RI en aval des fragments synthétisés (voir gel correspondant montrant l'amplification par PCR du gène cible). Les fragments amplifiés contenant le gène *prk_Sco7942* ont ensuite été digérés par les enzymes *Nde*I et *Eco*RI et clonés au sein du vecteur pT (lui-même également linéarisé au niveau des sites de restrictions *Nde*I et *Eco*RI, voir gel du milieu montrant la digestion enzymatique), et générant par ligation, le plasmide pT-prk_Sco7942. L'amplification par PCR colonies d'*E. coli* du gène cible cloné dans le pT est montré par le gel de droite avec les amorces pFC1_Pra1 et pFC1_ReR1, s'appuyant respectivement en amont du *pR* et au niveau de l'ORF tronquée *Cm*^S. Le gène *prk_Sco7942* est exprimé à partir du promoteur fort *pR* du phage λ (en rouge) au sein d'un système d'expression thermocontrôlé sous la dépendance de l'activité du répresseur thermolabile (*ci*₈₅₇). Les gènes/opérons sont représentés par des flèches colorées pointant dans la direction de leur transcription. Il est à noter que le gène *Cm*^R de pT-prk_Sco7942 est tronqué, les cellules portant ce plasmide sont donc sensibles au chloramphénicol *Cm*^S, tandis que le gène *Sp*^R/*Sm*^R (en rose) est flanqué du double terminateur (TT, en orange). Le marqueur de poids moléculaire (M) = 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

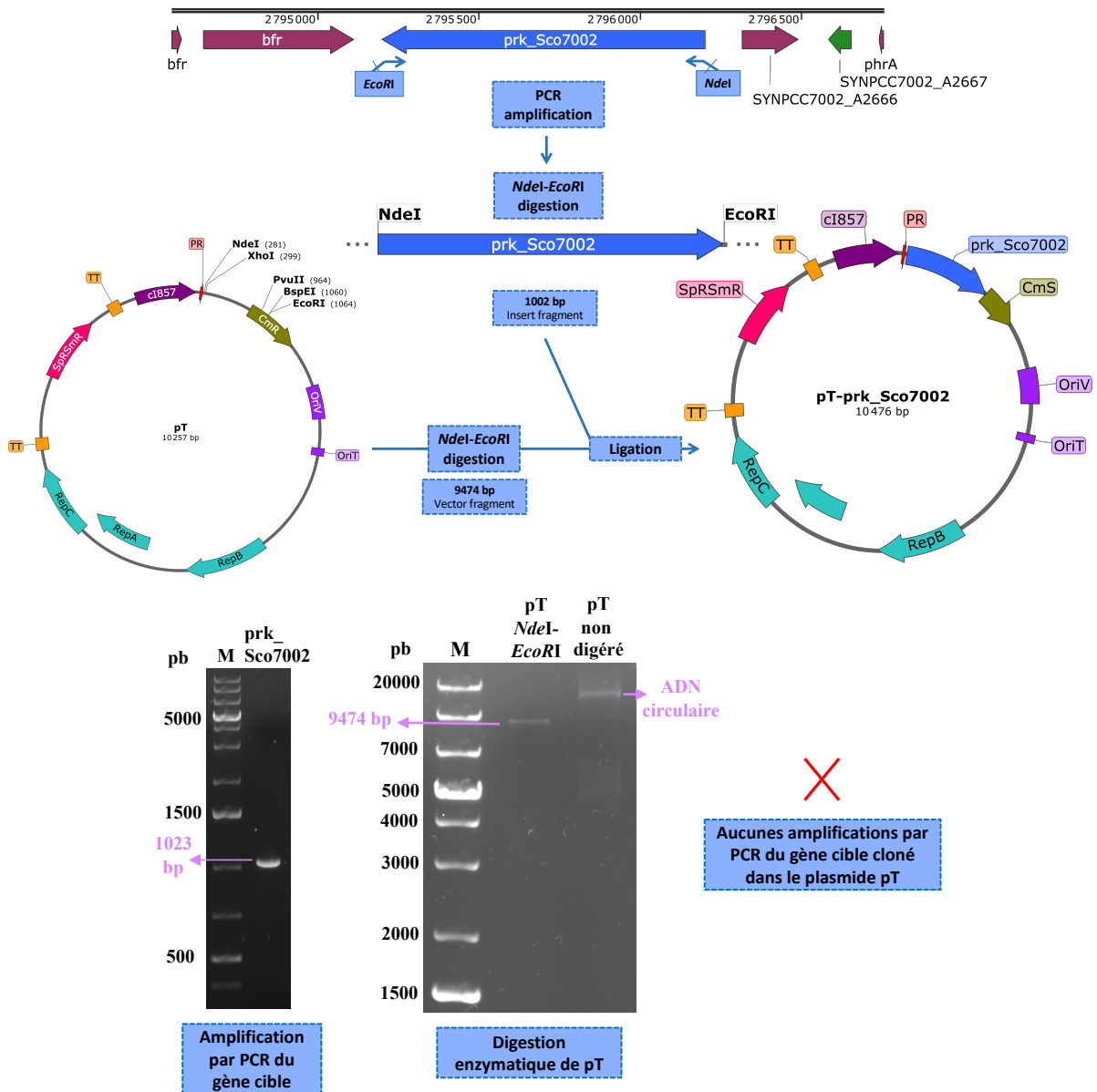


Figure 57. Construction du plasmide pT-prk_Sco7002 pour l'expression thermorégulée du gène (*prk*) codant pour la PRK de *Synechococcus* sp. PCC 7002.

La séquence du gène *prk_Sco7002* (en bleu) a été amplifiée par PCR à partir du génome de *Synechococcus* sp. PCC 7002 et des amorces (*prk*-S7002_Fw, *prk*-S7002_Rv) flanquées des sites de restriction *NdeI* en amont et *EcoRI* en aval des fragments synthétisés (voir gel correspondant montrant l'amplification par PCR du gène cible). Les fragments amplifiés contenant le gène *prk_Sco7002* ont ensuite été digérés par les enzymes *NdeI* et *EcoRI* et clonés dans le pT (lui-même linéarisé au niveau des sites de restrictions *NdeI* et *EcoRI*) (voir gel du milieu), et générant par ligation, le plasmide pT-prk_Sco7002. Néanmoins, après de nombreux screenings, **aucunes amplifications par PCR colonies d'*E. coli* du gène cible cloné dans le pT n'ont pu être obtenues**. Les gènes/opérons sont représentés par des flèches colorées pointant dans la direction de leur transcription. Il est à noter que le gène Cm^R de pT-prk_Sco7002 est tronqué, les cellules portant ce plasmide sont donc sensibles au chloramphénicol Cm^S , tandis que le gène Sp^R/Sm^R (en rose) est flanqué du double terminateur (TT, en orange). Le marqueur de poids moléculaire (M) = 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Pour la surexpression du gène codant pour la PRK de *Synechococcus* sp. PCC 7002, le clonage a été réalisé au sein du plasmide pT et malgré de nombreux screening, aucuns transformants au sein du châssis *E. coli* n'a montré détenir le gène *prk_Sco7002* (Figure 57.). Il est possible qu'il y ait une légère fuite d'expression au niveau du système d'expression pT à 30°C qui engendrerait une toxicité de la protéine au niveau du châssis *E. coli*. Une des perspectives serait d'utiliser d'autres souches *E.coli* réceptrices spécifiques pour le clonage et la production de protéines toxiques (voir annexe 14. Pour les alignements des séquences des 4 versions de gènes PRK et biais de codons).

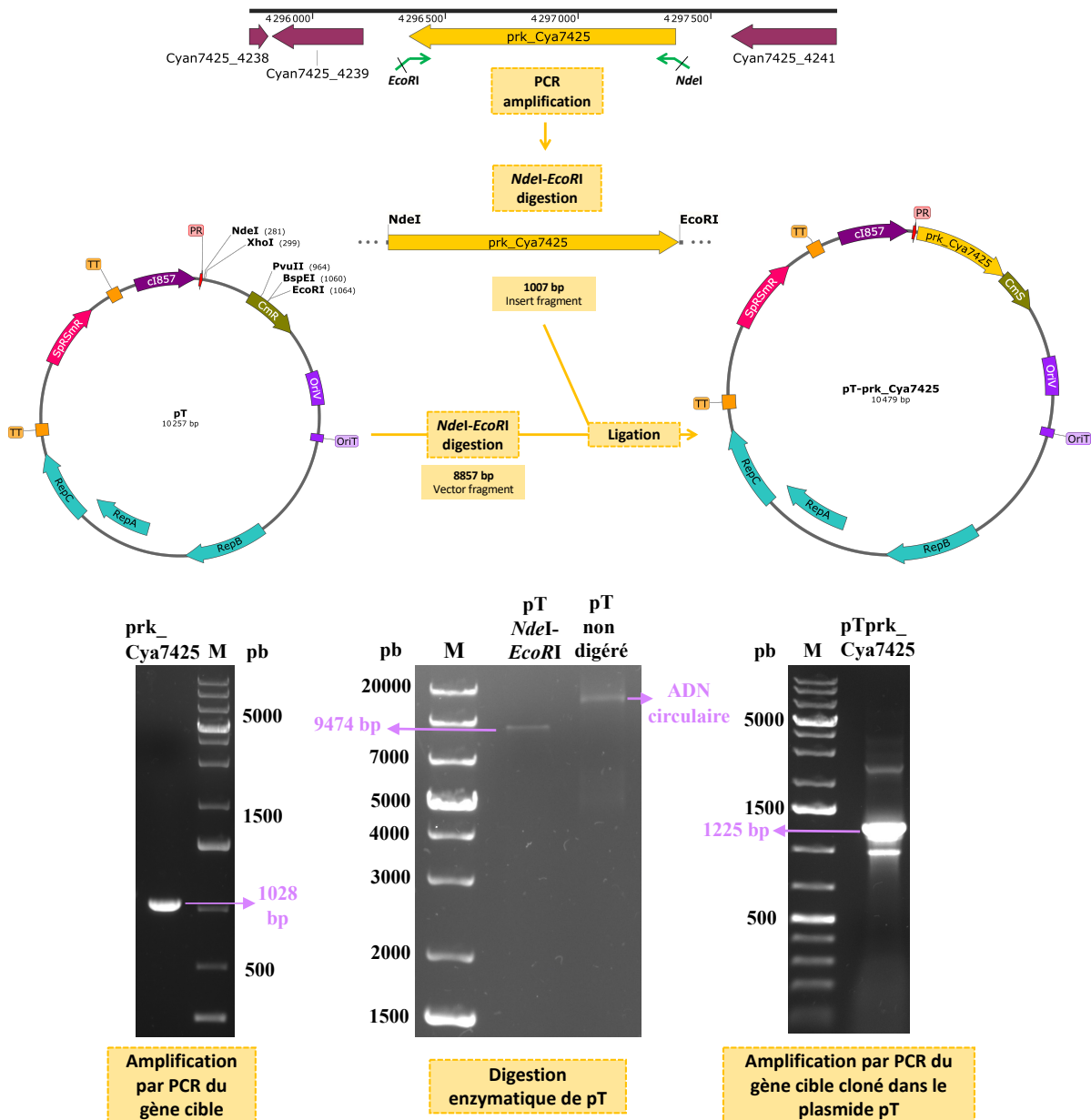


Figure 58. Construction du plasmide pT-prk_Cya7425 pour l'expression thermorégulée du gène (*prk*) codant pour la PRK de *Cyanotheca* sp. PCC 7425.

La séquence du gène *prk_Cya7425* (en jaune) a été amplifiée par PCR à partir du génome de *Cyanotheca* sp. PCC 7425 et des amorces (*prk-C7425_Fw*, *prk-C7425_Rv*) flanquées des sites de restriction *NdeI* en amont et *EcoRI* en aval des fragments synthétisés (voir gel correspondant montrant l'amplification par PCR du gène cible). Les fragments amplifiés contenant le gène *prk_Cya7425* ont ensuite été digérés par les enzymes *NdeI* et *EcoRI* et clonés dans le pT (lui-même également linéarisé au niveau des sites de restrictions *NdeI* et *EcoRI*, voir gel du milieu montrant la digestion enzymatique), et générant par ligation, le plasmide pT-prk_Cya7425. L'amplification par PCR colonies d'*E. coli* du gène cible cloné dans le pT est montré par le gel de droite avec les amorces pFC1_Pra1 et pFC1_ReR1, s'appuyant respectivement en amont du *pR* et au niveau de l'ORF tronquée *Cm^S*. Le gène *prk_Cya7425* est exprimé à partir du promoteur fort *pR* du phage λ (en rouge) au sein d'un système d'expression thermocontrôlé sous la dépendance de l'activité du répresseur thermolabile (*ci₈₅₇*). Les gènes/opérons sont représentés par des flèches colorées pointant dans la direction de leur transcription. Il est à noter que le gène *Cm^R* de pT-prk_Cya7425 est tronqué, les cellules portant ce plasmide sont donc sensibles au chloramphénicol *Cm^S*, tandis que le gène *Sp^R/Sm^R* (en rose) est flanqué du double terminateur (TT, en orange). Le marqueur de poids moléculaire (M) = 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

B. Stratégie d'introduction des cassettes d'expression au sein de différents châssis cyanobactériens

Ces 7 constructions 'pT' permettant la surexpression des gènes codants pour les enzymes RuBisCO de 4 versions différentes : *rbc_Scy6803* de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Figure 51.), *rbc_Sco7942* de *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Figure 53.), *rbc_Sco7002* de *Synechococcus* sp. PCC 7002 (Figure 52.) et *rbc_Cya7425* de *Cyanothece* sp. PCC 7425 (Figure 54.) ou de PRK de 3 versions différentes *prk_Scy6803* de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Figure 55.), *prk_Sco7942* de *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Figure 56.) et *prk_Cya7425* de *Cyanothece* sp. PCC 7425 (Figure 57.) ont ensuite été introduites par conjugaison (voir matériel et méthode pour plus de détails) au sein des châssis *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Synechococcus* sp. PCC 7942 et *Synechococcus* sp. PCC 7002. Les conjuguants résistants à la streptomycine et spectinomycine ont été sélectionnés, puis une vérification par PCR des colonies a été réalisée pour détecter la présence du gène ou opéron cible cloné au sein du pT. Enfin, une vérification est réalisée par séquençage d'ADN pour vérifier les séquences promotrices *pR* et des *ORF* cibles.

1) Introduction de chaque plasmide pT par conjugaison au sein du châssis *Synechocystis* sp. PCC 6803

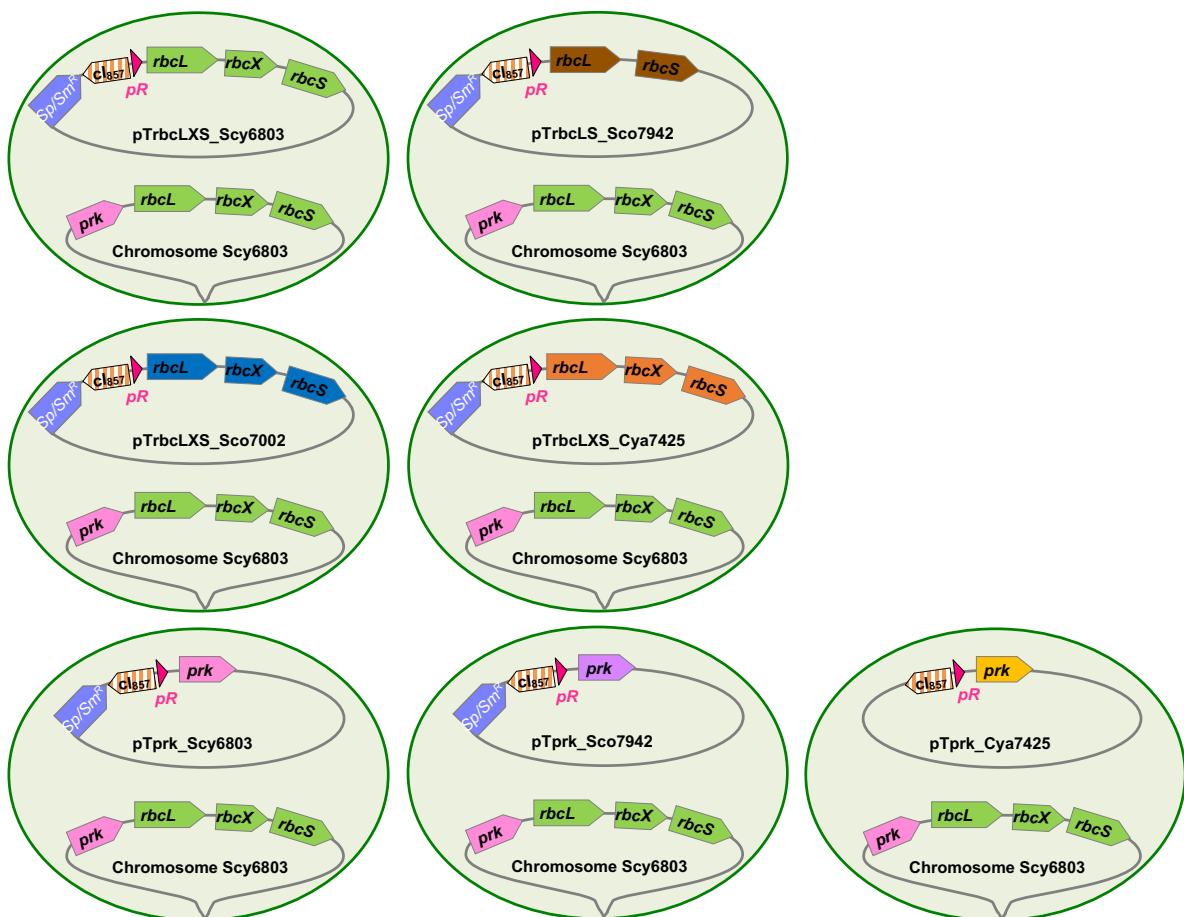


Figure 59. Composition génomique des 7 souches de *Synechocystis* sp. PCC 6803 portant un dérivé du 'pT' permettant l'expression contrôlée par la température des gènes codants pour une des diverses RuBisCO ou PRK.

Dans les différents schémas, la présence sur le chromosome, de l'opéron natif *rbcLXS_Scy6803* (en vert) ainsi que du gène natif *prk_Scy6803* (en rose) est indiquée. Un plasmide dérivé du pT a été introduit par conjugaison, permettant soit une surexpression de l'opéron natif *rbcLXS_Scy6803* (en vert) ou du gène natif *prk_Scy6803* (en rose), ou bien l'expression d'un des opérons hétérologues *rbcLS_Sco7942* (en marron), ou *rbcLXS_Sco7002* (en bleu), ou *rbcLXS_Cya7425* (en orange), ou des gènes hétérologues *prk_Sco7942* (en violet) ou *prk_Cya7425* (en jaune).

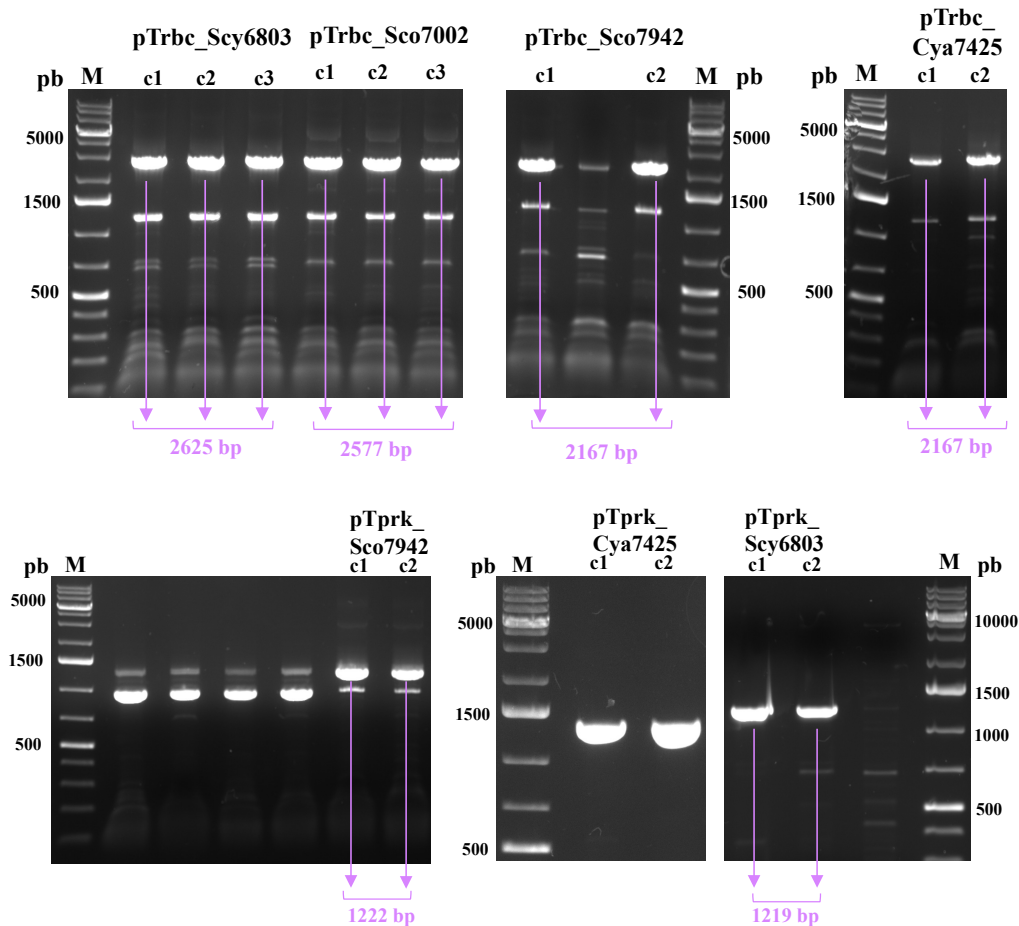


Figure 60. Vérification de l'introduction des différents plasmides permettant l'expression soit des gènes *prk* ou opérons *rbc* chez *Synechocystis sp. PCC 6803*

Les 7 constructions pTrbc_Scy6803, pTrbc_Sco7942, pTrbc_Sco7002, pTrbc_Cya7425, pTprk_Scy6803, pTprk_Sco7942 et pTprk_Cya7425 ont été vérifiées par PCR des colonies obtenues après conjugaison, avec les amorces pFC1_pra1 et pFC1_rer1 (position de part et d'autre de la cassette d'expression). Le marqueur de poids moléculaire (M) = 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

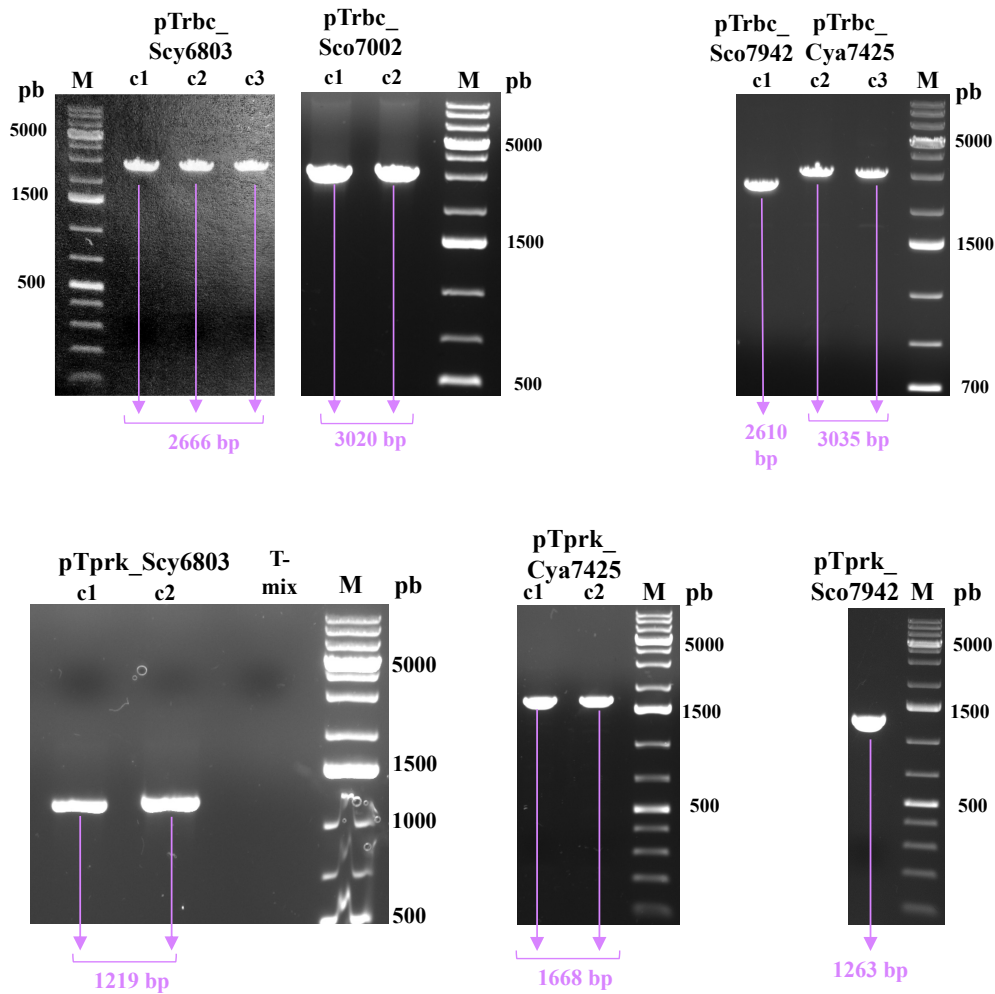


Figure 62. Vérification de l'introduction des différents plasmides permettant l'expression soit des gènes *prk* ou opérons *rbc* chez *Synechococcus* sp. PCC 7942

Les 7 constructions pTrbc_Scy6803, pTrbc_Sco7942, pTrbc_Sco7002, pTrbc_Cya7425, pTprk_Scy6803, pTprk_Sco7942 et pTprk_Cya7425 ont été vérifiées par PCR des colonies obtenues après conjugaison, avec les amorces pFC1_pra1 et pFC1_rer1 (position de part et d'autre de la cassette d'expression). Le marqueur de poids moléculaire (M) = 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

3) Introduction de chaque plasmide pT par conjugaison au sein du châssis *Synechococcus* sp. PCC 7002

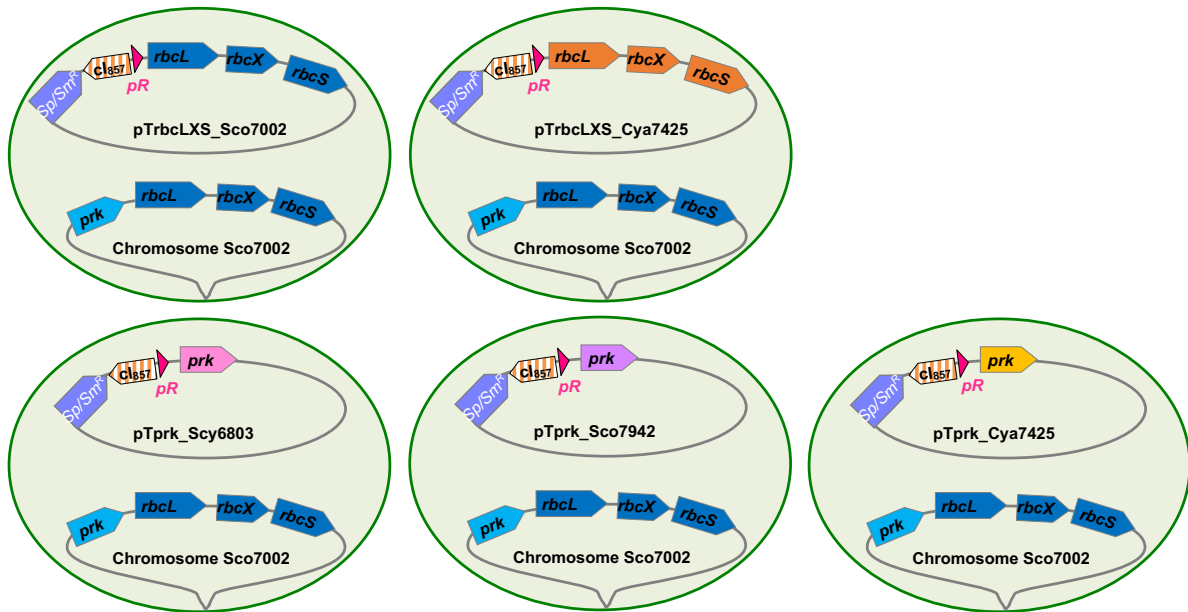


Figure 63. Composition génomique des 5 souches de *Synechococcus* sp. PCC 7002 possédant un des 5 plasmides dérivés du 'pT' permettant l'expression contrôlée par la température des gènes codants pour les RuBisCO ou de PRK native ou hétérologue.

Les différents schémas de la composition génomique présentent pour l'ensemble des 5 châssis de *Synechococcus* sp. PCC 7002 une expression chromosomique de l'opéron natif *rbcLXS_Sco7002* (en bleu foncé) ainsi que du gène natif *prk_Sco7002* (en bleu clair). Un plasmide dérivé du pT a été introduit par conjugaison, permettant soit une surexpression de l'opéron natif *rbcLXS_Sco7002* (en bleu) ou de l'opéron hétérologue *rbcLXS_Cya7425* (en orange), ou bien des gènes hétérologues *prk_Scy6803* (en rose), ou *prk_Sco7942* (en violet), ou *prk_Cya7425* (en jaune).

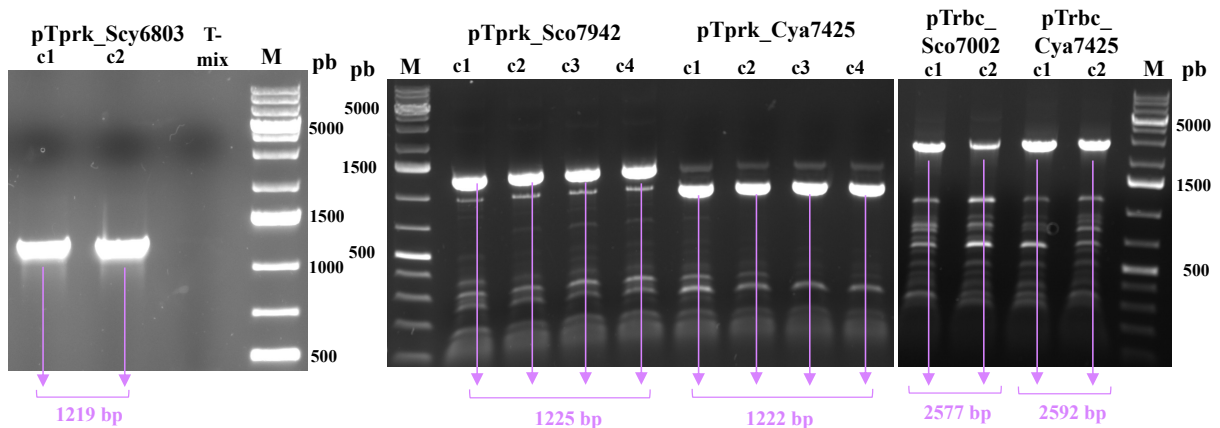


Figure 64. Vérification de l'introduction des différents plasmides permettant l'expression soit des gènes *prk* ou opérons *rbc* chez *Synechococcus* sp. PCC 7002

Les 7 constructions pTrbc_Scy6803, pTrbc_Sco7942, pTrbc_Sco7002, pTrbc_Cya7425, pTprk_Scy6803, pTprk_Sco7942 et pTprk_Cya7425 ont été vérifiées par PCR des colonies obtenues après conjugaison, avec les amorces pFC1_pra1 et pFC1_rer1 (position de part et d'autre de la cassette d'expression). Le marqueur de poids moléculaire (M) = 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

C. Analyses phénotypiques des châssis cyanobactériens dans les conditions de surexpression forte et constitutive du système d'expression thermorégulé pT

1) Analyses phénotypiques des châssis WT *Synechocystis* sp. PCC 6803 et *Synechococcus* sp. PCC 7942

La croissance des souches WT *Synechocystis* sp. PCC 6803 et *Synechococcus* sp. PCC 7942 ont pu être comparés en photoautotrophie à 2500 lux ($\approx 35 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) à 30°C ou 39°C (Figure 65.). Le CO₂ dissous sous forme de gaz dans l'eau dépend de la pression et de la température selon la loi Henry, et il est démontré qu'à 39°C le CO₂ est 30% moins soluble dans le milieu de culture qu'à 30°C.

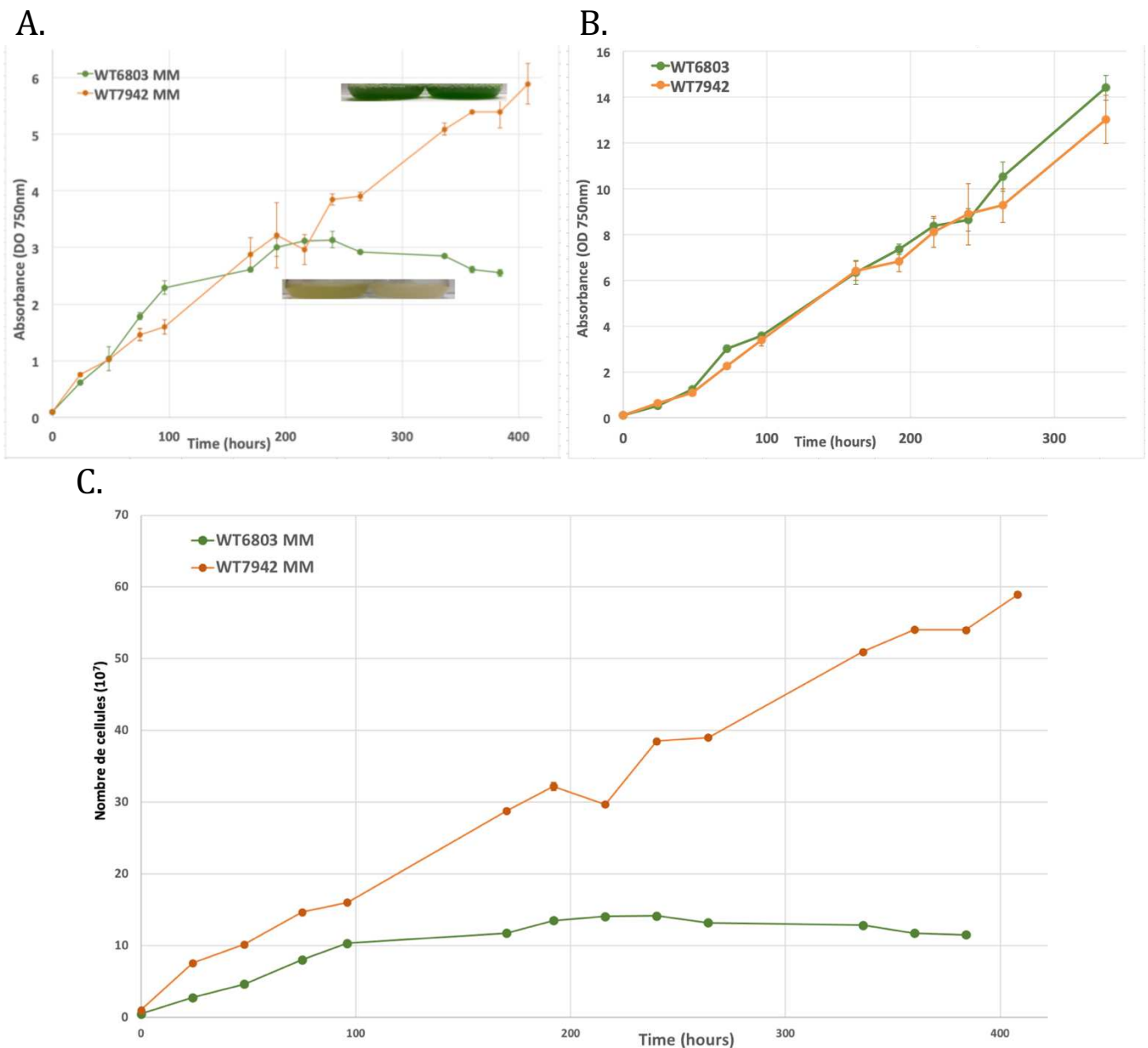
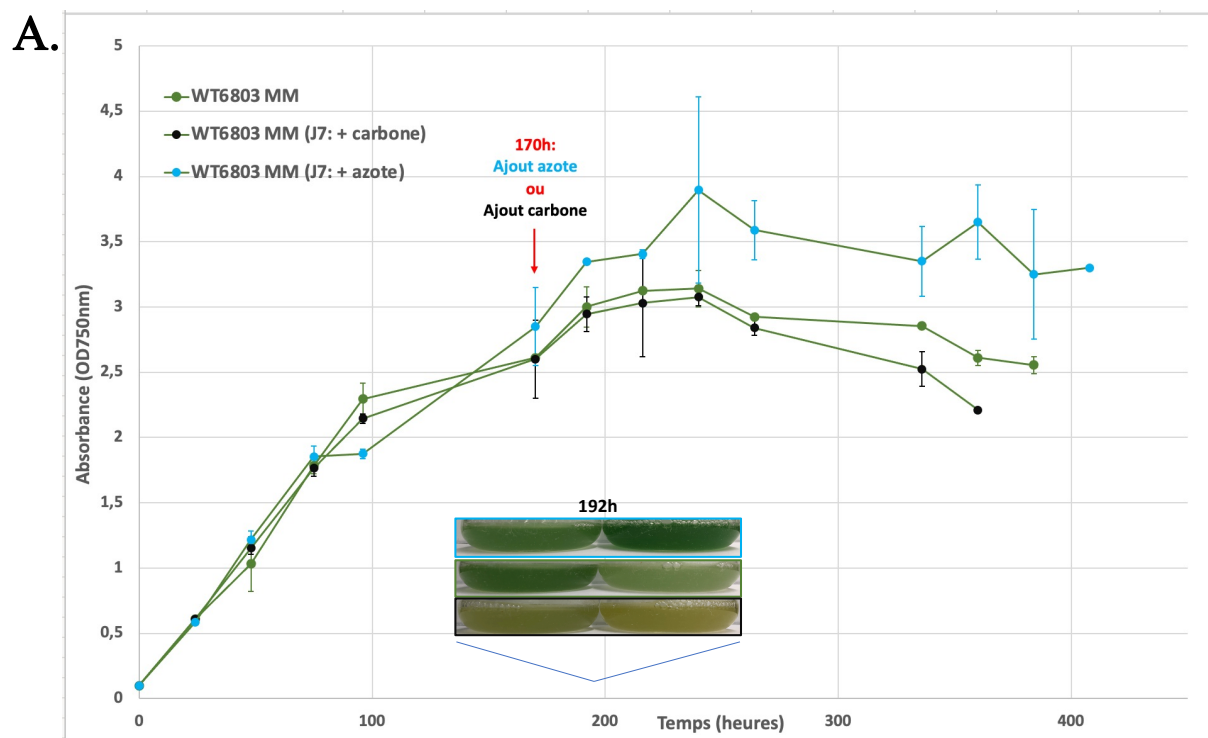


Figure 65. Comparaison de croissance entre les souches *Synechocystis* sp. PCC 6803 et *Synechococcus* sp. PCC 7942 en milieu minéral MM A. à 39°C ou B. à 30°C C. à 39°C par nombre de cellules

La souche WT *Synechococcus* sp. PCC 7942 tolère bien mieux une croissance à 39°C en milieu minéral MM (voir Matériel et Méthodes pour la composition du milieu) que la souche WT *Synechocystis* sp. PCC 6803 qui, au bout d'environ 7 jours, rentre en phase stationnaire (Figure 65. A.) tandis que la densité optique (DO_{750nm}) à 39°C, est de plus du double pour *Synechococcus* sp. PCC 7942. En rapportant cette donnée au nombre de cellules par unité de DO à 750nm (DO_{750nm}=1) on obtient 1.10⁸ cellules pour *Synechococcus* sp. PCC 7942 et 4,5.10⁷ cellules pour *Synechocystis* sp. PCC 6803, c'est-à-dire que la biomasse finale relevée est environ **4 fois** plus importante pour *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Figure 65. C.). A 30°C en MM, en revanche il n'y pas de différences de croissance entre les 2 souches (Figure 64. B.).

Les effets de la supplémentation en azote (NaNO₃) ou en carbone (Na₂CO₃) après 7 jours de culture en MM à 39°C ont ensuite été analysés chez les souches WT, *Synechocystis* sp. PCC 6803 et *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Figure 66.).



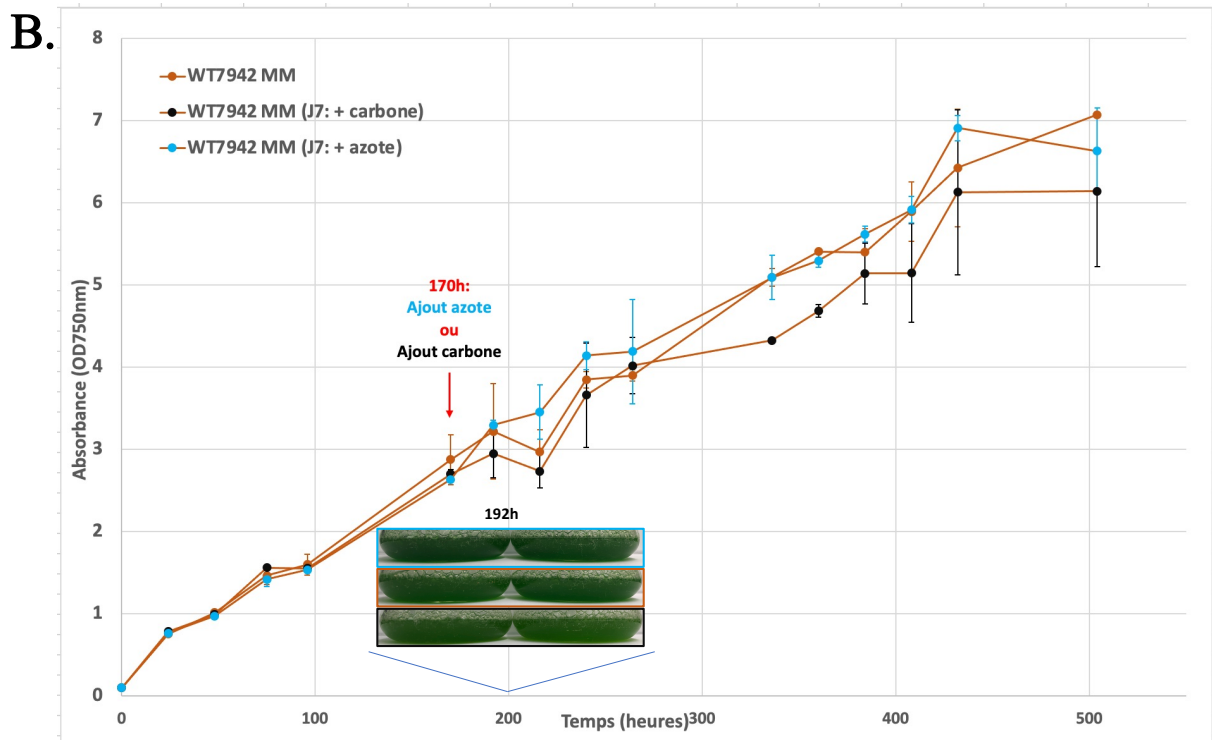


Figure 66. Courbes de croissance des souches WT *Synechocystis* sp. PCC 6803 et *Synechococcus* sp. PCC 7942 à 39°C, 2500 lux ($\approx 35 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) en MM avec ou sans ajout de carbone (Na_2CO_3) ou azote ($NaNO_3$) 7 jours après le début de la culture.

(A.) Courbes de croissance de la souche *Synechocystis* sp. PCC 6803 (B.) Courbes de croissance de la souche *Synechococcus* sp. PCC 7942. Les photos encadrées correspondent à la couleur des cultures après une supplémentation à J7 de $NaNO_3$ (en bleu), de Na_2CO_3 (en noir) et sans supplémentation (en vert).

Pour *Synechocystis* sp. PCC 6803, la concentration en azote ($NaNO_3$) du MM semble limitante et l'ajout de $NaNO_3$ à 7 jours ralentit l'entrée en phase stationnaire et permet :

- la poursuite de la phase exponentielle
- une plus grande accumulation de biomasse finale : environ +25% par rapport aux autres cultures en phase stationnaire,
- une prolongation du temps de culture avant mort cellulaire :
 - +24h (+5%) par rapport à la culture sans ajout de Ci
 - +48h (+10%) par rapport à la culture avec ajout de Ci

Pour *Synechococcus* sp. PCC 7942 en revanche, l'addition de $NaNO_3$ n'a pas d'effet sur la croissance.

Pour les 2 souches, la concentration de carbone inorganique (Na_2CO_3) dans notre milieu de culture (MM), ne semble pas limitante. En effet, l'addition de Na_2CO_3 est même délétère en fin de culture chez *Synechocystis* sp. PCC 6803 et *Synechococcus* sp. PCC 7942.

Une des hypothèses est qu'un des facteurs limitant la croissance des souches soit la capacité à assimiler le CO_2 par le CCB et qu'une augmentation de la quantité de RuBisCO, de son activité ou de son substrat pourrait améliorer la production de biomasse. De la même manière, des versions de protéines du CCB hétérologues au châssis pourraient avoir un impact positif sur la fixation de CO_2 vu que toutes les cyanobactéries n'ont pas les mêmes régulations du ratio C/N (Veaudor *et al.*, 2018).

2) Analyses phénotypiques des châssis mutants et contrôles (pT) *Synechocystis* sp. PCC 6803 et *Synechococcus* sp. PCC 7942

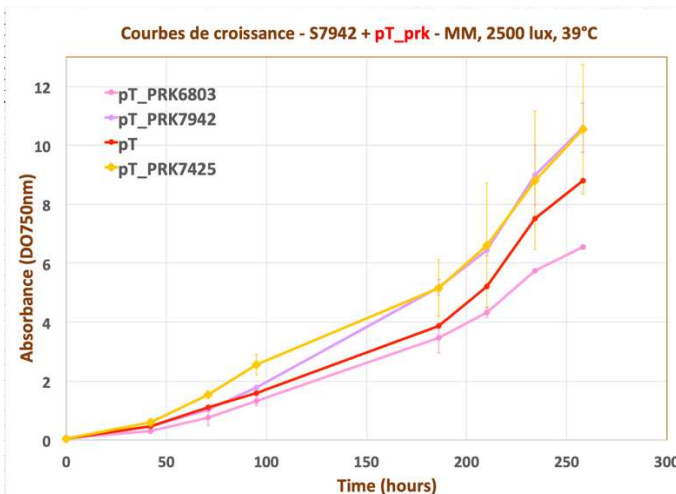
La comparaison de croissance des différentes souches mutantes *Synechocystis* sp. PCC 6803 ou *Synechococcus* sp. PCC 7942 surexprimant diverses versions du gène *prk* ou de l'opéron *rbc* a été réalisée dans des conditions de culture à 2500 lux, 39°C (pour une expression totale des gènes en aval du *pR*), en milieu standard (MM), en MM supplémenté en carbone inorganique sous la forme de carbonate de sodium Na_2CO_3 à 0,6 g/L (MM+Ci) et en MM sans carbone inorganique (MM+Ci) uniquement atmosphérique (CO_2).

Il est montré que lorsque les β -cyanobactéries (dont font partie les châssis cyanobactériens modèles utilisés) sont exposées à une limitation en Ci : c'est le cas à 39°C où la solubilité du carbone inorganique est bien moindre (-30%) par rapport à une température standard de culture à 30°C, elles ont la capacité d'exprimer un niveau accru d'activité CCM qui s'accompagne d'une augmentation de l'activité de la RuBisCO, d'une augmentation du contenu en carboxysome et d'une augmentation des affinités pour les activités d'absorption du CO_2 et du HCO_3^- (Price *et al.*, 1992 ; McKay *et al.*, 1993 ; Kaplan *et al.*, 1994).

Les résultats de croissance observés vont dans ce sens et montrent que la surexpression de diverses versions du gène *prk* ou de l'opéron *rbc* ont un effet positif sur la croissance de *Synechocystis* sp. PCC 6803 ou *Synechococcus* sp. PCC 7942 qui diffère en fonction des conditions de croissance :

Dans les conditions standard de croissance (MM), la surexpression de versions homologues de PRK augmente la production de biomasse dans les souches réceptrices par rapport à la souche contrôle pT, portant uniquement le plasmide sans séquences clonées dans le site multiple de clonage (Figure 67.).

A.



B.

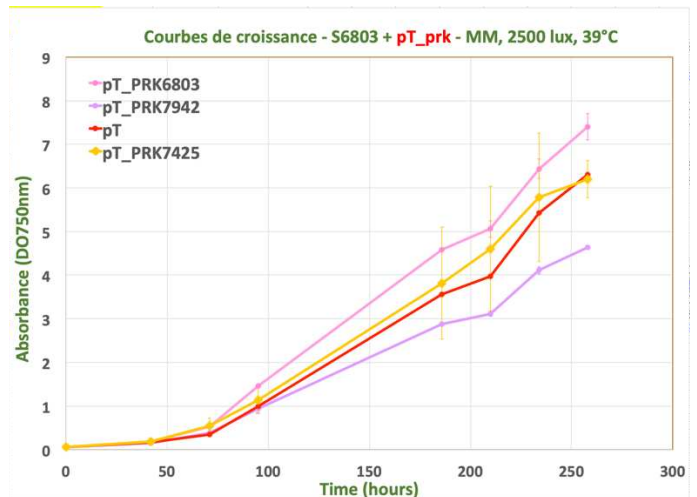
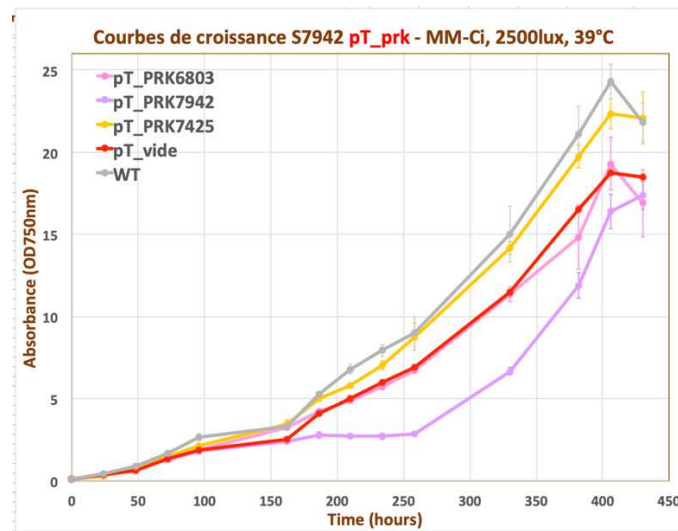


Figure 67. Comparaison de croissance (à 39°C, 2500 lux ($\approx 35 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) en MM) des différentes souches mutantes *Synechococcus* sp. PCC 7942 (A.) ou *Synechocystis* sp. PCC 6803 (B.) surexprimant le gène codant pour différentes versions de PRK.

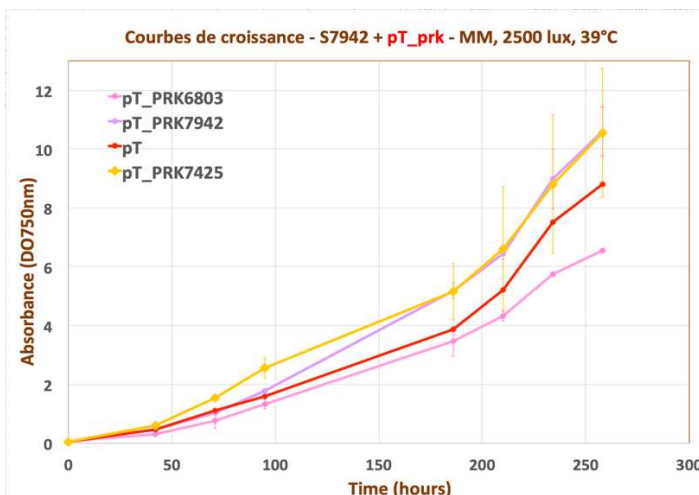
De manière générale la surexpression de *prk_Cya7425* au sein de *Synechococcus* sp. PCC 7942 a un impact positif sur la production de biomasse peu importe les concentrations en carbone inorganique dans le milieu (Figure 68.). Aussi, parmi les versions PRK (*prk_Scy6803*,

prk_Sco7942 et *prk_Cya7425*) nous verrons ultérieurement que seule la version *prk_Cya7425* a pu être clonée dans le vecteur d'expression constitutif pC.

A.



B.



C.

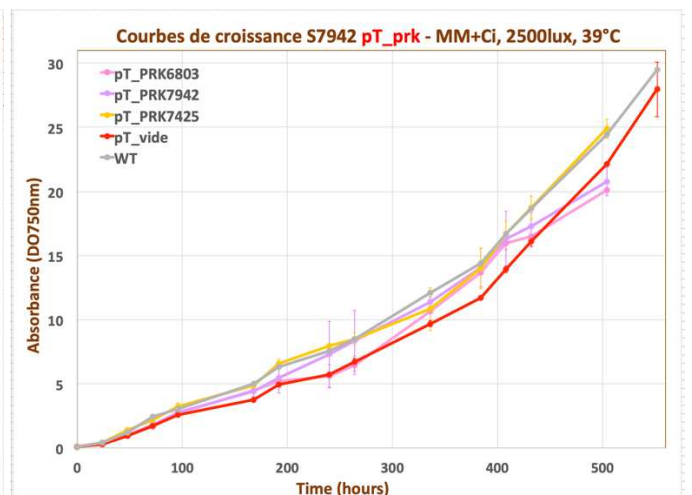
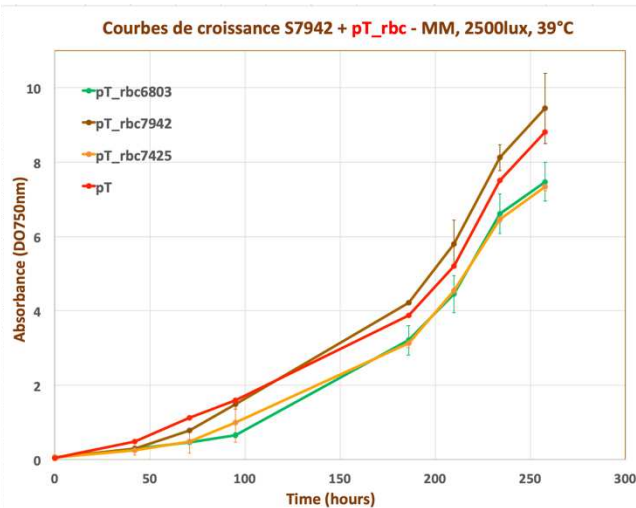


Figure 68. Comparaison de croissance des souches WT *Synechococcus sp. PCC 7942* et mutantes surexprimant le gène codant pour différentes versions de PRK, à 39°C et 2500 lux ($\approx 35 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) (A.) en MM-Ci (B.) en MM et (C.) en MM + Ci.

La surexpression de l'ensemble des versions d'opéron *rbc* (sauf celle de *Cyanotheca sp. PCC 7425 : rbc_Cya7425*) a un impact positif sur la croissance de *Synechocystis sp. PCC 6803*, mais pas de *Synechococcus sp. PCC 7942* (Figure 69.).

A.



B.

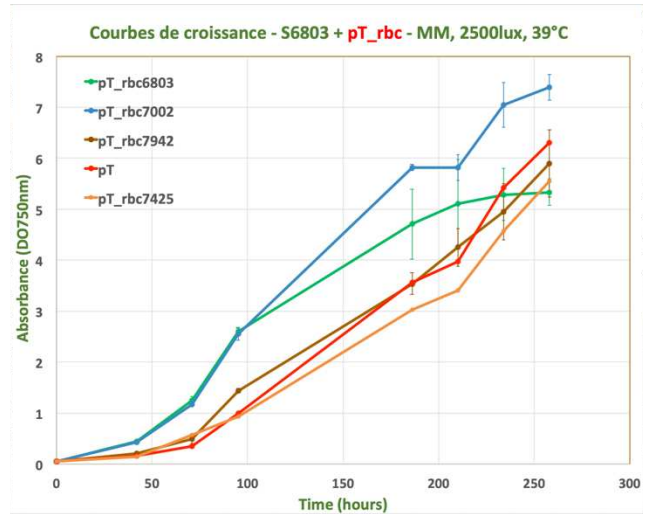
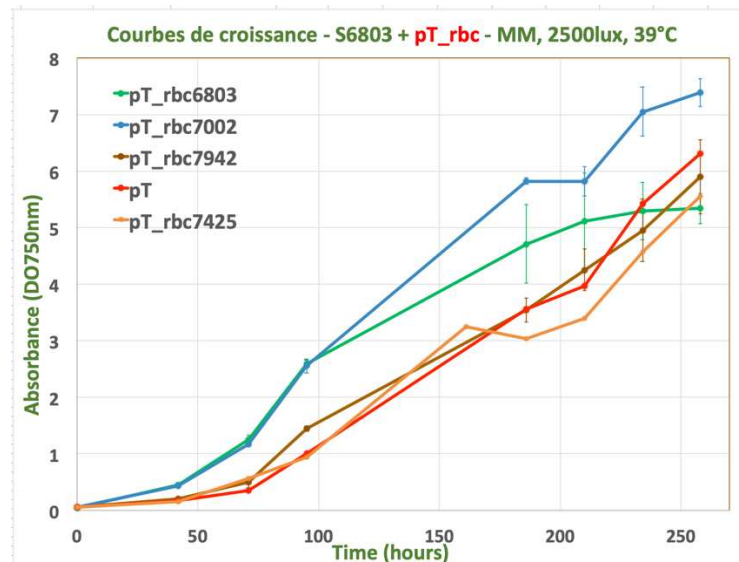


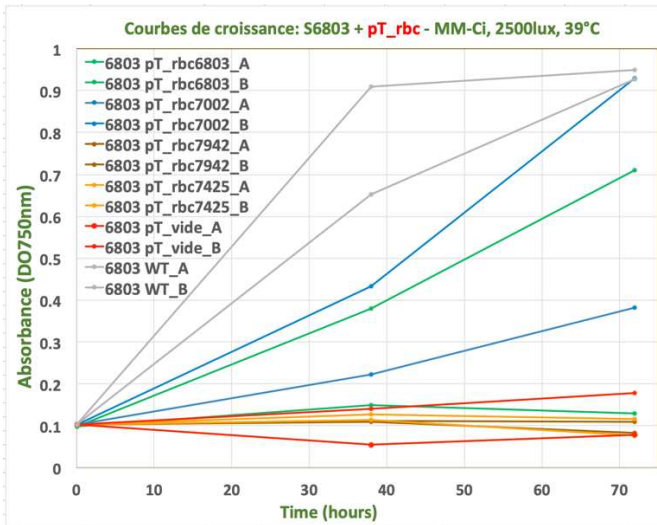
Figure 69. Comparaison de croissance (à 39°C, 2500 lux ($\approx 35 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) en MM) des différentes souches mutantes *Synechococcus* sp. PCC 7942 (A.) ou *Synechocystis* sp. PCC 6803 (B.) surexprimant l'opéron codant pour différentes version de RuBisCO.

Pour *Synechocystis* sp. PCC 6803, la surexpression de l'opéron *rbc_Sco7002* permet une augmentation des taux de croissance et de l'accumulation de biomasse importants par rapport à la souche contrôle **pT**, en conditions MM standard, en MM-Ci et en MM+Ci. L'addition Na_2CO_3 dans le milieu augmente encore plus la croissance des souches surexprimants *rbc_Sco7002* et *rbc_Sco7942* par rapport à la souche contrôle **pT** pour qui la croissance s'arrête 2X plus tôt que pour les autres souches surexprimants divers opérons *rbc* (Figure 70.).

A.



B.



C.

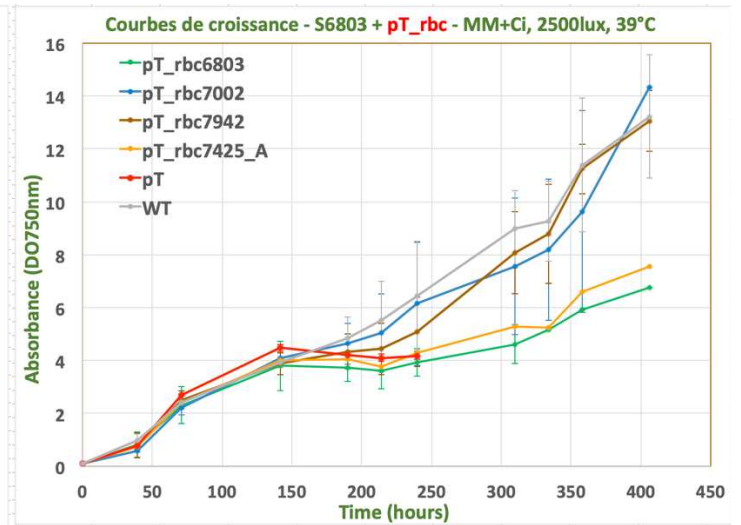


Figure 70. Comparaison de la croissance de différentes souches de *Synechocystis sp. PCC 6803* surexprimant l'opéron codant pour différentes version de RuBisCO et sauvage à 39°C, 2500 lux ($\approx 35 \mu E.m^{-2}.s^{-1}$) en MM (A.), MM-Ci (B.) et MM+Ci (C.).

Pour le châssis *Synechococcus sp. PCC 7002*, les conjuguants pTrbc_Scy6803 et pTrbc_Sco7942 n'ont pas été obtenus et l'analyse phénotypique des souches mutantes n'a donc pas été réalisée, j'ai préféré me concentrer sur les constructions au sein du plasmide pC permettant une expression constitutive (en me servant des constructions pT pour obtenir les constructions « pC » par religation après digestion *PsiI* qui délète une partie du *cI857*) et à l'analyse de leurs phénotypes.

III. Surexpression indépendante de la température via le plasmide répliatif constitutif ‘pC’ chez les souches *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Synechococcus* sp. PCC 7942 et *Synechococcus* sp. PCC 7002.

Pour une expression des gènes d’intérêt forte et constitutive, j’ai utilisé le plasmide pC dans lequel le gène *cl₈₅₇* est tronqué et où le *pR* a donc une activité maximale et constitutive et ceci indépendamment de la température. Ce vecteur peut être utilisé si les gènes à exprimer ne sont pas toxiques pour *E. coli* ou les cyanobactéries.

A. Stratégie de construction des cassettes d’expression

La construction des 5 plasmides ‘pC’ permettant la surexpression des gènes codants pour les enzymes RuBisCO de 4 versions différentes : *rbc_Scy6803* de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Figure 71.), *rbc_Sco7942* de *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Figure 73.), *rbc_Sco7002* de *Synechococcus* sp. PCC 7002 (Figure 72.) et *rbc_Cya7425* de *Cyanothece* sp. PCC 7425 (Figure 74.) ou de PRK d’une seule version : *prk_Cya7425* de *Cyanothece* sp. PCC 7425 (Figure 75.) ont été obtenues. Les plasmides d’expression constitutive « pC » ont été obtenus à partir des plasmides pT après digestion par *PsiI* et religation, générant une ORF *cl₈₅₇* tronquée de 532 pb. Les produits de ligation sont introduits par transformation chez *E. coli*. Des vérifications par PCR colonies et séquençages ont été réalisées afin de s’assurer que le plasmide a bien été tronqué d’une partie du gène *cl₈₅₇* et que les séquences promotrices des gènes/opérons cibles n’ont pas été mutées. Les divers plasmides ont été introduits au sein de différents châssis cyanobactériens par conjugaison.

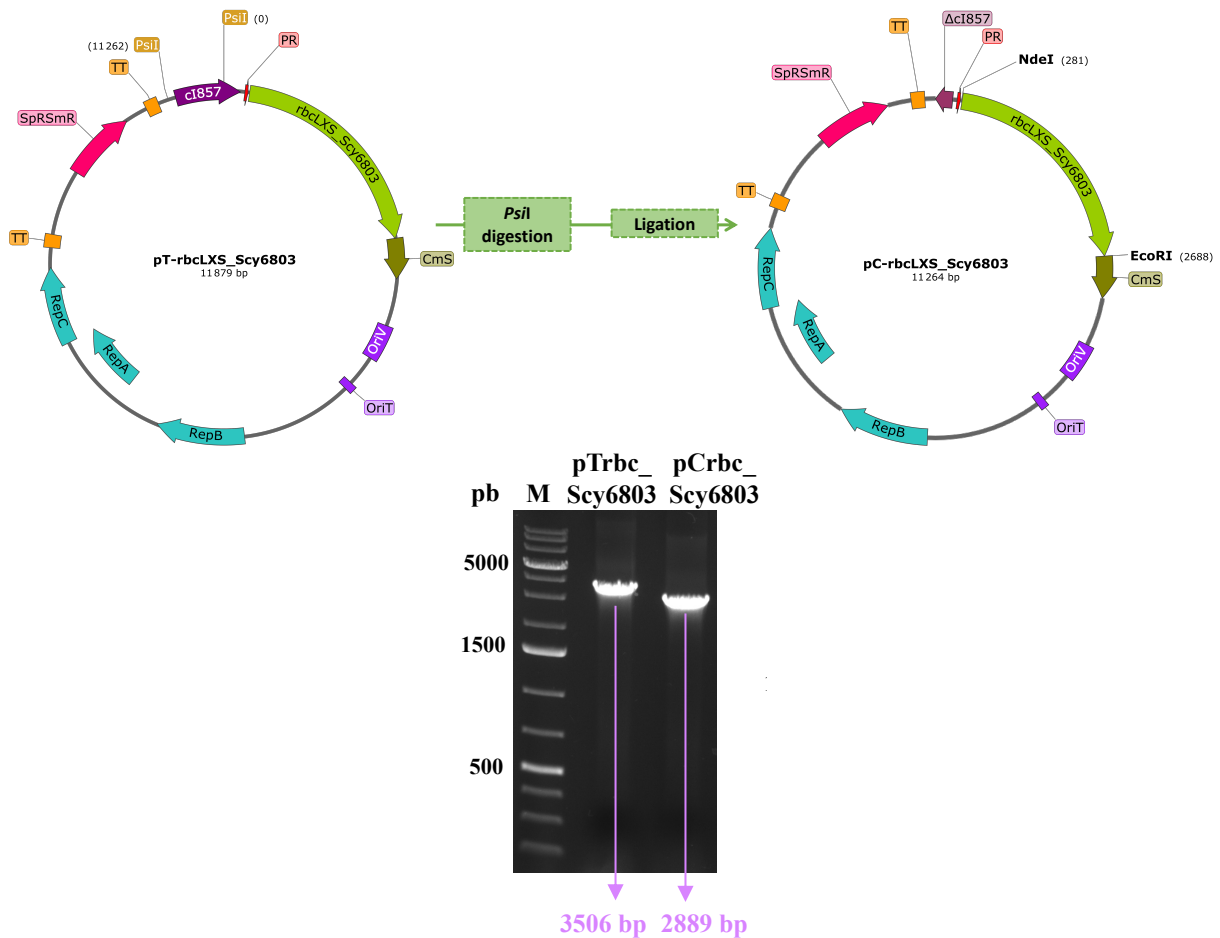


Figure 71. Construction du plasmide pC-rbcLXS_Scy6803 pour l'expression forte et constitutive de l'opéron (*rbcLXS_Scy6803*) codant pour la RuBisCO de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Le plasmide pC-rbcLXS_Scy6803 (à droite) est obtenu à partir du plasmide pT-rbcLXS_Scy6803 (à gauche) par religation après digestion par *Psil* (2 sites de restrictions), générant une ORF *cI857* tronquée de 532 pb. Le gel montre l'amplification par PCR colonies d'*E. coli* de l'opéron cible cloné dans le plasmide pC avec les amorces Ci857_Fw et pFC1_seq_rev, s'appuyant respectivement en amont du gène *cI857* et au niveau de l'ORF tronquée *CMs*. Le marqueur de poids moléculaire (M) = 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

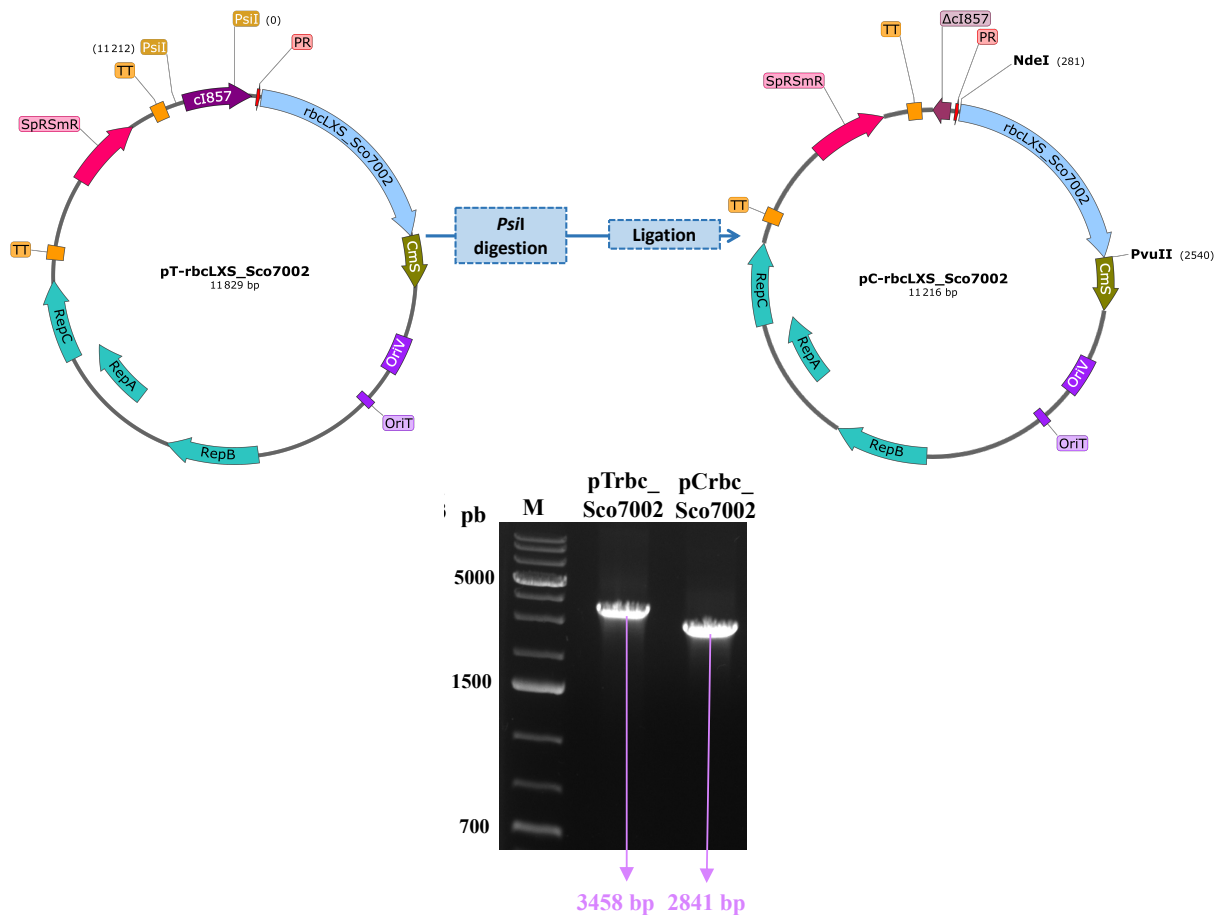


Figure 72. Construction du plasmide *pC-rbcLXS_Sco7002* pour l'expression forte et constitutive de l'opéron (*rbcLXS_Sco7002*) codant pour la RuBisCO de *Synechococcus* sp. PCC 7002.

Le plasmide *pC-rbcLXS_Sco7002* (à droite) est obtenu à partir du plasmide *pT-rbcLXS_Sco7002* (à gauche) par religation après digestion par *PsiI* générant une ORF *ci857* tronquée de 532 pb. Le gel montre l'amplification par PCR colonies d'*E. coli* de l'opéron cible cloné dans le plasmide pC avec les amorces *Ci857_Fw* et *pFC1_seq_rev*, s'appuyant respectivement en amont du gène *ci857* et au niveau de l'ORF tronquée *Cm^S*. Le marqueur de poids moléculaire (M) = 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

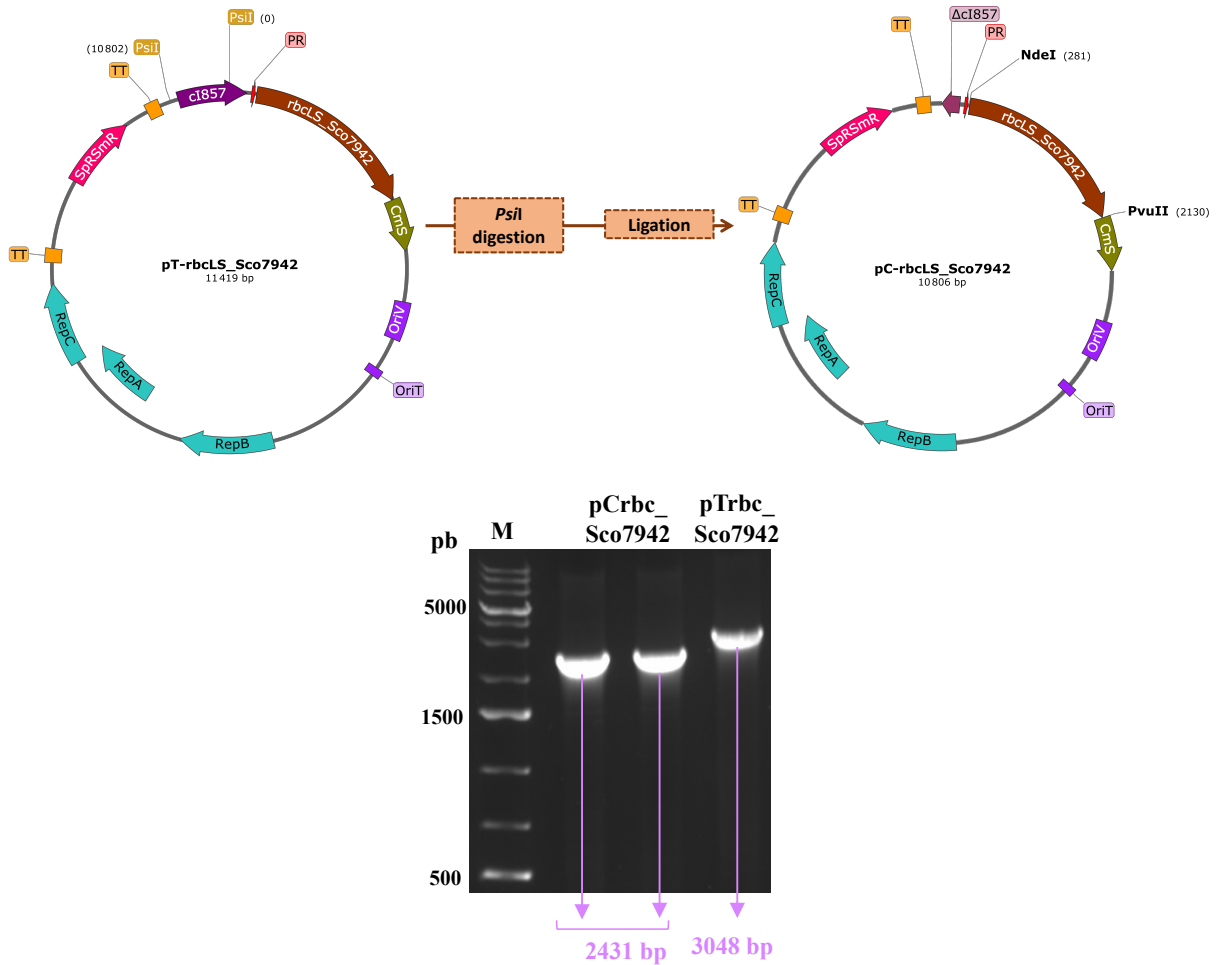


Figure 73. Construction du plasmide pC-rbcLS_Sco7942 pour l'expression forte et constitutive de l'opéron (*rbcLS_Sco7942*) codant pour la RuBisCO de *Synechococcus sp.* PCC 7942. Le plasmide pC-rbcLS_Sco7942 (à droite) est obtenu à partir du plasmide pT-rbcLS_Sco7942 (à gauche) par religation après digestion par *PsiI* générant une ORF *ci857* tronquée de 532 pb. Le gel montre l'amplification par PCR colonies d'*E. coli* de l'opéron cible cloné dans le plasmide pC avec les amorces Ci857_Fw et pFC1_seq_rev, s'appuyant respectivement en amont du gène *ci857* et au niveau de l'ORF tronquée *cmS*. Le marqueur de poids moléculaire (M) = 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

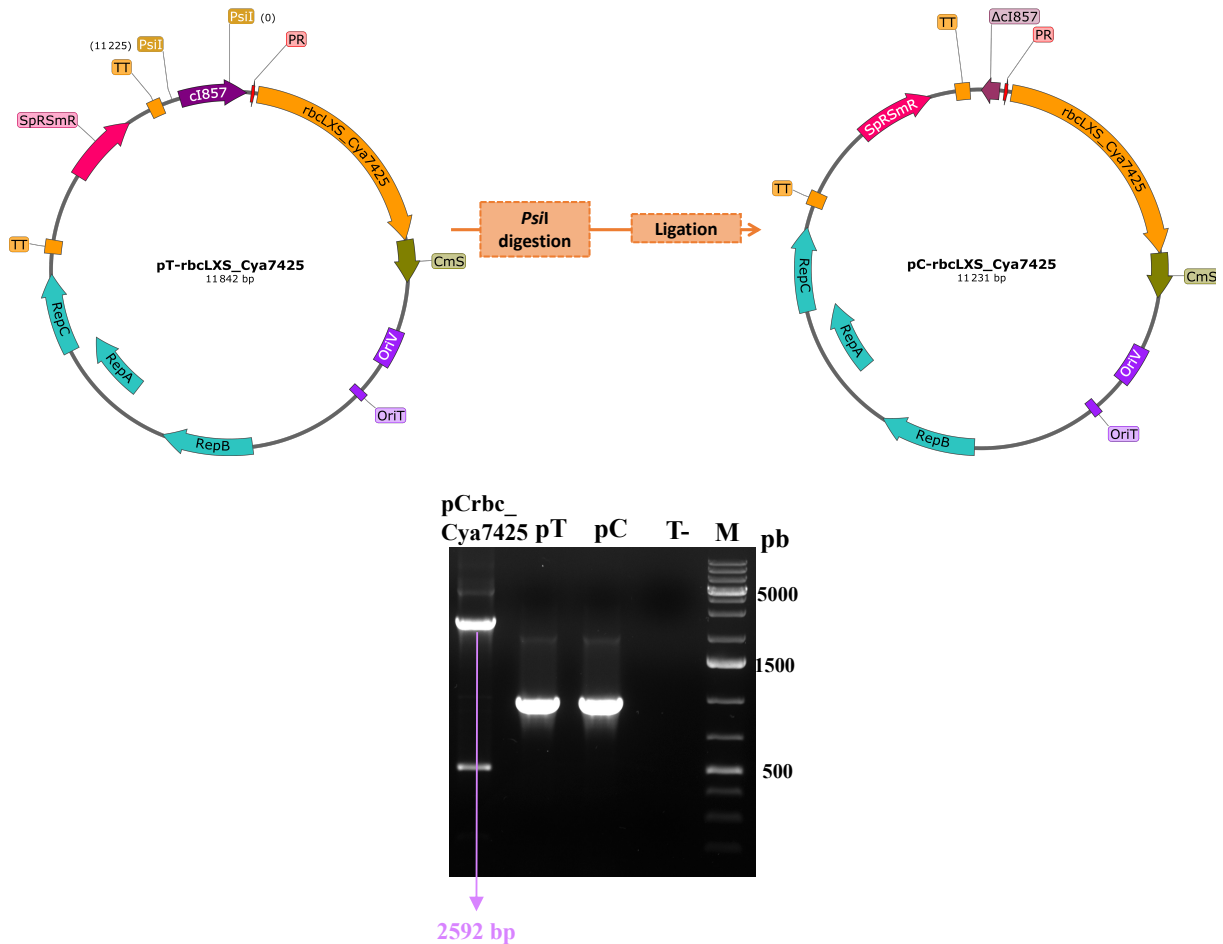


Figure 74. Construction du plasmide *pC-rbcLXS_Cya7425* pour l'expression forte et constitutive de l'opéron (*rbcLXS_Cya7425*) codant pour la RuBisCO de *Cyanospora* sp. PCC 7425.

Le plasmide *pC-rbcLXS_Cya7425* (à droite) est obtenu à partir du plasmide *pT-rbcLXS_Cya7425* (à gauche) par religation après digestion par *Psil* générant une ORF *cI857* tronquée de 532 pb. Le gel montre l'amplification par PCR colonies d'*E. coli* de l'opéron cible cloné dans le plasmide *pC* avec les amorces *Ci857_Fw* et *pFC1_seq_rev*, s'appuyant respectivement en amont du gène *cI857* et au niveau de l'ORF tronquée *Cm^S*. Le marqueur de poids moléculaire (*M*) = 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

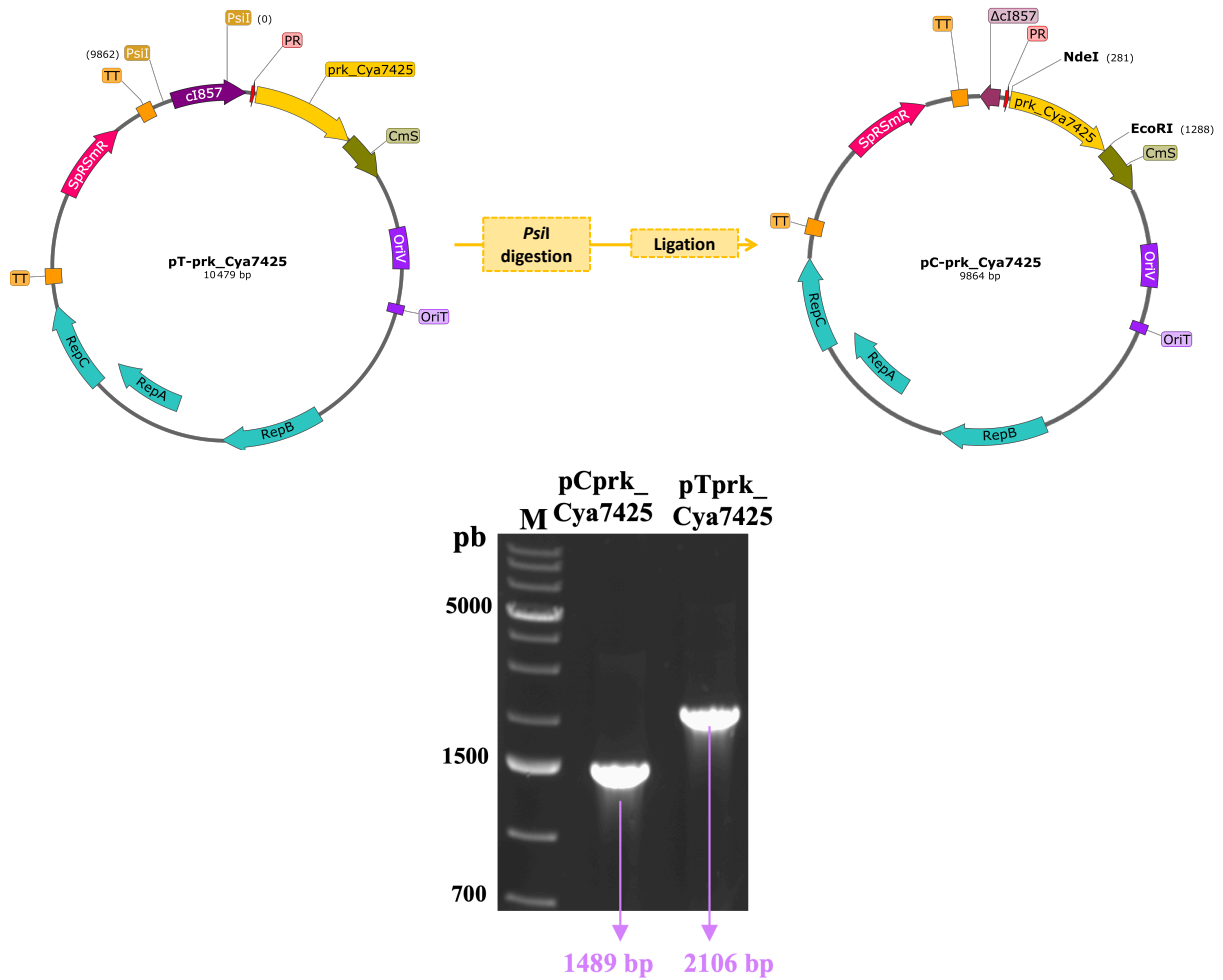


Figure 75. Construction du plasmide pC-prk_Cya7425 pour l'expression forte et constitutive du gène (*prk_Cya7425*) codant pour la PRK de *Cyanothece sp. PCC 7425*. Le plasmide pC-prk_Cya7425 (à droite) est obtenu à partir du plasmide pT-prk_Cya7425 (à gauche) par religation après digestion par *Psil* générant une ORF *ci857* tronquée de 532 pb. Le gel montre l'amplification par PCR colonies d'*E. coli* de l'opéron cible cloné dans le plasmide pC avec les amorces Ci857_Fw et pFC1_seq_rev, s'appuyant respectivement en amont du gène *ci857* et au niveau de l'ORF tronquée *Cm^S*.

B. Stratégie d'introduction des cassettes d'expression au sein de différents châssis cyanobactériens

Ces 5 constructions 'pC' permettant la surexpression des gènes codants pour les enzymes RuBisCO de 4 versions différentes : *rbc_Scy6803* de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Figure 71.), *rbc_Sco7942* de *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Figure 73.), *rbc_Sco7002* de *Synechococcus* sp. PCC 7002 (Figure 72.) et *rbc_Cya7425* de *Cyanothece* sp. PCC 7425 (Figure 74.) ou de la PRK d'une seule version différente : *prk_Cya7425* de *Cyanothece* sp. PCC 7425 (Figure 75.) ont ensuite été introduites par conjugaison au sein des châssis *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Synechococcus* sp. PCC 7942 et *Synechococcus* sp. PCC 7002. Les conjuguants résistants à la streptomycine et spectinomycine ont été sélectionnés, puis une vérification par PCR colonies a été réalisée pour détecter la présence du gène ou opéron cible cloné au sein du pC. Enfin, une vérification est réalisée par séquençage d'ADN pour vérifier les séquences promotrices *pR* et des *ORF* cibles.

1) Introduction de chaque plasmide pC par conjugaison au sein du châssis *Synechococcus* sp. PCC 7942

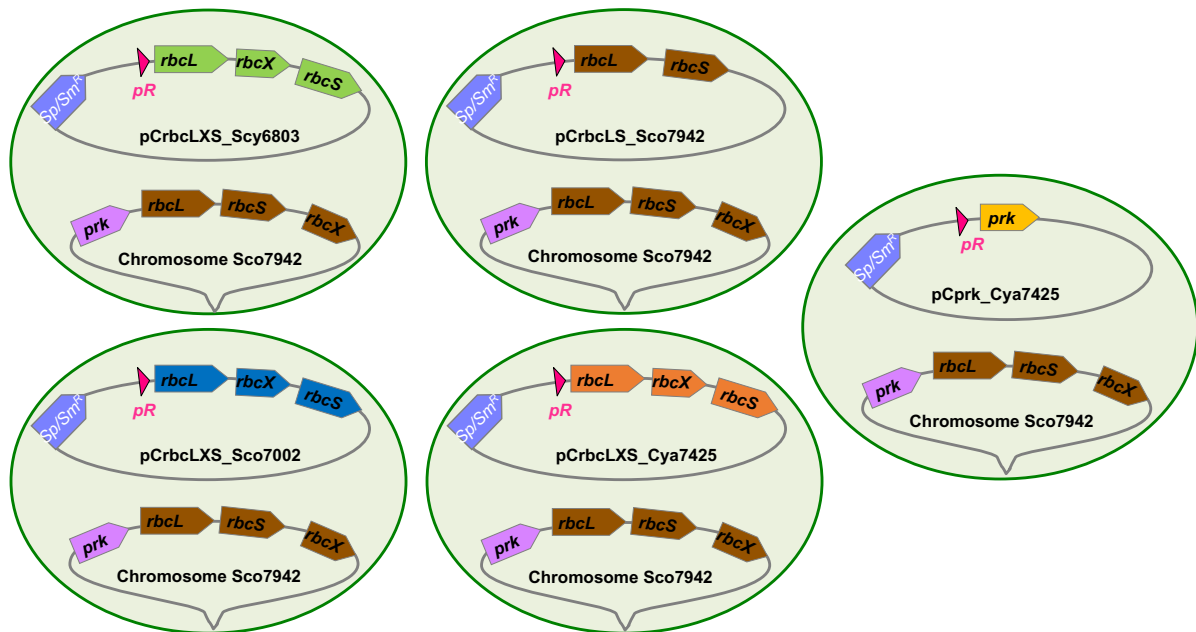


Figure 76. Composition génomique des 5 souches de *Synechococcus* sp. PCC 7942 portant chacune un des 5 plasmides dérivés du 'pC' permettant l'expression forte et constitutive des gènes codants pour les enzymes RuBisCO de 4 versions différentes ou de la PRK de *Cyanothece* sp. PCC 7425.

La souche sauvage de *Synechococcus* sp. PCC 7942 qui a été ingénierée possède sur son chromosome les gènes natifs *rbcLSX_Sco7942* (en marron) ainsi que le gène natif *prk_Sco7942* (en violet). Les divers plasmides dérivés du pC ont été introduits par conjugaison dans ce châssis permettant une surexpression de l'opéron *rbcLS_Sco7942* (en marron), ou une expression forte et constitutive supplémentaire de l'opéron hétérologue *rbcLXS_Scy6803* (en vert), ou *rbcLXS_Sco7002* (en bleu), ou *rbcLXS_Cya7425* (en orange), ou bien du gène hétérologue *prk_Cya7425* (en jaune).

Chez la souche *Synechococcus* sp. PCC 7942, j'ai remarqué un effet inattendu sur la vitesse du temps d'apparition des conjugants *pCprk_Cya7425* et *pCrbc_Cya7425* qui est bien plus rapide (4-5j), et le nombre de conjugants obtenus bien plus élevé, que ce qui est normalement observé au laboratoire, et par comparaison avec les résultats observés avec les autres constructions portées par le pC réalisées au même moment. En suivant les courbes de croissance des conjugants pT chez *Synechococcus* sp. PCC 7942, on peut constater une corrélation entre résultats de conjugaisons obtenus (plus nombreux) et biomasses finales accumulées (plus importantes) (Figure 77.). Les cassettes d'expression *pCprk_Cya7425* et *pCrbc_Cya7425* pourraient donc conférer un avantage au châssis *Synechococcus* sp. PCC 7942.

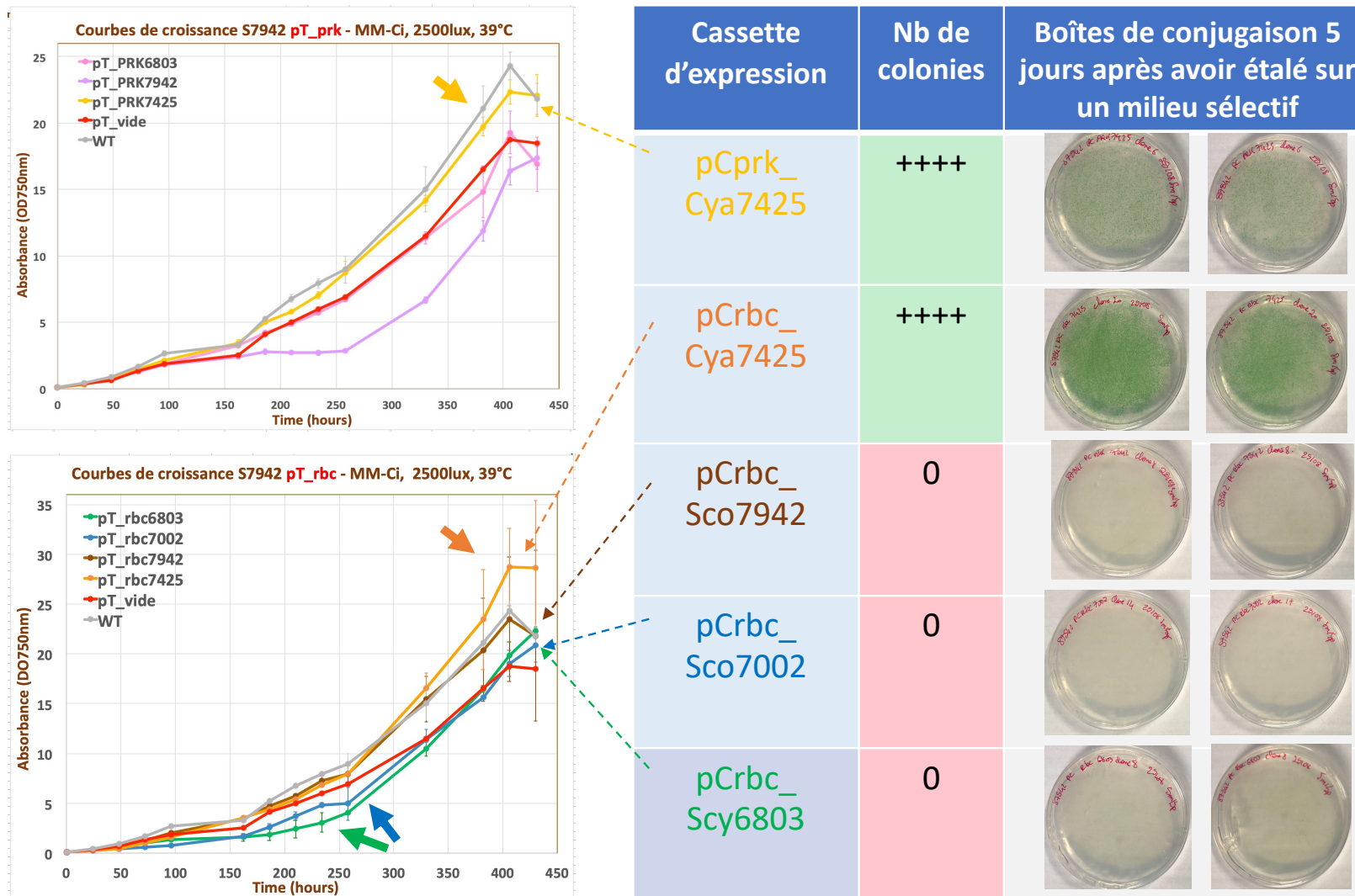


Figure 77. Corrélation des résultats de conjugaison et de surexpression des gènes codants pour les enzymes du CCB par le biais du 'pT' chez *Synechococcus* sp. PCC 7942

2) Introduction de chaque plasmide pC par conjugaison au sein du châssis *Synechocystis* sp. PCC 6803

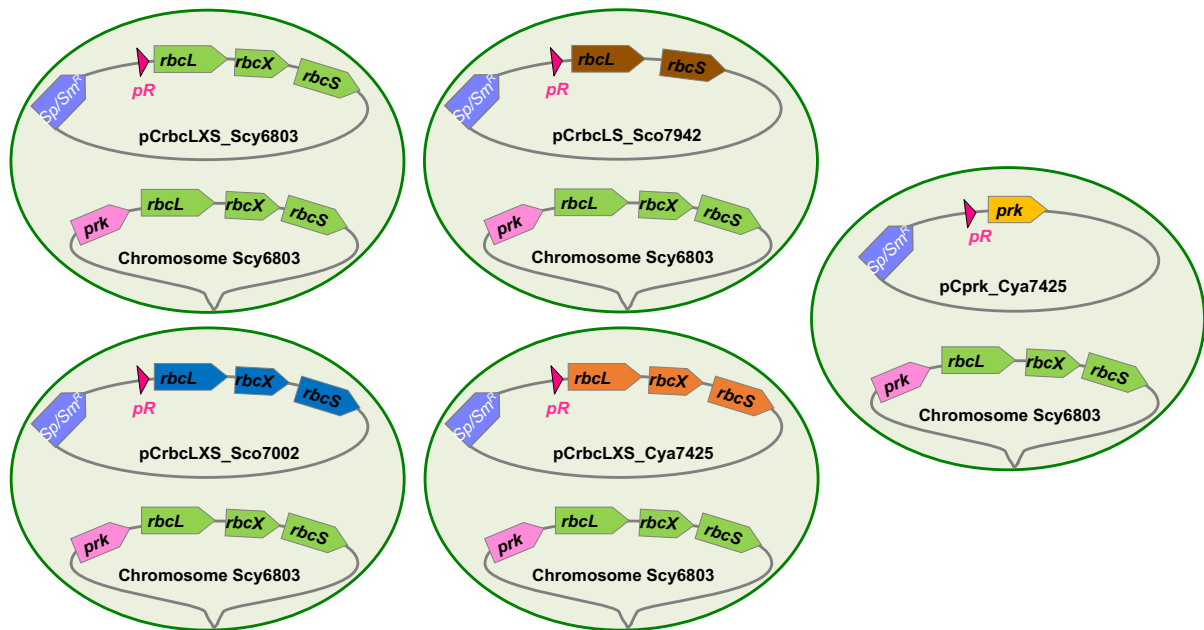


Figure 78. Composition génomique des 5 souches de *Synechocystis* sp. PCC 6803 portant chacune un des 5 plasmides dérivés du 'pC' permettant l'expression forte et constitutive des gènes codants pour les enzymes RuBisCO de 4 versions différentes ou de la PRK de *Cyanothece* sp. PCC 7425.

La souche sauvage de *Synechocystis* sp. PCC 6803 qui a été ingénierée possède sur son chromosome l'opéron natif *rbcLXS_Scy6803* (en vert) ainsi que le gène natif *prk_Scy6803* (en rose). Pour chacun des châssis un plasmide pC a été ensuite conjugué, permettant une surexpression de l'opéron natif *rbcLXS_Scy6803* (en vert), ou de l'opéron hétérologue *rbcLS_Sco7942* (en marron), ou *rbcLXS_Sco7002* (en bleu), ou *rbcLXS_Cya7425* (en orange), ou bien du gène hétérologue *prk_Cya7425* (en jaune).

Chez *Synechocystis* sp. PCC 6803, le temps d'apparition des conjuguants est de manière générale beaucoup plus court par rapport à ce qu'on observe chez *Synechococcus* sp. PCC 7942 qui a le même temps de génération que *Synechocystis* sp. PCC 6803. En revanche, pour l'ensemble des constructions, la vitesse d'apparition des conjuguants est similaire à ce qui est normalement observé au laboratoire, mais le nombre de conjuguants est bien plus important pour les constructions *pCrbc_Sco7942* et *pCprk_Cya7425*.

3) Introduction de chaque plasmide pC par conjugaison au sein du châssis *Synechococcus sp.* PCC 7002

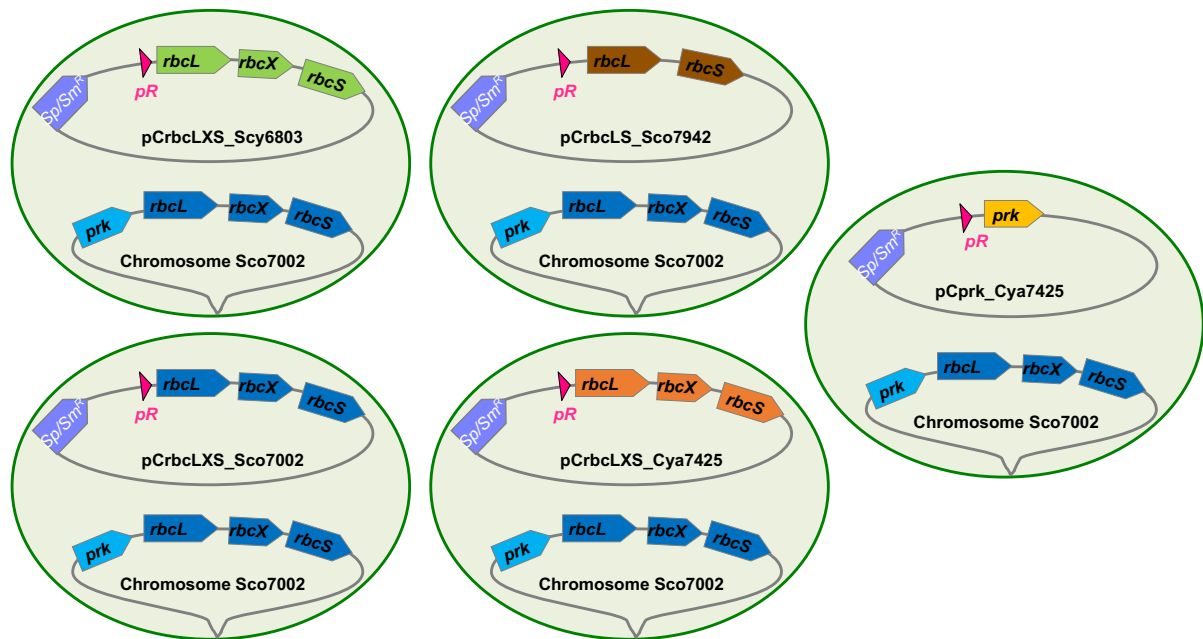


Figure 79. Composition génomique des 5 souches de *Synechococcus sp.* PCC 7002 portant chacune un des 5 plasmides dérivés du 'pC' permettant l'expression forte et constitutive des gènes codants pour les enzymes RuBisCO de 4 versions différentes ou de la PRK de *Cyanothece sp.* PCC 7425.

La souche sauvage de *Synechococcus sp.* PCC 7002 qui a été ingénierée possède sur son chromosome l'opéron natif *rbcLXS_Sco7002* (en bleu foncé) ainsi que le gène natif *prk_Sco7002* (en bleu clair). Pour chacun des châssis un plasmide pC a été ensuite conjugué, permettant une surexpression de l'opéron natif *rbcLXS_Sco7002* (en bleu foncé), ou de l'opéron hétérologue *rbcLS_Sco7942* (en marron), ou *rbcLXS_Scy6803* (en vert), ou *rbcLXS_Cya7425* (en orange), ou bien du gène hétérologue *prk_Cya7425* (en jaune).

C. Analyses phénotypiques des châssis cyanobactériens dans les conditions de surexpression forte et constitutive du système d'expression thermorégulé pC

L'analyse des croissances des mutants des 3 souches modèles surexprimant les gènes *prk* et opérons *rbc* de cyanobactéries a été réalisée en conditions de photoautotrophie à 2500 lux ($\approx 35 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) et 30°C notamment au niveau des effets sur la vitesse de croissance et la biomasse finale accumulée. Les phénotypes des souches mutantes sont comparés avec la souche WT et contrôle pC (le plasmide pC vide *i.e* sans gène hétérologue exprimé).

1) Courbes de croissance en conditions standard

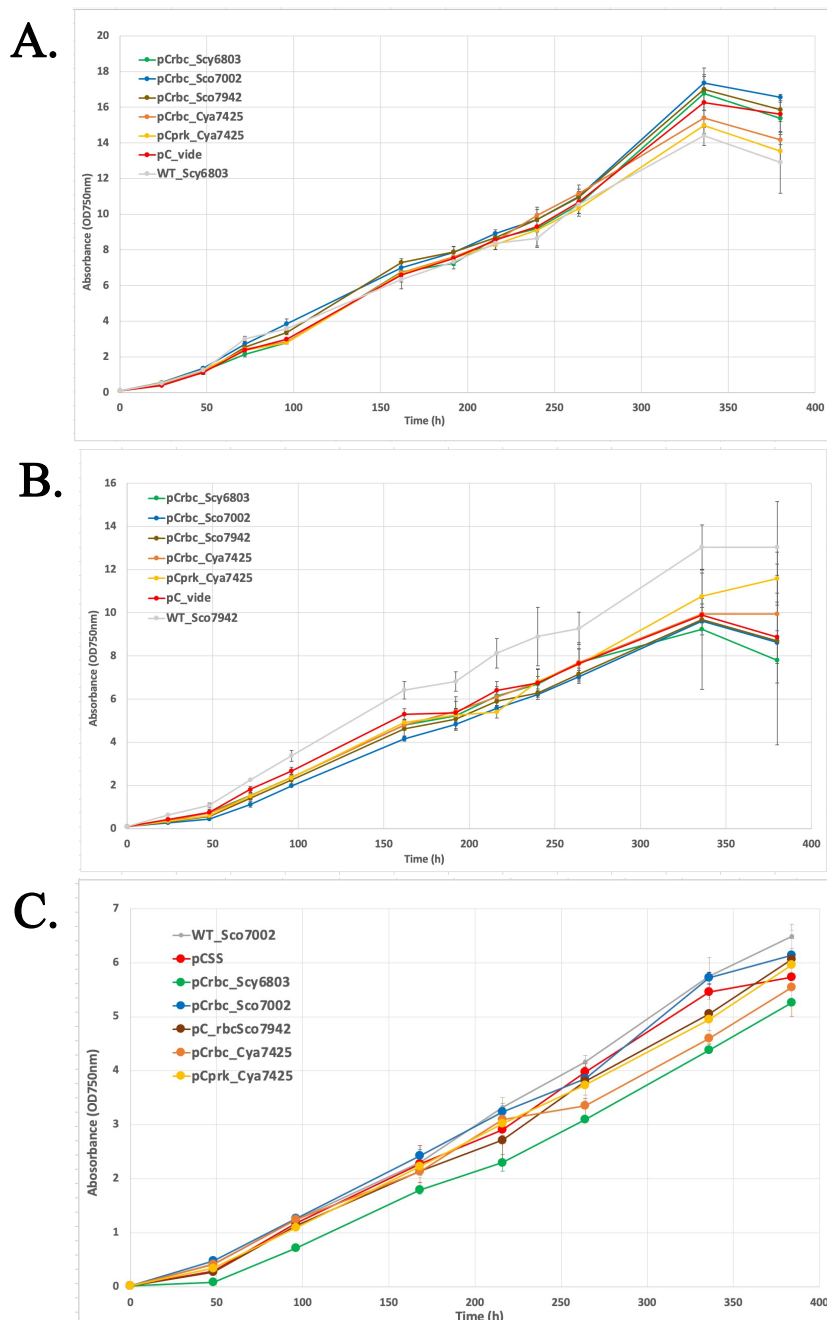


Figure 80. Courbes de croissance des souches mutantes WT et contrôles en photoautotrophie (2500 lux, 30°C).

(A.) Courbe de croissance des souches *Synechocystis* sp. PCC 6803 en MM (B.) Courbe de croissance des souches *Synechococcus* sp. PCC 7942 en MM (C.) Courbe de croissance des souches *Synechococcus* sp. PCC 7002 en milieu A+ et en dodécane et une souche contrôle pCSS.

Le milieu utilisé pour la souche *Synechococcus* sp. PCC 7002 est un milieu salin enrichi en nitrate et en vitamine B12 (4µg/L) appelé milieu A+ et non supplémenté en carbone inorganique. J'ai réalisé les courbes de croissance des différentes souches mutantes et WT *Synechococcus* sp. PCC 7002 en supplémentant le milieu avec du carbonate de sodium (Na₂CO₃), qui n'a eu aucune influence sur la croissance des souches par comparaison avec un milieu A+ sans carbone.

2) Etudes de la phototolérance

Une étude de la phototolérance des souches mutantes (pC_rbc ou pC_prk) des souches *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Figure. 81), *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Figure. 82) et *Synechococcus* sp. PCC 7002 (Figure. 83) a été réalisée par comparaison avec les souches témoins, WT ou contenant le pC sans gènes clonés (abrégié 'pC_vide').

Même si la RuBisCO est considérée comme l'une des principales étapes limitantes du CCB, cela n'est pas valable pour toutes les conditions expérimentales ; dans la littérature, les études montrent que sous faible intensité lumineuse, la RuBisCO n'est pas une enzyme limitante dans l'assimilation photosynthétique du carbone, tandis que sous une lumière saturante (et/ou des niveaux saturés en CO₂), le contrôle exercé par RuBisCO augmente de manière significative (Hudson *et al.*, 1992 ; Quick *et al.*, 1991 ; Iwaki *et al.*, 2016 ; Liang *et al.*, 2016).

L'hypothèse proposée est qu'une augmentation de l'intensité lumineuse sur les cultures entraînerait une augmentation de la quantité d'électrons produits au niveau de la chaîne photosynthétique. Si les mutants conçus (pC_rbc et pC_prk) sont plus aptes à fixer le carbone, ils auront besoin de plus de pouvoir réducteur et d'ATP pour alimenter le CCB, les mutants vont alors 'tirer' sur ces co-facteurs et donc sur les électrons. Au contraire, une souche WT accumulera des électrons qui se recombieront avec les ROS et produiront un stress oxydatif sur les cellules.

Ces analyses ont été effectuées par dilutions sériées en spots tests sur milieu solide en duplicats pour comparaison sous différentes intensités lumineuses (de 1000 lux soit $\approx 12,5 \mu\text{E m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ et jusqu'à 20000 lux).

Néanmoins, malgré nos hypothèses et les études de la littérature, aucune différence de croissance n'ont été observées pour les mutants et WT des 2 châssis cyanobactériens *Synechocystis* sp. PCC 6803 et *Synechococcus* sp. PCC 7942, à aucunes intensités lumineuses. Pour *Synechococcus* sp. PCC 7002, il y a une différence, même si faible, à forte intensité lumineuse (à partir de 6000 lux jusqu'à 15000 lux), entre la souche mutante pCrbc_Sco7002 qui montre une meilleure croissance par rapport à la WT (Figure 83.). Ces résultats vont dans le sens de nos hypothèses ci-dessus, en montrant que la surexpression de l'opéron natif rbcLXS_Sco7002 de la souche, permet une redirection du flux d'électrons produits au niveau de la chaîne photosynthétique, vers le CCB et la biomasse. Pour confirmer ce résultat, il serait intéressant de réaliser le suivi des croissances en liquide (par mesure de l'absorbance) à forte intensité lumineuse.

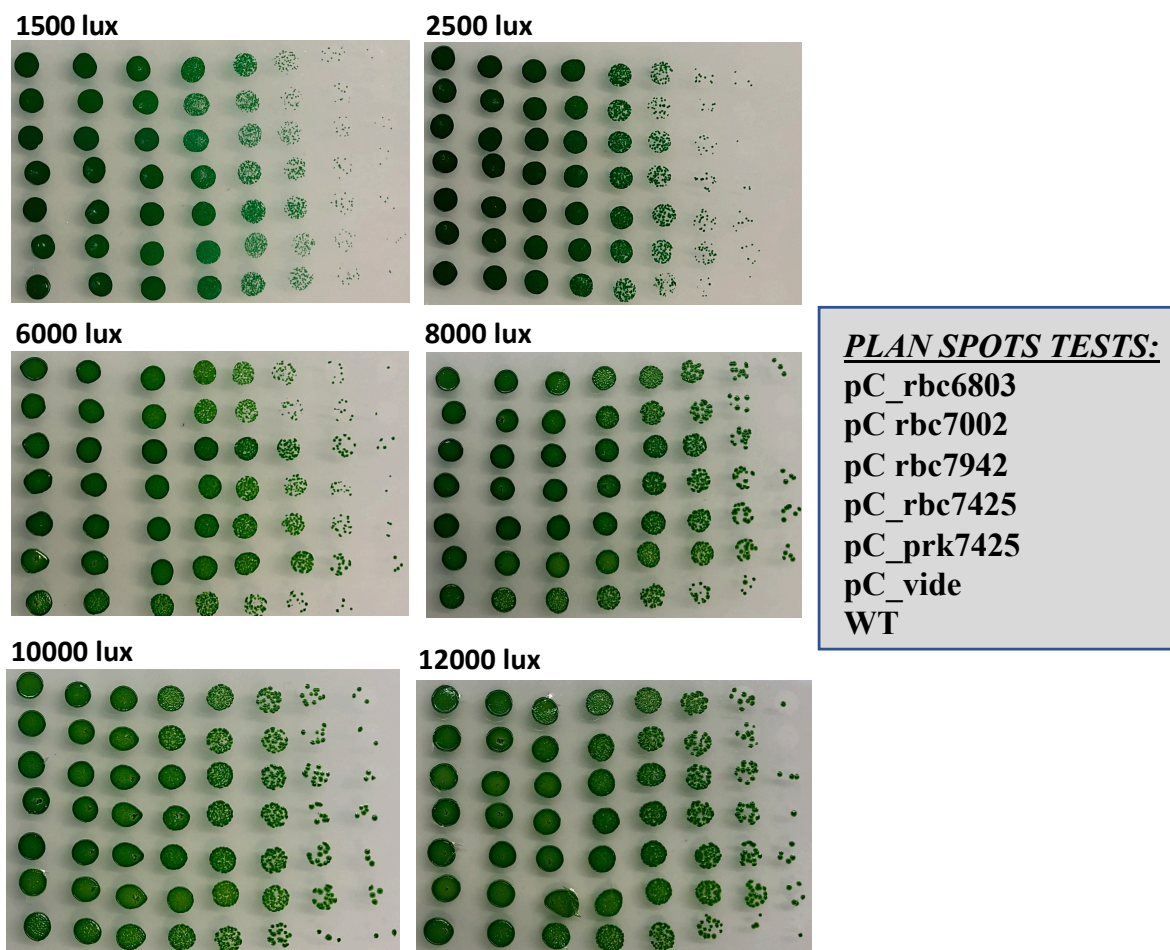


Figure 82. Étude de la phototolérance des mutants de la souche *Synechococcus* sp. PCC 7942 surexprimant les gènes *prk* ou opérons *rbc*

Les 7 souches différentes *Synechococcus* sp. PCC 7942 ont été repiquées en phase exponentielle (3X), puis mises à une $DO_{i750nm} = 0,1$ pour dilutions successives au 1/5 (8X) dans du MM. Les dilutions sériées en spots tests sur milieu MM agar sans antibiotique, proviennent, de la ligne du haut à la ligne du bas, des souches *Synechococcus* sp. PCC 7942 : pC_{rbc}_Scy6803, pC_{rbc}_Sco7002, pC_{rbc}_Sco7942, pC_{rbc}_Cya7425, pC_{prk}_Cya7425, pC_{vide}, et WT (voir encadré grisé). Les boîtes de pétries (en duplicats) ont ensuite été disposées dans une pièce à 30°C, à différentes intensités lumineuses : 1500 lux ($\approx 20 \mu E m^{-2}.s^{-1}$), 2500 lux ($\approx 35 \mu E m^{-2}.s^{-1}$), 6000 lux ($\approx 85 \mu E m^{-2}.s^{-1}$), 8000 lux ($\approx 120 \mu E m^{-2}.s^{-1}$), 10000 lux ($\approx 150 \mu E m^{-2}.s^{-1}$), 12000 lux ($\approx 180 \mu E m^{-2}.s^{-1}$). Les photos ont été prises au bout de 8 jours de croissance.

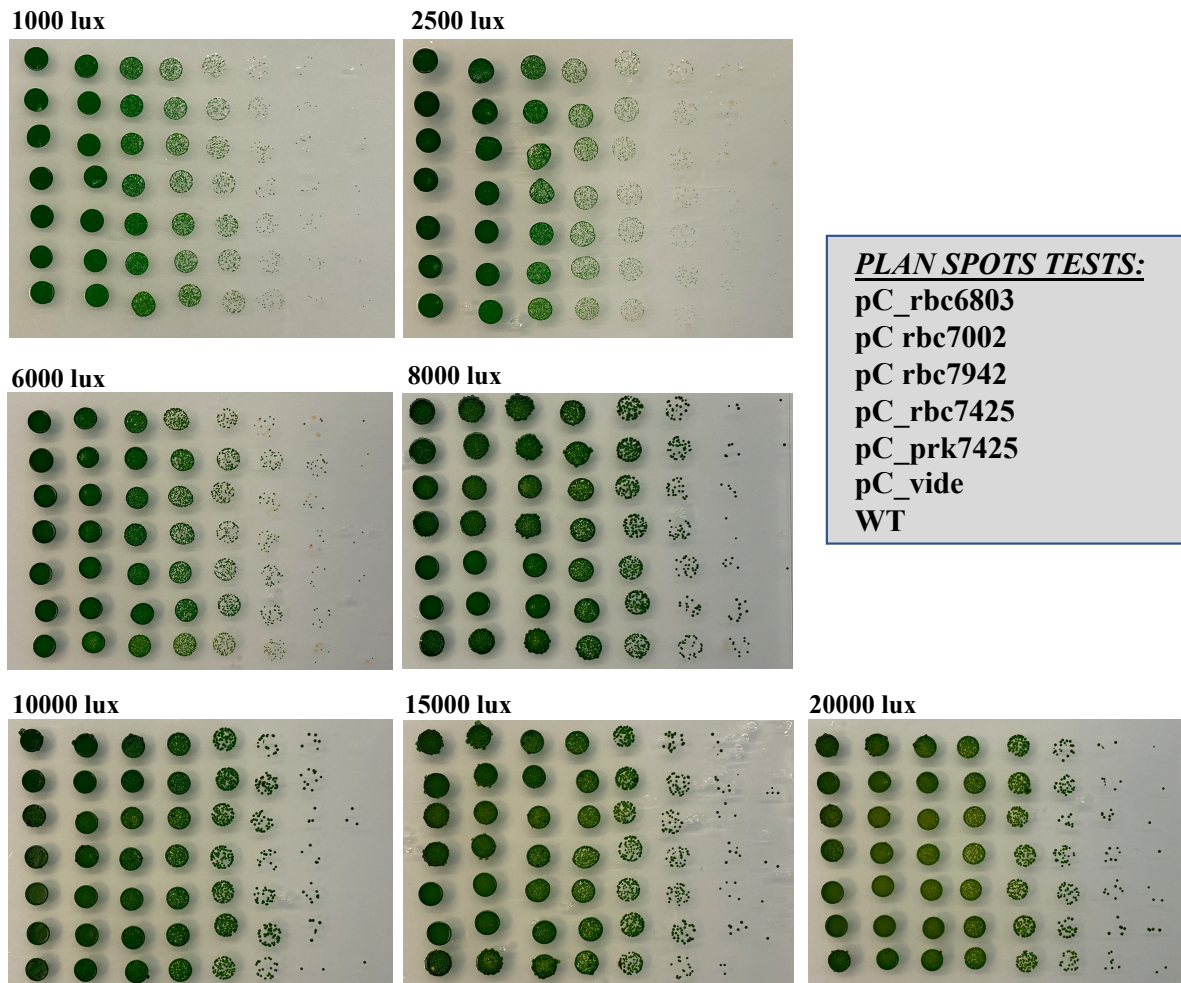


Figure 83. Étude de la phototolérance des mutants de la souche *Synechococcus* sp. PCC 7002 surexprimant les gènes *prk* ou opérons *rbc*

Les 7 souches différentes *Synechococcus* sp. PCC 7002 ont été repiquées en phase exponentielle (3X), puis mises à une $DO_{i750nm} = 0,1$ pour dilutions successives au 1/5 (8X) dans du milieu A+. Les dilutions sériées en spots tests sur milieu A+ agar (+ vitamine B12) sans antibiotique, proviennent, de la ligne du haut à la ligne du bas, des souches *Synechococcus* sp. PCC 7002 : pCrbc_Scy6803, pC_rbc_Sco7002, pCrbc_Sco7942, pCrbc_Cya7425, pCprk_Cya7425, pC_vide, et WT (voir encadré grisé). Les boîtes de pétries (en duplicats) ont ensuite été disposées dans une pièce à 30°C, à différentes intensités lumineuses : 1000 lux ($\approx 12,5 \mu E m^{-2}.s^{-1}$), 2500 lux ($\approx 35 \mu E m^{-2}.s^{-1}$), 6000 lux ($\approx 85 \mu E m^{-2}.s^{-1}$), 8000 lux ($\approx 120 \mu E m^{-2}.s^{-1}$), 12000 lux ($\approx 150 \mu E m^{-2}.s^{-1}$), 15000 lux ($\approx 180 \mu E m^{-2}.s^{-1}$) et 20000 lux ($\approx 300 \mu E m^{-2}.s^{-1}$). Les photos ont été prises au bout de 7 jours de croissance.

IV. Conclusions et perspectives

Afin d'approfondir les résultats phénotypiques, d'autres analyses peuvent être réalisées pour les souches ayant des phénotypes suggérant que la fixation du CO₂ et/ou la performance de l'activité photosynthétiques ont été améliorées :

- Mesure de l'accumulation des réserves carbonées

Il serait intéressant de mesurer l'accumulation des réserves carbonées au sein des souches surexprimant les opérons/gènes codants pour les enzymes du CCB car la redirection du carbone pourrait s'effectuer autrement qu'au niveau de taux de croissance plus rapide et de plus grande accumulation de biomasse. La redirection des flux du CCB pourrait également s'orienter vers les voies de stockages de réserves carbonées telles que les polyhydroxybutyrates (PHB) ou bien le glycogène par exemple. Leur accumulation serait intéressante à des fins biotechnologiques et pour la production de matières premières telles que les bioplastiques (PHB).

- Mesure de l'impact de la surexpression des enzymes du CCB via la mesure de l'évolution de l'O₂

Une méthode pour mesurer l'impact sur des souches surexprimant les gènes ou opérons codants pour des enzymes du CCB est la mesure de l'évolution (consommation / production) de l'O₂ via une électrode de Clarke. En effet, l'un des effets potentiels de la surproduction d'enzymes du CCB est l'augmentation du rendement photosynthétique et donc une potentielle augmentation de la consommation et production d'O₂. Le taux de dégagement de l'oxygène, proportionnel à l'activité du PSII, pourrait alors servir de mesure approximative de l'activité de la RuBisCO ou de la PRK.

- Mesure de la dynamique du pouvoir réducteur au fluoromètre

En collaboration avec le LMB au CEA Saclay, la mesure de la production et de la consommation de NADPH *in vivo*, linéaire avec la fixation du CO₂, par un fluoromètre DUAL PAM, pourrait être un axe intéressant à approfondir pour l'analyse phénotypique des mutants surexprimant gènes et opérons codants pour des enzymes du CCB.

- Mesure de l'activité photosynthétique du PSII

En collaboration avec Diana Kirilovsky du laboratoire B3S au CEA Saclay, la mesure des activités photosynthétiques via les rendements quantiques du PSII (efficacité de conversion de la lumière), linéaires avec l'assimilation du carbone pourrait également être un axe intéressant à approfondir pour l'analyse phénotypique des mutants.

- Quantification des protéines PRK et RuBisCO
 - Western Blot et analyses avec des anticorps spécifiques
 - SDS PAGE
- Mesure des activités enzymatiques de la PRK et de la RuBisCO
 - Étiquettes peptidiques
 - Bicarbonate de sodium radiomarqué (NaH₁₄CO₃), pour la mesure de l'activité carboxylase de la RuBisCO
 - Protéomique quantitative

PARTIE 2. Ingénierie métabolique pour une redirection du flux de carbone du CCB, vers la production de molécules d'intérêt : les terpènes

Au vu de la grande diversité des cyanobactéries combinée à la grande famille des molécules d'intérêt que sont les terpènes, le laboratoire souhaite identifier les meilleures combinaisons 'souches-terpènes', en utilisant de surcroît l'ingénierie métabolique au niveau de la régulation du CCB et l'assimilation du CO₂, et cela, en vue de maximiser les rendements et la durabilité des productions.

J'ai donc contribué à l'ingénierie de plusieurs châssis cyanobactériens pour la production de quatre terpènes, via l'introduction des cassettes d'expression des terpènes synthases correspondantes au niveau de sites neutres génomiques (chromosome ou plasmides endogènes) sélectionnés ; tout en combinant la surexpression constitutive (à partir d'un plasmide répliquatif à large spectre d'hôte : pC) de différentes versions de gènes *prk* ou opérons *rbc* codants pour les enzymes du CCB (diversité de séquences) ou bien des gènes codants pour les terpènes synthases (nombre de cassettes d'expression des terpènes synthases doublées).

I. Contexte et stratégies

De nouvelles stratégies ont été dessinées suite aux résultats phénotypiques obtenus dans la Partie 1 des différents mutants cyanobactériens des souches modèles surexprimant différents gènes et opérons codants pour des enzymes du CCB, par l'intermédiaire des systèmes d'expression 'pT' à 39°C en milieux MM- Ci, MM et MM+ Ci, et 'pC' en conditions standard à 30°C en MM à différentes intensités lumineuses, et la comparaison de leurs performances via le suivi de leurs taux de croissance et biomasses finales accumulées notamment. Spécifiquement, au vu de l'absence de différences phénotypiques au niveau de la phototolérance de 15 mutants de divers châssis cyanobactériens par rapport aux châssis sauvages.

Lors de la surexpression des gènes/opérons codants pour les enzymes PRK et RuBisCO, plusieurs réponses physiologiques et de régulation au sein des cellules des souches mutantes peuvent découler : une augmentation de la photosynthèse oxygénique et donc du flux d'électrons, une utilisation plus efficace des réducteurs cellulaires pour le catabolisme, une redirection du flux de carbone vers la synthèse de plus de biomasse, ou bien une redirection vers d'autres voies cataboliques, voies de stockage sous la forme de réserves carbonées (non exhaustif).

L'hypothèse proposée à partir de l'étude phénotypique de phototolérance était qu'une augmentation de l'intensité lumineuse sur les cultures entraînerait une augmentation de la quantité d'électrons produits au niveau de la chaîne photosynthétique, qui pourraient, pour la souche WT se recombinaient avec les ROS, et produire un stress oxydatif sur les cellules, tandis que pour les mutants (pC_*rbc* et pC_*prk*) plus aptes à fixer le carbone, ces électrons seraient utilisés pour alimenter le pool de pouvoir réducteur et d'ATP et CCB. Mais, malgré une exposition à de très fortes intensités lumineuses, les phénotypes entre les mutants des différentes espèces étaient assez similaires.

Ce constat nous a amené à réfléchir à de nouvelles stratégies et à la mise en place de nouvelles

expériences pour observer phénotypiquement l'influence de la surexpression des gènes *prk* et opéron *rbc*. Nos choix se sont alors donc portés sur l'hypothèse, chez les mutants, d'une redirection des flux de carbone assimilé par le CCB vers diverses voies cataboliques notamment les voies de stockage.

La stratégie opérée étant d'introduire une voie catabolique hétérologue comme puit de carbone efficace dans leur métabolisme, par le design de double-mutant. L'hypothèse considère que ces souches 'double-mutant' opéreront une augmentation des flux de carbone au vu d'une plus forte activation du CCB et de l'assimilation du CO₂ (en exploitant le gène *prk* ou opéron *rbc* surexprimé), mais également une redirection des flux de carbone des diverses voies cataboliques ou voies de stockage (via l'intégration d'un gène hétérologue codant pour une terpène synthase) vers le pool de molécules carrefour (comme le pyruvate, ou le G3P), les précurseurs de la voie MEP et la production de molécules de terpènes (Figure 84.).

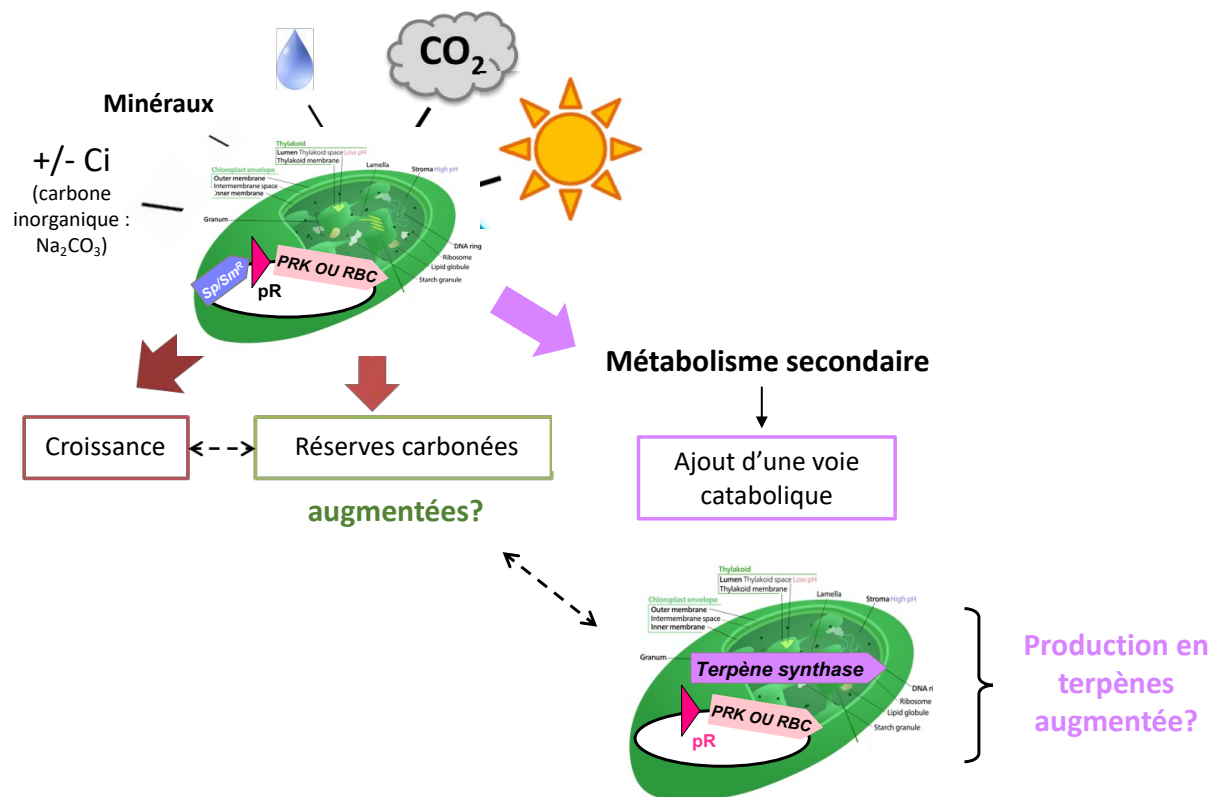


Figure 84. Représentation schématique des hypothèses de redirection de flux de carbone pour la mise en place de la stratégie de la création de double mutants combinant la production de terpènes à la surexpression gènes/opérons codants pour des enzymes du CCB

Au niveau du design des doubles mutants, ceux-ci exploiteront le gène *prk* ou l'opéron *rbc* surexprimé via le plasmide répliquatif à expression constitutive *pC* pour la production de molécules d'intérêt via l'intégration d'un gène codant pour diverses terpènes synthases au niveau de différents loci sélectionnés du génome de 3 souches de cyanobactéries modèles.

L'efficacité de la surexpression des gènes et opérons codants pour les enzymes PRK et RuBisCO pour la fixation du CO₂ sera donc évaluée via les analyses phénotypiques de mesure de la production de terpènes en aval, et par comparaison des rendements avec des souches 'contrôles'.

Ces hypothèses vont dans le sens de la littérature, où des études ont montré que la surexpression de la RuBisCO endogène de *Synechococcus* sp. PCC 7002 a entraîné des changements protéomiques avec une augmentation coordonnée des protéines impliquées dans le métabolisme du pyruvate, le cycle TCA et la biosynthèse des acides gras (Porcellinis *et al.*, 2018). D'autres études montrent également que dans des conditions à forte concentration en carbone, la plupart du carbone nouvellement fixé quitte CCB en direction du métabolisme des glucides et du stockage, tandis que dans des conditions où le carbone est en moindre concentration, le carbone est exporté via la glycolyse et le cycle de l'acide tricarboxylique (TCA) pour fournir des squelettes carbonés pour la synthèse des acides aminés (Schwarz *et al.*, 2013 ; Huege *et al.*, 2011 ; Burnap *et al.*, 2015).

II. Introduction de voies cataboliques dans le métabolisme des cyanobactéries pour la production de molécules d'intérêt : les terpènes

L'utilisation d'un châssis cyanobactérien comme usine cellulaire pour la production de biocarburants est une stratégie très intéressante, car elle repose sur un cycle du carbone neutre. En effet, la combustion de biocarburants libère dans l'atmosphère du CO₂ préalablement assimilé par l'organisme photosynthétique.

On dénote parmi ces biocarburants durables, les terpènes, une large famille de composés organiques naturels (au moins 55 000) de type hydrocarbure, de formule générale (C₅H₈)_n et aux multiples propriétés physico-chimiques intéressantes. De par leurs forte densité énergétique et faible viscosité (même à très basse température), ces hydrocarbures peuvent être utilisés pour les industries de la chimie, de la pétrochimie et de l'environnement comme alternative directe au diesel (bisabolène et farnésène), mais aussi pour l'amélioration des propriétés du kérosène d'aviation (limonène) (Jongedijk *et al.*, 2016; Vespermann *et al.*, 2017). De par leurs propriétés organoleptiques (santalène), les terpènes sont également utilisés dans les industries alimentaire, cosmétique et de la parfumerie, mais encore dans l'industrie pharmaceutique pour leurs propriétés biologiques antimicrobiennes et antiparasites (huiles essentielles).

A. Les voies métaboliques nécessaires à la production de terpènes : la voie du méthylérythritol (voie MEP) en lien avec le cycle de Calvin-Benson et la glycolyse.

Les cyanobactéries disposent de la voie du méthylérythritol phosphate (voie MEP) leur permettant la synthèse d'isopentenyl-pyrophosphate (IPP) et de diméthylallyl-pyrophosphate (DMAPP) et des métabolites précurseurs de terpènes le farnesyl-pyrophosphate (FPP) et le geranyl-pyrophosphate (GPP). La voie MEP est alimentée par deux substrats: le pyruvate produit par la glycolyse (voie métabolique d'assimilation du glucose et de production d'énergie) ; et le glyceraldéhyde-3-phosphate (G3P) généré par la glycolyse ainsi que le CCB.

En revanche, les cyanobactéries ne possèdent pas les enzymes «terpènes synthases» permettant de convertir les précurseurs FPP et GPP en terpènes d'intérêts comme le limonène, le pinène, le farnésène, le bisabolène ou le santalène. Par conséquent, afin de générer des cyanobactéries productrices de terpènes, il est nécessaire d'introduire des cassettes d'expression de gènes hétérologues codants pour les terpènes synthase (Figure 85.).

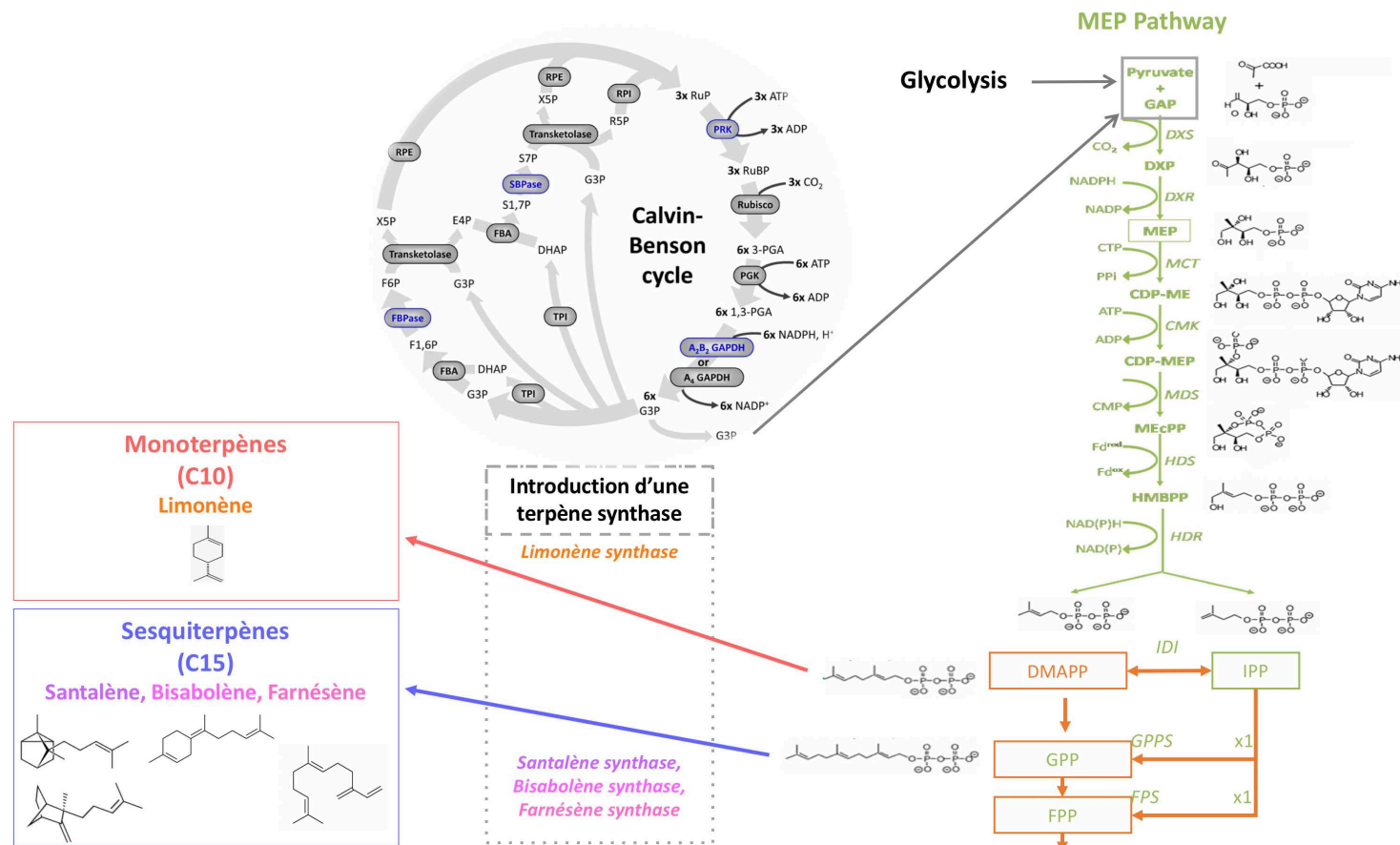


Figure 85. Expression hétérologue de terpènes synthases grâce aux voies métaboliques en amont : CCB, Glycolyse et voie MEP de synthèse de monoterpènes et sesquiterpènes.

Abréviations (voie MEP): Ferrédoxine réduite (Fd^{red}); glycéraldéhyde 3-phosphate (**G3P**); 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (**DXP**) synthase (**DXS**); DXP reductoisomérase (**DXR**); MEP cytidyltransférase (**MCT**); 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-méthyl-D-erythritol (**CDP-ME**) kinase (**CMK**); 2-C-méthyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate (**MEcPP**) synthase (**MDS**); 4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényl diphosphate (**HMBPP**) synthase (**HDS**); HMBPP réductase (**HDR**); isopentenyl pyrophosphate (**IPP**) isomérase (**IDI**); diméthylallyl pyrophosphate (**DMAPP**); géranyl pyrophosphate (**GPP**) synthase (**GPSS**); farnésyl pyrophosphate (**FPP**) synthase (**FPSS**); géranyl géranyl pyrophosphate (**GGPP**) synthase (**GGSS**); terpène synthase (**TPS**).

B. Sélection de cassettes d'expression exprimant diverses terpènes synthases pour la production de terpènes (monoterpènes ou sesquiterpènes).

Dans l'étude, le choix s'est porté sur l'introduction au sein de sites neutres génomiques, de 4 cassettes d'expression codants pour 4 terpène synthases, de plantes :

- la 4S-limonène synthase (LS) (*Mentha spicata*, GenBank : Q40322) sans les 168 premières paires de bases codants pour le peptide de localisation au chloroplaste (Chenebault *et al.*, 2020).
- la farnésène synthase (FS) (*Picea abies*, GenBank: AAS47697.1)
- la bisabolène synthase (BS) (*Abies grandis*, GenBank AF006195.1)
- la santalène synthase (SS) (*Santalum album*, GenBank : HQ343276.1).

Les 4 séquences de terpènes synthases de plantes ont alors été adaptées au biais de codons de *Synechocystis* sp. PCC 6803 en utilisant le logiciel GENEius puis synthétisées par Eurofins Genomics (Design Encarnacion Diaz-Santos et Célia Chenebault).

Grâce aux précurseurs issus de la voie métabolique MEP de la cyanobactérie, ces différentes terpènes synthases permettent la production de divers terpènes d'intérêt. Les différents terpènes de cette étude appartiennent soit à la famille des monoterpènes (en C10) soit des sesquiterpène (en C15), c'est-à-dire qu'ils présentent une chaîne carbonée à 10 ou 15 carbones.

- le limonène (C10) produit par la 4S-limonène synthase
- le farnésène (C15) produit par la α -farnésène synthase
- le bisabolène (C15) produit par l'E- α -bisabolène synthase
- les 3 isomères du santalène (C15): α -santalène, α -exo-bergamotène et épi- β -santalène produits par la santalène synthase et caractérisés par l'étude

C. Choix des châssis cyanobactériens et des terpènes dont la production doit être améliorée

L'introduction des différentes cassettes d'expression a été réalisée au sein des châssis cyanobactériens modèles : *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Synechococcus* sp. PCC 7942 et *Synechococcus* sp. PCC 7002.

Néanmoins une stratégie s'est imposée au niveau du choix d'introduction des 4 différentes terpènes synthases au sein des 3 différents châssis cyanobactériens, et celle-ci de par les résultats de production observés au laboratoire de plusieurs terpènes (mono et sesquiterpènes) en fonction du châssis cyanobactérien.

En effet, le laboratoire étudie la production de terpènes via l'expression de différents gènes codants pour des terpènes synthases clonés dans les plasmides pFC1 ou son dérivé pC (Chenebault *et al.*, 2020). Les résultats ont révélé que la nature des terpènes à produire (spécifiquement la longueur de leur chaîne carbonée) jouait un rôle important au niveau des rendements de production au sein de différents châssis cyanobactériens. Plus spécifiquement que les rendements du limonène (monoterpène) sont supérieurs chez *Synechococcus* sp. PCC 7002 comparés à ceux obtenus chez *Synechocystis* sp. PCC 6803 et *Synechococcus* sp. PCC 7942, tandis que les rendements en sesquiterpènes (C15) comme le farnésène, le bisabolène et le santalène sont meilleurs au sein des châssis *Synechocystis* sp. PCC 6803 et *Synechococcus*

sp. PCC 7942 comparés à ceux obtenus chez *Synechococcus* sp. PCC 7002.

Ainsi, il a été décidé de ne pas introduire tous les gènes codants pour les terpènes synthases au sein des trois châssis cyanobactériens modèles. La cassette d'expression codant pour la limonène synthase (C10) a été conçue pour être introduite dans le chromosome de *Synechococcus* sp. PCC 7002 et les cassettes d'expression codants pour la farnésène synthase, la bisabolène synthase et la santalène synthase ont été conçues pour être introduites indépendamment dans les chromosomes respectifs de *Synechocystis* sp. PCC 6803 et *Synechococcus* sp. PCC 7942 (donc cela demande la construction d'une cassette par châssis et localisation chromosomique).

III. Design de cassettes d'expression de terpènes synthases et leur intégration au sein diverses régions génomiques désignées comme 'sites neutres'

A. Sélection de 5 régions génomiques désignées comme sites neutres au sein des châssis cyanobactériens modèles

L'appellation 'site neutre' désigne une région génomique qui a été identifiée et utilisée de manière standardisée au sein d'un microorganisme dans laquelle l'intégration de séquences/gènes n'affecte pas la viabilité cellulaire, ni ne cause de modification métabolique identifiable (en tout cas décrite ou observée dans la littérature).

Une recherche bibliographique conséquente a été réalisée afin de sélectionner les *loci* les plus favorables chez les trois souches modèles *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Synechococcus* sp. PCC 7942 et *Synechococcus* sp. PCC 7002 à la catégorisation 'sites neutres'. Les critères de sélection pour le choix de sites neutres décrits par la littérature se sont portés sur la nature des ORF présentes aux environs de la région génomique utilisée ou bien sur les résultats d'expression/production issus de l'intégration de cassettes au sein du site neutre tout en tenant compte du nombre de publications les utilisant (Cassier-Chauvat *et al.*, 2021).

Finalement 5 sites neutres ont été sélectionnés :

- *Synechocystis* sp. PCC 6803 : 3 sites neutres, 1 pour une intégration chromosomique et 2 pour une intégration au niveau de 2 petits plasmides endogènes: pCA2.4 et pCC5.2.
- *Synechococcus* sp. PCC 7942 : 1 site neutre pour une intégration chromosomique.
- *Synechococcus* sp. PCC 7002 : 1 site neutre pour une intégration chromosomique.

Il existe en effet certains avantages et inconvénients à l'intégration de cassettes d'expression au sein de plasmides hétérologues, chromosome ou de plasmides endogènes :

- Un plasmide d'expression à large spectre d'hôtes (basé sur RSF1010) ayant le grand avantage d'être utilisables dans différentes souches de cyanobactéries et pouvant permettre une expression constitutive ou thermorégulée (Marraccini *et al.*, 1993; Mermet-Bouvier *et al.*, 1993). Une seule construction peut être testée dans divers châssis cyanobactériens.
- L'introduction d'une cassette d'expression au sein de sites neutres dans le chromosome ou le plasmide endogène peut sembler plus stable ; par comparaison avec le plasmide dit hétérologue, et surtout car il n'est pas forcément nécessaire de maintenir une pression de sélection.
- Pour intégration au sein d'un plasmide indigène, le nombre de copies est souvent plus élevé que le chromosome (Xu *et al.*, 2011), ce qui est très intéressant. Cependant, ils sont de

petites tailles, ce qui rend l'insertion de longues séquences difficiles.

De manière générale, le design de plasmides 'plateformes' et de cassettes pour l'intégration de gènes hétérologues au sein des différents sites neutres permettra au laboratoire d'intégrer n'importe quelles cassettes d'expression au sein du génome (chromosomes ou plasmides endogènes) de 3 souches cyanobactériennes modèles. Par ailleurs, une autre stratégie d'introduction d'un promoteur fort ciblé (par des plateformes d'homologie) en amont d'ORF sélectionnées dans le chromosome cyanobactérien n'ayant pas abouti (voir la Partie 3), nous pourrions également utiliser les sites neutres pour tenter d'intégrer directement, et dans une région standardisée, un promoteur fort couplé à une cassette d'expression des différentes versions du gène *prk* ou de l'opéron *rbc*.

Ci-après sont présentés les régions génomiques de la sélection des 5 sites neutres chez les trois souches modèles *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Synechococcus* sp. PCC 7942 et *Synechococcus* sp. PCC 7002.

1) Sites neutres chez *Synechocystis* sp. PCC 6803

La localisation génomique d'un site neutre peut exercer une influence sur le niveau d'expression de cassettes hétérologues. C'est pourquoi, pour le châssis *Synechocystis* sp. PCC 6803, la stratégie a été de tester l'expression de cassettes hétérologues au niveau de sites neutres localisés dans différentes régions du génome ; certains au niveau du chromosome (NS_slr0168) et deux autres au niveau des plasmides endogènes pCA2.4 (région intergénique=NS_pCA2.4) et (NSP1=NS_pCC5.2). Le nombre de copies élevées des plasmides endogènes en fait des candidats idéaux de vecteur d'expression. En effet, il a été observé que lors de la phase stationnaire de croissance cellulaire, le nombre de copies des plasmides endogènes (pCA2.4, pCB2.4, pCC5.2) dans *Synechocystis* sp. PCC 6803 est de 3 à 7 par copies chromosomiques (Berla *et al*, 2012).

a) *NS_slr0168* : site neutre au niveau du chromosome de *Synechocystis* sp. PCC 6803

Le locus sélectionné NS_slr0168 qualifié de 'site neutre' se situe entre les paires de bases 2300515 et 2302446 du chromosome (brin direct) de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (numéro d'accès Genbank GCA_000009725.1), il s'étend sur 1932 pb et correspond au même locus que le gène *slr0168* codant pour une protéine hypothétique (NCBI-ProteinID : 111708) (Figure 86.).

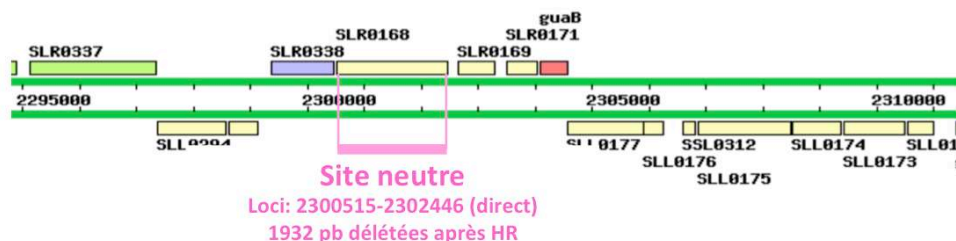


Figure 86. Carte de la région génomique portant le locus du site neutre chromosomique sélectionné de la souche *Synechocystis* sp. PCC 6803

Le segment indiqué en rose correspond au locus du site neutre chromosomique de la souche *Synechocystis* sp. PCC 6803. Ce locus correspond au gène *slr0168* qui sera substitué par les diverses cassettes de surexpression construites via le processus de recombinaison homologue. Le site neutre sélectionné correspond au locus [2300515-2302446] du chromosome et s'étend sur 1932 pb. La séquence complète sous le numéro d'accès GCA_000009725.1 de Genbank.

Le site neutre NS_slr0168 a déjà été très utilisé comme l'attestent de nombreuses publications (34 publications voir Cassier-Chauvat *et al.*, 2021). Quelques exemples : afin de mesurer la force d'un promoteur via le clonage d'un marqueur de fluorescence (GFP) et la mesure de l'intensité de fluorescence émise (Sebesta *et al.*, 2019). La cyanobactérie *Synechocystis* sp. PCC 6803 a également été manipulée génétiquement pour la production de 13R-manoyl oxide (13R-MO), un précurseur de la forskoline un diterpénoïde à forte valeur ajoutée. Les gènes codants pour les diterpènes synthases CfTPS2 et CfTPS3 (en tandem) qui catalysent la formation 13R-MO chez *Coleus forskohlii*, ont été intégrés au sein du site neutre NS_slr0168. Les résultats indiquent que l'intégration de la cassette d'expression au niveau du NS_slr0168 permet une expression stable et des titres de production allant jusqu'à 0,24 mg par g de biomasse sèche de 13R-MO (Lindberg *et al.*, 2015).

b) NS_pCA2.4 : site neutre du plasmide endogène pCA2.4

Le pCA2.4 (2378 pb) est l'un des petits plasmides endogènes du génome de *Synechocystis* sp. PCC 6803, maintenu de manière stable dans la cellule et à un niveau de copie jusqu'à 7 fois supérieur à celui du chromosome polyploïde (Armshaw *et al.*, 2015). Il est composé de deux phases codantes potentielles, l'ORF1 (1010 bp) et l'ORF2 (303 bp). L'ORF1 coderait pour la protéine RepA (NCBI-ProteinID : Q06465), une protéine de réplication jouant un rôle au niveau de la réplication de l'ADN (Yang et McFadden, 1993). L'ORF1 présente 52% d'identité avec la protéine Rep de *Tolypothrix bouteillei* (WP_038092011); 51% d'identité avec la protéine Rep (plasmide) de *Planktothrix agardhii* (CUM62448) et *Synechococcus* sp. PCC 8807 (ANV92011). L'ORF2 en revanche ne présente aucune similitude avec les séquences annotées dans la base de données NCBI.

Le locus NS_pCA2.4 qualifié de 'site neutre' sélectionné se situe entre les paires de bases 227 et 465 du plasmide endogène pCA2.4 (brin direct) de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (numéro d'accès Genbank CP003272), il s'étend sur 238 pb et se situe entre deux ORF codantes ORF1 ou RepA (brin direct) codant pour une protéine de réplication et ORF2 (brin complément) (Figure 87.). Après recombinaison homologue celui-ci sera substitué entièrement par la cassette d'expression intégrée.

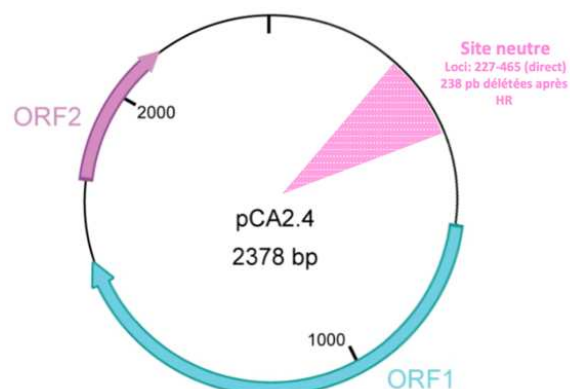


Figure 87. Carte du plasmide endogène pCA2.4 (2378bp) à la souche *Synechocystis* sp. PCC 6803

Le pCA2.4 est un plasmide endogène de 2,378 pb du génome de *Synechocystis* sp. PCC 6803 ; il est composé de 2 régions codantes représentées par des flèches de couleurs : ORF1 (1010bp, D) et ORF2 (303bp, D). Le segment circulaire en pointillés rose correspond au site neutre sélectionné sur le plasmide pCA2.4 pour recevoir les cassettes de surexpression via le processus de recombinaison homologue par transformation. Le site neutre sélectionné correspond au locus [227-465] du plasmide et s'étend sur 238pb, après recombinaison homologue ce loci sera substitué entièrement par la cassette intégrée. La

séquence complète du plasmide peut être retrouvée sous le numéro d'accès L13739 de Genbank. *D*, brin direct ; *C*, brin complémentaire, *HR*, recombinaison homologue.

Ce locus a déjà été utilisé à plusieurs reprises.

Afin d'étudier la faisabilité du système d'expression au sein du plasmide endogène pCA2.4, une cassette d'expression codant pour la protéine fluorescente jaune (YFP) sous le contrôle du promoteur P_{TRC} avait été intégrée au sein du site neutre NS_pCA2.4. Les résultats indiquent que l'expression est stable sur plusieurs générations (même avec suppression de la pression de sélection), la viabilité cellulaire de la souche mutante n'est pas entravée, et il est observé qu'en moyenne le niveau de fluorescence est de 20 (jour 6) à 100 (jour 14) fois plus élevé au niveau du système d'expression NS_pCA2.4 que par rapport à la souche témoin où la cassette est intégrée au niveau du site neutre NS_slr0168 chromosomique (Armshaw *et al.*, 2015).

Le nombre de copies du plasmide pCA2.4 par copie de chromosome diffère de manière significative en fonction du type trophique de culture implémenté et de la phase de croissance de la souche. Il est plus élevé en conditions mixotrophiques et en phase stationnaire. En effet, en conditions d'autotrophie, le rapport est de 0,75 en phase exponentielle et de 5,41 en phase stationnaire. En condition de mixotrophie (5 mM de glucose), il est de 6,26 et de 7,36 en phase exponentielle et stationnaire respectivement (voir tableau 10. Pour une comparaison des niveaux d'expression au sein de sites neutres de plasmides endogènes).

c) *NS_pCC5.2 : site neutre au niveau du plasmide endogène pCC5.2 de Synechocystis sp. PCC 6803*

Le pCC5.2 (5214 pb) est l'un des petits plasmides du génome de *Synechocystis sp. PCC 6803* ; il est composé de 6 régions codantes potentielles : *ORFa* (354 bp), *ORFb* (2916 bp), *ORFc* (282 bp), *ORFd* (276 bp), *ORFe* (306 bp, sur le brin complémentaire) et *ORFf* (294 bp, sur le brin complémentaire). Les *ORFa*, *ORFc* et *ORFf* sont annotées comme codant pour des protéines hypothétiques tandis que l'*ORFe* n'a pas d'annotation. L'*ORFb* présente une similitude de 39% avec un domaine de type TOPRIM qui suggère une fonction liée à la réplication de l'ADN (Jin *et al.*, 2018). Les homologies de séquences entre *ORFb* (pCC5.2) et *ORF1* (pCA2.4) suggèrent également que l'*ORFb* coderait pour la protéine de réplication Rep. L'*ORFd* quant à elle montre 38% de similarités de séquence avec une acyl-CoA synthétase.

Le locus NS_pCC5.2 qualifié de 'site neutre' sélectionné se situe entre les paires de bases 5137 et 2 du plasmide endogène pCC5.2 (brin direct) de *Synechocystis sp. PCC 6803* (numéro d'accès Genbank CP003272), il s'étend sur 80 pb et se situe entre deux ORF codantes *ORFd* (brin direct) et *ORFf* (brin complément) codants pour deux protéines hypothétiques (NCBI-ProteinID : AGF53824.1 et AGF53826.1 respectivement) (Figure 88.) Après recombinaison homologue ce locus est substitué entièrement par la cassette intégrée.

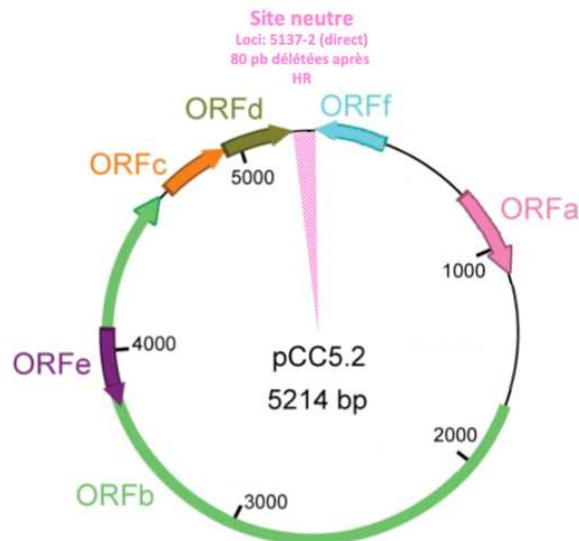


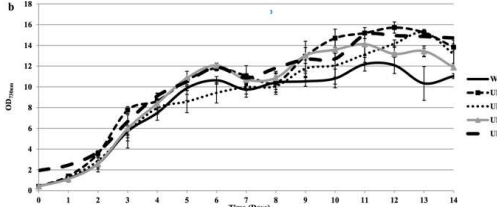
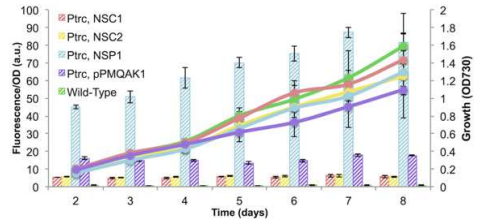
Figure 88. Carte du plasmide endogène pCC5.2 (5214 bp) de la souche *Synechocystis sp. PCC 6803*. Le pCC5.2 est un plasmide indigène de 5214 pb appartenant au génome de *Synechocystis sp. PCC6803* ; il est composé de 6 régions codantes représentées par des flèches de couleurs : ORFa (354bp, D), ORFb (2916bp, D), ORFc (282bp, D), ORFd (276bp, D), ORFe (306bp, C) et ORFf (294bp, C). Le segment circulaire en pointillés rose correspond au site neutre sélectionné (NSP1 = NS_pCC5.2) sur le plasmide pCC5.2 pour recevoir les cassettes d'expression via la recombinaison homologue par transformation naturelle. Le site neutre sélectionné correspond au locus [5137-2] du plasmide et s'étend sur 80pb, après recombinaison homologue ce locus sera substitué entièrement par la cassette intégrée. La séquence complète du plasmide peut être retrouvée sous le numéro d'accès CP003272 de Genbank. D, brin direct ; C, brin complémentaire, HR, recombinaison homologue.

Ce site neutre a déjà été utilisé dans plusieurs études.

Afin d'étudier la faisabilité du système d'expression au sein du plasmide endogène pCC5.2, une cassette d'expression codant pour la protéine fluorescente jaune (EYFP) sous le contrôle du promoteur P_{TRC} a été intégrée au sein du site neutre NS_pCC5.2 (NSP1) ainsi qu'au sein d'un plasmide répliatif pPMQAK1 et de 2 sites neutres chromosomiques de la souche *Synechocystis sp. PCC 6803* (Tableau 10.). Les résultats indiquent que la viabilité cellulaire de la souche mutante n'est pas entravée et que le niveau de fluorescence observé est environ 3 fois supérieur par rapport à celui obtenu si la cassette est portée par le plasmide répliatif et 8 à 14 fois supérieur à celui observé à partir de l'expression chromosomique aux sites neutre NSC1 et NSC2 (Ng *et al.*, 2015).

Ce site neutre (NSP1=NS_pCC5.2) a été également utilisé pour introduire une cassette d'expression codant pour la limonène synthase de *Mentha spicata* ou *Citrus limon* sous le contrôle du promoteur P_{TRC10}. Les résultats indiquent un niveau d'expression élevé pendant la phase stationnaire et conduisant ainsi à des niveaux plus élevés de production de limonène (Lin *et al.*, 2017).

Tableau 10. Comparaison des résultats phénotypiques de souches mutantes obtenues après intégration de cassettes d'expression au sein des sites neutres de 2 petits plasmides endogènes (pCA2.4 et pCC5.2) du génome de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

	NS_pCA2.4 du plasmide endogène pCA2.4	NS_pCC5.2 du plasmide endogène pCC5.2																																														
Cassette intégrée au sein du site neutre (SN)	P _{TRC} -YFP- Km ^r	P _{TRC10} -EYFP-Km ^r																																														
Rapport du nombre de copies du plasmide endogène par copie chromosomique	<p>Copy no./chromosome (mean ± SD)</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Replicon</th> <th colspan="2">Autotrophic</th> <th colspan="2">Mixotrophic</th> </tr> <tr> <th>Exponential</th> <th>Stationary</th> <th>Exponential</th> <th>Stationary</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>pSysA</td> <td>0.34 ± 0.00</td> <td>0.33 ± 0.00</td> <td>0.64 ± 0.01</td> <td>0.60 ± 0.01</td> </tr> <tr> <td>pSysG</td> <td>0.64 ± 0.01</td> <td>0.54 ± 0.01</td> <td>0.72 ± 0.02</td> <td>0.83 ± 0.01</td> </tr> <tr> <td>pSysM</td> <td>0.33 ± 0.00</td> <td>0.31 ± 0.00</td> <td>0.69 ± 0.01</td> <td>0.49 ± 0.01</td> </tr> <tr> <td>pSysX</td> <td>0.65 ± 0.01</td> <td>0.66 ± 0.01</td> <td>1.24 ± 0.02</td> <td>1.09 ± 0.01</td> </tr> <tr> <td>pCA2.4</td> <td>0.75 ± 0.01</td> <td>5.41 ± 0.10</td> <td>6.26 ± 0.06</td> <td>7.39 ± 0.09</td> </tr> <tr> <td>pCB2.4</td> <td>0.40 ± 0.00</td> <td>2.46 ± 0.02</td> <td>3.74 ± 0.04</td> <td>2.68 ± 0.02</td> </tr> <tr> <td>pCC5.2</td> <td>0.93 ± 0.01</td> <td>3.72 ± 0.04</td> <td>6.02 ± 0.05</td> <td>7.33 ± 0.07</td> </tr> </tbody> </table> <p>Comparaison des effets des types trophiques et phases de croissance sur le nombre de copies de différents plasmides endogènes par copies de chromosome de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803. (Tableau extrait de Berla <i>et al.</i>, 2012)</p>				Replicon	Autotrophic		Mixotrophic		Exponential	Stationary	Exponential	Stationary	pSysA	0.34 ± 0.00	0.33 ± 0.00	0.64 ± 0.01	0.60 ± 0.01	pSysG	0.64 ± 0.01	0.54 ± 0.01	0.72 ± 0.02	0.83 ± 0.01	pSysM	0.33 ± 0.00	0.31 ± 0.00	0.69 ± 0.01	0.49 ± 0.01	pSysX	0.65 ± 0.01	0.66 ± 0.01	1.24 ± 0.02	1.09 ± 0.01	pCA2.4	0.75 ± 0.01	5.41 ± 0.10	6.26 ± 0.06	7.39 ± 0.09	pCB2.4	0.40 ± 0.00	2.46 ± 0.02	3.74 ± 0.04	2.68 ± 0.02	pCC5.2	0.93 ± 0.01	3.72 ± 0.04	6.02 ± 0.05	7.33 ± 0.07
Replicon	Autotrophic		Mixotrophic																																													
	Exponential	Stationary	Exponential	Stationary																																												
pSysA	0.34 ± 0.00	0.33 ± 0.00	0.64 ± 0.01	0.60 ± 0.01																																												
pSysG	0.64 ± 0.01	0.54 ± 0.01	0.72 ± 0.02	0.83 ± 0.01																																												
pSysM	0.33 ± 0.00	0.31 ± 0.00	0.69 ± 0.01	0.49 ± 0.01																																												
pSysX	0.65 ± 0.01	0.66 ± 0.01	1.24 ± 0.02	1.09 ± 0.01																																												
pCA2.4	0.75 ± 0.01	5.41 ± 0.10	6.26 ± 0.06	7.39 ± 0.09																																												
pCB2.4	0.40 ± 0.00	2.46 ± 0.02	3.74 ± 0.04	2.68 ± 0.02																																												
pCC5.2	0.93 ± 0.01	3.72 ± 0.04	6.02 ± 0.05	7.33 ± 0.07																																												
Résultats de fluorescence entre l'expression au sein de SN sur les plasmides endogènes par comparaison avec les SN sur le chromosome	Fluorescence YFP : Jour 6, +Km : >15X Jour 14, +Km : 100X	Fluorescence YFP : Jour 6, +Km : 15X Jour 14, +Km : pas de données																																														
Phénotype de croissance	<p>Pas d'effets d'inhibition de croissance observés (voir figure). Les souches UL006 (insertion de P_{trc}-YFP au SN chromosomique) et UL018 (insertion de P_{trc}-YFP au SN pCA2.4) ont la même croissance que la souche WT.</p> 	<p>L'expression de EYFP depuis les 4 différents locus ne produit aucunes différences de croissance.</p>  <p>(NSP1 = NS_pCC5.2 ; NSC1 et NSC2 = sites neutres chromosomiques ; pPMQAK1 = plasmide répliatif non endogène)</p>																																														

L'utilisation des cyanobactéries comme usines cellulaires microbiennes pour la production de molécules d'intérêt pousse à utiliser des nouvelles stratégies d'ingénierie métabolique et de biologie synthétique les plus favorables à la maximisation de la production.

Dans le cas du châssis cyanobactérien *Synechocystis* sp. PCC 6803, le choix s'est porté sur l'intégration de cassette d'expression de gènes hétérologues au niveau de 3 sites neutres localisés à différents endroits du génome de la souche (plasmides endogènes et chromosome).

De par l'étude bibliographique portée sur l'influence de la localisation génomique des sites neutres sur le niveau d'expression de cassettes hétérologues et les résultats du laboratoire quant à la production de molécules d'intérêt, il résulte que les plasmides endogènes comme pCA2.4 ou pCC5.2 s'avèrent être les matrices les plus avantageuses pour l'intégration de cassette d'expression hétérologue. Le nombre de copies des plasmides endogènes est bien plus conséquent que le nombre de copies chromosomique et accru en phase stationnaire, phase au niveau de laquelle les produits d'intérêt sont métabolisés (tandis que la production de biomasse intervient en phase exponentielle).

2) NSI_7942 : site neutre au niveau du chromosome de *Synechococcus* sp. PCC 7942

Le locus NSI_7942 qualifié de 'site neutre' sélectionné se situe entre les positions 2578661 et 2578662 du chromosome polyploïde (brin complément) de *Synechococcus* sp. PCC 7942 (numéro d'accès Genbank CP000100). Il est implanté au sein de l'ORF SYNPC7942_RS12675 codant pour une protéine membranaire, la flotillin (NCBI-ProteinID : ABB58528) (Figure 89.).

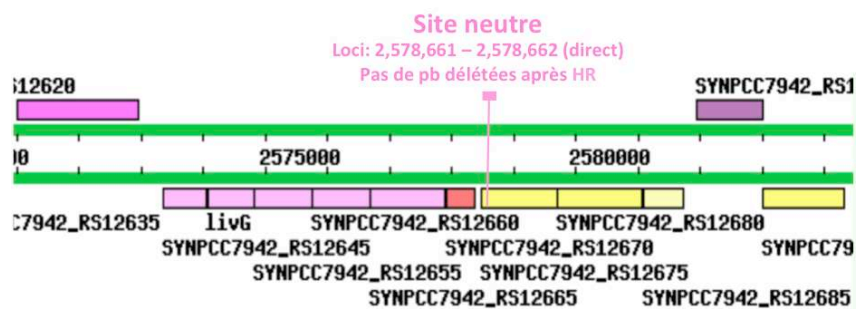


Figure 89. Carte de la région génomique portant le loci du site neutre chromosomique sélectionné de la souche *Synechococcus* sp. PCC 7942

Le segment indiqué en rose correspond au site neutre sélectionné au sein du chromosome de la souche *Synechococcus* sp. PCC 7942 ; il se situe entre les paires de bases [2578661-2578662] du chromosome ; ainsi après recombinaison homologue, les cassettes construites seront intégrées au loci sans aucune délétion. La séquence complète du génome de *Synechococcus* sp. PCC 7942 est accessible sous le numéro Genbank: CP000100. HR, recombinaison homologue.

Ce site neutre a déjà été utilisé en permettant une expression stable de cassette d'expression de gènes hétérologues pour la production de molécules d'intérêt :

Des plateformes de biologie synthétique telles que Synebricks vectors (Kim *et al.*, 2017) ou bien Cyanogate (Vasudevan *et al.*, 2019) dérivé du MoClo (plantes) ou encore des vecteurs de clonage tel que le plasmide pCV0035 (Taton *et al.*, 2014) y ont inclus le site neutre NSI_7942 comme locus standardisé de clonage.

Une production finale d'acétone de 10 mg/L a été implémentée au sein d'une souche pour laquelle les gènes codant pour la voie de production de l'acétone (à partir de l'acétyl-CoA) ont été clonés au sein de ce site (Chwa *et al.*, 2016).

Un système de régulation (*araBAD*) combiné à une cassette d'expression de la protéine fluorescente mtGFP via un promoteur inductible p_{BAD} a été implémenté au sein du site neutre NSI_7942. L'addition de L-arabinose (inducteur) contrôle l'expression de la cassette, dont l'expression se révèle linéaire et homogène. L'ajout d'une seconde voie métabolique hétérologue (*E. coli*) permettant la dégradation de L-arabinose en xylulose-5-phosphate assimilable par la voie des pentoses phosphate est intégrée au sein d'un autre site neutre du

chromosome de *Synechococcus* sp. PCC 7942 (NSII_7942) ; ces deux voies intégrées aux sites neutres permettent *in fine* une augmentation de la biomasse de la souche modifiée. (Cao *et al.*, 2017)

Trois gènes codants pour des transporteurs de glucose provenant de trois espèces différentes (*GlcP* de *Synechocystis* sp. PCC 6803, *GalP* de *E. coli* et *Glut1* d'érythrocytes humains) sous le contrôle du promoteur inductible P_{TRC} (IPTG), ont été clonés au sein du NSI_7942 afin d'instaurer une croissance continue de la souche sous des conditions diurnales (jour/nuit) et ainsi convertir une souche photoautotrophe en hétérotrophe. Les résultats indiquent que l'expression hétérologue de la *GalP* d'*E. coli* au sein du NSI_7942 est un succès, la viabilité cellulaire de la souche mutante n'est pas entravée et la localisation du transporteur dans la membrane de *Synechococcus* sp. PCC 7942 permet un transport efficace du glucose dans la cellule (McEwen *et al.*, 2013).

Enfin les sites neutres chromosomiques de *Synechococcus* sp. PCC 7942 ont été utilisés pour l'expression hétérologue de la farnésène synthase (FS) de la pomme (*Malus domestica*) (NSII_7942) pour la production d' α -farnésène. Afin d'améliorer la production, les gènes *dxs-idi-ispA* codant pour des enzymes de la voie du méthylérythritol phosphate (MEP) ont été introduits au sein du site neutre NSI_7942 pour fournir l'intermédiaire farnésyl-pyrophosphate (FPP) à partir du glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P) et pyruvate. Les résultats indiquent que l'expression hétérologue de la FS de *Malus domestica* combinée à l'expression de la voie MEP au sein des sites neutres est un succès, la viabilité cellulaire de la souche mutante n'est pas entravée et la production atteint $4,6 \pm 0.4$ mg/L en 7 jours (Lee *et al.*, 2017).

3) NSI_7002 : site neutre au niveau du chromosome de *Synechococcus* sp. PCC 7002

Le locus NSI_7002 se situe entre les paires de bases 965960 et 966310 du chromosome de *Synechococcus* sp. PCC 7002 (voir le numéro d'accès Genbank CP000951). Il s'étend sur 350 pb et est implanté entre deux phases codantes : ORF SYNPC7002_A0935 (NCBI-ProteinID : ACA98939) sur le brin direct et SYNPC7002_A0936 (NCBI-ProteinID : ACA98940) sur le brin complémentaire, codants pour des protéines hypothétiques (Figure 90.).

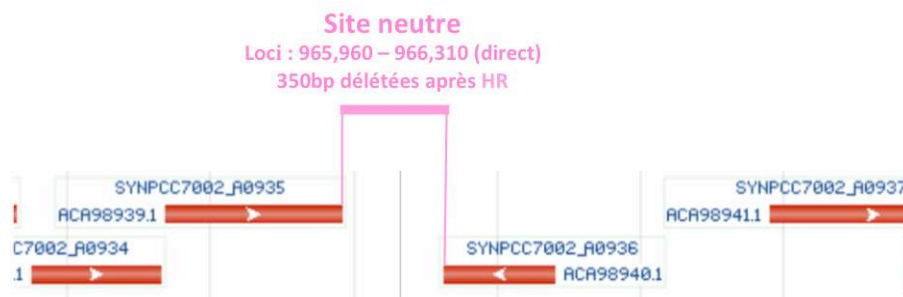


Figure 90. Carte de la région génomique portant le loci du site neutre chromosomique sélectionné de la souche *Synechococcus* sp. PCC 7002

Le segment indiqué en rose correspond au site neutre sélectionné au sein du chromosome de la souche *Synechococcus* sp. PCC 7002 ; son loci se situe entre les paires de bases [965960-966310] du chromosome et s'étend sur 350pb ; après recombinaison homologue ce loci sera substitué entièrement par la cassette intégrée. La séquence complète du génome de *Synechococcus* sp. PCC 7002 peut être retrouvée sous numéro d'accès GenBank CP000951. HR, recombinaison homologue.

Ce site neutre a déjà été utilisé dans la littérature pour l'expression d'une cassette de résistance à la kanamycine (Vogel *et al.*, 2017). L'article compare les différences de croissance entre trois souches dans lesquelles la cassette a été intégrée au sein de *loci* différents dits 'sites neutres' (dont celui utilisé dans cette étude). Les résultats ne montrent aucune différence de croissance au niveau des souches. L'interférence de l'expression de la cassette de kanamycine au niveau du site neutre NSI_7002 de l'étude notamment n'affectant pas la viabilité cellulaire.

Le site neutre NSI_7002 a notamment été utilisé pour la surproduction de terpènes synthases : la limonène synthase (production de 4 mg/L de limonène) et bisabolène synthase (production de 0,6 mg/L d' α -bisabolène) (Davies *et al.*, 2014). L'intégration de cassettes d'expression au niveau de ce site neutre n'affecte pas la viabilité cellulaire de la souche, et n'engendre pas de phénotypes différant de la souche sauvage ; en effet, les taux de croissance (mesurés par l'accumulation de biomasse et de chlorophylle) sont comparables entre la souche sauvage et la souche contrôle (intégration d'une cassette d'expression de la protéine fluorescente YFP au niveau du site neutre).

B. Design des cassettes d'expression pour l'intégration de gènes hétérologues au niveau de sites neutres

1) Stratégie

L'ensemble des clonages pour l'intégration de gènes hétérologues ont été réalisés par assemblage Gibson (en une seule réaction, voir matériels et méthodes) à chaque fois entre un fragment d'ADN portant un promoteur fort et constitutif contrôlant le gène codant pour une terpène synthase, ainsi qu'un cassette de résistance à la kanamycine – et le plasmide plateforme préalablement linéarisé au niveau d'un site de restriction entre les régions amont et aval correspondant aux plateformes s'alignant de part et d'autre des sites neutres des différents châssis cyanobactériens (voir Figure 91.).

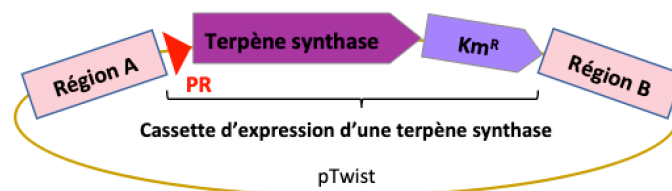


Figure 91. Schéma représentatif d'une cassette d'expression d'un gène codant pour une terpène synthase qui s'intégrera par recombinaison homologue au niveau de plateformes d'homologies de sites neutres ciblés

Le plasmide pTwist (Twist Bioscience®) porte une cassette d'expression d'un gène codant une terpène synthase. Il ne se réplique pas au sein des cyanobactéries (vecteur suicide). Le *pR* désigne un promoteur fort, Km^R la cassette de résistance à l'antibiotique kanamycine, et les régions A et B représentent les régions d'homologies amont et aval au site neutre génomique ciblé (pour recombinaison homologue après transformation au sein d'un châssis cyanobactérien).

L'ensemble des plasmides résultant de l'assemblage Gibson sont ensuite introduits par transformation au sein de *E. coli*, permettant de les amplifier et d'obtenir également des ADN méthylés pour pouvoir ensuite intégrer aux sites neutres ciblés, les cassettes d'expression par transformation naturelle (Tableau 11). De cette manière après recombinaison homologue, les *loci* des différents sites neutres seront substitués par les cassettes d'expression clonées entre les plateformes d'homologies des différents vecteurs élaborés.

Tableau 11. Tableau récapitulatif des 13 souches d'*E. coli* obtenues après transformation avec les plasmides portant des cassettes d'expression de gènes codants pour diverses terpènes synthase et les plateformes d'homologies de sites neutres de 3 souches modèles de cyanobactéries.

Abréviations : **Scy6803** = *Synechocystis* sp. PCC 6803, **Sco7942** = *Synechococcus* sp. PCC 7942 et **Sco7002** = *Synechococcus* sp. PCC 7002, **FS** = farnésène synthase, **BS** = bisabolène synthase, **SS** = santalène synthase, **LS** = limonène synthase.

Châssis	Terpènes synthase exprimées	Cassettes d'expression portées dans les sites neutres				
		Site neutre Scy6803			Site neutre Sco7942	Site neutre Sco7002
		slr0168	pCC5.2	pCA2.4	NS-S7942	NS-S7002
<i>E. coli</i>	FS	Oui	Oui	Oui	Oui	
	BS	Oui	Oui	Oui		
	LS					Oui
	SS	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui

2) Design des plasmides plateformes pour les 5 sites neutres sélectionnés

Dans un premier temps, le design des fragments d'ADN correspondant aux régions flanquantes (amonts et avalés) des divers sites neutres a été réalisé puis les plasmides plateformes synthétiques commandés chez Twist Biosciences™ (Figure 92.).

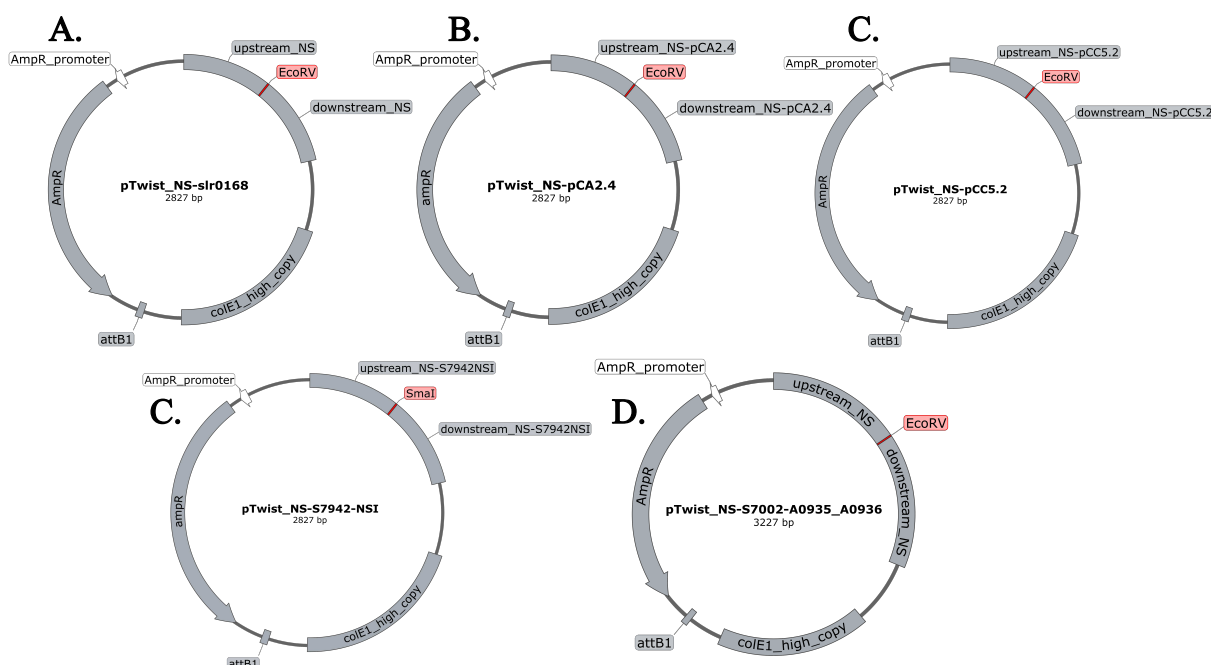


Figure 92. Représentation schématique des plasmides plateformes (avec gènes synthétiques) commandés à TwistBiosciences™

Les plasmides plateformes se composent des plasmides pTwist (TwistBiosciences™ ; medium copy number) dans lesquels ont été clonés les plateformes d'homologies amont et avalés des 5 différents sites neutres ciblés avec un site de restriction (*EcoRV* ou *SmaI*, surligné en rouge) séparant les régions amont et avalés : (A.) le site neutre chromosomique *slr0168* de *Synechocystis* sp. PCC 6803 et le site de restriction *EcoRV* (B.) le site neutre du plasmide endogène pCA2.4 de *Synechocystis* sp. PCC 6803 et

(C.) le site neutre du plasmide endogène pCC5.2 de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (D.) le site neutre chromosomique de *Synechococcus* sp. PCC 7942 (E.) le site neutre chromosomique de *Synechococcus* sp. PCC 7002.

3) Design des cassettes d'expression de la santalène synthase au sein des 5 sites neutres sélectionnés

Pour l'assemblage par Gibson des 5 cassettes d'expression permettant l'expression de la santalène synthase (SS) sous contrôle d'un promoteur fort (pR) combiné à une cassette de résistance à la kanamycine (Km^R) au sein des 5 sites neutres slr0168, pCA2.4, pCC5.2, NSI-S7942 et NS-S7002, des amplifications PCR avec des primers spécifiques ont été réalisées (Figure 93.).

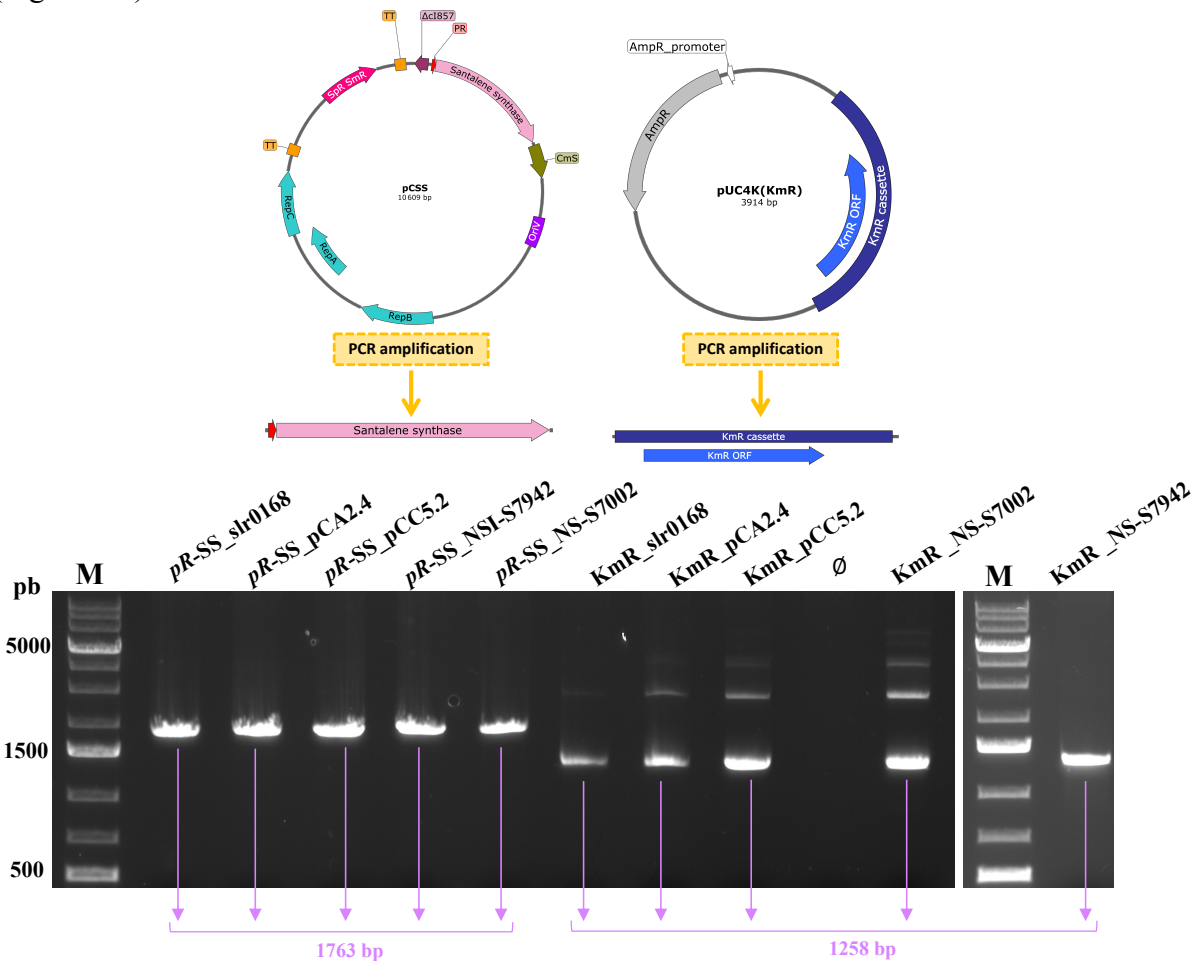


Figure 93. Amplification PCR spécifiques des biobricks pR -SS et Km^R -SS pour chaque site neutre pour assemblage GIBSON

Les biobricks pR -SS correspondent aux gènes codants pour la santalène synthase exprimées avec le promoteur fort pR et les biobricks Km^R -SS correspondent aux gènes codant pour la cassette de résistance à la kanamycine. 5 biobricks pR -SS et 5 biobricks Km^R sont amplifiées respectivement à partir des plasmides pCSS et pUC4K (voir panel du haut) avec des primers spécifiques pour l'assemblage Gibson et la construction des cassettes d'expression. De gauche à droite, les biobricks pR -SS_slr0168, pR -SS_pCA2.4, pR -SS_pCC5.2, pR -SS_NSI-S7942 et pR -SS_NS-S7002 ont été amplifiées respectivement avec les primers Pr_SS_fwd_NS-sl0168 et Pr_SS_rev_SS-Km, Pr_SS_fwd_NS-pCA2.4 et Pr_SS_rev_SS-Km, Pr_ss_fwd_NS-pCC5.2 et Pr_SS_rev_SS-Km, Pr_SS_fwd_NS-S7942 et Pr_SS_rev_SS-Km, Pr_SS_fwd_NS-S7002 et Pr_SS_rev_SS-Km. Les biobricks KmR_slr0168, KmR_pCA2.4, KmR_pCC5.2, KmR_NSI-S7942 et KmR_NS-S7002 ont été amplifiées respectivement avec les primers KmR_fwd_SS-Km et KmR_rev_NS-sl0168, KmR_fwd_SS-Km et KmR_rev_NS-

pCA2.4, KmR_fwd_SS-Km et KmR_rev_NS-pCC5.2 , KmR_fwd_SS-Km et KmR_rev_NS-S7942 , KmR_fwd_SS-Km et KmR_rev_NS-S7002. Le marqueur de poids moléculaire (M) = 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Les 5 cassettes d'expressions ont été obtenues après transformation au sein des châssis *E. coli* et le clonage des différentes biobricks et leurs séquences ont été vérifiées par amplification PCR et séquençages (Figure 94. Ci-dessous).

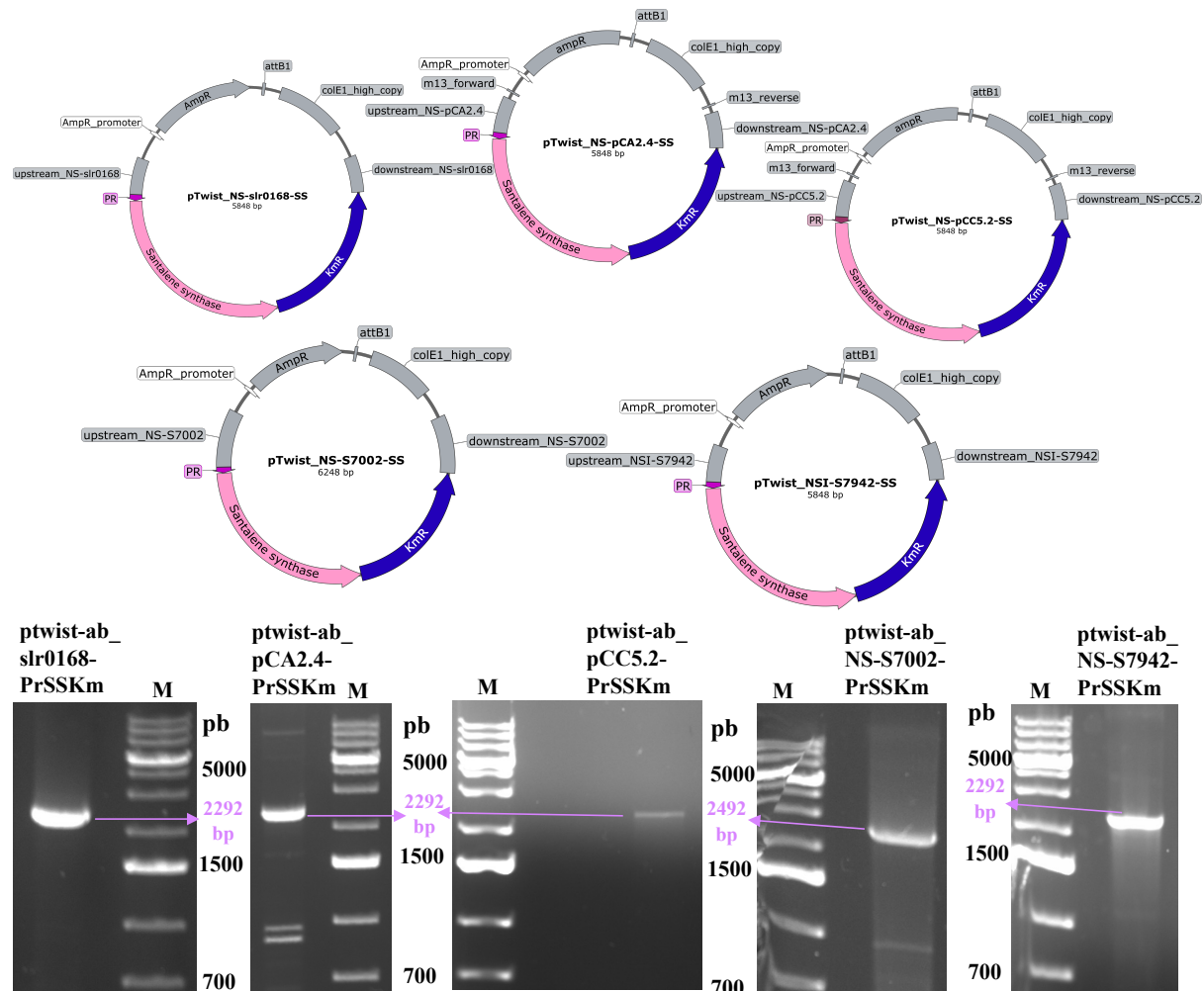


Figure 94. Représentation des cassettes d'expression permettant l'expression du gène codant pour la santalène synthase au sein des 5 sites neutres sélectionnés et leurs vérifications par PCR amplification. Les cassettes permettant l'expression de la santalène synthase au sein des 5 sites neutres sélectionnés ont été obtenues par transformation dans les châssis *E. coli*, après assemblage Gibson : pTwist-ab-slr0168-pR-SS-Km, pTwist-ab-pCA2.4-pR-SS-Km, pTwist-ab-pCC5.2-pR-SS-Km, pTwist-ab-NS-S7002-pR-SS-Km, pTwist-ab-NS-S7942-pR-SS-Km. Le panel du bas présente la vérification du clonage des différentes cassettes d'expression par amplification PCR colonie d'*E. coli* avec les amorces M13_Fwd et KmA9_For, s'appuyant respectivement en amont de la plateforme d'homologie amont et au niveau de l'ORF Km^R. Le marqueur de poids moléculaire (M) = 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

4) Design des cassettes d'expression de la limonène synthase au sein du site neutre de *Synechococcus sp. PCC 7002*

Pour l'assemblage par Gibson de la cassette d'expression permettant l'expression du gène codant pour la limonène synthase (LS) à partir un promoteur fort (*pR*) combiné à une cassette de résistance à la kanamycine (Km^R) au sein du site neutre NS-S7002, des amplifications PCR avec des primers spécifiques ont été réalisées (Figure 95. ci-dessous).

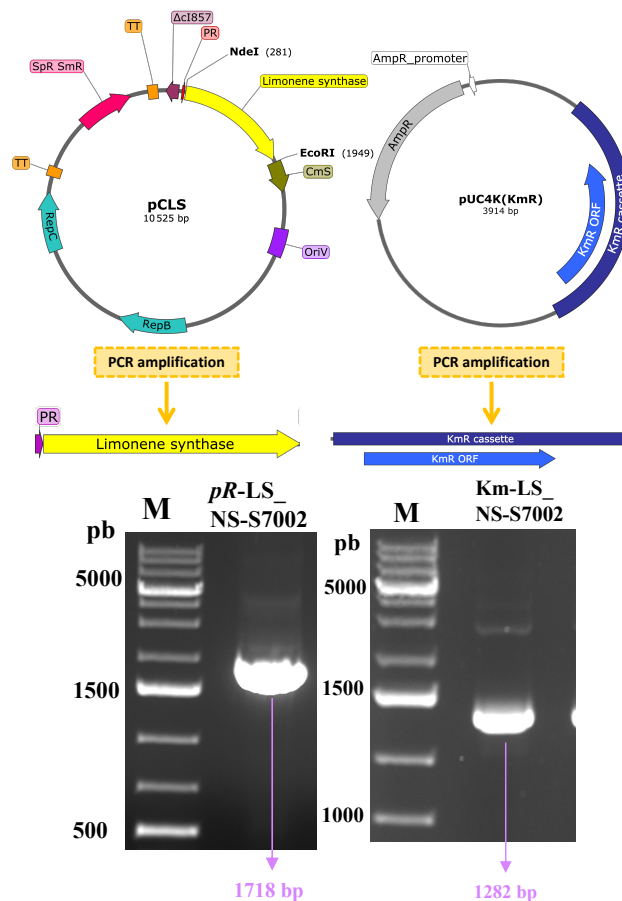


Figure 95. Amplification PCR spécifiques des biobricks *pR-LS* et Km^R -*LS* pour le site neutre chromosomique de *Synechococcus sp. PCC 7002* pour assemblage Gibson

La biobrick *pR-LS* correspond au gène codant pour la limonène synthase à partir du promoteur fort *pR* et la biobrick Km^R -*LS* correspond au gène codant pour la cassette de résistance à la kanamycine. Les biobricks *pR-LS* et Km^R -*LS* sont amplifiées respectivement à partir des plasmides pCLS et pUC4K avec des primers spécifiques pour l'assemblage Gibson et la construction de la cassette d'expression. De gauche à droite, les biobricks *pR-LS*_NS-S7002 et Km -*LS*_NS-S7002 ont été amplifiées respectivement avec les primers Pr-fwd-7002 et Pr-LS-rev, Km-LS-fwd et Km-rev-7002. Le marqueur de poids moléculaire (M) = 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Une cassette d'expression a été obtenue après transformation au sein du châssis *E. coli* et le clonage des différentes biobricks et leurs séquences ont été vérifiées par amplification PCR et séquençages (Figure 96.).

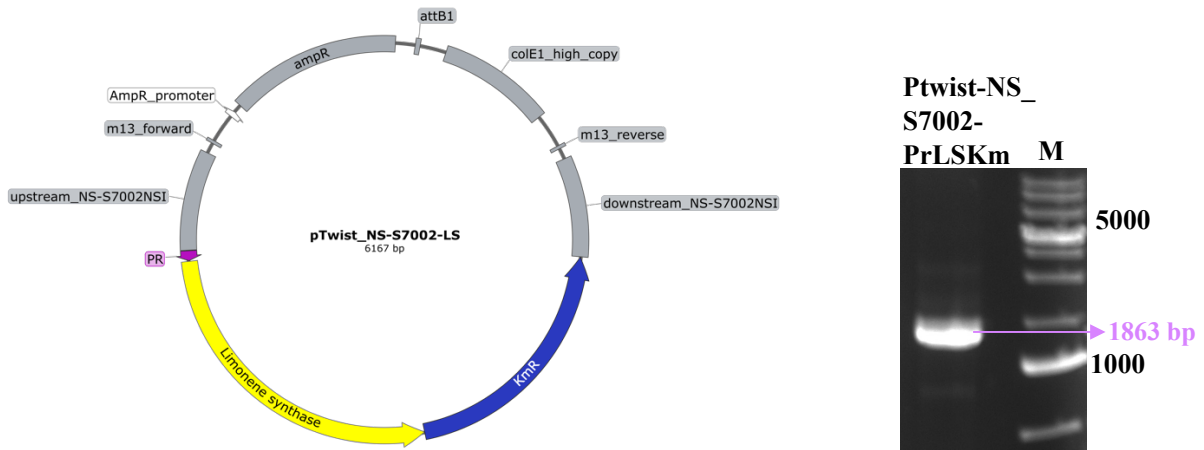


Figure 96. Représentation de la cassette permettant l'expression du gène codant pour la limonène synthase au sein du site neutre NS-S7002 et vérification par amplification PCR

La figure de gauche présente la cassette d'expression permettant l'expression de la limonène synthase après intégration au sein du site neutre NS-S7002. Elle a été obtenue par transformation dans le châssis *E. coli*, après assemblage Gibson : pTwist_NS-S7002-LS. La figure de droite présente la vérification du clonage de la cassette d'expression *pR-LS Km* pTwist_NS-S7002-LS par amplification PCR colonie d'*E. coli* avec les amorces Pr-LS_fwd-S7002 et KmA9_for. Le marqueur de poids moléculaire (M) = 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

5) Design des cassettes d'expression du gène codant pour la farnésène synthase au sein de sites neutres de *Synechocystis* sp. PCC 6803 et *Synechococcus* sp. PCC 7942

Pour l'assemblage par Gibson des 4 cassettes d'expression permettant l'expression de la farnésène synthase (FS) sous un promoteur fort (*pR*) combiné à une cassette de résistance à la kanamycine (Km^R) au sein des 4 sites neutres *slr0168*, *pCA2.4*, *pCC5.2* et *NSI-S7942*, des amplifications PCR avec des primers spécifiques ont été réalisées (Figure 97).

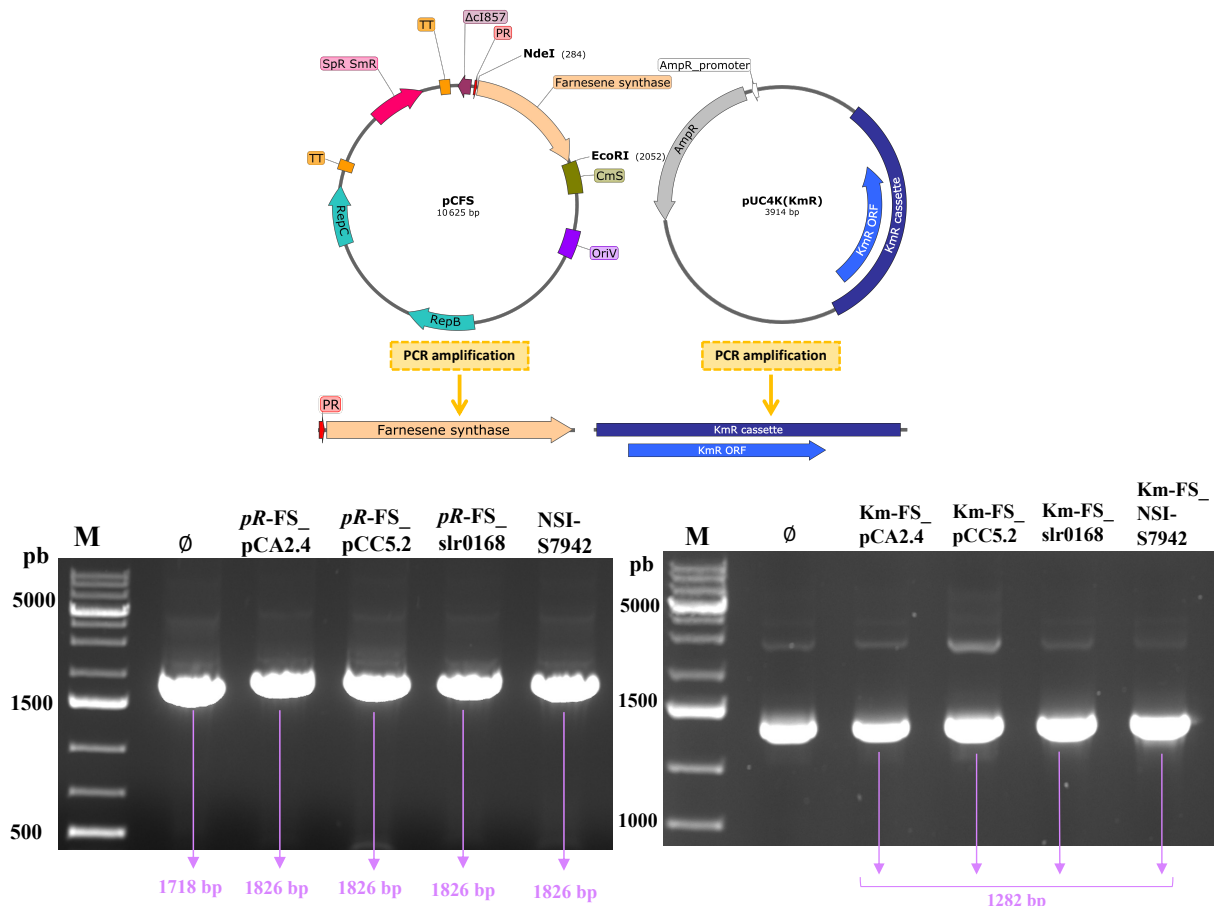


Figure 97. Amplification PCR spécifiques des biobricks *pR-FS* et Km^R -*FS* pour chaque site neutre pour l'assemblage Gibson

Les biobricks *pR-FS* correspondent aux gènes codant pour la farnésène synthase exprimés avec le promoteur fort *pR* et les biobricks Km^R -*FS* correspondent aux gènes codant pour la cassette de résistance à la kanamycine. 3 biobricks *pR-FS* et 3 biobricks Km^R -*FS* sont amplifiées respectivement à partir des plasmides *pCFS* et *pUC4K* avec des primers spécifiques pour l'assemblage Gibson et la construction des cassettes d'expression. De gauche à droite, les biobricks *pR-FS_pCA2.4*, *pR-FS_pCC5.2*, *pR-FS_slr0168* et *pR-FS_NSI-S7942* ont été amplifiées respectivement avec les primers Pr-fwd-6803-pCA2.4 et Pr-FS-rev, Pr-fwd-6803-pCC5.2 et Pr-FS-rev, Pr-fwd-6803-sl0168 et Pr-FS-rev, Pr-fwd-7942 et Pr-FS-rev. Les biobricks *Km-FS_pCA2.4*, *Km-FS_pCC5.2*, *Km-FS_slr0168* et *Km-FS_NSI-S7942* ont été amplifiées respectivement avec les primers *Km-FS-fwd* et *Km-rev-6803-pCA2.4*, *Km-FS-fwd* et *Km-rev-6803-pCC5.2*, *Km-FS-fwd* et *Km-rev-6803-sl0168*, *Km-FS-fwd* et *Km-rev-7942*.

Les 4 cassettes d'expressions ont été obtenues après transformation au sein des châssis *E. coli* et le clonage des différentes biobricks et leurs séquences ont été vérifiées par amplification PCR et séquençages (Figure 98).

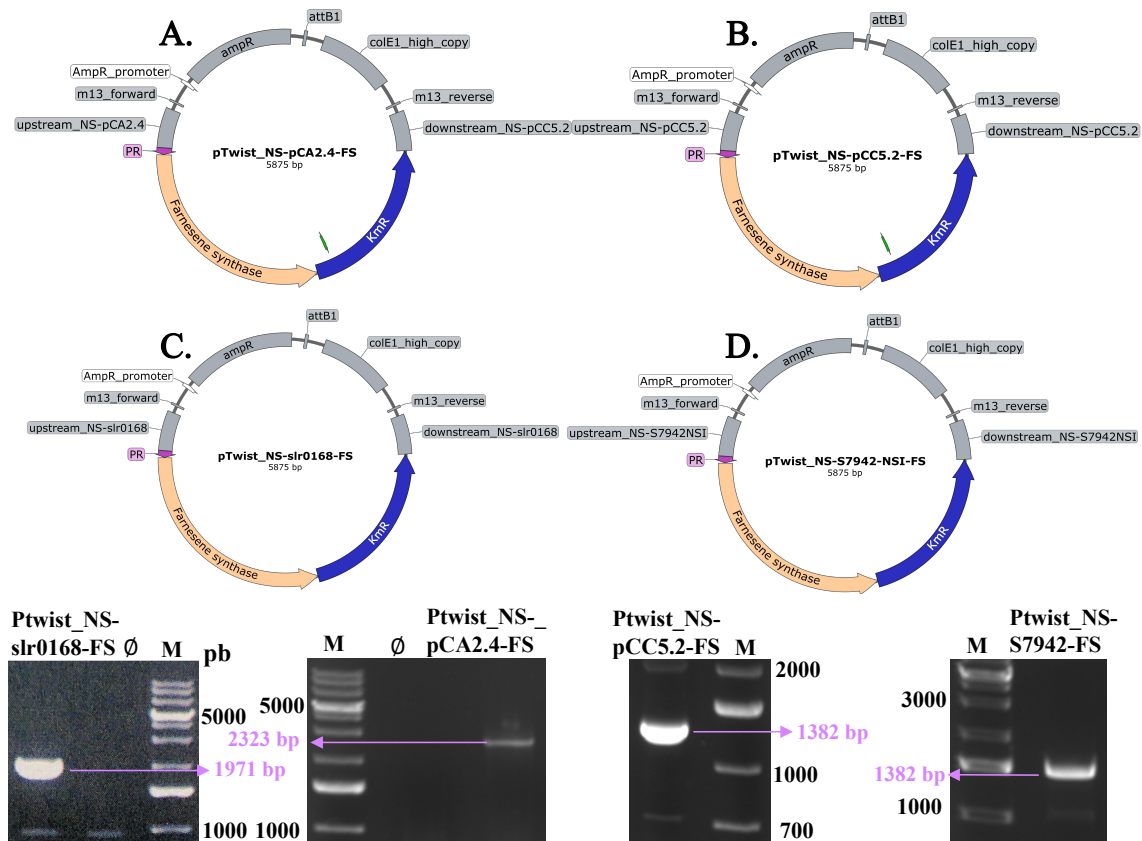


Figure 98. Représentation de la cassette permettant l'expression du gène codant la farnésène synthase au sein des sites neutres sélectionnés et leurs vérifications par PCR amplification

Les cassettes permettant l'expression du gène codant pour la farnésène synthase au sein des sites neutres **(A.)** pCA2.4 : pTwist-ab-NS-pCA2.4-FS, **(B.)** pCC5.2 : pTwist-ab-NS-pCC5.2-FS **(C.)** slr0168 : pTwist-ab-NS-slrl0168-FS **(D.)** NS-S7002 : pTwist-ab-NSI-S942-FS ont été obtenues par transformation dans le châssis *E. coli*, après assemblage Gibson. Le panel du bas présente les amplifications par PCR colonies d'*E. coli* pour vérification des 4 cassettes d'expression cibles *pR*-SS-Km clonées dans les 4 plasmides plateformes pTwist différents sont montrés par les gels de gauche à droite pour les cassettes d'expression pTwist_NS-slrl0168-FS, pTwist_NS-pCA2.4-FS, pTwist_NS-pCC5.2-FS et pTwist-NS-S7942-FS, respectivement avec les amorces Pr_FS_fwd_slrl0168 et KmA9_for, M13_fwd et KmA9_for, FS_fwd_2 et KmA9_for, et enfin FS_fwd_2 et KmA9_for. Le marqueur de poids moléculaire (M) = 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

6) Design des cassettes d'expression de la bisabolène synthase au sein des 3 sites neutres sélectionnés de *Synechocystis* sp. PCC 6803

Pour l'assemblage par Gibson des 3 cassettes permettant l'expression du gène codant pour la bisabolène synthase (BS) à partir du promoteur fort (pR) et portant une cassette de résistance à la kanamycine (Km^R) au sein des 3 sites neutres *slr0168*, *pCA2.4* et *pCC5.2*, des amplifications PCR avec des primers spécifiques ont été réalisées (Figure 99.).

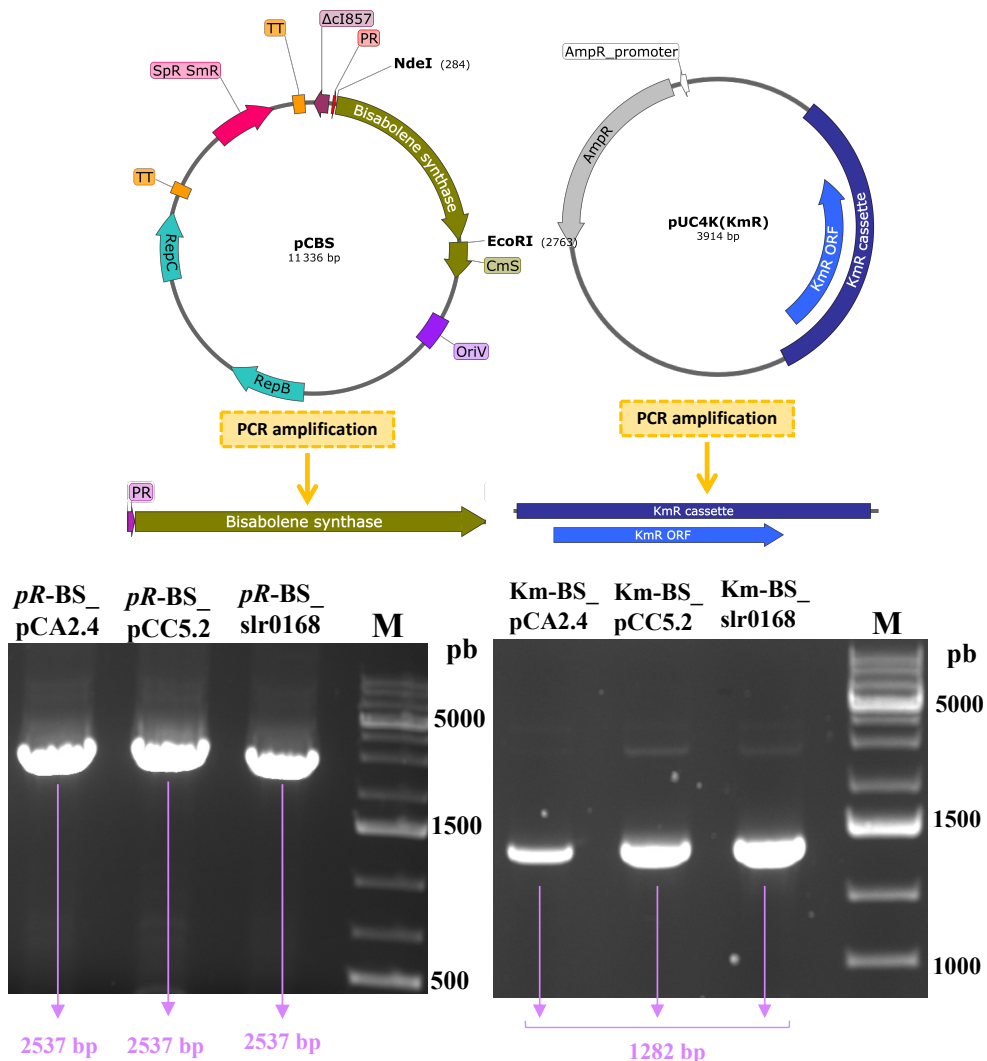


Figure 99. Amplification PCR spécifiques des biobricks pR -BS et Km^R -BS pour chaque site neutre pour assemblage Gibson

Les biobricks pR -BS correspondent aux gènes codant pour la bisabolène synthase exprimés avec le promoteur fort pR et les biobricks Km^R -BS correspondent aux gènes codant pour la cassette de résistance à la kanamycine. 3 biobricks pR -BS et 3 biobricks Km^R -BS sont amplifiées respectivement à partir des plasmides pCBS et pUC4K avec des primers spécifiques pour l'assemblage Gibson et la construction des cassettes d'expression. De gauche à droite, les biobricks pR -BS_ *pCA2.4*, pR -BS_ *pCC5.2* et pR -BS_ *slr0168* ont été amplifiées respectivement avec les primers Pr-fwd-6803-*pCA2.4* et Pr-BS-rev, Pr-fwd-6803-*pcc5.2* et Pr-BS-rev, Pr-fwd-6803-*slr0168* et Pr-BS-rev. Les biobricks Km -BS_ *pCA2.4*, Km -BS_ *pCC5.2* et Km -BS_ *slr0168* ont été amplifiées respectivement avec les primers Km -BS-fwd et Km -rev-6803-*pCA2.4*, Km -BS-fwd et Km -rev-6803-*pcc5.2*, Km -BS-fwd et Km -rev-6803-*slr0168*. Le marqueur de poids moléculaire (M) = 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Les 3 cassettes d'expressions ont été obtenues après le clonage des différents biobricks et introduction par transformation au sein d'*E. coli*. Leurs séquences ont été vérifiées par amplification PCR et séquençages (Figure 100.).

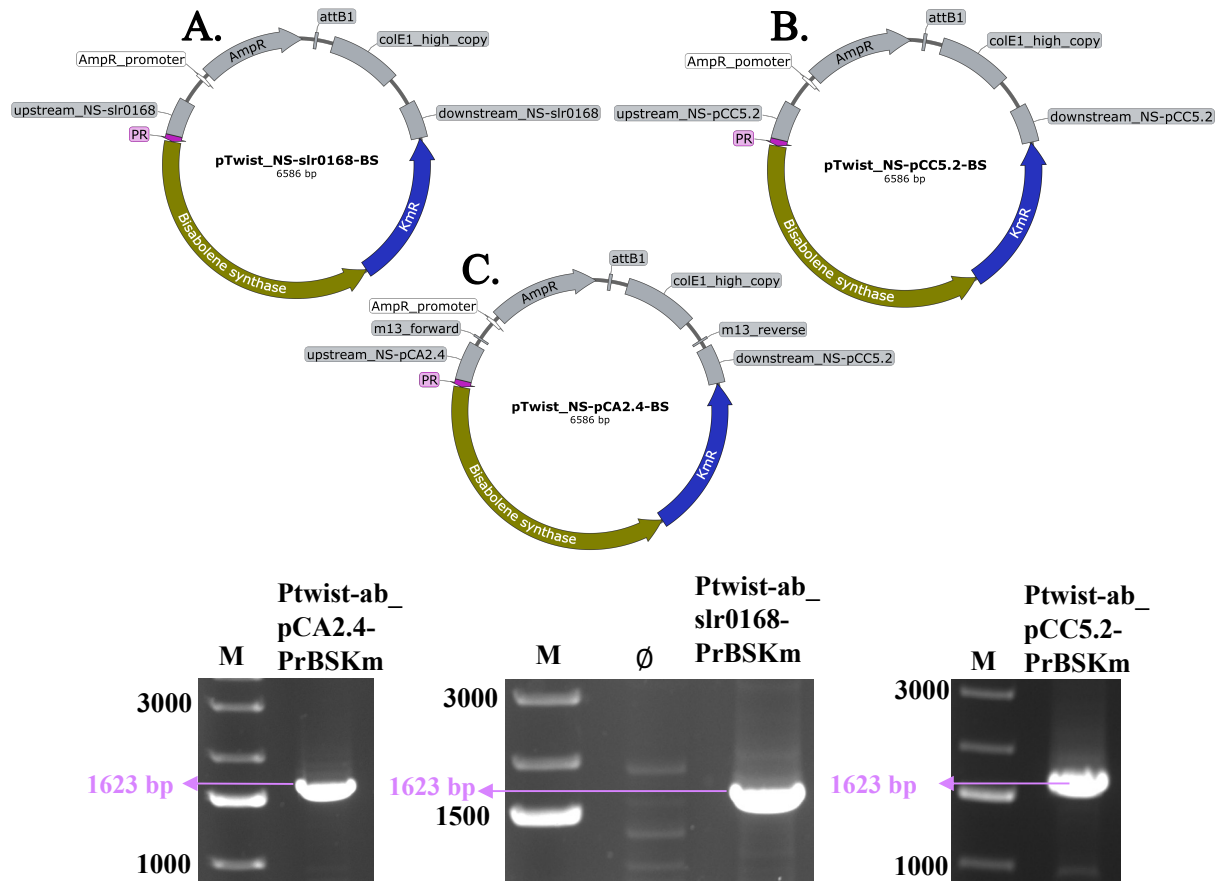


Figure 100. Représentation des cassettes permettant l'expression du gène codant pour la bisabolène synthase au sein des sites neutres sélectionnés et leurs vérifications par PCR amplification

Les cassettes permettant l'expression du gène codant pour la bisabolène synthase au sein des sites neutres, (A.) slr0168 : pTwist-NS-slR0168-BS (B.) pCC5.2 : pTwist-NS-pCC5.2-BS (C.) pCA2.4 : pTwist-ab-NS-pCA2.4-BS ont été obtenues par transformation d'*E. coli*, après assemblage Gibson. Le panel du bas présente les amplifications par PCR colonies d'*E. coli* pour vérification des 3 cassettes d'expression cibles *pR*-BS-Km clonées dans les 3 plasmides plateformes pTwist différents sont montrés par les gels de gauche à droite pour les cassettes d'expression pTwist_NS-pCA2.4-BS, pTwist_NS-slR0168-BS et pTwist_NS-pCC5.2-BS avec les amorces BS_fwd3 et KmA9_for. Le marqueur de poids moléculaire (M) = 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

C. Intégration des cassettes d'expression au niveau des sites neutres de différentes souches mutantes ou sauvages de cyanobactéries par transformation naturelle.

1) Stratégies d'ingénierie génétique

L'intégration des cassettes d'expression pour recombinaison homologue au niveau des différents sites neutres par transformation naturelle peut générer des mutants cyanobactériens aux propriétés multiples. En effet, plusieurs souches cyanobactériennes sauvages ou mutantes peuvent être transformées avec ces cassettes d'expression :

- Les souches WT de *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Synechococcus* sp. PCC 7942 et *Synechococcus* sp. PCC 7002.
- Les souches surexprimant les gènes *prk* ou opérons *rbc* via un plasmide réplcatif constitutif 'pC' des 3 souches modèles.
- Les souches surexprimant déjà une terpène synthase via un plasmide réplcatif constitutif 'pC' des 3 souches modèles.

Trois types de souches mutantes découlent de ces transformations (Figure 101.) et ont des applications différentes :

- Les souches sauvages (WT) des différents châssis cyanobactériens portant une cassette d'expression d'un gène codant pour une terpène synthase serviront de souches contrôles pour la comparaison de production.
- Les souches surexprimant les gènes *prk* ou opérons *rbc* au sein du 'pC' ainsi que ceux codants pour une *terpène synthase* au sein leurs sites neutres chromosomiques permettront d'analyser les possibles redirections de flux de carbone du CBB vers la voie MEP.
- Les souches dont le nombre de cassettes d'expression codant pour une terpène synthase est doublé (au sein du pC et du site neutre) pourront être intéressantes pour accroître la production en terpènes.

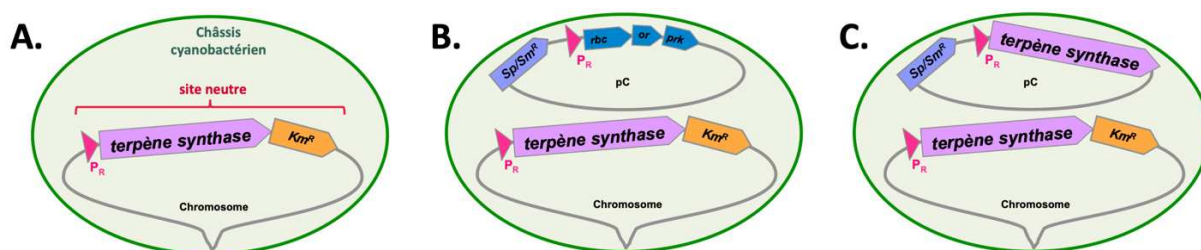


Figure 101. Schéma des 3 types de souches mutantes pouvant découler de la transformation avec la cassette d'expression portant les gènes codants pour une terpène synthase.

A. La souche mutante portant la cassette d'expression codant pour une terpène synthase au sein du site neutre. **B.** La souche mutante surexprimant les gènes *prk* ou opérons *rbc* via un plasmide réplcatif constitutif 'pC' et portant la cassette d'expression codant pour une terpène synthase au sein du site neutre. **C.** La souche mutante portant deux fois la cassette d'expression codant pour une terpène synthase, au sein du site neutre et du plasmide réplcatif constitutif 'pC'.

Les souches modèles utilisées étant polyploïdes (chromosomes et petits plasmides endogènes) les cassettes d'expression introduites au sein des différents sites neutres doivent ségréger dans

toutes les copies parallèles du chromosome ou petits plasmides endogènes pour empêcher la ré-émergence de copies sauvage par sélection négative. Ceci est réalisé expérimentalement par une augmentation de la pression de sélection médiée par une augmentation de la concentration en antibiotique (kanamycine).

Il est également possible d'introduire par conjugaison différents plasmides réplicatifs 'pC' portant les cassettes d'expression codant pour les terpènes synthases, cela sera discuté au cas par cas ultérieurement.

2) Récapitulatif des diverses souches productrices de terpènes construites

Le tableau 12. récapitulatif ci-dessous résume les mutants cyanobactériens obtenus au sein des 3 châssis modèles *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Synechococcus* sp. PCC 7942 et *Synechococcus* sp. PCC 7002 portant les cassettes d'expression « Pr-Terpène synthase_Km » au sein des sites neutre chromosomique des 2 souches modèles : *slr0168*, *SN_S7942* et *SN_S7002* ainsi que le plasmide répliatif à expression constitutive (pC) surexprimant différentes versions des gènes *prk* ou opéron *rbc* ou *terpènes synthases* (ou non : WT). Les clonages des plasmides pC_LS et pC_SS ont été effectués par Encarnacion Diaz-Santos et pC_FS et pC_BS par Célia Chenebault.

Tableau 12. Tableau récapitulatif des mutants cyanobactériens obtenus après intégration (par transformation naturelle) des cassettes d'expression de gènes codants pour différentes terpènes synthase au niveau des sites neutres chromosomiques *slr0168*, *NSI_S7942* et *NS_S7002*, respectivement des souches modèles WT ou mutantes.

Les cassettes d'expression surexprimant les gènes/opérons codant pour des **enzymes du Cycle de Calvin sont indiquées en bleu** et celles surexprimant des gènes codants pour **des terpènes synthase sont indiquées en rouge**. Abréviations : **S6803** = *Synechocystis* sp. PCC 6803, **S7942** = *Synechococcus* sp. PCC 7942 et **S7002** = *Synechococcus* sp. PCC 7002, **FS** = farnésène synthase, **BS** = bisabolène synthase, **SS** = santalène synthase, **LS** = limonène synthase.

Châssis	Terpènes synthases exprimées	Cassettes d'expression portées	
		Dans le plasmide répliatif à expression constitutive « pC »	Dans le site neutre chromosomique
S7942	FS	∅	Pr-FS Km
		pC <i>rbc6803</i>	Pr-FS Km
		pC <i>rbc7002</i>	Pr-FS Km
		pC <i>rbc7942</i>	Pr-FS Km
		pC <i>rbc7425</i>	Pr-FS Km
		pC <i>prk7425</i>	Pr-FS Km
		pC FS	Pr-FS Km
S6803	FS	∅	Pr-FS Km
		pC <i>prk7425</i>	Pr-FS Km
		pC FS	Pr-FS Km
S7002	LS	∅	Pr-LS Km
		pC <i>rbc6803</i>	Pr-LS Km
		pC <i>rbc7002</i>	Pr-LS Km
		pC <i>rbc7942</i>	Pr-LS Km
		pC <i>rbc7425</i>	Pr-LS Km
		pC <i>prk7425</i>	Pr-LS Km
		pC LS	Pr-LS Km
	SS	∅	Pr-SS Km
		pC <i>rbc6803</i>	Pr-SS Km
		pC <i>rbc7942</i>	Pr-SS Km
		pC <i>rbc7425</i>	Pr-SS Km
		pC <i>prk7425</i>	Pr-SS Km
		pC SS	Pr-SS Km

Les résultats phénotypiques de l'ensemble de ces mutants seront présentés dans la partie suivante.

D. Des sites neutres, pas si neutres que la littérature semble l'indiquer...

L'obtention de souches de *Synechocystis* sp. PCC 6803 possédant la cassette permettant l'expression du gène codant pour la farnésène synthase au sein du site neutre *slr0168*, a été difficile et très chronophage pour une raison inconnue. Après l'obtention de la cassette d'expression pTwist_NS-sl_r0168-FS dans *E. coli*, j'ai transformé l'ensemble des souches WT ou mutantes surexprimant les gènes *prk* ou opérons *rbc* avec le plasmide pC, et n'ai obtenu au total que deux clones valides correspondants aux souches mutantes pC_prk_Cya7425 + chrFS et pCFS + chrFS. J'ai répété une quinzaine de fois les transformations pour obtenir finalement deux clones valides de la souche *Synechocystis* sp. PCC 6803 chrFS, et notamment via une dernière stratégie qui a consisté en la digestion de la cassette d'expression afin d'augmenter les chances de recombinaison homologue pour d'une part linéariser le plasmide et d'autre part réduire la cassette uniquement aux plateformes d'homologies et aux séquences d'intérêt. Une fois ces deux clones *Synechocystis* sp. PCC 6803 chrFS obtenus, j'ai ensuite introduit par conjugaison les différents plasmides pC surexprimant respectivement les gènes *prk*, les opérons *rbc*, ou gène codant pour la farnésène synthase (pCFS).

D'autre part, les tentatives d'intégration d'autres cassettes d'expression au sein de ce site neutre comme celle codant pour la bisabolène synthase (20 tentatives) ont échouées, avec de nombreuses phases de screening sans jamais obtenir un seul clone valide.

Des articles parus récemment dans la littérature montrent que la recombinaison homologue et l'intégration de cassette d'expression au sein de certains sites neutres ne sont pas aussi efficaces qu'il n'y paraît. Seuls les succès sont publiés et pas les tentatives...

Matsudaira *et al.*, 2020 se sont intéressés à la production de la substance aromatique (S)-linalool, un alcool mono-terpénique, chez la souche *Synechocystis* sp. PCC 6803. Pour cela, ils ont tenté l'intégration du gène codant pour la linalool synthase (LINS) provenant d'*Actinidia arguta* exprimé sous le contrôle du promoteur fort *tac* au sein de divers sites neutres. Ils ont testé l'intégration au sein d'un site neutre intergénique entre *slr2031* et *slr2030* sans obtenir de souche productrice de linalool. Ils ont également tenté l'intégration au niveau du site neutre *slr0846*. Dans ce cas, ils ont pu obtenir seulement 1 clone avec un phénotype assez particulier. Plusieurs explications pourraient expliquer ces effets inattendus : après disruption d'un site neutre et introduction de nouveaux fragments d'ADN, l'organisation du *locus* génomique peut être affecté au niveau de l'arrangement de l'ADN et avoir des effets sur la réplication, l'efficacité de transcription et donc les niveaux d'expression. Particulièrement, l'utilisation du site neutre *slr0168*, implique une disruption complète de l'ORF *slr0168*, qui n'a, à ce jour, pas de fonction connue. Dans certaines conditions, le gène pourrait avoir un rôle à jouer pour la souche, et donc il serait pertinent de se poser la question de la véritable neutralité du site neutre ; des articles parus très récemment infirment en partie ces présomptions de neutralité (voir ci-après).

Le tableau 12., qui présente les mutants cyanobactériens producteurs de terpènes via la cassette d'expression intégrée au niveau de sites neutres chromosomiques, ne fait pas état d'utilisation des sites neutres des petits plasmides endogènes pCA2.4 et pCC5.2 de la souche *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Dans mes tentatives (plus de 50 transformations), après recombinaison homologue des cassettes d'expression au niveau de chacun des deux sites neutres, après transformation au sein des cyanobactéries, un screening par PCR colonies des clones obtenus a permis de détecter des mutants dont la cassette d'expression était intégrée au niveau du site neutre pCC5.2 et pCA2.4. Une pression de sélection par augmentation croissante de la concentration en antibiotiques a donc été initiée, sur une période plus longue et avec des concentrations plus importantes car le nombre de copies de petits plasmides endogène est plus important que le nombre de copies chromosomiques ; néanmoins sans jamais réussir à obtenir une ségrégation complète des copies mutantes endogènes des petits plasmides, dont les copies sauvages reprenaient le dessus après quelques repiquages (Figure 102.).

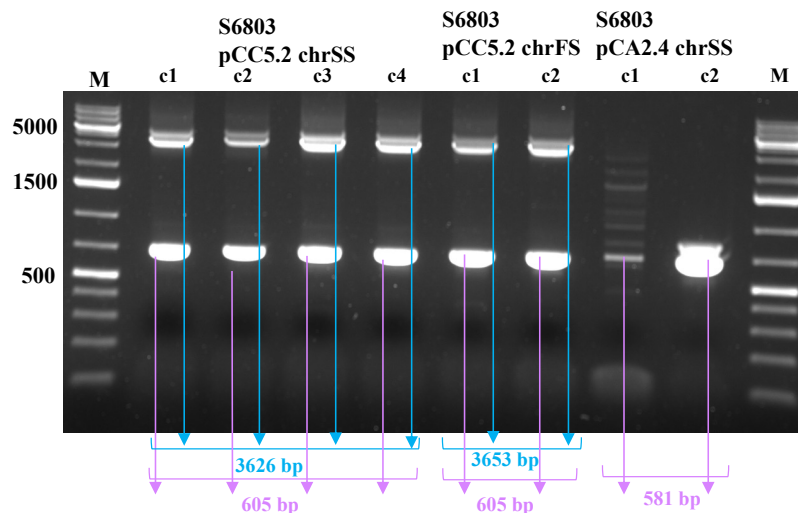


Figure 102. Amplification PCR spécifiques au niveau des sites neutres pCA2.4 et pCC5.2 des petits plasmides endogènes de *Synechocystis* sp. PCC 6803

Amplification par PCR colonies après plusieurs repiquages des clones obtenus par transformation sur des concentrations croissantes en antibiotiques : [Km]= 50 µg/mL, puis [Km]= 100 µg/mL, puis [Km]= 200 µg/mL et [Km]= 300 µg/mL.

(A.) De gauche à droite, les sites neutres de pCC5.2 ont été amplifiés par PCR avec les amorces NSpCC5.2_a_Fwd et NSpCC5.2_b_Rev s'appuyant au niveau des plateformes d'homologies de part et d'autre du site neutre. Les premiers clones c1, c2, c3, c4 de la souche *Synechocystis* sp. PCC 6803 pCC5.2 chrSS montrent deux géotypes : les bandes à 3625 bp soulignent une recombinaison homologue de la cassette d'expression de la santalène synthase au niveau du site neutre, tandis que les bandes à 605 pb attestent de la non-intégration de la cassette d'expression.

Les clones suivants c1 et c2, de la souche *Synechocystis* sp. PCC 6803 pCC5.2 chrFS montrent deux géotypes différents : les bandes à 3653 bp soulignent une recombinaison homologue de la cassette d'expression de la farnésène synthase au niveau du site neutre, tandis que les bandes à 605 pb attestent de la non-intégration de la cassette d'expression. Enfin, les sites neutres de pCA2.4 ont été amplifiés par PCR avec les amorces NSpCA2.4_a_Fwd et NSpCA2.4_b_Rev s'appuyant au niveau des plateformes d'homologies de part et d'autre du site neutre. Les deux derniers clones c1 et c2 montrent un unique géotype, celui d'un mutant aux copies plasmidiques pCA2.4 endogène homoploïde dont la cassette d'expression a été délétée. (B.) Les deux clones c1 et c2 de *Synechocystis* sp. PCC 6803 pCC5.2, repiqués une fois de plus [Km]= 300 µg/mL montrent une disparition progressive des copies mutantes ayant intégrée la cassette d'expression et un regain de copies sauvages. Le marqueur de poids moléculaire (M) = 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

De la même manière que pour l'obtention de la souche *Synechocystis* sp. PCC 6803 chrFS, afin d'augmenter l'efficacité de transformation, j'ai digéré les cassettes d'expression permettant l'intégration au niveau des sites neutres des petits plasmides endogènes pCA2.4 et pCC5.2,

mais cela ne m'a quand même pas permis d'obtenir en aval une ségrégation complète des clones. Une étude très récente comparant les sites d'intégration dans le chromosome et les plasmides natifs de la cyanobactérie *Synechocystis* sp. PCC 6803, au niveau de leur efficacité d'expression et du nombre de leurs copies, fait notamment état pour chacun, du nombre de tentatives indépendantes de transformation/ségrégation effectuées pour chaque souche (Nagy *et al.*, 2021).

Pour le site neutre chromosomique *slr0168*, 2 tentatives de transformation ont été effectuées, soit le nombre le moins important de tentatives de l'étude. Pour ce dernier résultat, au vu des nombreuses transformations réalisées, il est probable que la cause de nos nombreuses tentatives soit donc gène-dépendant.

Pour le site neutre intergénique pCA2.4, 11 tentatives de transformation (d'une cassette d'expression YFP2) ont été réalisées, soit le nombre le plus important de tentatives de l'étude. Des analyses RT-qPCR ont également étudié le nombre relatif de copies par rapport au copies chromosomiques et ont montré pour le petit plasmide pCA2.4, un nombre de copies par chromosome le plus élevé de l'étude soit 5,4/1 copie chromosomique.

Ng *et al.*, 2015 ont étudié l'introduction par transformation d'une cassette EYFP-Km^R au sein du site neutre NSP1 de pCC5.2 qui n'a donné qu'un seul transformant. Les copies mutantes du plasmide ne ségrégeaient pas complètement, même après la répétition de repiquages pendant plusieurs mois. Ces observations vont dans le sens de nos résultats (Figure 102. Gels des ségrégations). Un autre site neutre de pCC5.2 au niveau du gène *orfA* a été étudié avec 6 tentatives d'intégration d'une cassette d'expression YFP2, sans aucun succès de ségrégation (Nagy *et al.*, 2021).

L'expérience d'intégration de cassette d'expression au sein des sites neutres des petits plasmides endogènes pCA2.4 et NSP1 de pCC5.2 est donc très chronophage, mais possible. Cela pourrait être dû au fait que le nombre important de copies de ces petits plasmides endogènes complexifie le processus de ségrégation des copies mutantes parmi les nombreuses copies sauvages. Il serait donc intéressant de réitérer l'expérience et de mettre en culture les cellules présentant également deux types de copies de plasmides endogènes (mutants ou sauvage). Même si les copies des plasmides endogènes ne sont pas toutes ségrégées, leurs nombres assez élevés par copie de chromosome pourraient tout de même générer des résultats phénotypiques intéressants notamment au niveau des rendements de production de terpènes. Ng *et al.*, 2015 ont montré notamment que le plasmide répliatif pPMQAK1 dérivé de RSF1010, au nombre de 30 copies par cellules (Nagy *et al.*, 2021), permet une expression plus faible que celle à partir d'une cassette intégrée et non ségrégée au sein des copies du site NSP1 du petit plasmide endogène pCC5.2.

IV. Analyses phénotypiques par la détection et quantification de la production de terpènes en GC-MS des terpènes par les souches productrices.

A. Principe

Des études phénotypiques comparatives ont été réalisées entre les différents mutants cyanobactériens et les souches contrôles, via la détection et la quantification de la production de terpènes par de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). Les souches portant les cassettes d'expression des gènes codants pour les terpènes synthases sont cultivées en présence de dodécane, une molécule hydrophobe permettant ainsi de piéger les terpènes produits par les cellules (les terpènes étant volatiles). Les molécules de terpènes piégées dans le dodécane sont alors détectées et quantifiées par GC-MS grâce aux méthodes de dosages analytiques développées en collaboration avec le laboratoire de chimie analytique du CEA de Saclay (Figure 103. Pour les informations détaillées de mise en place du protocole de quantification des terpènes par GC-MS), voir le Matériel et méthode.

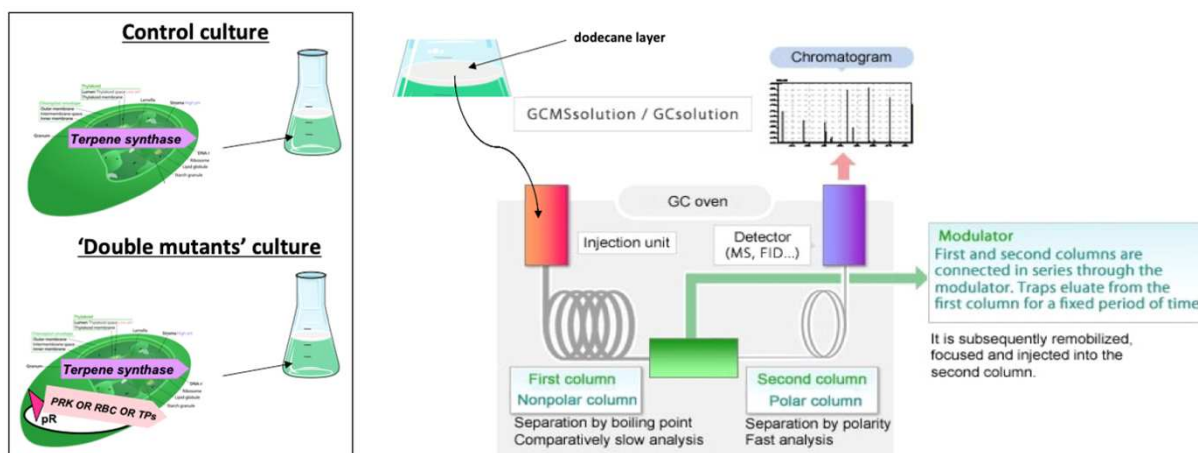


Figure 103. Principe de la chromatographie en phase gazeuse couplée à de la spectrométrie de masse (GC-MS) pour détection et quantification de la production en terpènes d'intérêt entre souches contrôles et mutantes (Figure adaptée de www.shimadzu.fr)

Les cultures sont suivies sur 21 jours, des prélèvements de culture et d'échantillons de dodécane réguliers permettent le suivi de croissance et la quantification de la production en terpènes.

B. Analyses phénotypiques préliminaires

Au laboratoire, les études préliminaires réalisées par Encarnacion Diaz Santos et Célia Chenebault ont permis d'établir les conditions de cultures les plus intéressantes pour chaque châssis cyanobactériens au niveau des paramètres d'intensité lumineuse, de température, de milieu de culture, d'influence des sources de carbone et d'azote ou encore de la densité cellulaire d'inoculation. Les paramètres retenus sont ceux qui sont qualifiés de « conditions de culture standard » avec, pour l'ensemble des souches modèles, une température de 30°C, une intensité lumineuse de 2500 lux, de milieu MM pour *Synechocystis* sp. PCC 6803 et *Synechococcus* sp. PCC 7942 et de milieu A+ supplémenté en vitamine B12 pour *Synechococcus* sp. PCC 7002, et une $DOI_{750nm} = 0,02$. Ces paramètres seront utilisés pour l'ensemble des analyses phénotypiques des diverses souches mutantes construites (sauf quand précisé).

Afin de quantifier les terpènes produits par les souches de cyanobactéries génétiquement modifiées, les cultures sont réalisées en présence de dodécane (20% v/v_{tot}), une molécule hydrophobe venant piéger les terpènes (volatiles) produits. Des études préliminaires ont été effectuées au laboratoire pour observer si la présence de dodécane au sein de la culture exerçait une influence sur la croissance de différents châssis cyanobactériens. Pour les châssis *Synechocystis* sp. PCC 6803 et *Synechococcus* sp. PCC 7002, le dodécane a peu d'influence sur leur croissance (Figure 104. A et B). En revanche pour *Synechococcus* sp. PCC 7942 les effets du dodécane sont très différents (Figure 104. C). En présence de dodécane, une souche « non adaptée » ne croît pas pendant plusieurs jours et présente donc une phase de latence après inoculation, puis la croissance reprend à partir du 7^{ème} jour de culture. Une souche « adaptée », c'est à dire qui a été préalablement cultivée en présence de dodécane, puis remise en croissance avec du dodécane, présente une croissance similaire à la souche WT cultivée sans dodécane. Il sera donc toujours nécessaire d'adapter les cultures des diverses souches de *Synechococcus* sp. PCC 7942 au dodécane avant de commencer les cultures pour mesurer la production de terpènes.

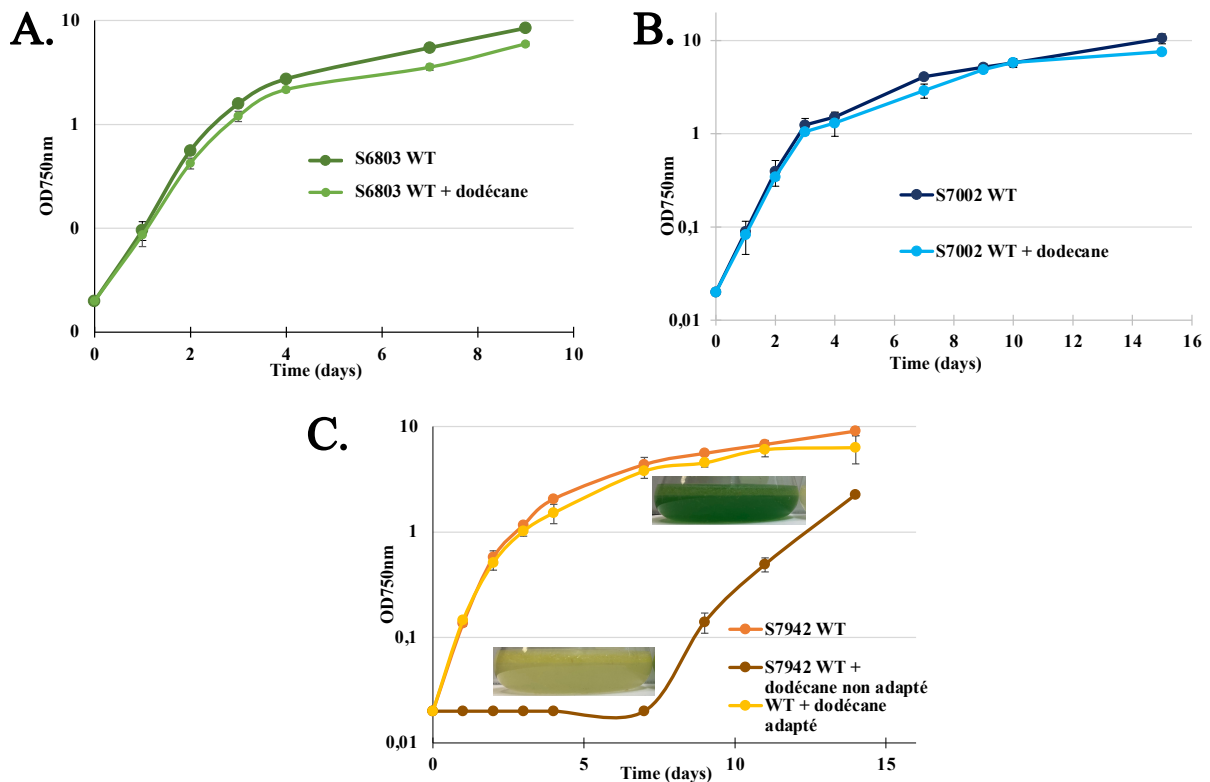


Figure 104. Comparaison de la croissance des souches sauvages de plusieurs châssis cyanobactériens avec ou sans dodécane dans leur milieu de culture

Les croissances ont été effectuées en conditions standard à 30°C, 2500 lux ($\approx 35 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) en infors à 140 rpm, dans un milieu A+ supplémenté en vitamine B12 pour la souche *Synechococcus* sp. PCC 7002 et en milieu MM pour les souches *Synechocystis* sp. PCC 6803 et *Synechococcus* sp. PCC 7942, avec ou sans 20% v/v_{tot} de dodécane inoculé au temps t0. (A.) Comparaison de croissance chez la souche *Synechocystis* sp. PCC 6803 (S6803) WT dans un milieu de culture sans dodécane (en vert foncé) et avec 20% v/v_{tot} dodécane (vert clair) (B.) Comparaison de croissance chez la souche *Synechococcus* sp. PCC 7002 (S7002) WT dans un milieu de culture sans dodécane (en bleu foncé) et avec 20% v/v_{tot} dodécane (bleu clair) (C.) Comparaison de croissance chez la souche *Synechococcus* sp. PCC 7942 (S7942) WT dans un milieu de culture sans dodécane (en orange) et avec 20% v/v_{tot} dodécane chez une souche adaptée (en jaune) et chez une souche non adaptée au préalable (en marron).

V. Constructions et analyses phénotypiques des souches *Synechococcus* sp. PCC 7002 productrices de limonène

A. Construction de la souche *Synechococcus* sp. PCC 7002 productrice de limonène

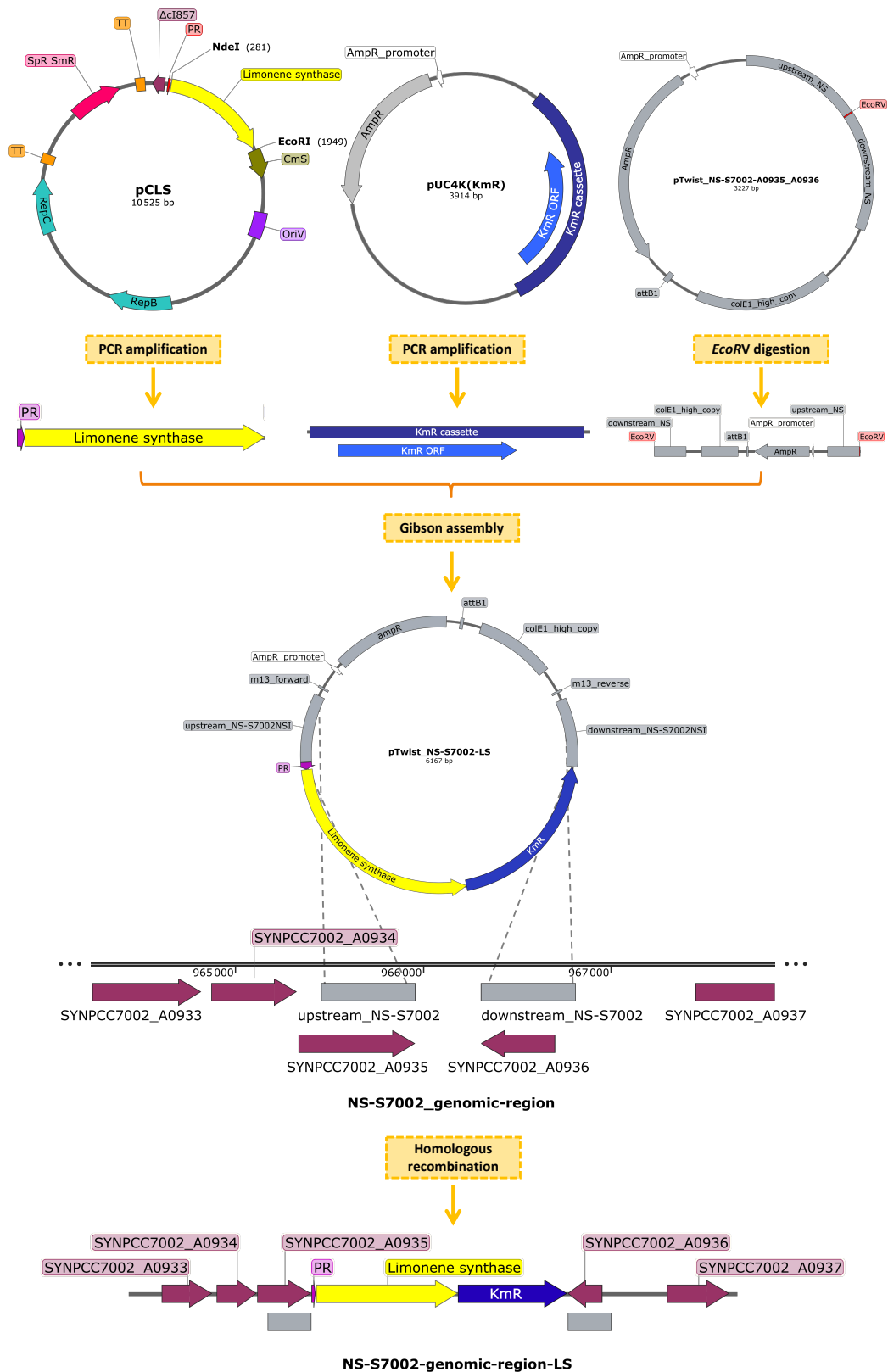
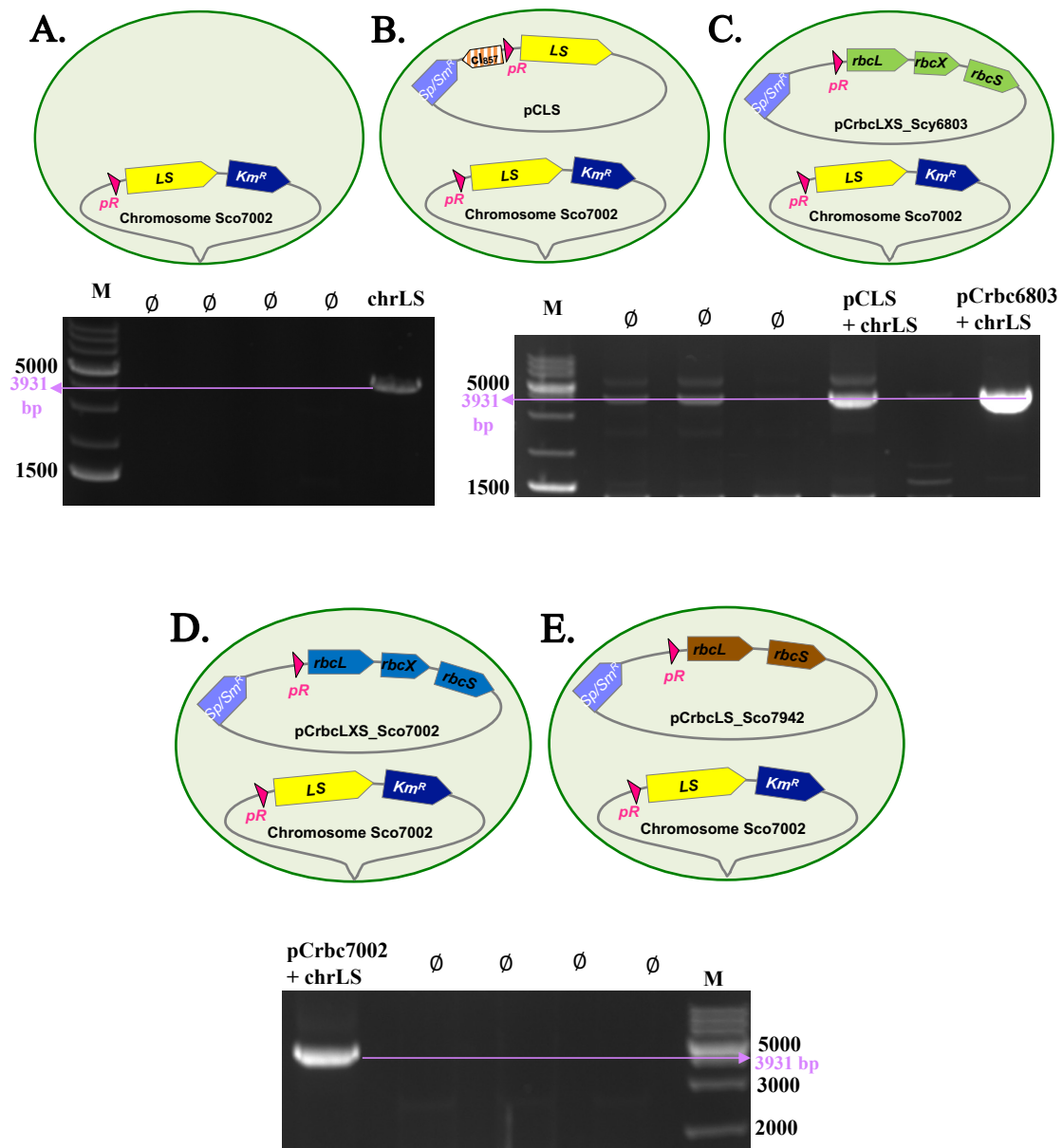


Figure 105. Construction de la souche mutante *Synechococcus sp.* PCC 7002 portant la cassette d'expression du gène codant la limonène synthase au sein du site neutre chromosomique A0935-A0936

Dans un premier temps, deux fragments synthétiques ciblés sont amplifiés par PCR à partir des plasmides matrices pCLS et pUC4K(Km^R), respectivement avec les primers Pr-fwd-7002 et Pr-LS-rev, Km-LS-fwd et Km-rev-7002, pour l'obtention des biobricks P_R-LS (codant pour l'expression forte (P_R))

et constitutive de la limonène synthase (LS) de *Mentha spicata*, dont la séquence a été adaptée au biais de codons de *Synechocystis* sp. PCC 6803) et Km^R (codant pour le gène de résistance à la kanamycine). Le plasmide pTwist_NS-S7002-A0935-A0936 contenant les plateformes amonts et avalés du site neutre A0935-A0936 du chromosome de *Synechococcus* sp. PCC 7002, est lui linéarisé par digestion avec l'enzyme *EcoRV* au site de restriction ajouté entre les deux régions plateformes. Le plasmide linéarisé et les deux inserts disposant d'homologies de séquence en leurs extrémités (grâce aux créations d'overhangs lors des amplifications PCR) sont assemblés par clonage Gibson®, qui résulte en la création du plasmide pTwist_NS-S7002-LS. Ce dernier est alors composé de la cassette d'expression P_R -LS- Km^R disposée entre les régions amonts et avalés d'homologie avec le site neutre A0935-A0936. Par transformation de ce plasmide au sein de la souche *Synechococcus* sp. PCC 7002 et recombinaison homologue, la cassette d'expression sera intégrée au niveau du site neutre chromosomique ciblé A0935-A0936 de la souche.



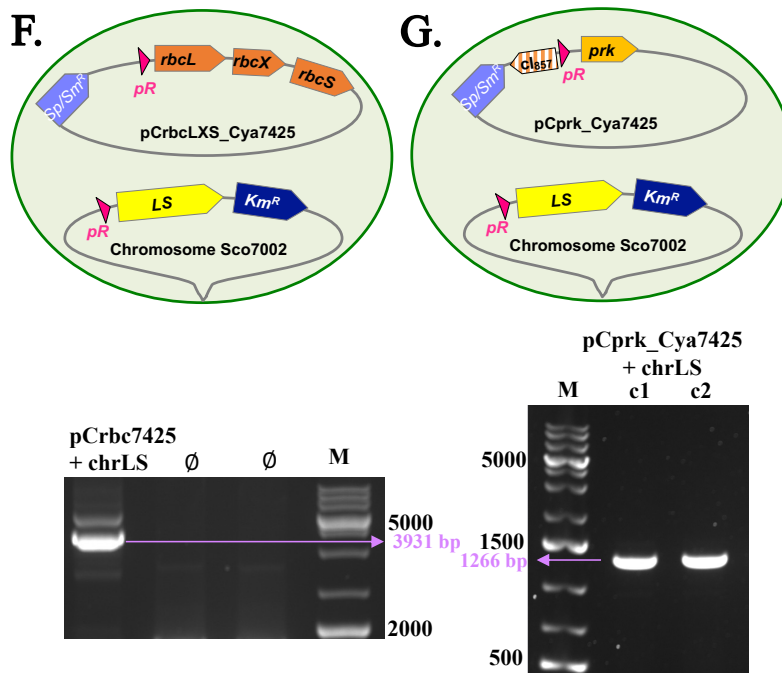


Figure 106. Composition génomique des 7 souches mutantes *Synechococcus* sp. PCC 7002 productrices de limonène et leurs vérifications par amplification PCR

Les 7 châssis de *Synechococcus* sp. PCC 7002 présentent la cassette d'expression de la limonène synthase au niveau de leurs sites neutres chromosomiques : **(A)**, le châssis chrLS a été obtenu par transformation de la souche WT avec la cassette d'expression pTwist_NS-S7002-LS et a été vérifié par amplification PCR avec les amorces NS7002_a_Fwd et NS7002_b_rv qui s'appuient respectivement sur les plateformes d'homologies amonts et avales du site neutre NS-S7002. **(B)**, le châssis pCLS + chrLS a été obtenu par transformation de la souche pCLS avec la cassette d'expression pTwist_NS-S7002-LS et a été vérifié par amplification PCR avec les amorces NS7002_a_Fwd et NS7002_b_rv. **(C)**, le châssis pCrbc_Scy6803 + chrLS a été obtenu par transformation de la souche pCrbc_Scy6803 avec la cassette d'expression pTwist_NS-S7002-LS et a été vérifié par amplification PCR avec les amorces NS7002_a_Fwd et NS7002_b_rv **(D)**, le châssis pCrbc_Sco7002 + chrLS a été obtenu par transformation de la souche pCrbc_Sco7002 avec la cassette d'expression pTwist_NS-S7002-LS et a été vérifié par amplification PCR avec les amorces NS7002_a_Fwd et NS7002_b_rv. **(E)**, le châssis pCrbc_Sco7942 + chrLS a été obtenu par transformation de la souche pCrbc_Sco7942 avec la cassette d'expression pTwist_NS-S7002-LS et a été vérifié par amplification PCR avec les amorces NS7002_a_Fwd et NS7002_b_rv. **(F)**, le châssis pCrbc_Cya7425 + chrLS a été obtenu par transformation de la souche pCrbc_Cya7425 avec la cassette d'expression pTwist_NS-S7002-LS et a été vérifié par amplification PCR avec les amorces NS7002_a_Fwd et NS7002_b_rv. **(G)**, le châssis pCprk_Cya7425 + chrLS a été obtenu par transformation de la souche pCprk_Cya7425 avec la cassette d'expression pTwist_NS-S7002-LS et a été vérifié par amplification PCR avec les amorces NS7002_a_Fwd et NS7002_b_rv. Le marqueur de poids moléculaire (M) = 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

B. Analyses phénotypiques des souches *Synechococcus* sp. PCC 7002 productrices de limonène

1) Augmentation de la production de limonène par augmentation du nombre de copies de cassettes d'expression du gène codant pour la limonène synthase chez *Synechococcus* sp. PCC 7002

Les souches *Synechococcus* sp. PCC 7002 **pCLS** et **chrLS** portent la cassette d'expression du gène codant pour la limonène synthase (LS) respectivement au sein du plasmide réplcatif par augmentation du nombre de cassette pC dérivé du RSF1010 et du site neutre chromosomique NS_S7002. La souche *Synechococcus* sp. PCC 7002 **pCLS + chrLS** porte les deux cassettes.

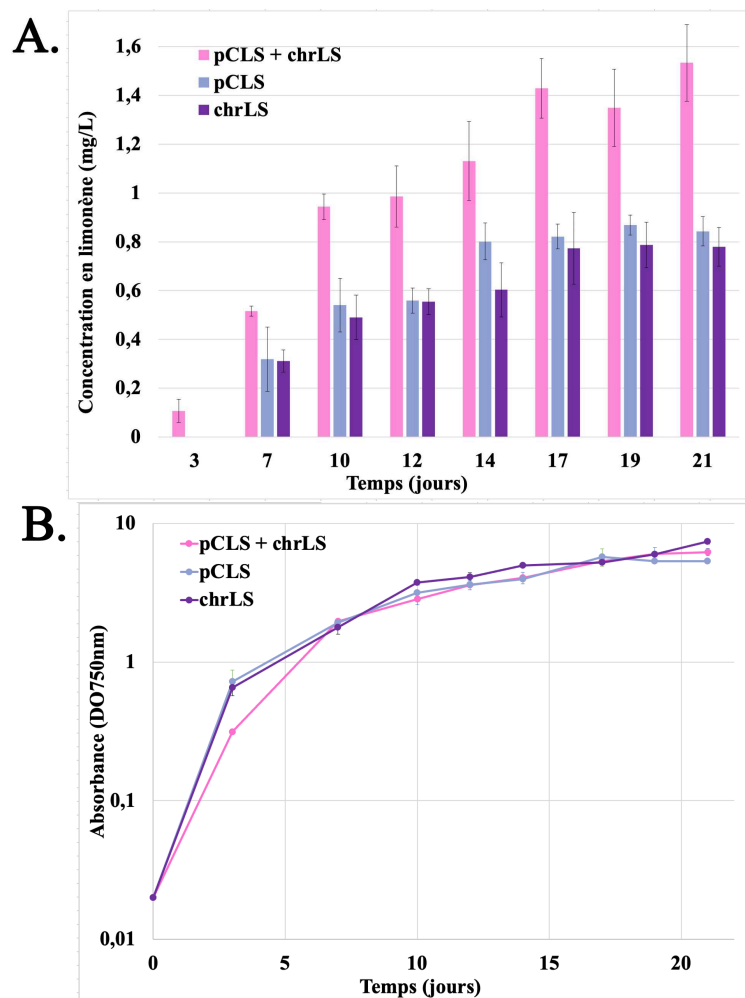


Figure 107. Production en limonène des souches *Synechococcus* sp. PCC 7002 en fonction de la localisation (plasmidique ou chromosomique) et du nombre de cassettes d'expression du gène codant pour la limonène synthase (*ls*).

Production (A) et courbes de croissance (B) des souches *Synechococcus* sp. PCC 7002 possédant la cassette d'expression du gène *ls* portée au sein du plasmide (pCLS en violet clair), ou au sein du site neutre chromosomique A0935-A0936 (chrLS en violet foncé), ou bien possédant les deux (pCLS + chrLS en rose). Ces diverses souches ont été cultivées en conditions standard : milieu A+ en présence de dodécane (20% v/v), 2500 lux, sous agitation (140 rpm dans un incubateur Infors), 30°C, en erlenmeyers ($V_{\text{culture}} = 50\text{mL}$) et à une $DO_i = 0,02$. Les données présentées ont été réalisées en triplicat et moyennées pour chaque constructions. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts-types standard de chaque triplicats.

Comme montré sur la Figure 107. chez *Synechococcus* sp. PCC 7002, la production de limonène n'est pas dépendante de la localisation de la cassette d'expression du gène *ls* (plasmide pC ou site neutre NS_S7002). En revanche, une production accrue de limonène est observée lorsque *Synechococcus* sp. PCC 7002 possèdent les deux cassettes **pC_LS et chrLS**. En effet, pour la moitié des données relevées cette production est supérieure de 50% (et X2 à 21 jours) à celles des souches pCLS ou chrLS (Figure 107.). Le doublement du nombre de terpènes synthases au sein du châssis, entraîne un léger retard de croissance de la souche les premiers jours de culture (3-5 jours). Cependant la production de limonène à 3 jours est déjà mesurable par comparaison aux souches contrôles. Au vu des résultats de production, l'augmentation du nombre de cassettes d'expression au sein de châssis cyanobactérien s'avère donc être une stratégie très intéressante pour augmenter les rendements de production en terpènes.

2) Absence d'effets notables de l'expression surnuméraire des gènes codants pour les enzymes CCB sur la production de limonène chez *Synechococcus* sp. PCC 7002

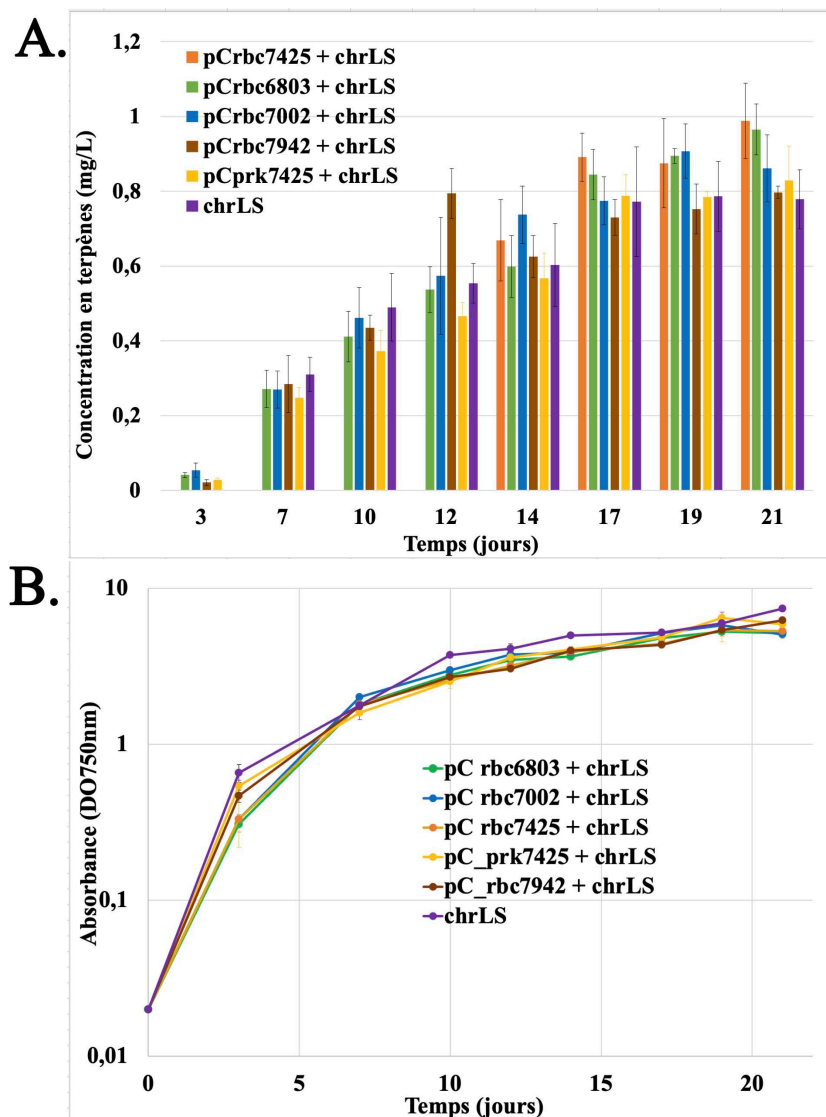


Figure 108. Comparaison de la production en limonène des souches *Synechococcus* sp. PCC 7002 combinant la surexpression du gène *prk* ou des opérons *rbc* par rapport à la souche contrôle.

Les résultats de production **A.** et courbes de croissance **B.** (suivis sur 21 jours) des souches mutantes *Synechococcus* sp. PCC 7002 combinant l'expression de la cassette d'expression de la limonène synthase au sein du site neutre chromosomique A0935-A0936, à la surexpression du gène *prk* sont présentés : pC_prk7425 + chrLS en jaune, ou des opérons *rbc* : pC_rbc6803 + chrLS en vert, pC_rbc7942 + chrLS en marron, pC_rbc7002 + chrLS en bleu, pC_rbc7425 + chrLS en orange, par rapport à la souche contrôle chrLS en violet. Ces souches mutantes sont cultivées en conditions standard : milieu A+ en présence de dodécane (20% v/v), 2500 lux, 140 rpm dans un incubateur Infors, 30°C, en erlenmeyers ($V_{\text{culture}} = 50\text{mL}$) et à une $\text{DOi} = 0,02$. Les données présentées ont été réalisées en triplicat et moyennées pour chaque construction. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts-types standard de chaque triplicats.

L'impact de la surexpression des gènes codants pour les enzymes CCB sur la production de limonène chez *Synechococcus* sp. PCC 7002 est assez neutre avec peut-être une légère augmentation de la production pour les souches mutantes **pCrbc_Scy6803 + chrLS** et **pCrbc_Cya7425 + chrLS** par rapport à la souche contrôle chrLS.

VI. Constructions et analyses phénotypiques des souches *Synechocystis* sp. PCC 6803 productrices de farnésène

A. Construction de la souche *Synechocystis* sp. PCC 6803 productrice de farnésène

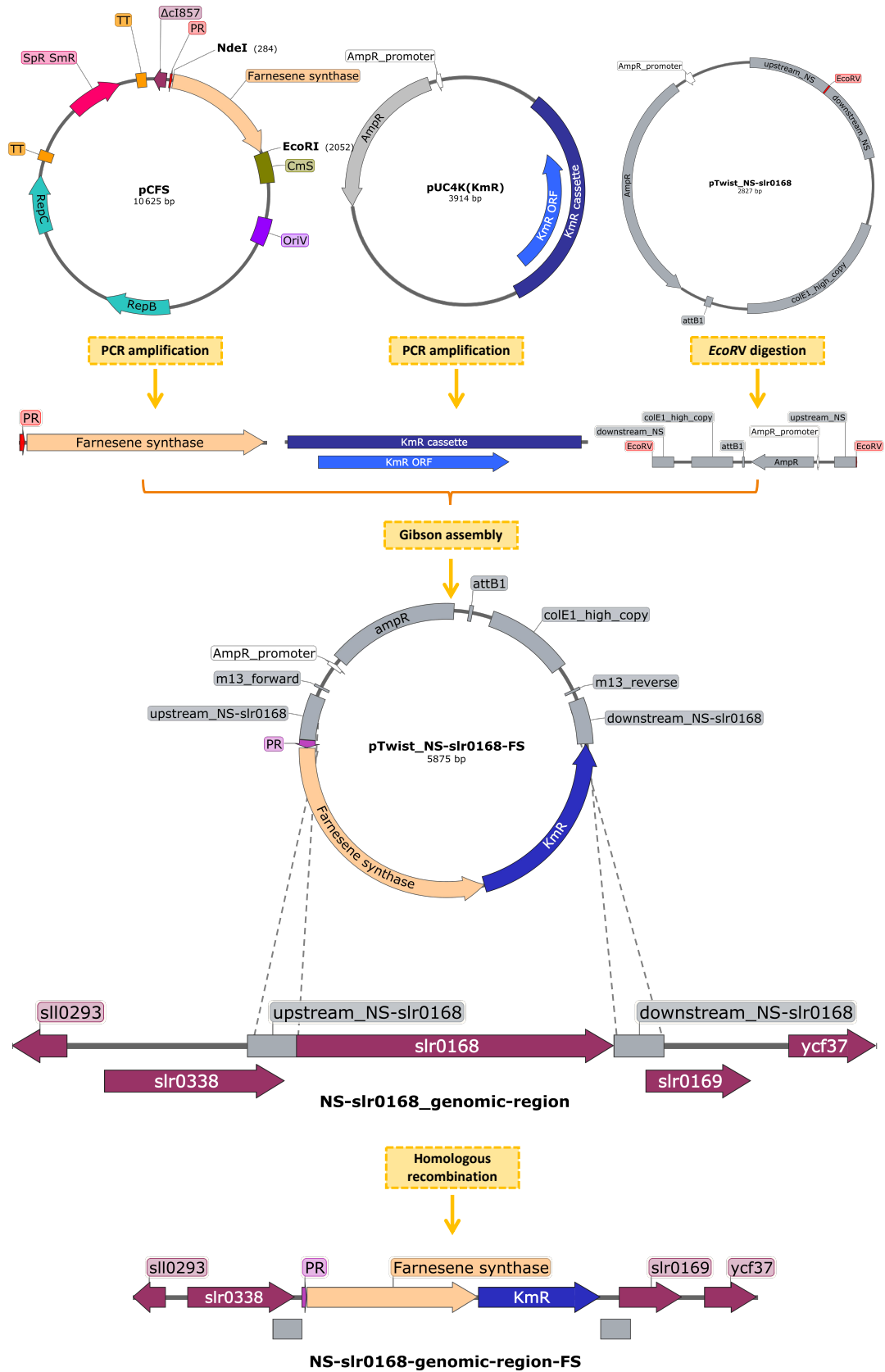
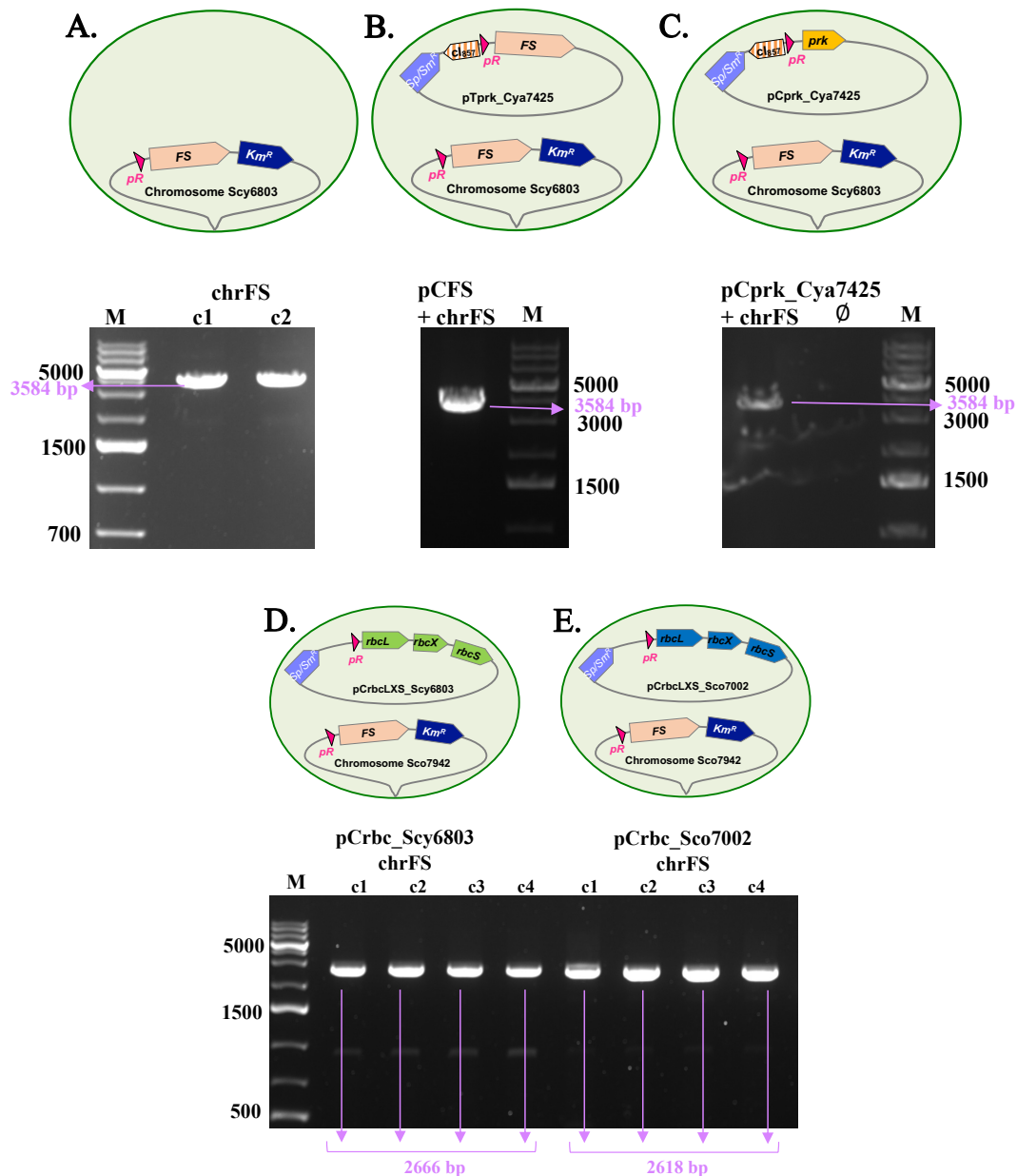


Figure 109. Construction de la souche mutante *Synechocystis sp.* PCC 6803 portant la cassette d'expression du gène codant pour la farnésène synthase au sein du site neutre chromosomique *slr0168*

Dans un premier temps, deux fragments synthétiques ciblés sont amplifiés par PCR à partir des plasmides matrices pCFS et pUC4K(Km^R), respectivement avec les primers Pr-fwd-6803-slr0168 et Pr-FS-rev, Km-FS-fwd et Km-rev-6803-slr0168 pour l'obtention des biobricks P_R-FS (pour l'expression forte (P_R) et constitutive de la farnésène synthase (FS) de *Picea abies*, dont la séquence a été adaptée au biais de codons de *Synechocystis* sp. PCC 6803) et Km^R (codant pour le gène de résistance à la kanamycine). Le plasmide pTwist_NS-slr0168-FS contenant les plateformes amont et aval du site neutre *slr0168* du chromosome de *Synechocystis* sp. PCC 6803, est lui linéarisé par digestion avec l'enzyme *EcoRV* au site de restriction ajouté entre les deux régions plateformes. Le plasmide linéarisé et les deux inserts disposant d'homologies de séquence en leurs extrémités (grâce aux créations d'overhangs lors des amplifications PCR) sont assemblés par clonage Gibson®, qui résulte en la création du plasmide pTwist_NS-slr0168-FS. Ce dernier est alors composé de la cassette d'expression P_R-FS-Km^R disposée entre les régions amont et aval d'homologie avec le site neutre *slr0168*. Par transformation de ce plasmide au sein de la souche *Synechocystis* sp. PCC 6803 et recombinaison homologue, la cassette d'expression sera intégrée au niveau du site neutre chromosomique ciblé NSI de la souche.



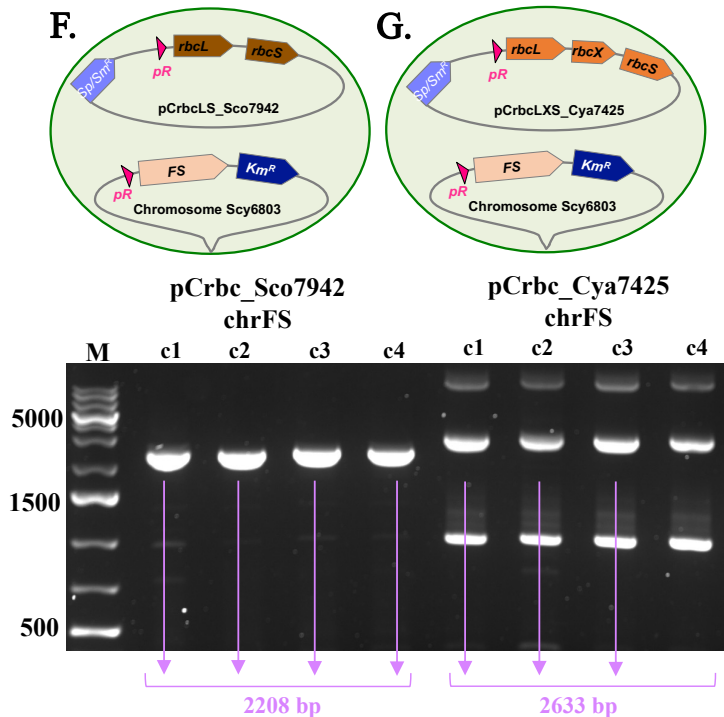


Figure 110. Composition génomique des 7 souches mutantes *Synechocystis* sp. PCC 6803 productrices de farnésène et leurs vérifications par amplification PCR

Les 7 châssis de *Synechocystis* sp. PCC 6803 présentent la cassette d'expression de la farnésène synthase au niveau de leurs sites neutres chromosomiques : (A). le châssis chrFS a été obtenu par transformation de la souche WT avec la cassette d'expression pTwist_slr0168-FS et a été vérifiée par amplification PCR avec les amorces NSslr0168_a_Fwd et NSslr0168_b_rev qui s'appuient respectivement sur les plateformes d'homologies amont et aval du site neutre slr0168. (B). le châssis pCFS + chrFS a été obtenu par transformation de la souche pCFS avec la cassette d'expression pTwist_slr0168-FS et a été vérifiée par amplification PCR avec les amorces NSslr0168_a_Fwd et NSslr0168_b_rev. (C). le châssis pCprk7425 + chrFS a été obtenu par transformation de la souche pCprk_Cya7425 avec la cassette d'expression pTwist_slr0168-FS et a été vérifiée par amplification PCR avec les amorces NSslr0168_a_Fwd et NSslr0168_b_rev. (D). le châssis pCrbc_Scy6803 + chrFS a été obtenu par conjugaison du pCrbc_Scy6803 avec la souche chrFS et a été vérifié par amplification PCR avec les amorces pFC1_pra1_VBG et pfc1_rev_seq théo qui s'appuient respectivement sur le pC au niveau en amont du pR et au niveau du Cm^S. (E). le châssis pCrbc_Sco7002 + chrFS a été obtenu par conjugaison du pCrbc_Sco7002 avec la souche chrFS et a été vérifiée par amplification PCR avec les amorces pFC1_pra1_VBG et pfc1_rev_seq théo (F). le châssis pCrbc_Sco7942 + chrFS a été obtenu par conjugaison du pCrbc_Sco7942 avec la souche chrFS et a été vérifié par amplification PCR avec les amorces pFC1_pra1_VBG et pfc1_rev_seq théo théo (G). le châssis pCrbc_Cya7425 + chrFS a été obtenu par conjugaison du pCrbc_Cya7425 avec la souche chrFS et a été vérifiée par amplification PCR avec les amorces pFC1_pra1_VBG et pfc1_rev_seq théo. Le marqueur de poids moléculaire (M) = 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

B. Analyses phénotypiques des souches *Synechocystis* sp. PCC 6803 productrices de farnésène

1) Augmentation de la production de farnésène par augmentation du nombre de copies de cassettes d'expression du gène codant pour la farnésène synthase chez *Synechocystis* sp. PCC 6803

Les souches *Synechocystis* sp. PCC 6803 **pCFS** et **chrFS** portent la cassette d'expression du gène codant pour la farnésène synthase (FS) respectivement au sein du plasmide répliatif pC et du site neutre chromosomique slr0168. La souche *Synechocystis* sp. PCC 6803 **pC FS + chrFS** porte les deux cassettes. On observe une vraie différence de production entre l'expression de la farnésène synthase au sein du site neutre (environ 3,8 mg/L à 21 jours) par rapport au pC (environ 27,2 mg/L à 21 jours), ce dernier permettant un rendement de production 7 fois supérieur par rapport au système d'expression chromosomique slr0168. Cela confirme nos premières hypothèses élaborées au vu de la difficulté de transformation du *locus* et au vu des résultats publiés dans la littérature. Il est donc probable que la cause de nos nombreuses tentatives de transformation soit donc gène-dépendant spécifiquement au niveau de ce *locus*, au vu des nouveaux phénotypes obtenus. Il est possible que l'organisation de l'ADN au niveau du site neutre soit impactée de manière négative et entraîne une diminution de l'expression de la cassette et de l'activité de la terpène synthase. La double intégration de la cassette codant pour la farnésène synthase chez la souche pCFS + chrFS entraîne une augmentation des rendements de production en farnésène jusqu'à 31,6 mg/L à 21 jours, résultant de l'addition des rendements de la production de la souche pCFS et de la souche chrFS (Figure 111.).

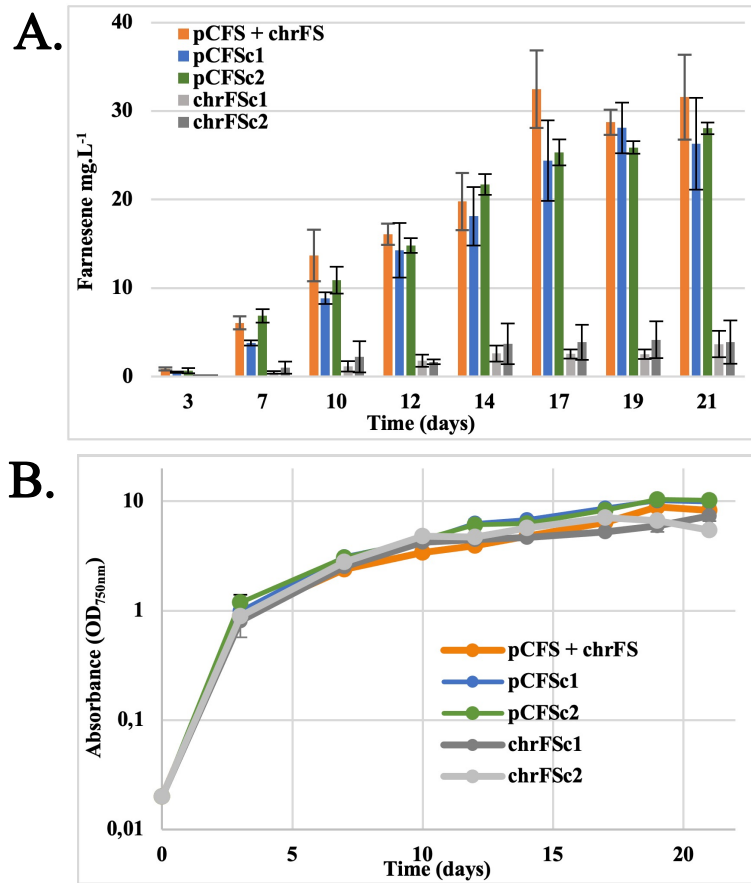


Figure 111. Production en farnésène des souches *Synechocystis* sp. PCC 6803 en fonction de la localisation et du nombre de cassettes d'expression (plasmidique ou chromosomique)

Production (A) et courbes de croissance (B) des souches de *Synechocystis* sp. PCC 6803 possédant la cassette d'expression de la farnésène synthase au sein du plasmide (pCFS en vert et bleu), au sein du site neutre chromosomique *slr0168* (chrFS en gris), ou au sein des deux systèmes d'expression (pCFS + chrFS en orange).

Ces souches mutantes sont cultivées en conditions standard : MM en présence de dodécane (20% v/v), 2500 lux, 140 rpm dans un incubateur Infors, 30°C, en erlensmeyers ($V_{\text{culture}} = 50\text{mL}$) et à une $\text{DOi} = 0,02$. Les données présentées ont été réalisées en triplicat et moyennées pour chaque construction. Les barres d'erreur représentent l'écart-type moyen pour tous les échantillons ($N \geq 2$).

2) L'expression hétérologue du gène *prk* de *Cyanotheca* sp. PCC 7425 et de certaines versions d'opérons *rbc* augmentent la production de farnésène chez *Synechocystis* sp. PCC 6803

En comparant avec la souche contrôle *Synechocystis* sp. PCC 6803 chrFS productrice de farnésène, on observe que la surexpression de certaines versions de gène ou opéron codant pour les enzymes PRK ou RuBisCO du CCB ont un impact positif sur les rendements en farnésène (Figure 112.).

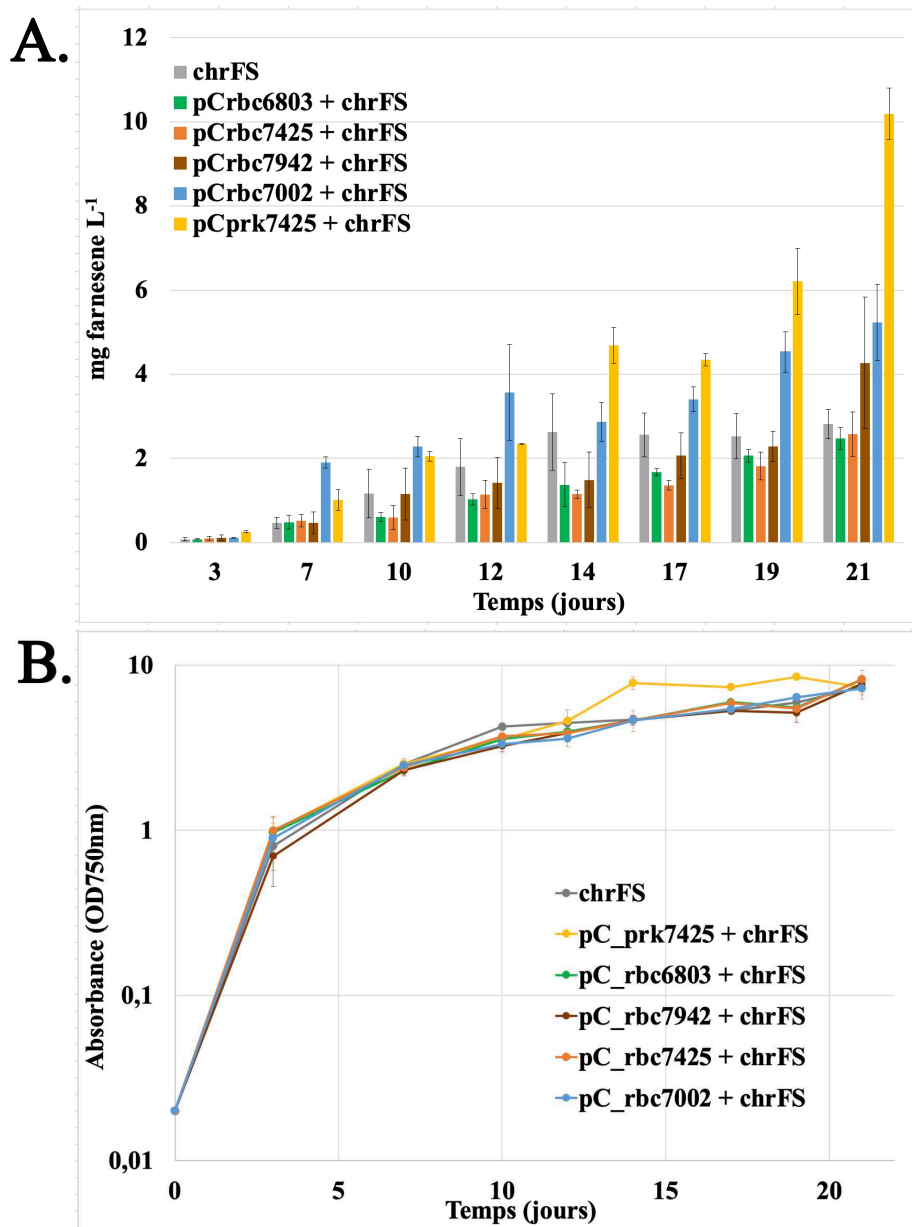


Figure 112. Production en farnésène des souches *Synechocystis* sp. PCC 6803 combinant la surexpression du gène *prk* ou des opérons *rbc* par rapport à la souche contrôle.

Production (A) et courbes de croissance (B) des souches de *Synechocystis* sp. PCC 6803 possédant la cassette d'expression du gène codant pour la farnésène synthase au sein du site neutre chromosomique *slr0168* et celle permettant l'expression du gène *prk* *Cyanotheca* sp. PCC 7425 portée par le plasmide pC_prk7425 + chrFS en jaune, ou des opérons *rbc*, avec pC_rbc6803 + chrFS en vert, pC_rbc7942 + chrFS en marron, pC_rbc7002 + chrFS en bleu, et pC_rbc7425 + chrFS en orange, par rapport à la souche contrôle chrFS en gris. Ces souches ont été cultivées en conditions standard : MM en présence

de dodécane (20% v/v), 2500 lux, sous agitation (140 rpm dans un incubateur Infors), 30°C, en erlenmeyers ($V_{\text{culture}} = 50\text{mL}$) et à une $DO_i = 0,02$. Les données présentées ont été réalisées en triplicat et moyennées pour chaque construction. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts-types standard de chaque triplicats.

La surexpression du gène codant pour la **prk_Cya7425** permet une augmentation à 21 jours d'un facteur 3,6 de la production de terpènes par rapport à la souche contrôle chrFS. Cette version du gène *prk* surexprimé au sein du pT avait également eu un impact positif sur la croissance de la souche à 39°C par rapport au contrôle, et était de plus la seule version de *prk* ayant pu être clonée dans le vecteur d'expression constitutif pC. Aussi la conjugaison du **pCprk7425_Cya7425** a permis des rendements de conjugants bien plus importants et leurs arrivées bien plus rapidement que ce qui d'habitude observé au laboratoire. Cette version de gène *prk* a enfin eu une influence positive sur la croissance en conditions standard (MM, 2500 lux, 30°C) lorsqu'il est exprimé de manière constitutive et forte par le pC.

L'augmentation de la production de farnésène n'est pas visible avec l'expression des opérons hétérologues **rbc_Cya7425** ou **rbc_Sco7942** ou de l'opéron natif **rbc_Scy6803**. Pour ce dernier, il est possible que des régulations (post-transcriptionnelles, traductionnelles...) s'effectuent chez la souche *Synechocystis* sp. PCC 6803. En revanche, la surexpression de l'opéron **rbc_Sco7002** exprimé de manière constitutive à 30°C lorsqu'il est cloné dans le pC, entraîne une nouvelle fois un phénotype positif chez *Synechocystis* sp. PCC 6803 : on peut en effet observer une augmentation d'un facteur quasiment 2 à 21 de la production en farnésène par rapport à la souche contrôle chrFS. J'ai également montré dans mes résultats précédents que chez *Synechocystis* sp. PCC 6803, l'expression de l'opéron **rbc_Sco7002** cloné dans le plasmide pFC1 (pT) à 39°C, en lumière standard (2500 lux) et en milieu MM, MM-Ci et MM+Ci, entraîne à chaque fois, un impact positif sur la croissance de la souche. Au vu de l'ensemble de ces résultats phénotypiques, il est possible que la version de l'opéron *rbc* issue de la souche *Synechococcus* sp. PCC 7002, passe notamment outre les régulations du châssis hôte *Synechocystis* sp. PCC 6803 et entraîne une amélioration de l'activité totale des RuBisCO dans la souche, donc une meilleure assimilation du CO₂ et des flux de carbone vers les voies anaboliques (CCB) et catabolique (voie MEP).

D'autre part, chez les cyanobactéries, l'activité de la RuBisCO présente un niveau plus élevé au début de la phase logarithmique, puis diminue au fur et à mesure de la croissance de la culture pour finalement arriver à un niveau constant (Iwaki *et al.*, 2006). Ce que j'ai observé est cohérent avec ce phénomène (Figure. 112) ; en effet, on remarque une production importante de farnésène dès les premiers points relevés et au début de la phase logarithmique, qui augmente ensuite très progressivement, possiblement en raison de l'augmentation de la densité cellulaire dans la culture.

VII. Constructions et analyses phénotypiques des souches *Synechococcus* sp. PCC 7942 productrices de farnésène

A. Construction de la souche *Synechococcus* sp. PCC 7942 productrice de farnésène

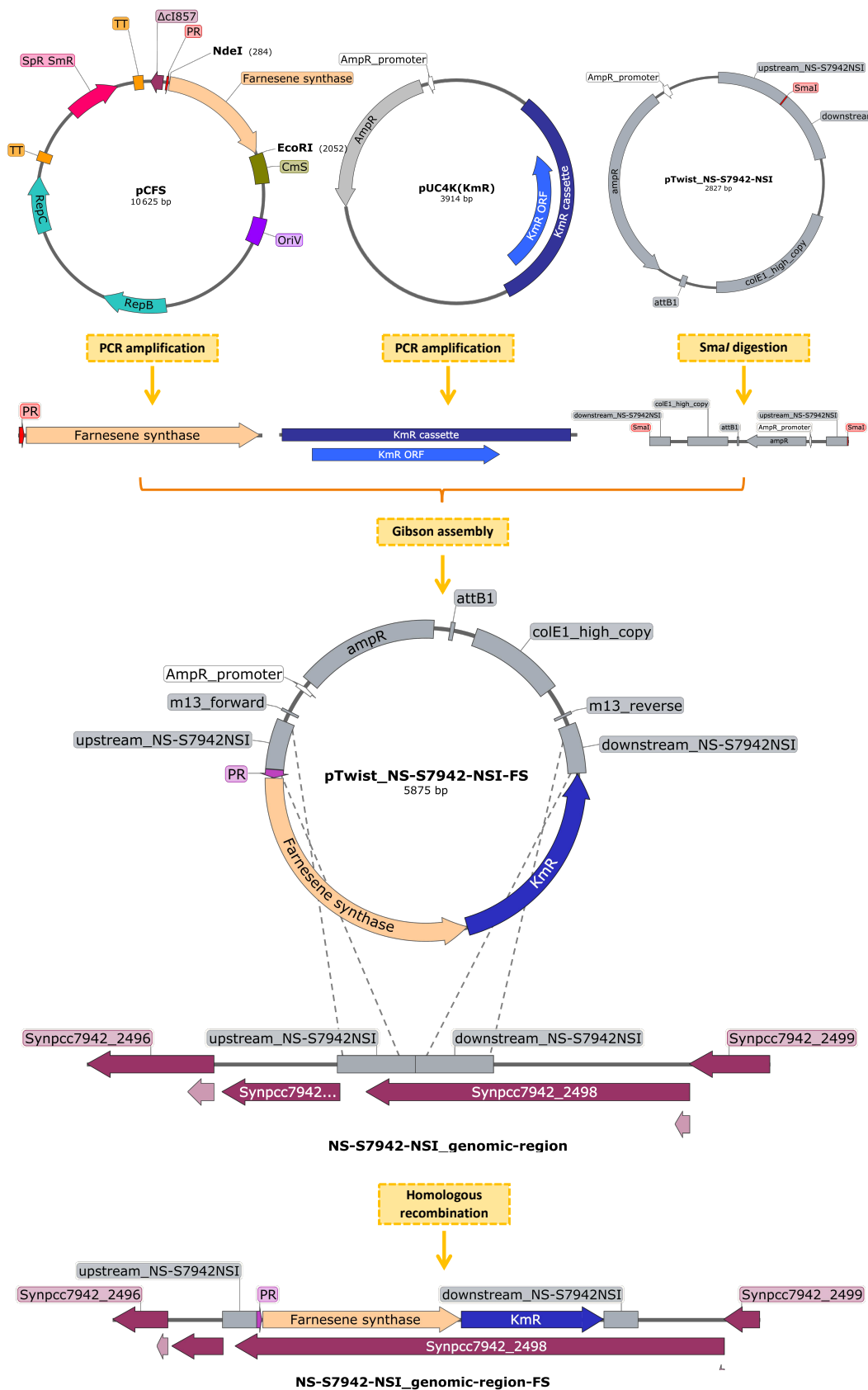


Figure 113. Construction de la souche mutante *Synechococcus sp.* PCC 7942 portant la cassette d'expression du gène codant pour la farnésène synthase au sein du site neutre chromosomique NSI. Deux biobricks ont été amplifiées par PCR. La première, P_R-FS (pour l'expression forte et constitutive

du gène codant pour la farnésène synthase (FS) de *Picea abies*, dont la séquence est adaptée au biais de codons de *Synechocystis* sp. PCC 6803) à partir du plasmide pCFS et des primers Pr-fwd-7942 et Pr-FS-rev. La deuxième correspond à la cassette Km^R (gène conférant la résistance à la kanamycine) amplifiée à partir du pUC4K(Km^R) et des primers Km-FS-fwd et Km-rev-7942.

Le plasmide pTwist_NS-S7942-NSI contient les plateformes amonts et avales du site neutre NSI du chromosome de *Synechococcus* sp. PCC 7942 linéarisé par digestion *SmaI* donc séparant les deux régions plateformes d'homologie. Le plasmide linéarisé et les deux inserts disposant d'homologies de séquence à leurs extrémités (grâce aux créations d'overhangs réalisées lors des amplifications PCR) ont été assemblés par clonage Gibson®, pour créer le plasmide pTwist_NS-S7942-NSI-FS qui contient la cassette P_R -FS- Km^R qui s'intègre par recombinaison homologue au niveau du site neutre chromosomique ciblé NSI de *Synechococcus* sp. PCC 7942.

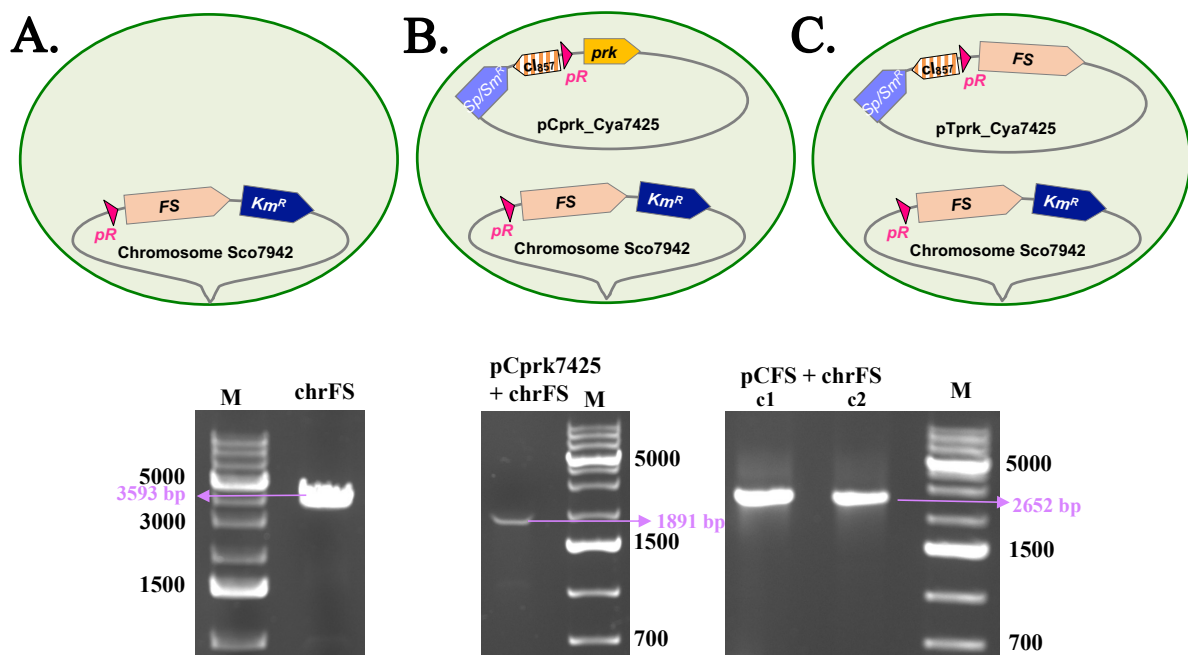


Figure 114. Composition génomique de 3 souches *Synechococcus* sp. PCC 7942 productrices de farnésène et leurs vérifications par amplification PCR

Les 3 châssis de *Synechococcus* sp. PCC 7942 portent la cassette d'expression chrFS au niveau du site neutre chromosomique NSI : (A). le châssis chrFS a été obtenu par transformation de la souche WT avec la cassette d'expression pTwist_NS-S7942-FS et a été vérifié par amplification PCR avec les amorces NS7942_a_Fwd et NS7942_b_rv qui s'appuient respectivement sur les plateformes d'homologies amont et avales du site neutre NSI-S7942. (B). le châssis pCprk7425 + chrFS a été obtenu par conjugaison du plasmide pCprk_Cya7425 avec la souche chrFS et a été vérifié par amplification PCR avec les amorces Ci857_fwd et pFC1_rer1_célia qui s'appuient respectivement sur le pC au niveau du gène *Ci857* et du Cm^S . (C). Le châssis pCFS + chrFS a été obtenu par conjugaison du plasmide pCFS avec la souche chrFS et a été vérifié par amplification PCR avec les amorces Ci857_fwd et Pfc1_rer1_célia qui s'appuient respectivement sur le pC au niveau du gène *Ci857* et du Cm^S . Le marqueur de poids moléculaire (M) = 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

B. Analyses phénotypiques des souches *Synechococcus* sp. PCC 7942 productrices de farnésène

1) Augmentation de la production de farnésène par augmentation du nombre de copies de cassettes d'expression du gène codant pour la farnésène synthase chez *Synechococcus* sp. PCC 7942

Les souches de *Synechococcus* sp. PCC 7942 **pCFS** et **chrFS** portent la cassette d'expression du gène codant pour la farnésène synthase (FS) respectivement au sein du plasmide répliatif "pC" ou du site neutre chromosomique NS-S7942. La souche *Synechococcus* sp. PCC 7942 **pCFS + chrFS** possède les deux cassettes d'expression.

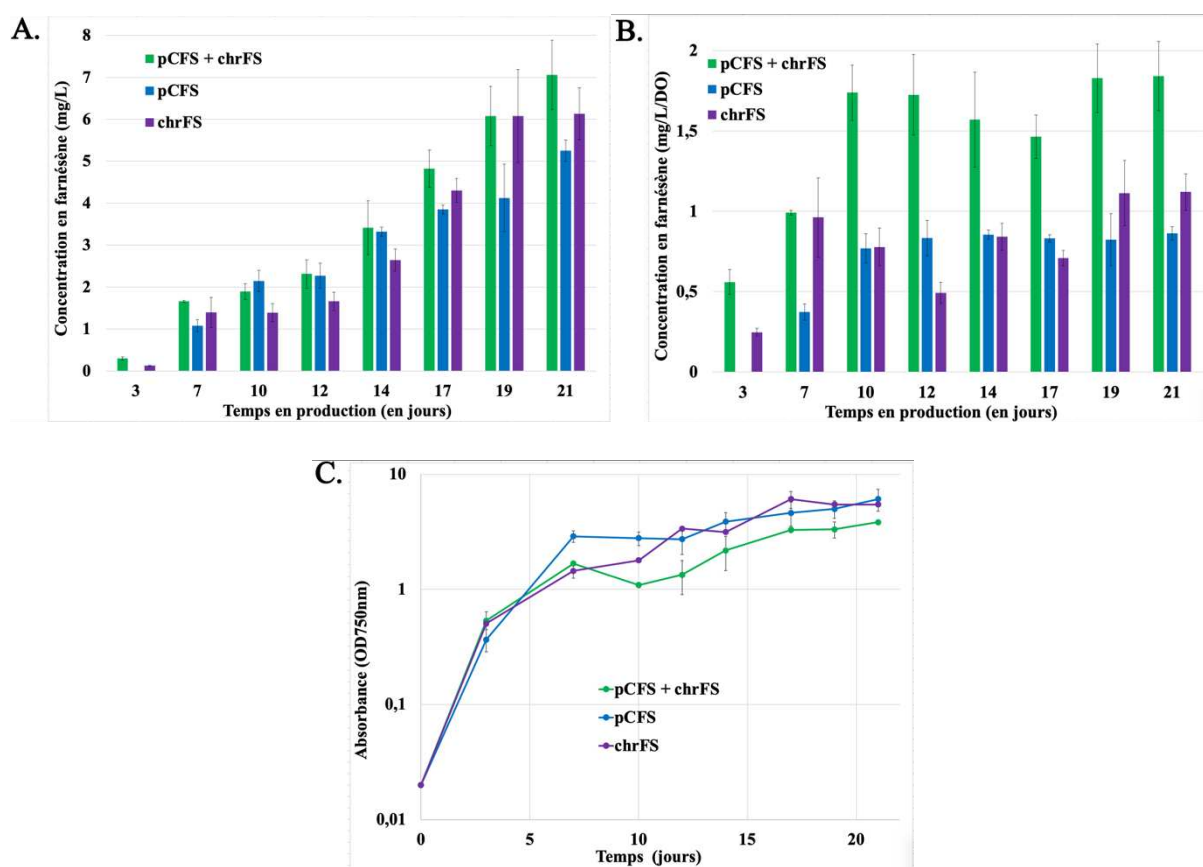


Figure 115. Production en farnésène des souches *Synechococcus* sp. PCC 7942 en fonction de la localisation (plasmidique ou chromosomique) et du nombre de la cassette d'expression du gène codant pour la farnésène synthase (*fs*)

Production (A. en mg/L et B. en mg/L/DO) et courbes de croissance (C.) des souches *Synechococcus* sp. PCC 7942 possédant la cassette d'expression du gène *fs* portée au sein du plasmide (pCFS en bleu), ou au sein du site neutre chromosomique NSI (chrFS en violet), ou au sein des deux systèmes d'expression (pCFS + chrFS en vert).

Ces diverses souches ont été cultivées en conditions standard : MM en présence de dodécane (20% v/v), 2500 lux, sous agitation 140 rpm (dans un incubateur Infors), à 30°C, en erlensmeyers ($V_{\text{culture}} = 50 \text{ mL}$) et à une $DO_i = 0,02$. Les données présentées ont été réalisées en triplicat et moyennées pour chaque construction. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts-types standard de chaque triplicats.

Par comparaison avec *Synechocystis* sp. PCC 6803, où l'expression des gènes codant pour la farnésène synthase varie drastiquement entre le système d'expression plasmidique pC et le site neutre slr0168, pour *Synechococcus* sp. PCC 7942, la comparaison de la production en farnésène au sein des deux systèmes d'expression (pC et site neutre NSI_S7942) montre, comme les souches *Synechococcus* sp. PCC 7002 productrices de limonène, des résultats équivalents de rendements en farnésène, lorsque ceux-ci sont rapportés par unité de DO. Contrairement au cas du site neutre *slr0168* de *Synechocystis* sp. PCC 6803, l'intégration d'une cassette d'expression au sein du site neutre NSI_S7942 (et sa disruption) n'entraîne pas, dans les conditions de laboratoire, de modifications phénotypiques notables au niveau des rendements de production ou de la croissance (Figure 115.). Néanmoins, une remarque pourrait être faite au niveau du temps de latence de la production ou de la croissance selon le système d'expression. On observe en effet, que lorsque le gène *fs* est exprimé au niveau du système plasmidique pC, les rendements en farnésène sont plus faibles en phase exponentielle, et les taux de croissance plus élevés que lors d'une expression du gène *fs* au niveau chromosomique où la production en farnésène est plus importante et potentiellement une cause du ralentissement de la phase exponentielle de la souche chrFS, dont l'accumulation de biomasse rattrape néanmoins celle de la souche pCFS en phase stationnaire (jour 12).

Le doublement du nombre de terpènes synthases chez la souche pCFS + chrFS, entraîne un retard de croissance en phase stationnaire par rapport aux autres souches contrôles pCFS et chrFS. Cependant, la production de farnésène à 3 jours est déjà mesurable, et 2X plus importante que celle de la souche chrFS, par comparaison à la souche contrôle pCFS qui n'observe pas de production.

En rapportant les rendements de production des différentes souches de *Synechococcus* sp. PCC 7942 par unité de DO comme le montre la figure 115.B, on remarque donc que la production de farnésène n'est pas dépendante de la localisation de la cassette d'expression du gène *fs* (plasmide pC ou site neutre NSI_S7942). La double intégration de la cassette codant pour la farnésène synthase chez la souche pCFS + chrFS entraîne une augmentation des rendements de production en farnésène résultant dès le 10 jours de production, de l'addition des rendements de la production de la souche pCFS et de la souche chrFS (Figure 115.). A 21 jours par exemple les rendements de production de la souche pCFS + chrFS sont de plus de 1,8 mg/L/DO à 21 jours, ceux de la souche pCFS de 0,86 mg/L/DO, et ceux de la souche chrFS de 1,12 mg/L/DO. Au vu des résultats de production, l'augmentation du nombre de cassettes d'expression au sein de *Synechococcus* sp. PCC 7942 s'avère entraîner un retard de croissance pour la souche, qui non négligeable pour la production en farnésène en mg/L, mais qui rapporté en mg/L/DO permet un doublement des rendements. *Synechococcus* sp. PCC 7942

Plusieurs hypothèses peuvent être formulées quant au retard de croissance de la souche pCFS + chrFS par rapport aux souches contrôles. Il est possible que la souche *Synechococcus* sp. PCC 7942, afin d'assumer l'addition d'une cassette supplémentaire codant pour la farnésène synthase pour doubler les rendements de production (qu'elle atteint), viennent rediriger (au niveau de son métabolisme) les flux de carbone requis au niveau de la voie MEP. Cette redirection de flux se solvant en une diminution de la fitness de la souche visible phénotypiquement par la baisse de ses taux de croissance. Une autre hypothèse (la plus plausible) serait que le doublement de la production en farnésène par cellule soit toxique pour *Synechococcus* sp. PCC 7942. On remarque en effet sur les figures 115. B et C, qu'à 7 jours la souche pCFS + chrFS observe une légère diminution de sa phase exponentielle pouvant être corrélée au doublement des rendements par rapport au jour 3. Au jour 7, ses rendements de production sont de nouveaux quasiment doublés par rapport au jour 3 (et par rapport aux souches contrôles pCFS et chrFS au même jour), très probablement en cause de la diminution

de la DO observée entre le jour 3 (1,675 en log) et le jour 7 (à 1,09 en log). Afin de vérifier ces hypothèses, il serait intéressant d'intégrer une autre cassette d'expression codant pour une autre terpène synthase que la FS au niveau du site neutre NSI_S7942 et de comparer les productions obtenues par le doublement du nombre de cassette d'expression codant pour une terpène synthase avec des souches contrôles. Néanmoins, au vu des différents résultats obtenus avec la souche *Synechococcus* sp. PCC 7942 dans cette étude et au laboratoire (au niveau de la production de différents terpènes encodés par des gènes exprimés dans le pC), le châssis ne semble pas être très avantageux pour la production de terpène, tant au niveau de l'adaptation au dodécane qu'il est nécessaire d'établir avant de démarrer toute production, qu'au niveau des rendements obtenus en terpènes par rapport à d'autres châssis cyanobactériens.

2) Absence d'effets notables de la surexpression du gène codant pour la PRK de *Cyanotheca* sp. PCC 7425 sur la production de farnésène chez *Synechococcus* sp. PCC 7942

Précédemment nous avons observé que l'expression de la *prk_Cya7425* au sein du châssis *Synechococcus* sp. PCC 7942 a un impact positif sur la production de biomasse quelle que soit la concentration en Ci dans le milieu lorsque les cellules sont cultivées à 39°C (expression thermorégulée à partir du *p_R*). Néanmoins, à 30°C l'expression du gène *prk_Cya7425* à partir du plasmide réplcatif pC ne semble pas avoir d'influence au niveau des rendements de production en farnésène.

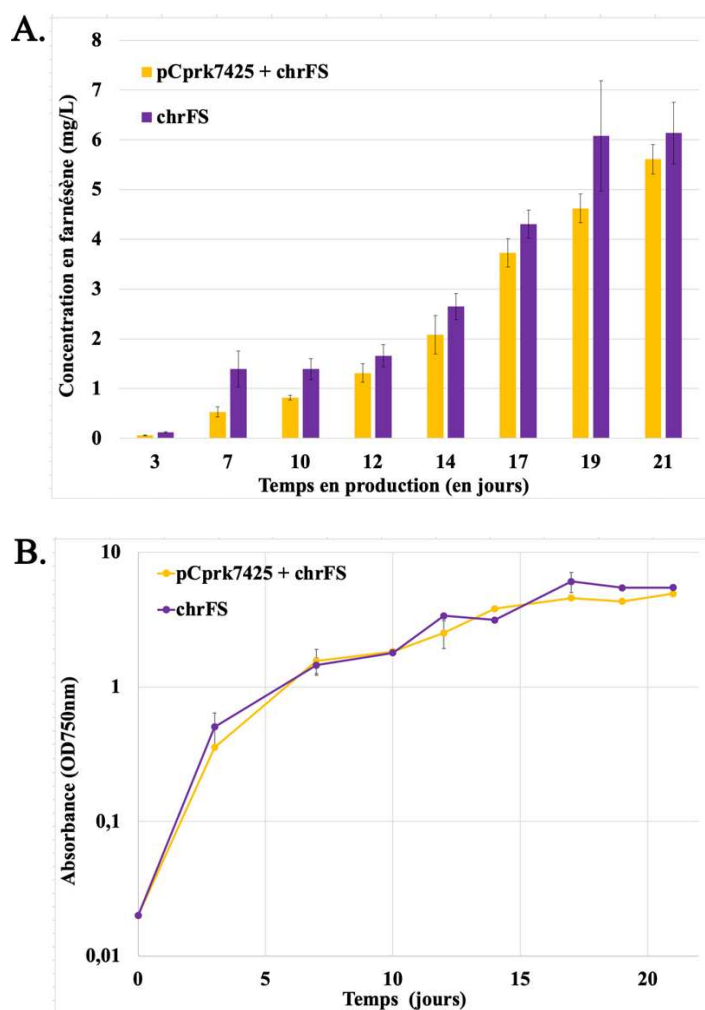


Figure 116. Production en farnésène des souches *Synechococcus* sp. PCC 7942 combinant la surexpression du gène *prk* par rapport à la souche contrôle.

Les résultats de production (A.) et courbes de croissance (B.) des souches *Synechococcus* sp. PCC 7942 possédant la cassette d'expression du gène codant pour la farnésène synthase au sein du site neutre chromosomique NSI et celle permettant l'expression du gène *prk* *Cyanotheca* sp. PCC 7425 portée par le plasmide pC_ *prk*7425 + chrFS en jaune, par rapport à la souche contrôle chrFS en violet. Ces souches ont été cultivées en conditions standard : MM en présence de dodécane (20% v/v), 2500 lux, sous agitation (140 rpm dans un incubateur Infors), 30°C, en erlensmeyers ($V_{\text{culture}} = 50 \text{ mL}$) et à une $DO_i = 0,02$. Les données présentées ont été réalisées en triplicat et moyennées pour chaque constructions. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts-types standard de chaque triplicats.

VIII. Constructions et analyses phénotypiques des souches *Synechococcus* sp. PCC 7002 productrices de santalène

A. Construction de la souche *Synechococcus* sp. PCC 7002 productrice de santalène

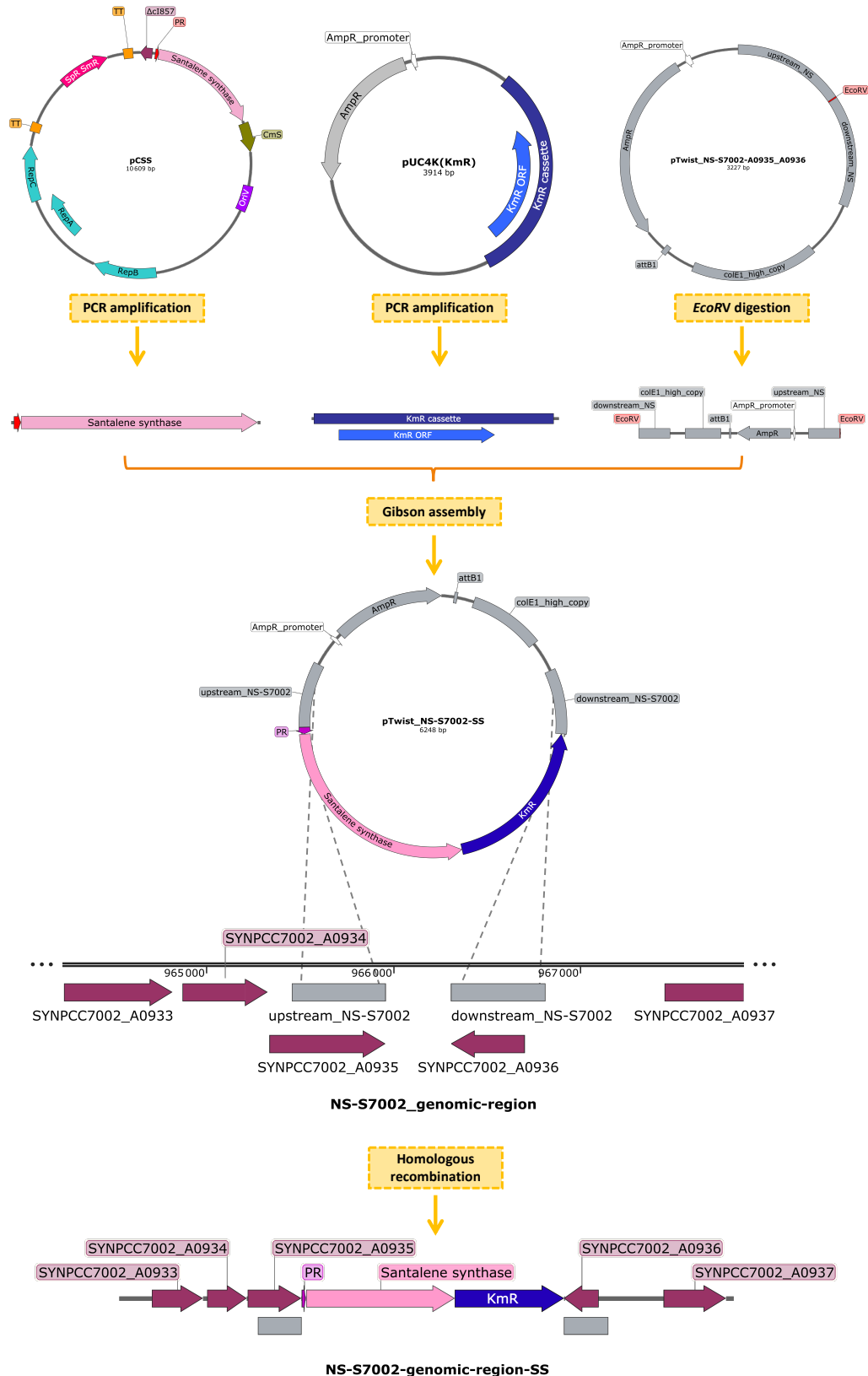
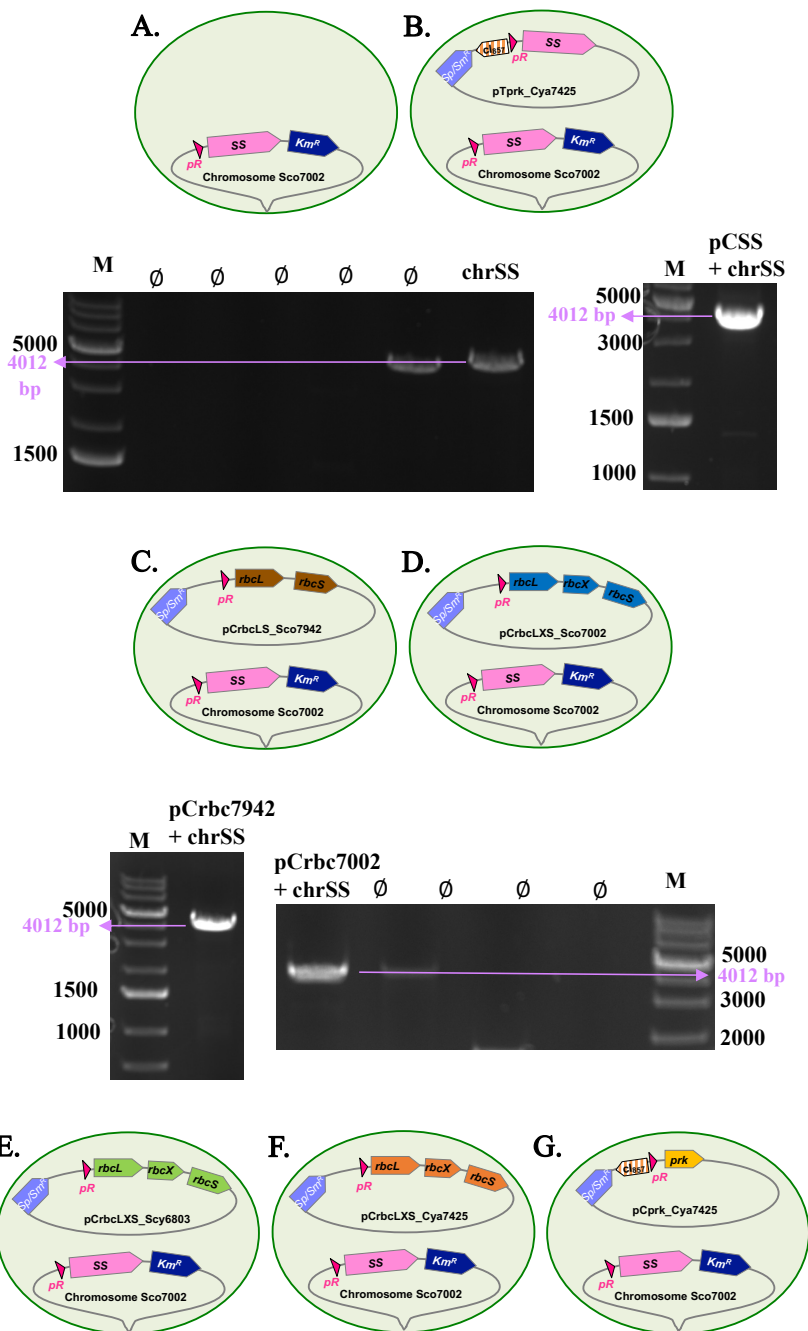


Figure 117. Construction de la souche mutante *Synechococcus sp.* PCC 7002 portant la cassette d'expression du gène codant pour la santalène synthase clonée au site neutre chromosomique NS_S7002 (A0935-A0936)

Deux biobricks ont été amplifiées par PCR. La première, Pr-SS (pour l'expression forte et constitutive du gène codant pour la santalène synthase (SS) de *Santalum album*, dont la séquence est adaptée au biais de codons de *Synechocystis sp.* PCC 6803) à partir du plasmide pCSS et des primers Pr_SS_fwd_NS-

S7002 et Pr_SS_rev_SS-Km. La deuxième correspond à la cassette Km^R (gène conférant la résistance à la kanamycine) amplifiée à partir du pUC4K(Km^R) et des primers KmR_fwd_SS-Km et KmR_rev_NS-S7002.

Le plasmide pTwist_NS-S7002-A0935-A0936 contient les plateformes amonts et avals du site neutre A0935-A0936 du chromosome de *Synechococcus* sp. PCC 7002 linéarisé par digestion *EcoRV* donc séparant les deux régions plateformes d'homologie. Le plasmide linéarisé et les deux inserts disposant d'homologies de séquence à leurs extrémités (grâce aux créations d'overhangs réalisées lors des amplifications PCR) ont été assemblés par clonage Gibson®, pour créer le plasmide pTwist_NS-S7002-SS qui contient la cassette P_R-SS-Km^R qui s'intègre par recombinaison homologue au niveau du site neutre chromosomique ciblé A0935-A0936 de *Synechococcus* sp. PCC 7002.



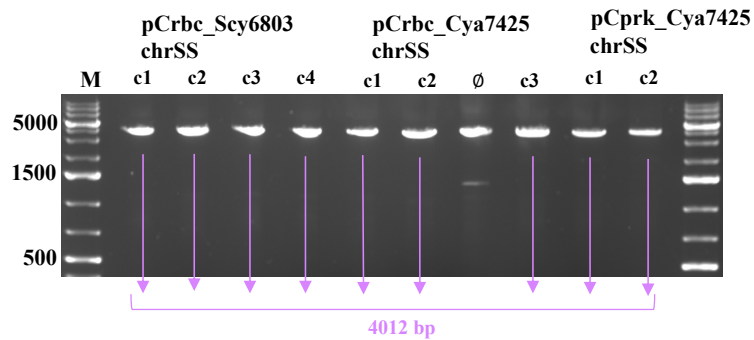


Figure 118. Composition génomique des 7 souches de *Synechococcus* sp. PCC 7002 productrices de santalène et leurs vérifications par amplification PCR

Les 7 châssis de *Synechococcus* sp. PCC 7002 présentent la cassette d'expression de la santalène synthase au niveau de leurs sites neutres chromosomiques : (A). le châssis chrSS a été obtenu par transformation de la souche WT avec la cassette d'expression pTwist_NS-S7002-SS et a été vérifié par amplification PCR avec les amorces NS7002_a_Fwd et NS7002_b_rv qui s'appuient respectivement sur les plateformes d'homologies amonts et avalées du site neutre NS-S7002. (B). le châssis pCSS + chrSS a été obtenu par transformation de la souche pCSS avec la cassette d'expression pTwist_NS-S7002-SS et a été vérifié par amplification PCR avec les amorces NS7002_a_Fwd et NS7002_b_rv. (C). le châssis pCrbc_Sco7942 + chrSS a été obtenu par transformation de la souche pCrbc_Sco7942 avec la cassette d'expression pTwist_NS-S7002-SS et a été vérifié par amplification PCR avec les amorces NS7002_a_Fwd et NS7002_b_rv (D). le châssis pCrbc_Sco7002 + chrSS a été obtenu par transformation de la souche pCrbc_Sco7002 avec la cassette d'expression pTwist_NS-S7002-SS et a été vérifié par amplification PCR avec les amorces NS7002_a_Fwd et NS7002_b_rv. (E). le châssis pCrbc_Scy6803 + chrSS a été obtenu par transformation de la souche pCrbc_Scy6803 avec la cassette d'expression pTwist_NS-S7002-SS et a été vérifié par amplification PCR avec les amorces NS7002_a_Fwd et NS7002_b_rv. (F). le châssis pCrbc_Cya7425 + chrSS a été obtenu par transformation de la souche pCrbc_Cya7425 avec la cassette d'expression pTwist_NS-S7002-SS et a été vérifié par amplification PCR avec les amorces NS7002_a_Fwd et NS7002_b_rv. (G). le châssis pCprk_Cya7425 + chrSS a été obtenu par transformation de la souche pCprk_Cya7425 avec la cassette d'expression pTwist_NS-S7002-SS et a été vérifié par amplification PCR avec les amorces NS7002_a_Fwd et NS7002_b_rv. Le marqueur de poids moléculaire (M) = 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

B. Analyses phénotypiques des souches *Synechococcus* sp. PCC 7002 productrices de santalène

1) Le système d'expression plasmidique ne permet pas la production des 3 isomères et le doublement du nombre de cassettes d'expression de la santalène synthase a un impact négatif sur leurs rendements

L'expression du gène codant pour la santalène synthase de *Santalum album* (adaptée au biais de codon de *Synechocystis* sp. PCC 6803) catalyse la synthèse de nombreux composés dont nous avons pu mesurer les rendements chez les souches ingénierées de *Synechococcus* sp. PCC 7002. C'est le cas des isomères α -santalène, epi - β -santalène et α -*exo*-bergamotène.

La souche *Synechococcus* sp. PCC 7002 **chrSS** porte la cassette d'expression du gène codant pour la santalène synthase (SS) au sein du site neutre chromosomique NS_S7002. La souche *Synechococcus* sp. PCC 7002 **pC SS + chrSS** porte deux cassettes d'expression du gène codant pour la santalène synthase, une portée par le plasmide réplcatif pC et l'autre intégrée au site neutre chromosomique NS_S7002 (Figure 119.).

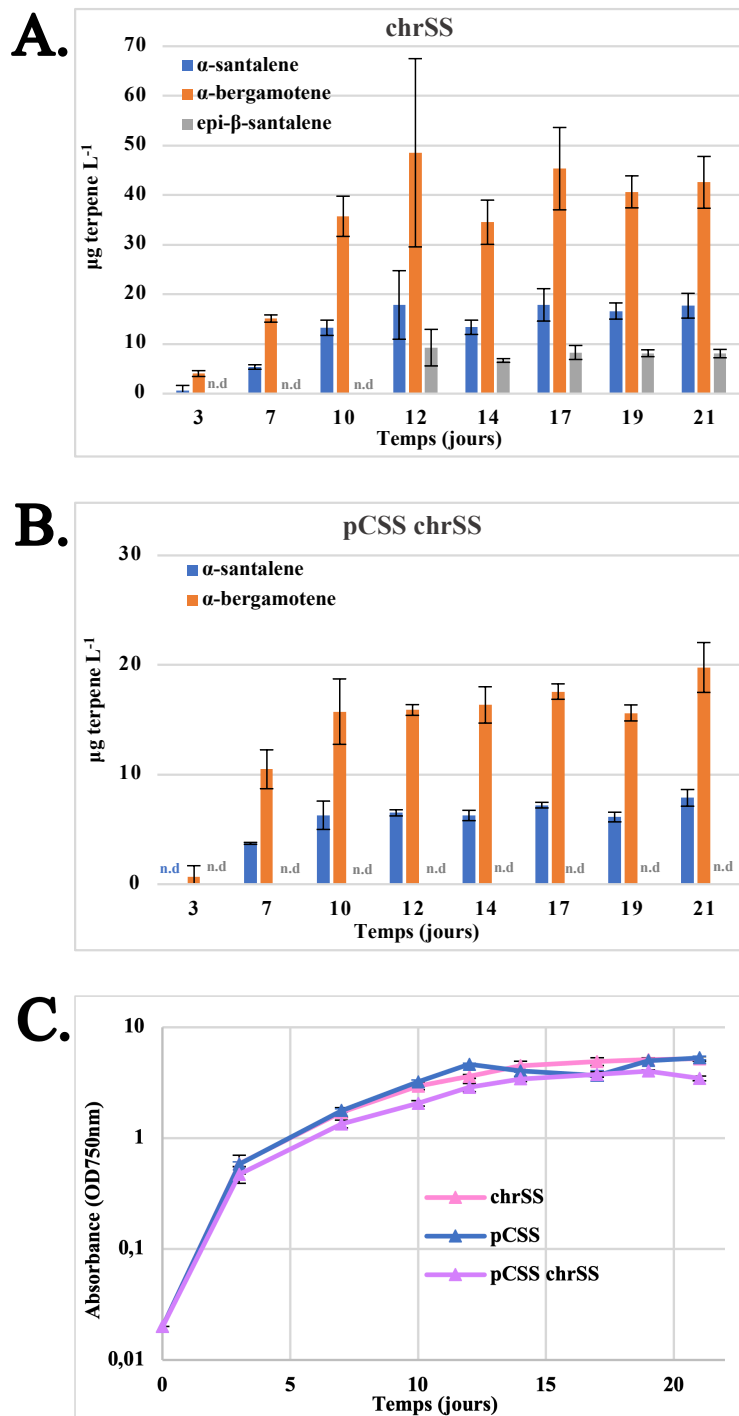


Figure 119. Production en santalène des souches *Synechococcus* sp. PCC 7002 en fonction de la localisation et du nombre de cassette d'expression (plasmidique ou chromosomique)

Production (A) et courbes de croissance (B) des souches de *Synechococcus* sp. PCC 7002 possédant la cassette d'expression de la santalène synthase au sein du plasmide (pCSS en bleu), au sein du site neutre chromosomique A0935-A0936 (chrSS en rose), ou au sein des deux systèmes d'expression (pCSS + chrSS en violet).

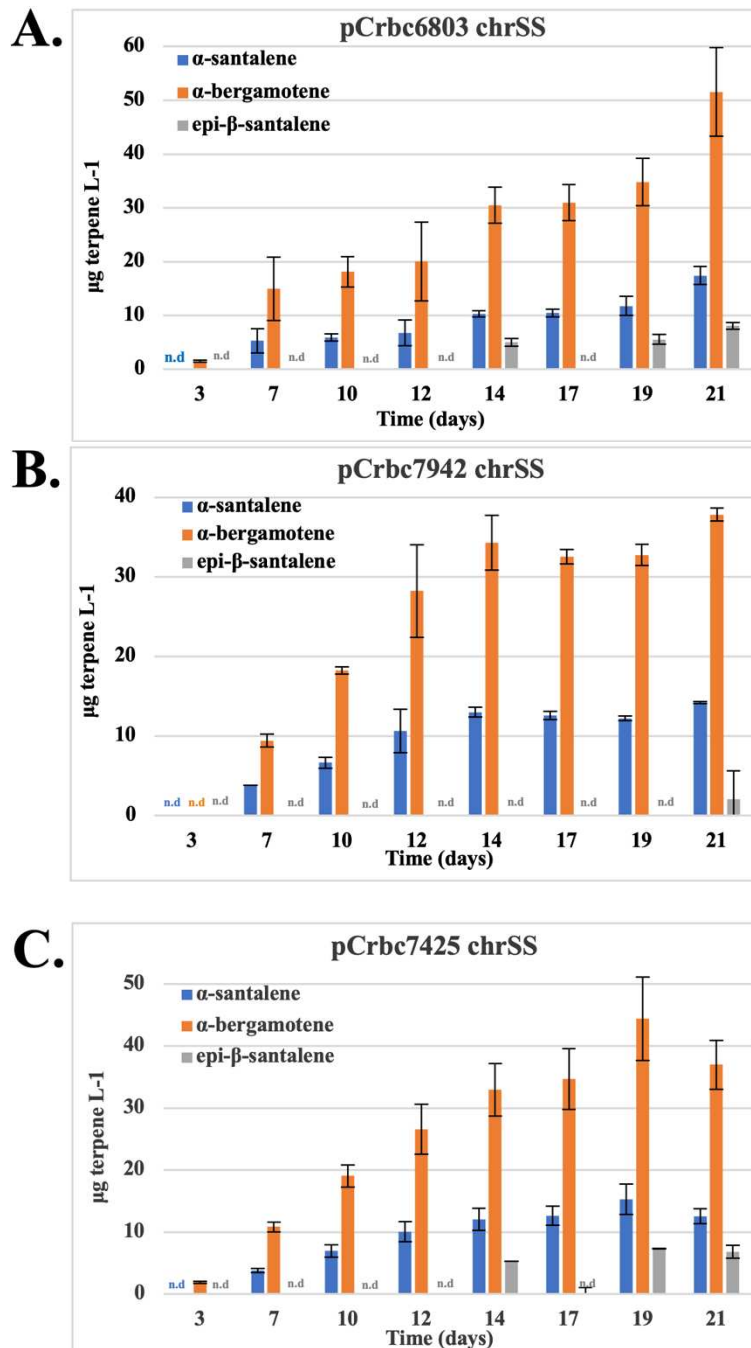
Ces souches mutantes sont cultivées en conditions standard : milieu A+ en présence de dodécane (20% v/v), 2500 lux, 140 rpm dans un incubateur Infors, 30°C, en erlenmeyers ($V_{\text{culture}} = 50\text{mL}$) et à une $DO_i = 0,02$. Les données présentées ont été réalisées en triplicat et moyennées pour chaque constructions. Les barres d'erreur représentent l'écart-type moyen pour tous les échantillons.

Le plasmide pCSS propagé au sein de *Synechococcus* sp. PCC 7002, qui se réplique de façon stable et autonome dans le châssis sans perturber la croissance de la souche, ne permet pas la production, des isomères de santalène, même après 3 semaines de culture. Ceci est à l'image d'une autre souche de cyanobactérie *Synechococcus* sp. PCC 7942, pourtant le pCSS propagé dans d'autres châssis cyanobactériens tels que *Synechocystis* sp. PCC 6803 ou *Cyanothece* sp. PCC 7425 (résultats non publiés) est fonctionnel et permet la production de santalène. 3 clones pCSS ont été vérifiés par PCR et séquençages au niveau de leurs séquences promotrices et ORF codantes, et ne montrent pourtant aucune mutation ponctuelle.

En revanche, en intégrant la même cassette d'expression au site neutre chromosomique NS_S7002, une production des différents isomères du santalène est observée. En revanche, un impact négatif est observé sur la production de santalène par la souche pCSS + chrSS par rapport à la souche chrSS ; la souche montrant une production 2X moins importante que la souche chrSS en α -santalène et α -*exo*-bergamotène et une absence de production d'*epi*- β -santalène (Figure 119.). Une hypothèse serait que l'intégration de la cassette d'expression de la santalène synthase au niveau du système d'expression plasmidique pC engendre des mutations ponctuelles indétectables sans reséquençage total du génome

2) La surexpression des gènes codants pour les enzymes du CCB n'a pas d'influence sur la production des 3 différents isomères chez *Synechococcus* sp. PCC 7002

Les souches *Synechococcus* sp. PCC 7002 portant la cassette de la santalène synthase clonée au sein du site neutre NS_S7002, avec la combinaison de la surexpression de plusieurs gènes/opérons codants pour différentes enzymes du CCB, n'ont pas d'influence sur les rendements de production des différents isomères α -santalène, α -exo-bergamotène et *epi*- β -santalène (Figure 119.).



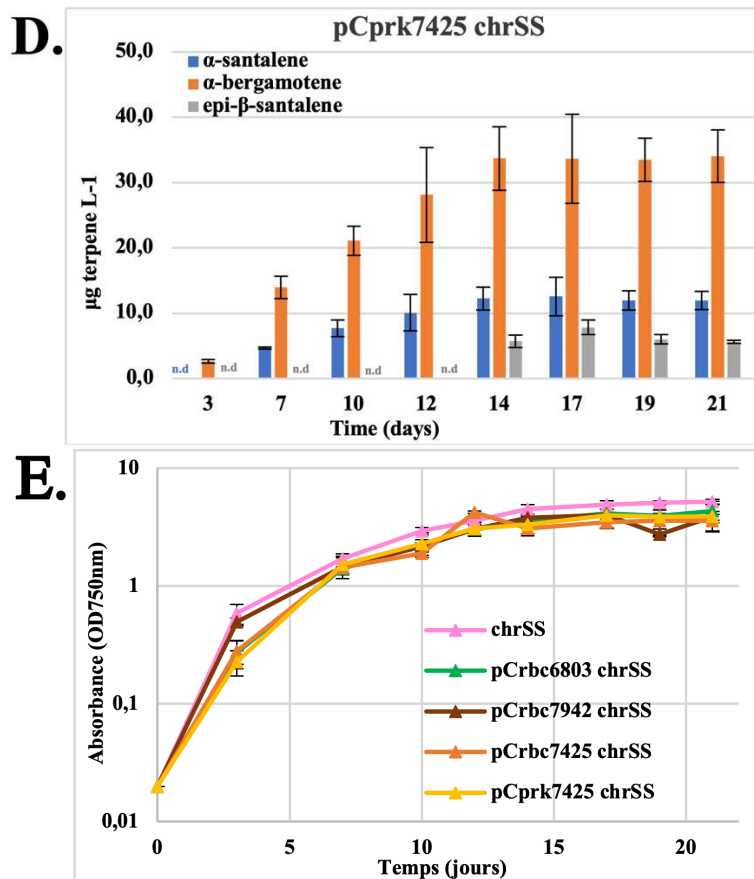


Figure 120. Production des isomères α -santalène, α -exo-bergamotène et epi- β -santalène des souches *Synechococcus* sp. PCC 7002 combinant la surexpression du gène *prk* et opérons *rbc* à l'expression du gène codant pour la santalène synthase au sein du site neutre A0935-A0936

Les résultats de production et courbes de croissance des souches *Synechococcus* sp. PCC 7002 portant la cassette d'expression de la santalène synthase au sein du site neutre chromosomique A0935-A0936 et celles permettant la surexpression des opérons *rbc* sont présentés dans les panels : **A.** (résultats de production) pCrbc6803 + chrSS et **E.** (résultats de croissance) en vert, **B.** pCrbc7942 + chrSS et **E.** en marron, **C.** pCrbc7425 + chrSS et **E.** en orange, et pour la surexpression du gène *prk* dans les panels : **D.** pCprk7425 + chrSS et **E.** en jaune. Ces souches ont été cultivées en conditions standard : milieu A+ en présence de dodécane (20% v/v), 2500 lux, sous agitation (140 rpm dans un incubateur Infors), 30°C, en erlensmeyers ($V_{\text{culture}} = 50$ mL) et à une DOI = 0,02. Les données présentées ont été réalisées en triplicats ou quadruplicats et moyennées pour chaque construction. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts-types standard de chaque triplicats ou quadruplicats.

IX. Influence de la composition du milieu sur la production en terpènes chez la souche *Synechocystis* sp. PCC 6803

A. Comparaison de la croissance et de la production en farnésène de la souche *Synechocystis* sp. PCC 6803 au sein de différents milieux

La production de la souche *Synechocystis* sp. PCC 6803 mutante pCFS est comparée en milieu minéral (MM), en MM supplémenté en carbone inorganique Na₂CO₃ à 0,6 g/L (MM+Ci) et en MM sans carbone inorganique (MM-Ci) uniquement atmosphérique (CO₂). L'abréviation « d72 » signifie que le dodécane a été ajouté 72h après l'ensemencement des cellules.

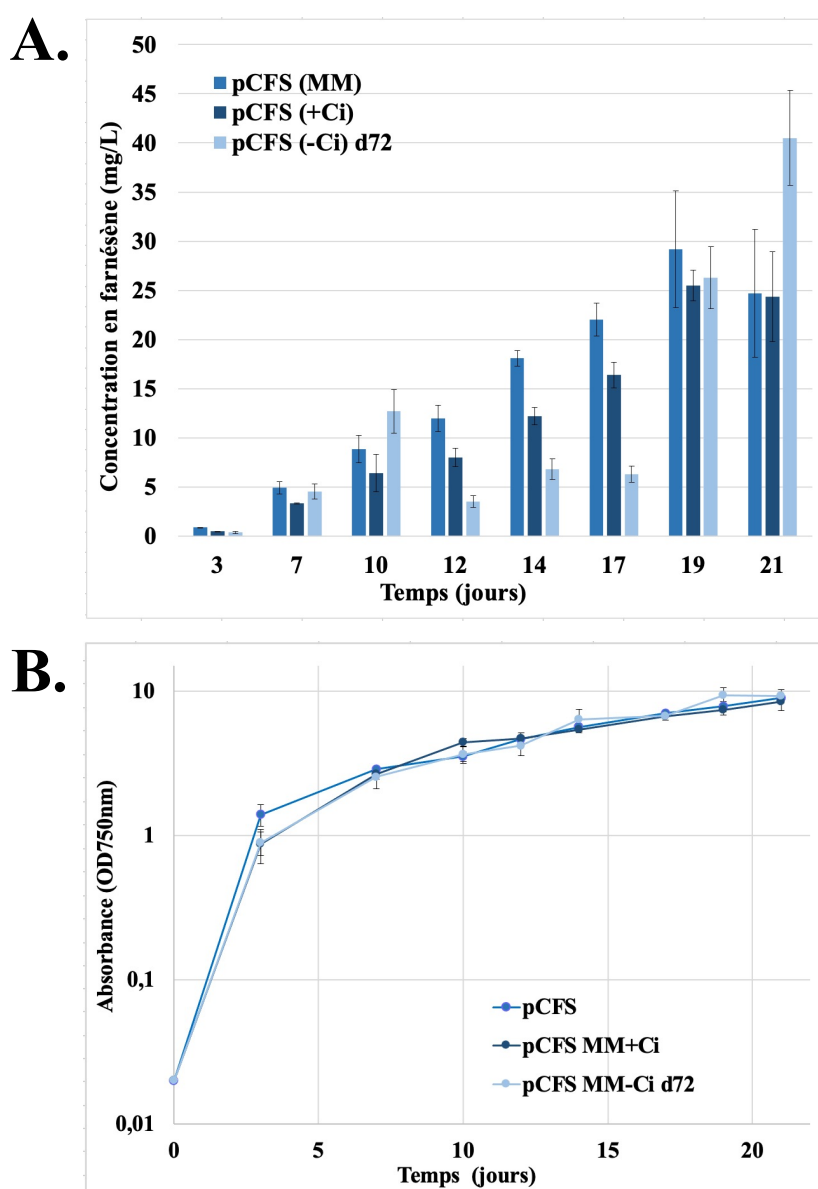


Figure 121. Résultats de la quantification par GC-MS de la production en farnésène et suivi de la croissance sur 21 jours de la souche mutante *Synechocystis* sp. PCC 6803 pCFS. (A.) Quantification de la production en farnésène en milieu MM, MM-Ci et MM+Ci (B.) Courbe de croissance en milieu MM, MM-Ci et MM+Ci

En milieu **MM–Ci**, les quantités en terpènes produites sont, en fin de phase exponentielle de la souche mutante, bien inférieures aux quantités produites en milieux de cultures (MM et MM +Ci) ; cette tendance s’inverse en phase stationnaire. On observe que le milieu de culture utilisé n’a en revanche pas d’influence sur la croissance de la souche pCFS, tant au niveau des vitesses de croissance que des biomasses accumulées (Figure 121).

La distribution du carbone allouée à la voie MEP et la production en farnésène semble la plus importante au niveau de la phase stationnaire et cette différence est d’autant plus nette dans un milieu où le carbone est limitant.

B. Comparaison de la croissance et de la production en limonène de la souche *Synechocystis* sp. PCC 6803 au sein de différents milieux

1) Construction de la souche *Synechocystis* sp. PCC 6803 productrice de limonène pCLS

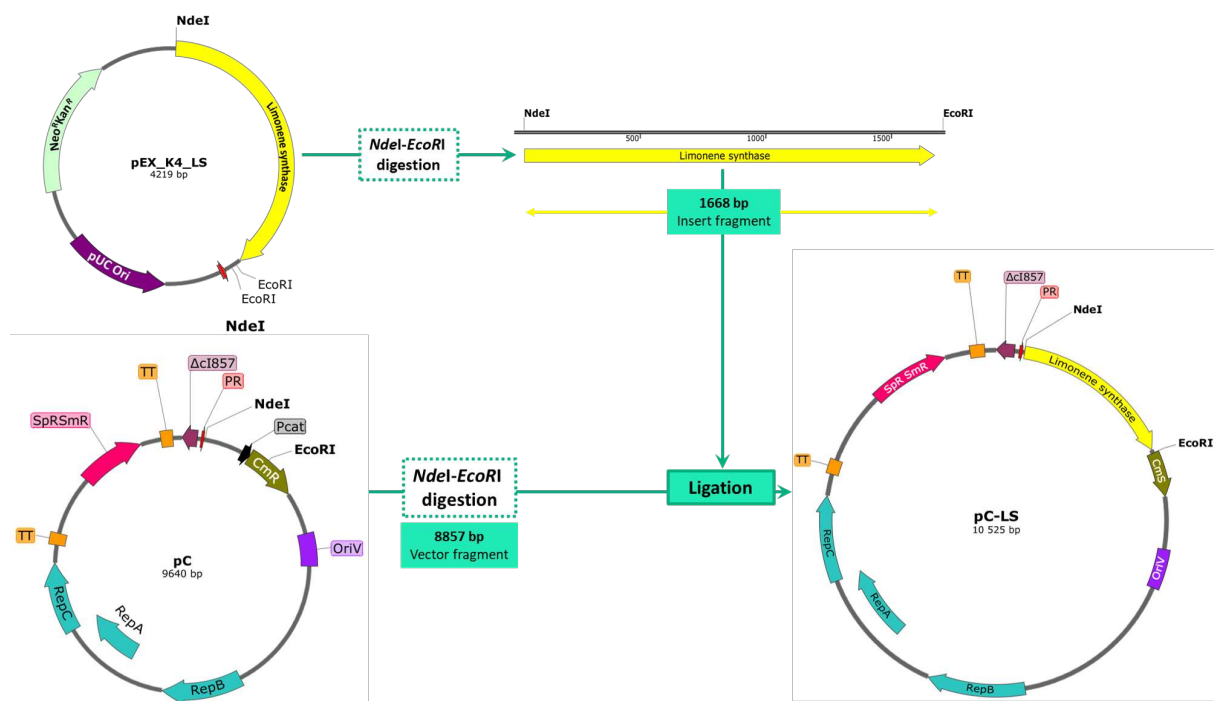
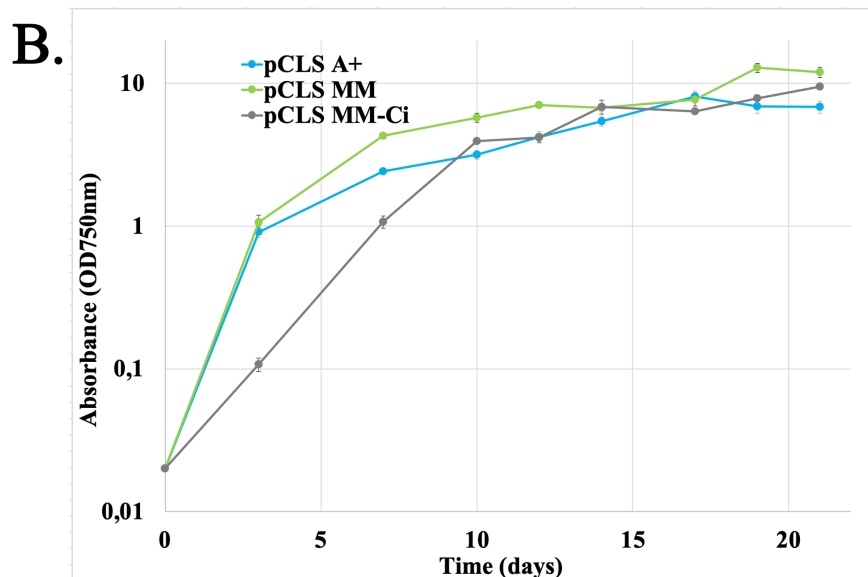
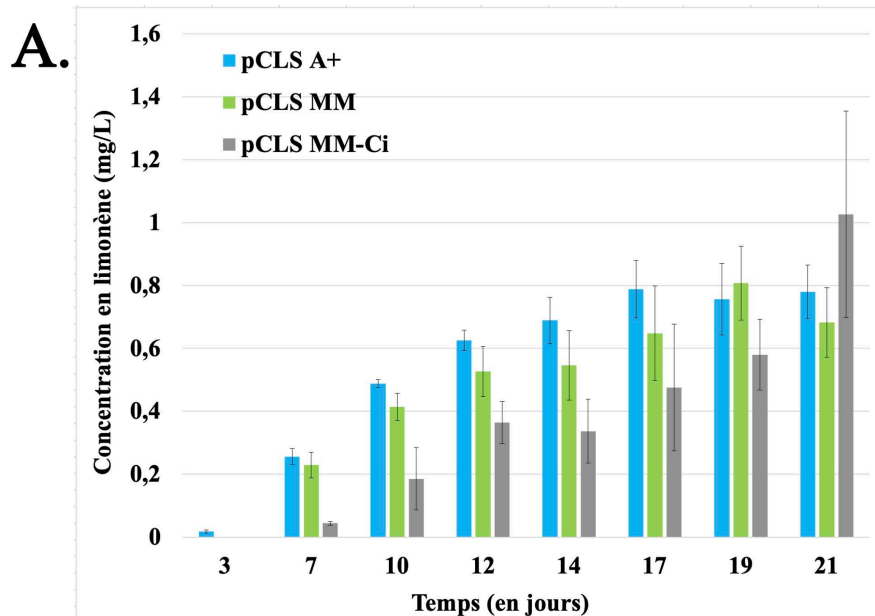


Figure 122. Construction du plasmide pC-LS pour l'expression constitutive du gène codant pour la 4S-limonène synthase de *Mentha spicata*

La séquence du gène codant pour la 4S-limonène synthase est adaptée au biais de codon de *Synechocystis* sp. PCC 6803. Les sites de restriction *NdeI* et *EcoRI* sont utilisés pour le clonage du gène de la limonène synthase à partir du pEX_K4_LS (fourni par Eurofins Genomics) dans le vecteur pC, générant le plasmide pC-LS. Le gène de la limonène synthase (en jaune) est exprimé de manière constitutive à partir du puissant promoteur du phage λ *pR* (en rouge). Les gènes sont représentés par des flèches colorées pointant dans la direction de leur transcription. Le gène *Cm^R* de pC-LS est tronqué et le gène *Sp^R/Sm^R* (rose) est flanqué du double terminateur (TT, orange) pour empêcher la propagation de l'expression du gène (Chenebault *et al.*, 2020).

2) Analyses phénotypiques de la souche *Synechocystis* sp. PCC 6803 productrice de limonène au sein de différents milieux

Le suivi de la croissance et la quantification de la production en limonène de la souche mutante pCLS *Synechocystis* sp. PCC 6803 ont été réalisés, dans des conditions standard (30°C, 2500 lux ($\approx 35 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) et 20% v/v_{tot} de dodécane) au sein de différents milieux de culture : en MM standard, en MM-Ci (sans supplémentation de Na₂CO₃) et en milieu A+ (Figure 123.).



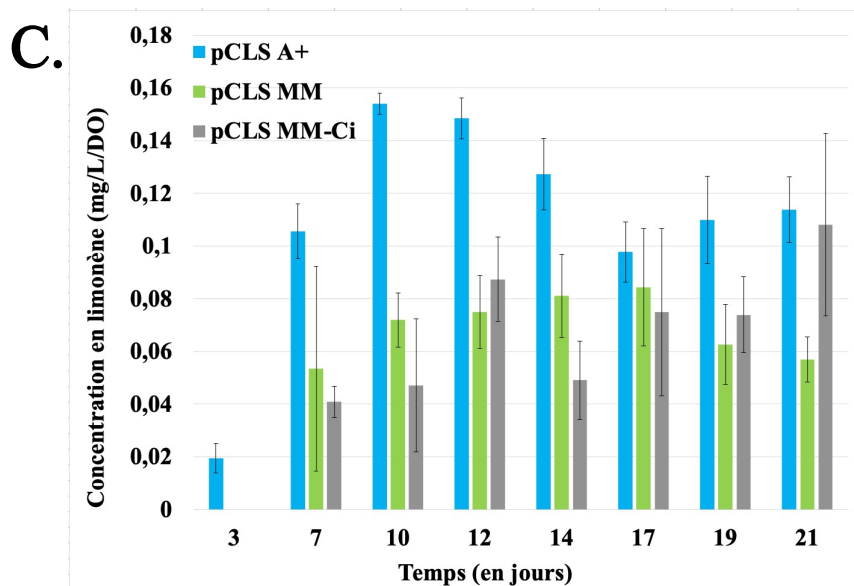


Figure 123. Comparaison de l'influence des milieux MM, MM-Ci et A+ chez une souche *Synechocystis sp. PCC 6803* productrice de limonène

Les résultats de production **A.** et courbes de croissance **B.** (suivis sur 21 jours) de la souche mutante *Synechocystis sp. PCC 6803* exprimant la cassette d'expression de la limonène synthase au sein du plasmide pC (pCLS), cultivée dans un milieu de culture MM (en vert), MM-Ci (en gris), A+ (en bleu). L'ensemble des souches productrices de limonène sont cultivées en présence de dodécane (20% v/v), sous 2500 lux ($\approx 35 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) d'intensité lumineuse, dans un incubateur Infors (140 rpm), 30°C, en erlenmeyers ($V_{\text{culture}} = 50\text{mL}$) et à une $\text{DO}_i = 0,02$. Les données présentées ont été réalisées en triplicat et moyennées pour chaque construction. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts-types standard de chaque triplicats.

La croissance et la production de la souche *Synechocystis sp. PCC 6803* en milieu MM-Ci montre un taux de croissance plus lent, respectivement au niveau de la phase exponentielle, qui est plus longue à démarrer et au niveau de la production en limonène qui est moindre en raison d'une part, d'une plus faible densité cellulaire (de J0-J10) et d'autre part (de J10-J21) en raison d'une moindre redirection du flux de carbone vers la voie MEP, qui est alloué dans un premier temps à génération de biomasse qui à J10 à quasiment rattrapée celle de la souche en MM.

Par comparaison avec une culture en MM, une production en limonène supérieure par unité de DO est observée pour la culture en milieu A+. Une hypothèse concerne le rôle du composé NaCl présent dans le milieu A+ sur l'activation de la photosynthèse cyclique au niveau du PSI. Cette activation pourrait générer plus d'ATP et de cofacteurs, et donc possiblement une plus d'assimilation de carbone et sa redirection vers la voie MEP. Une perspective de comparaison intéressante serait donc de réaliser de nouvelles expériences de suivi de production et de croissance de *Synechocystis sp. PCC 6803* en milieu A+ sans NaCl et en MM supplémenté avec du NaCl.

X. Conclusions et perspectives

➤ La toxicité de la *prk*

Les constructions permettant la surexpression de la majeure partie des versions de PRK n'ont pu être obtenues, car la surexpression constitutive par le biais du 'pC' semble entraîner une toxicité pour le châssis intermédiaire *E. coli* (différentes souches testées NEB10beta, TOP10, DH5alpha). Néanmoins, grâce à l'expression thermorégulée via la surexpression des gènes au niveau du système d'expression pT, 3 des 4 versions ont tout de même pu être analysées phénotypiquement.

Concernant l'expression du gène *prk* chez *E. coli*, des études ont montré que l'expression était toxique pour la souche et avait une incidence négative sur sa viabilité cellulaire car la bactérie ne métabolise pas habituellement l'accumulation de son produit catalytique, le RuBP (Hudson *et al.*, 1992). Il a été montré que la présence de codons rares dû à une différence d'utilisation des codons entre les séquences de différents organismes (châssis *E. coli* et cyanobactérien par exemple) peut être nuisible à un haut niveau d'expression dans *E. coli*. Une étude montre que la séquence codante de la PRK d'épinard utilisant principalement des codons AGA ou AGG pour l'arginine (pour 13 des 14 résidus arginyles totaux), alors que les codons d'arginine préférés chez *E. coli* sont CGN, pourrait être à l'origine de la toxicité de l'expression de la PRK (Brandes *et al.*, 2006). Néanmoins, les séquences codantes des différentes versions de *prk* : *prk_Sco7942*, *prk_Cya7425* et *prk_Sco7002* ne montrent aucune utilisation des codons pour l'arginine AGA et AGG (100% pour CGN) et 17% pour la version *prk_Scy6803* (83% pour CGN). Les protéines recombinantes formées des versions *prk_Sco7942*, *prk_Scy6803* et *prk_Sco7002* sont donc sûrement spécifiquement toxique à l'hôte *E. coli*, et il serait donc intéressant d'utiliser une souche *E. coli* plus tolérante à la toxicité ou bien de passer par exemple par un site neutre directement au sein du châssis cyanobactérien, sans passer par le châssis *E. coli*. Pour cette dernière stratégie, une cassette d'expression du gène codant pour la PRK serait flanquée de séquences d'homologies amont et aval du site neutre ciblé, puis le produit PCR serait directement utilisé pour la transformation naturelle dans le châssis cyanobactérien ; la cassette d'expression serait enfin introduite dans le génome de la cyanobactérie par double recombinaison homologue. Cette stratégie a été utilisée par Lin *et al.*, (2017) pour l'intégration de la cassette d'expression de la LS de *Mentha spicata* au sein du site neutre de pCC5.2 de *Synechocystis* sp. PCC 6803 avec succès.

➤ La surexpression des gènes/opérons codants pour les enzymes du CCB

Des efforts importants d'ingénierie génétique ont été réalisés dans le but d'améliorer le taux de carboxylation ou la discrimination de la RuBisCO entre ses substrats CO₂ et O₂, mais avec un succès très limité qui suggère que les RuBisCO pourraient être parfaitement optimisées (Tcherkez *et al.*, 2006). Mais l'expression de gènes hétérologues codants pour la RuBisCO et également pour d'autres enzymes ont montré des effets positifs (voir Tableau 3. Tableau récapitulatif des stratégies et des phénotypes de surexpression des enzymes du CCB).

Dans cette étude, des analyses phénotypiques ont montré que la surexpression hétérologue des gènes et opérons codants pour les enzymes PRK et RuBisCO permettaient une augmentation de l'accumulation de biomasse ou de la production en terpènes ; ces dernières bénéficiant notamment du fait que les régulations post-transcriptionnelles et post-traductionnelles des gènes *rbc* et *prk* étrangers introduits dans la machinerie native sont évitées. Par exemple, concernant la meilleure production de farnésène dans une souche *Synechocystis* sp. PCC 6803 combinant la surexpression de *rbcLXS_Sco7002* ou *prk_Cya7425* il est possible que la protéine

hétérologue montre une activité catalytique supérieure à celle de l'enzyme native. Cela est observé dans la littérature, où la surexpression de *rbcLS* natif chez *Synechococcus* sp. PCC 7942 n'améliore pas la fixation du carbone, tandis que la surexpression de *rbcLS* chez *Synechococcus* sp. PCC 7942 dans l'hôte *Synechococcus* sp. PCC 7002 (non régulé) montre une amélioration du flux de carbone et de la biosynthèse d'acides gras (Ruffing *et al.*, 2013).

Concernant la surexpression de *rbcLS_Sco7942* chez différents châssis cyanobactériens, il pourrait être supposé qu'un manque de la protéine activase encodée par le gène *rbcX* (situé à environ 100 kb en aval de l'opéron *rbcLS*), puissent entraîner une production de RuBisCO moins actives car localisées au niveau du cytosol et non au sein des carboxysomes et donc réduire l'assimilation du CO₂. Mais dans la littérature, il est montré que l'inactivation de RbcX chez *Synechococcus* sp. PCC 7942 n'a pas eu d'effet significatif sur la croissance cellulaire (Emlyn-Jones *et al.*, 2006b), et que RbcX n'était pas nécessaire à l'assemblage de la RuBisCO *Synechococcus* sp. PCC 7942 dans les chloroplastes de *Nicotiana tabacum* (Occhialini *et al.*, 2016).

Une perspective d'amélioration possible de surexpression de protéine hétérologue concerne l'optimisation du biais de codon au châssis d'intérêt. En effet, il existe une certaine différence d'acides aminés entre les séquences des gènes et opérons codants pour PRK et RuBisCO, et ces différences pourraient engendrer différentes activités enzymatiques. Par exemple, les protéines RbcL et RbcS des cyanobactéries *Synechococcus* sp. PCC 7942 et *Synechococcus* sp. PCC 7002 présentent 86,2 et 68,81% d'identité dans leurs séquences d'acides aminés, ce qui indique qu'il s'agit de protéines très similaires, mais non identiques.

➤ L'intégration de cassettes d'expression au sein de sites neutres

La pression de sélection antibiotique continue est une méthode largement utilisée pour maintenir les cellules microbiennes génétiquement modifiées, en particulier lors de l'introduction de constructions génétiques non natives via des vecteurs auto-répliquatif.

Néanmoins, pour des applications industrielles potentielles, l'insertion des gènes cibles dans le génome et l'utilisation de constructions sans antibiotiques peuvent être nécessaires, afin de maintenir les souches génétiquement stables (ségrégation complètes des copies chromosomiques) sans aucune pression de sélection. En effet, l'utilisation d'antibiotiques dans des systèmes de culture à grande échelle n'est ni économiquement, ni écologiquement viable, ni pratiquement réalisable.

Au vu des résultats obtenus sur la production de terpènes par l'insertion de cassette d'expression de terpènes synthases au sein du très communément utilisé site neutre chromosomique de *Synechocystis* sp. PCC 6803 : *slr0168*, il peut être attesté que certains 'sites neutre' ne sont pas si neutres que cela ; la différence de production en farnésène entre l'intégration de la cassette d'expression de la farnésène synthase au sein du pC ou du site neutre *slr0168* en témoigne. Mais ce résultat est intéressant car c'est la première fois qu'une même molécule d'intérêt est produite dans un même châssis à partir de deux d'expression localisations.

Pourtant, dans mes recherches bibliographiques cela n'avait pas l'air d'impacter la production d'autres molécules d'intérêt : intégration de cassettes d'expression codants pour des diterpènes synthase CfTPS2 et CfTPS3 (Englund *et al.*, 2015) et d'une cassette d'expression du gène codant pour la GFP pour tester la force de promoteurs via la mesure de fluorescence (Sebesta

et al., 2019).

Il serait donc intéressant au vu des résultats d'amélioration de la production par la surexpression de l'opéron *rbc_Sco7002* et du gène *prk_Cya7425*, de sélectionner un nouveau site neutre plus simple à manipuler génétiquement, et permettant de meilleurs rendements en farnésène, au même titre que le plasmide pCFS (avec le plasmide pFC1 qui montre le même nombre de copie plasmidique qu'il y a de copie chromosomique au sein du génome de *Synechocystis* sp. PCC 6803).

Cette étude souligne l'importance de la sélection du châssis cyanobactérien, et les combinaisons d'ingénierie métabolique les plus à même d'augmenter leur potentiel comme usine cellulaire pour la production de molécules carbonées d'intérêt.

- La combinaison de la surexpression des gènes/opérons codants pour des enzymes du CCB à la production de terpènes

L'augmentation de la production de terpènes chez certains châssis cyanobactériens par la surexpression combinée de certaines versions de gènes ou opérons codants pour des enzymes du CCB et de terpènes synthases, implique que l'assimilation du carbone est une limitation dans la production de composés carbonés des précurseurs de la voie MEP, et des terpènes.

Plusieurs hypothèses peuvent répondre à cela : soit la surexpression des gènes/opérons codants pour ces enzymes permet d'augmenter la photosynthèse oxygénique, soit d'utiliser plus efficacement les réducteurs cellulaires, ou encore de rediriger les flux de carbone, initialement orienté vers les réserves carbonées, davantage vers les terpènes d'intérêt. Ces hypothèses peuvent être vérifiées par des analyses complémentaires qui sont détaillées dans la partie perspectives de la partie 1.

- Perspectives de mise en place au laboratoire d'un système de culture permettant d'atteindre de fortes densités cellulaires (système HDC de Cell DEG©)

Le système des cultivateurs haute densité (HDC) commercialisé par Cell DEG© est basé sur un apport de CO₂ à médiation membranaire (sans bulles) combiné à un mélange turbulent fort pour découpler les rendements au sein de petits volumes de cultures à haute densité cellulaire (Figure 124.). Dans la littérature, ce système a permis d'atteindre des biomasses très importantes chez la souche *Synechocystis* sp. PCC 6803 (DO_{750nm} = 32 après 96h de culture, en réduisant le temps de génération en phase exponentielle à 8h) ainsi qu'une augmentation des rendements en bisabolène, patchoulol et bisabolol respectivement par 24, 33 et 16 (Dienst *et al.*, 2020). Ce système pourrait être utilisé sur les meilleures souches productrices en terpènes et d'un point de vue fondamental sur les souches doubles mutantes surexprimant et les gènes codants des terpènes synthase et les gènes ou opérons codants pour des enzymes du CCB.

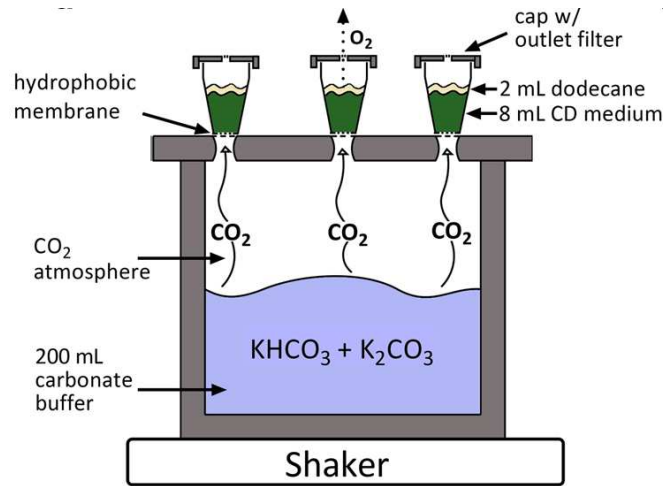


Figure 124. Représentation schématique du système HDC. Extrait de (Dienst et al., 2020)
 Le système permet la culture à forte densité cellulaire de 6 petits volumes de culture en parallèle.

PARTIE 3. Stratégie d'introduction d'une cassette de surexpression (promoteur fort) dans le chromosome de différentes cyanobactéries en amont du gène *prk* ou de l'opéron *rbc*.

En vue de surexprimer les gènes *prk* et opérons *rbc* naturels au sein du chromosome de différentes cyanobactéries, nous souhaitons introduire un promoteur fort (p_R) tout juste en amont des ORF de différents châssis cyanobactériens (Figure 125.).

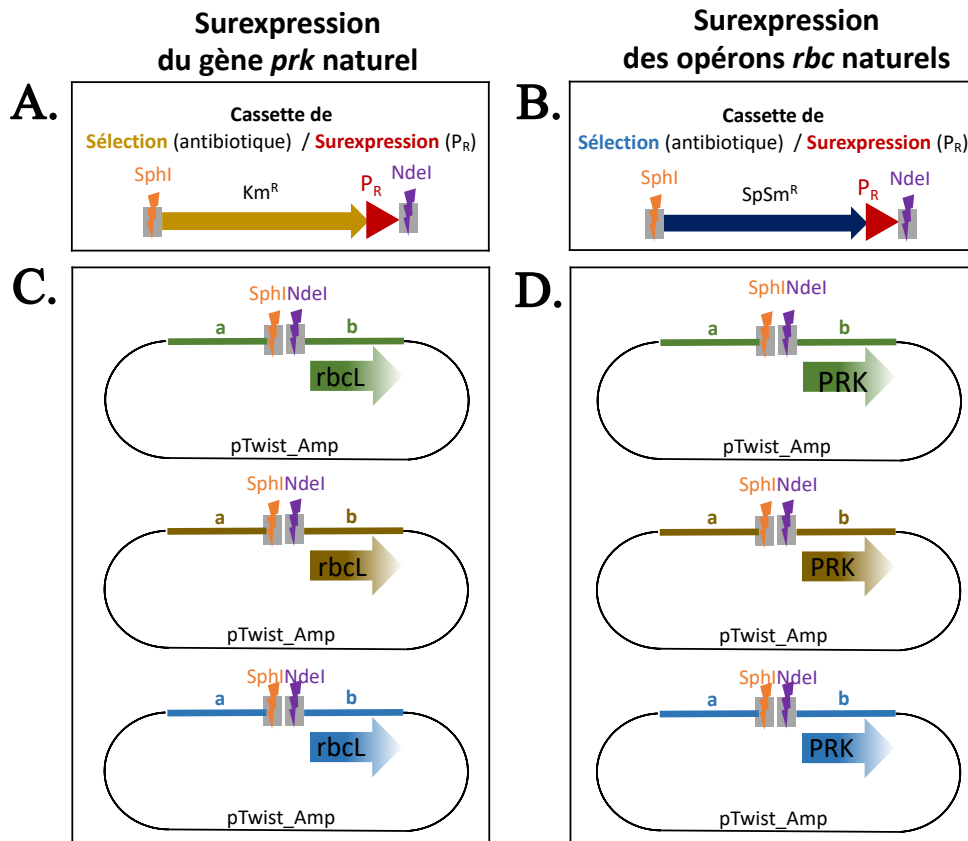


Figure 125. Design des biobricks pour la stratégie de surexpression des gènes/opérons du CCB naturels au sein de différents châssis cyanobactériens.

A. Cassette de sélection/surexpression composée d'un gène de résistance à l'antibiotique kanamycine suivi du promoteur fort p_R pour surexpression des gènes *prk* endogènes **B.** Cassette de sélection/surexpression composée d'un gène de résistance à l'antibiotique spectinomycine et streptomycine suivi du promoteur fort p_R pour surexpression des opérons *rbc* endogènes **C.** Plasmides composés des plateformes d'homologies amont et aval pour recombinaison homologue des cassettes d'expression/sélection des gènes *prk* des 3 châssis modèles cyanobactériens. **D.** Plasmides composés des plateformes d'homologies amont et aval pour recombinaison homologue des cassettes d'expression/sélection des gènes *rbc* des 3 châssis modèles cyanobactériens.

Les étapes de design de fragments synthétiques, clonages et vérifications par PCR et séquençages validés, les transformations des différentes constructions ont été réalisées au sein des châssis *E. coli* (étape nécessaire avant de pouvoir transformer une construction dans un châssis cyanobactérien).

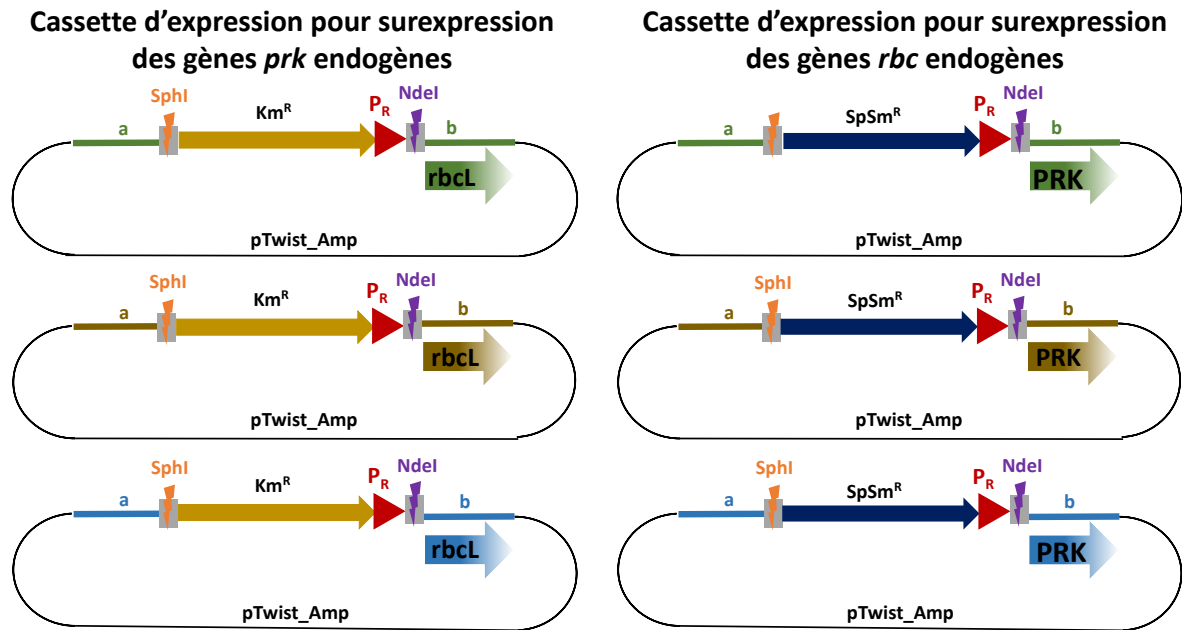


Figure 126. Cassettes d'expression en vue de recombinaisons homologues pour la surexpression des gènes *prk* et opérons *rbc* endogènes des 3 souches modèles de cyanobactéries

S'ensuit la vérification par séquençage des transformants *E. coli* obtenus, qui pour la quasi-totalité des constructions, révèle l'apparition de mutations spontanées au niveau des séquences promotrices permettant la surexpression de *prk* ou *rbc*. L'origine de ces mutations est peut-être liée à la surexpression d'ORF potentiellement toxiques pour *E. coli* au niveau du plasmide pTwist dans lequel les clonages sont effectués (régions plateformes avales clonés ou vecteur pTwist). Mes travaux qui ont suivi ont été de tester la transformation dans différentes souches réceptrices *E. coli*, mais cela n'a pas été concluant et les mutations ponctuelles étaient toujours présentes. Une autre solution aurait été de changer le vecteur de clonage (pUC, pGEM-T..) mais j'ai préféré mettre de côté cette stratégie et me focaliser sur d'autres de mes mutants.

Chapitre 5. La protéine CP12 : Un régulateur majeur de l'activité du cycle de Calvin et du métabolisme central

INTRODUCTION

Dans un premier temps, une partie introductive au chapitre détaillera : la découverte de la protéine CP12, les connaissances principalement biochimiques (*in vitro*) sur la protéine et son implication dans la formation de complexes supramoléculaires avec deux enzymes du CCB, les caractéristiques conservées de la protéine au sein de divers organismes, mais aussi sa diversité phylogénétique, ainsi que son rôle dans la régulation fine du chevauchement des réactions anaboliques et cataboliques.

Puis, la partie « Résultats et discussion » présentera les résultats obtenus quant au rôle *in vivo* de la protéine CP12 chez la cyanobactérie *Synechocystis* sp. PCC 6803 *via* l'analyse phénotypique des mutants de délétion du gène *cp12*, ainsi que le rôle des motifs conservés de la protéine par introduction de mutations ponctuelles dans la séquence du gène. Nous avons choisi la cyanobactérie unicellulaire modèle *Synechocystis* sp. PCC 6803, car elle est facilement manipulable et possède une seule copie canonique du gène *cp12* contrairement à d'autres organismes dont le génome a plusieurs copies du gène (pas toutes canoniques).

I. Découverte et caractéristiques de la protéine CP12 au sein de plusieurs organismes photosynthétiques

A. Découverte de la protéine CP12

À l'origine, la protéine CP12 a été décrite par Pohlmeier *et al.*, (1996) comme une petite protéine d'environ 70-80 acides aminés, avec une séquence similaire à l'extrémité N-terminale de la sous-unité GapB de la protéine GAPDH du cycle de Calvin-Benson (CCB). Elle a ensuite été trouvée dans de nombreux organismes photosynthétiques, y compris les plantes supérieures, les algues vertes et rouges et les cyanobactéries (Wedel *et al.*, 1997 ; Wedel et Soll 1998 ; Graciet *et al.* 2003a ; Marri *et al.*, 2005b ; Tamoi *et al.*, 2005 ; Oesterhelt *et al.*, 2007). La nomenclature CP12 (Protéine Chloroplastique de 12 kDa) résulte du résultat de migration par électrophorèse sous conditions dénaturantes de CP12, sous la forme d'une protéine de 12 kDa, alors que selon les espèces la protéine a une masse moléculaire théorique d'environ 8,5 kDa. Ce comportement électrophorétique est caractéristique d'une protéine intrinsèquement non structurée (IUP) (Gontero *et al.*, 2012).

Par ailleurs, la composition en acides aminés de la protéine CP12 est faible en nombre de résidus hydrophobes, mais est en revanche très riche en résidus chargés (favorisant le désordre), ce qui lui donne les caractéristiques des IUPs qui ont la particularité d'adopter des conformations plus structurées lors de la liaison de leur ligand cible, et leurs propriétés facilitent généralement les interactions protéine-protéine. En effet, les IUPs sont généralement impliquées dans plusieurs fonctions : elles peuvent piéger, neutraliser ou stocker de petits ligands, permettre l'assemblage de complexes ou moduler l'activité de molécules partenaires.

La protéine CP12, possède des cystéines. Lorsqu'elles sont sous forme réduite (thiol), CP12 a une forme désordonnée entièrement dépliée, flexible et mobile. En revanche, lorsque les cystéines sont oxydées, CP12 se 'structure' ; deux ponts disulfures et des hélices alpha se forment, qui transforment CP12 en une protéine permettant la régulation redox dépendante de la GAPDH et la PRK.

La découverte de la protéine CP12 au sein d'un supracomplexe ternaire avec les enzymes du CCB, la NAD(P)H-glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) et la phosphoribulokinase (PRK), a été faite chez le pois (Wedel *et al.*, 1997). En 1991, des complexes entre les enzymes GAPDH et PRK étaient déjà observés chez les plantes supérieures (Rault *et al.*, 1993 ; Clasper *et al.*, 1991). Depuis, des complexes supramoléculaires ont été décrits chez les cyanobactéries (*Synechocystis* sp. PCC 6803 (Wedel *et al.*, 1997), *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Tamoi *et al.*, 2005), les algues (*Chlamydomonas reinhardtii*) (Graciet *et al.*, 2003 ; Wedel *et al.*, 1998) et les plantes supérieures (Wedel *et al.*, 1997 ; Marri *et al.*, 2005 ; Scheibe *et al.*, 2002) où la protéine CP12 agit comme un régulateur majeur du CCB *in vitro* (Graciet *et al.*, 2003b; Trost *et al.*, 2006; Marri *et al.*, 2008, 2009, 2010; Erales *et al.*, 2009, 2011; Carmo-Silva *et al.*, 2011; Avilan *et al.*, 2012; Moparthi *et al.*, 2014, 2015).

B. Caractéristiques de la protéine CP12

CP12 est une protéine régulatrice qu'on retrouve dans presque tous les organismes de la lignée photosynthétique séquencés à ce jour (Gontero *et al.*, 2012 ; Groben *et al.*, 2010).

La protéine présente plusieurs résidus conservés : une séquence consensus riche en résidus négativement chargés comme les acides aspartiques (Asp, D) et acides glutamiques (Glu, E) donnant un motif conservé de 7 résidus de type 'AWDXVEEL' (Figure 127. JGI) et deux paires de cystéines situées respectivement près de l'extrémité N-terminale et C-terminale de la protéine.

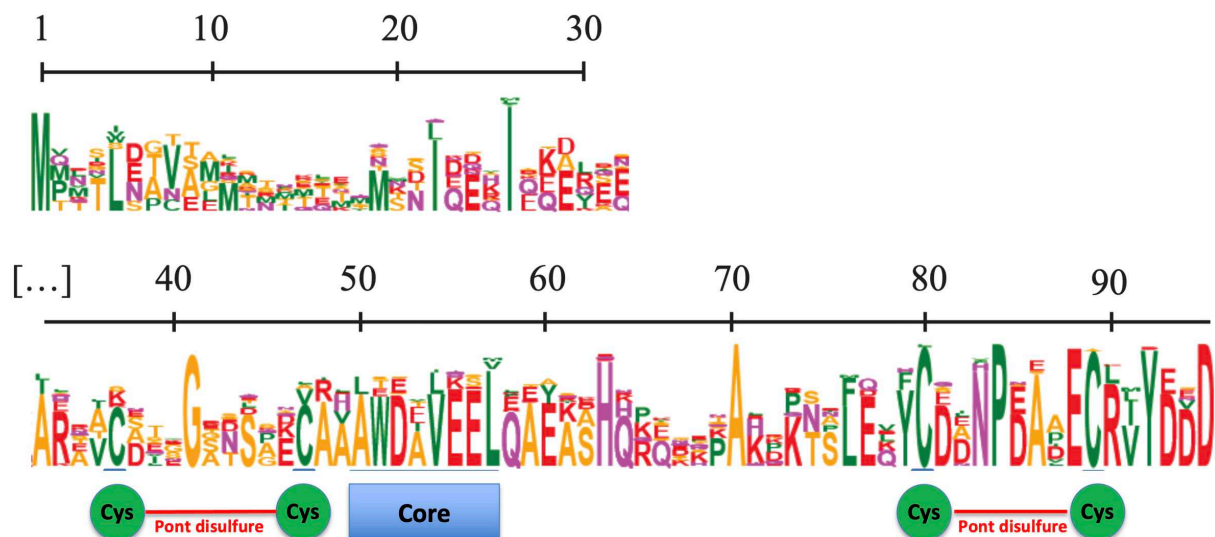


Figure 127. Conservation des acides aminés dans les protéines CP12 de cyanobactéries.

La représentation en logo motif a été obtenue à partir de 155 séquences de protéines CP12 issues du portail JGI. La taille des lettres est proportionnelle à la fréquence de chaque acide aminé à la position correspondante. La nature des résidus est indiquée par les couleurs jaune (petits acides aminés non polaires), vert (hydrophobes), magenta (polaires) et rouges (chargés positivement et négativement). Les résidus impliqués dans le mécanisme de régulation sont mis en évidence par les rectangles bleus. Les ponts disulfures formés par les paires de cystéines sont indiqués par les pointillés bleus. (Adapté du manuscrit de la thèse de T. Veaudor effectuée au laboratoire).

II. La formation de complexes supramoléculaires entre CP12 et deux enzymes du cycle de Calvin

La PRK et la GAPDH sont des enzymes clés essentielles au CCB qui permettent toutes deux un contrôle de la disponibilité du substrat RuBP nécessaire à la carboxylation de la RuBisCO. La PRK est la dernière enzyme impliquée dans la régénération du substrat RuBP et intervient à l'étape précédant directement la fixation du CO₂ par la RuBisCO ; tandis que l'activité de la GAPDH est au point de ramification entre la régénération de RuBP et le métabolisme central. En se basant sur la très forte conservation de séquences des protéines CP12, il a été suggéré dans la littérature qu'un mécanisme de régulation a dû être conservé dans l'évolution des cyanobactéries, algues et plantes. Néanmoins, en raison de leur propriété de structure intrinsèquement désordonnée, les protéines CP12 montrent une certaine flexibilité conformationnelle chez différents microorganismes et des divergences selon leur état réduit, oxydé ou lors d'interactions avec d'autres partenaires.

En conditions oxydantes (sous faible lumière ou la nuit), la formation d'un complexe ternaire entre CP12 et les deux enzymes PRK et GAPDH, entraîne une réduction de l'activité à la fois de PRK et de GAPDH. En conditions réductrices (en présence de lumière), les thiorédoxines notamment médient la dissociation du complexe en augmentant à la fois l'activité de GAPDH et de PRK. La formation/dissociation du complexe PRK/CP12/GAPDH permet une régulation rapide du taux de fixation du carbone par le cycle de Calvin en réponse aux changements de disponibilité de la lumière et de la production de NADPH et de l'ATP (Figure 128).

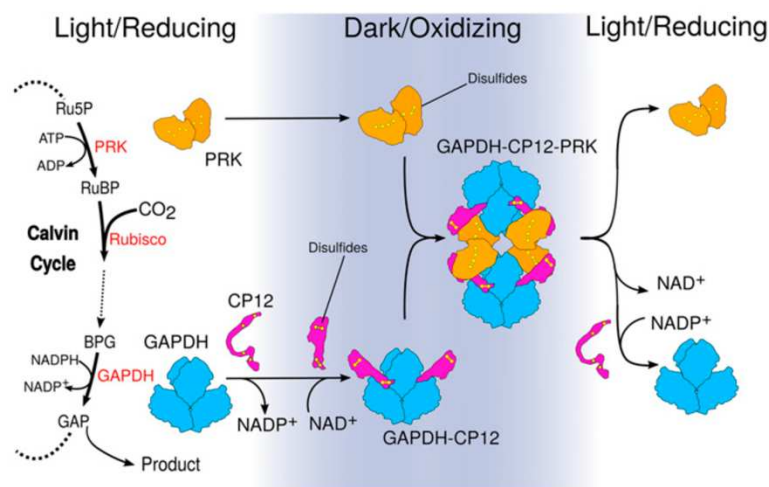


Figure 128. Modèle de formations du supracomplexe PRK-CP12-GAPDH basé sur une approche biochimique *in vitro* (McFarlane et al., 2019).

Sous conditions oxydantes (à l'obscurité), les paires de cystéines N- et C-terminales de la protéine CP12 forment deux ponts disulfure intramoléculaires, nécessaires à la formation du complexe PRK-CP12-GAPDH. Sous conditions réduites (à la lumière), ces ponts disulfures sont interconvertis en groupes thiol par réduction des Trx, et les hélices α présentes chez la protéine CP12 deviennent complètement flexibles et inactives en se déstructurant complètement.

A. Formation d'un complexe binaire entre CP12 et GAPDH...

La GAPDH est une enzyme réversible (une oxydoréductase) qui réalise sous son isoforme anabolique Gap2 une réduction du 1,3-bisphospho-D-glycérate (1,3-BPG) en Glyceraldéhyde-3-Phosphate (G3P) au niveau du cycle de Calvin via l'oxydation de NADPH en NADP⁺ (donnant la source d'électrons) et au niveau de la gluconéogenèse via l'oxydation de NAD(P)H → NAD(P)⁺. L'enzyme réversible peut également réaliser une oxydation sous son isoforme Gap1 au niveau de la voie de la glycolyse en réduisant NADP⁺ → NADH pour produire le 1,3Di-PGA depuis le G3P. L'isoforme GAPDH en complexe avec CP12 évoqué est l'isoforme anabolique Gap2.

La formation d'un complexe binaire entre GAPDH et CP12 s'enraye lorsque le flux d'électrons diminue (par exemple à la tombée de la nuit), les résidus thiols oxydés des cystéines à l'extrémité C-terminale de la protéine CP12 s'associent tout d'abord pour former une « hairpin verrouillée » par des ponts disulfures en conférant ainsi une rigidité partielle à la protéine via la formation d'une hélice α (Delobel *et al.*, 2005). Cette structure secondaire vient ensuite s'insérer dans le site actif de GAPDH et *in fine* former le complexe binaire CP12-GAPDH. Dans la littérature, il est montré notamment par filtration sur gel et cristallisation que le complexe cyanobactérien selon la stœchiométrie GAPDH₄-CP12₂ (c'est-à-dire que le tétramère GAPDH interagit avec deux CP12) est stable (Figure 129).

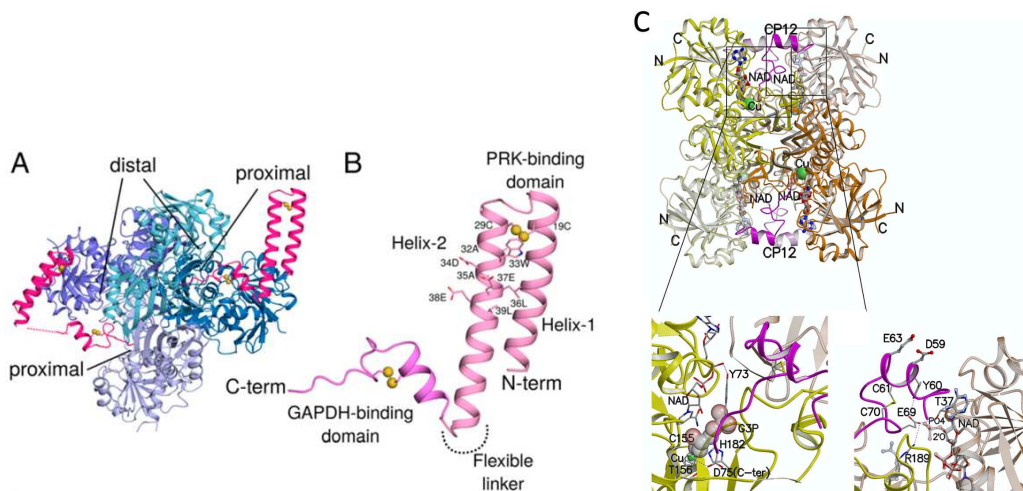


Figure 129. Structures cristallines du complexe binaire GAPDH-CP12 (Tirée de Matsumura *et al.*, 2011 et McFarlane *et al.*, 2019)

(A) Structure cristalline du tétramère GAPDH (bleu) avec ses 2 sites actifs liés avec la protéine CP12 (rose). (B) CP12 est formé de 2 domaines connectés par un linker flexible. Un domaine en C-terminal composé des résidus 55 à 75 (de *S. elongatus*) formants une région hélicoïdale à 2 tours suivie des résidus C-terminaux restants s'insérant dans le site actif de GAPDH. Ce repliement est stabilisé par un pont disulfure indiqué par des sphères jaunes (S-S). Un autre domaine en N-terminal composé des résidus 1 à 55 viendra former une liaison à 2 hélices antiparallèles reliées également par un pont disulfure au sommet des hélices pour interaction avec PRK. Les résidus du motif AWDA(V/L)EEL conservé sont représentés sous forme de bâtonnets (rouge). (C) Gros plan sur la région d'interaction de CP12-GAPDH. Le site de liaison du tétramère GAPDH (jaune et orange) et de la région C-terminal de CP12 (magenta) est composé du substrat D-glyceraldéhyde 3-phosphate (G3P) (modèles CPK semi-transparents), ses cofacteurs NAD (bâtonnets), de l'atome Cu²⁺ (modèle CPK vert).

Il est important de noter que sous conditions oxydantes, GAPDH ne possède pas de ponts disulfures et le cofacteur NADP⁺ a accès au site actif de GAPDH en complexe binaire, signifiant qu'au sein d'un complexe binaire l'activité de GAPDH est maintenue, car l'interaction avec NADP⁺ reste inchangée.

B. ... puis d'un complexe ternaire entre PRK, CP12 et GAPDH

La PRK est une protéine dimérique qui présente deux paires de cystéines, une paire en N-terminal et une paire en C-terminal. En conditions oxydantes, la formation chez la PRK de ponts disulfures au niveau des résidus thiol du site actif en N-terminal inactive la plupart (90%) de l'activité de la protéine (et ceci en amont de l'interaction avec la CP12) (G. Thieulin-Pardo *et al.*, 2015, Hackenberg *et al.*, 2018). De nombreuses tentatives de cristallisation de PRK cyanobactériennes ou eucaryotes isolés ou piégés dans un complexe avec CP12 ont échoué en raison des faibles rendements de purification. Mais récemment, certains groupes y sont parvenus (McFarlane *et al.*, 2018 pour la PRK de *Synechococcus* sp. PCC 6301, Gurrieri *et al.*, 2019 pour la PRK d'*Arabidopsis thaliana* et *Chlamydomonas reinhardtii* et résultats non publiés de Julien Henri à l'IBPC, Paris pour la PRK de *Synechocystis* sp. PCC 6803) permettant la mise en lumière des possibles interactions d'inhibition de la protéine CP12 selon les caractéristiques structurelles clés de la PRK.

Sous conditions oxydantes, les résidus cystéines des protéines PRK et CP12 s'oxydent progressivement provoquant la formation de ponts disulfure intramoléculaires au niveau des groupes thiols des différents partenaires. Ainsi, le domaine N-terminal de CP12 forme une « hairpin » de deux hélices (l'hélice 1 et l'hélice 2) stabilisées par un pont disulfure près de la spire hélicoïdale. Ces 2 hélices cachent également le core hydrophobe de séquence consensus (AWDA(V/L)EEL) constitué d'acides aminés chargés négativement : la leucine (présence d'un leucine zipper), l'acide glutamique et l'acide aspartique (Figure 130.). Ce « patch » acide consensus aide à la stabilisation de la double hélice α en N-terminal de CP12, et induit l'exposition de charges négatives à la surface des enzymes agrégées dans le complexe binaire permettant conjonctuellement le recrutement électrostatique des oligomères PRK chargés positivement, via ses acides aminés et son site actif où son substrat est riche en sucre et phosphate (Matsumura *et al.*, 2011).

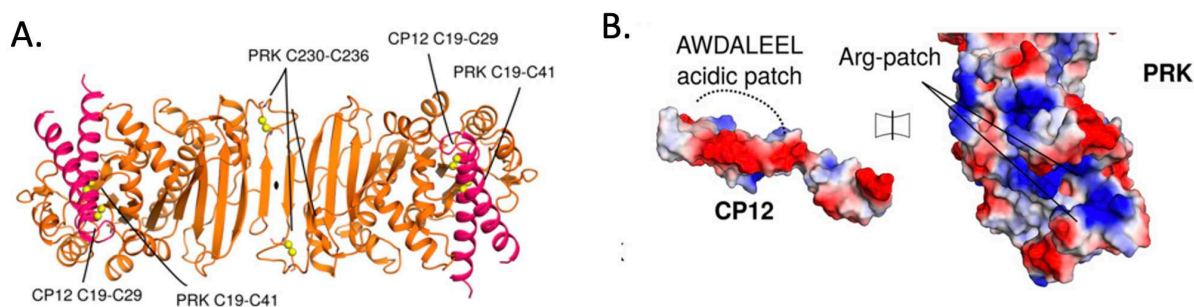


Figure 130. Représentation de la liaison entre CP12 et le dimère PRK (McFarlane *et al.*, 2019)

A. Le dimère PRK interagit avec deux protéines CP12 qui se lient au sein de ses deux sites actifs. Les ponts disulfures des deux protéines sont indiqués par des sphères jaunes (●). B. Potentiel électrostatique de surface des régions d'interface de CP12 et PRK. Ces régions montrent des charges complémentaires.

Lors de la formation d'un complexe ternaire avec CP12-GAPDH, l'activité de la PRK se retrouve totalement inhibée, la protéine CP12 monopolisant l'intégralité de ses sites actifs. De la même manière pour GAPDH, l'association de la PRK au complexe binaire CP12-GAPDH, enrayerait l'interaction de NADP⁺ avec GAPDH et vient ainsi inhiber totalement l'activité de GAPDH. L'interaction entre les enzymes GAPDH et PRK reste faible, la majorité se fait par l'intermédiaire de CP12 (Figure 131.). L'inhibition de ces deux enzymes permettant ainsi à la cellule de conserver son énergie, lorsque les réactions dépendantes de la lumière ne sont pas actives.

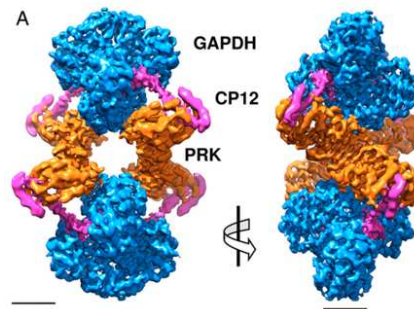


Figure 131. Reconstruction du supracomplexe GAPDH-CP12-PRK montrant la résolution des structures cristallines de la GAPDH d'une cyanobactérie thermophile (*Thermosynechococcus elongatus*) et de la protéine CP12 par cryo-microscopie électronique (cryo-ME) (McFarlane *et al.*, 2019). GAPDH (en bleu), PRK (en orange) et CP12 (en rose) (Échelle : 30 Å).

C. Dissociation du supracomplexe

En conditions réductrices, lors du retour à la lumière, la réduction des ponts disulfures dissocie le supracomplexe, libérant les enzymes GAPDH et PRK. Le contrôle du cycle de Calvin via l'association et l'inhibition des enzymes GAPDH et PRK est réversible et s'effectue selon la conformation de la protéine CP12 qui est dépendante de l'environnement rédox dans laquelle elle se trouve. L'état rédox des groupes thiol des cystéines de CP12 est régi en grande partie par le système Ferredoxine-Thioredoxine, qui assure un lien direct avec l'activité photosynthétique (Avilan *et al.*, 2000 ; Marri *et al.*, 2009).

McFarlane *et al.*, 2019 ont testé la stabilité *in vitro* de l'association de GAPDH dans le complexe binaire ou ternaire et montrent que le cofacteur NADPH peut déplacer la protéine CP12 du complexe binaire (non-dissociation du complexe et activité GAPDH maintenue), mais pas du complexe ternaire (activité GAPDH inhibée). Son activité de réduction (avec l'oxydation de NAD(P)H en NAD(P)⁺) au sein de la néoglucogénèse est très inhibée pour l'oxydation de NADH en NAD⁺ et de la même manière au sein des complexes binaires et ternaires.

L'incubation du complexe ternaire avec différents cofacteurs et les résultats de sa stabilité ont été testés et révèlent de la même manière une non-dissociation des 3 partenaires : pas de dissociation de GAPDH avec une incubation NADPH et pas de dissociation de PRK avec une incubation des cofacteurs ATP ou ATP. Seul l'ajout de Dithiothréitol (DTT) pour créer un environnement réducteur permet la réduction des ponts disulfures de PRK et CP12 et ainsi la dissociation de PRK du complexe ternaire.

L'acteur majeur impliqué dans le contrôle de l'association et la dissociation du supracomplexe PRK-CP12-GAPDH est la protéine CP12 et sa fonction de senseur rédox CP12 permettant la régulation par un switch ON/OFF de la fixation du carbone en fonction de l'environnement rédox mais aussi de la disponibilité des dinucléotides.

In vivo, cela se traduit à la lumière par une réduction de la protéine CP12, notamment par les thiorédoxines réduites (tr_{XRED}) grâce au flux linéaire d'électrons produits par la chaîne photosynthétique et à la réduction par PSI de la protéine soluble ferrédoxine. En étant continuellement réduite, la protéine CP12 permet une activité maximale de PRK et de GAPDH qui sont alors dissociées du supracomplexe. La transmission du pouvoir réducteur des Trx aux protéines cibles est permise via leurs paires de cystéines conservées qui interviennent dans la réaction d'échange dithiol/disulfure (Yoshida *et al.*, 2019). Les glutarédoxines pourraient

également jouer un rôle important dans la signalisation redox, notamment au niveau de la régulation post-traductionnelle de glutathionylation (Michelet *et al.*, 2006).

Chez le pois, lorsque les feuilles sont exposées à une forte luminosité, la dissociation du complexe PRK/CP12/GAPDH se produit en moins d'une minute, tandis que la ré-association du complexe est manifeste 1 minute après le transfert sous une faible luminosité et complète 5 minutes après le transfert à l'obscurité (Howard *et al.*, 2008). La quantité de lumière est corrélée au degré de dissociation et d'association du supracomplexe indiquant une fine régulation des activités des deux enzymes du CCB en fonction de la quantité de lumière disponible. Les thiorédoxines *f* (qui ne sont pas présentes chez les cyanobactéries) sont un facteur majeur de la dissociation du complexe, et ce, grâce à la réduction des ponts disulfures au sein de ces enzymes.

In vitro au sein de la lignée photosynthétique et chez *Chlamydomonas reinhardtii* et les diatomées notamment, des données biochimiques, biostructurales et de cinétiques des activités enzymatiques régissant l'association et la dissociation du supracomplexe tripartite ont été étudiées en profondeurs. Les connaissances des fonctions *in vivo* de la protéine CP12 en revanche, demeurent très insuffisantes et doivent être approfondies au sein des microorganismes où des conclusions préliminaires *in vitro* ont montré qu'elles jouaient un rôle majeur de régulation.

III. La diversité phylogénétique de CP12

A. La diversité phylogénétique selon les motifs portés par la séquence codante

Les cyanobactéries présentent une large et unique diversité de séquences de la protéine CP12. Des analyses phylogénétiques de 126 génomes cyanobactériens ont montré que le gène *cp12* était présent dans la quasi-totalité des cyanobactéries (Stanley *et al.*, 2013), excepté chez la cyanobactérie filamenteuse *Moorea producta* 3L et la cyanobactérie fixatrice d'azote *UCYN-A* (Hagino *et al.*, 2013). D'autres espèces de cyanobactéries peuvent détenir jusqu'à 5 copies du gène *cp12* dans leur génome. Malgré les différences dans les séquences codantes de CP12 et leur expression indiquant une diversité de leurs rôles (y compris éventuellement autres que la régulation du cycle de Calvin), ces formes restent étroitement liées (Marri *et al.*, 2005a ; Singh *et al.*, 2008). Chez les plantes supérieures, la présence de plusieurs formes est fréquemment rencontrée (Groben *et al.*, 2010).

Une classification en huit groupes a été proposée sur la base des caractéristiques de la séquence primaire en fonction de la présence ou de l'absence des trois caractéristiques conservées des protéines CP12 classiques, à savoir les paires de cystéines N- et C-terminales, la séquence core consensus AWD ou bien la présence d'un domaine cystathionine- β -synthase (CBS) fusionné à la partie N-terminal de la protéine (Figure 132).

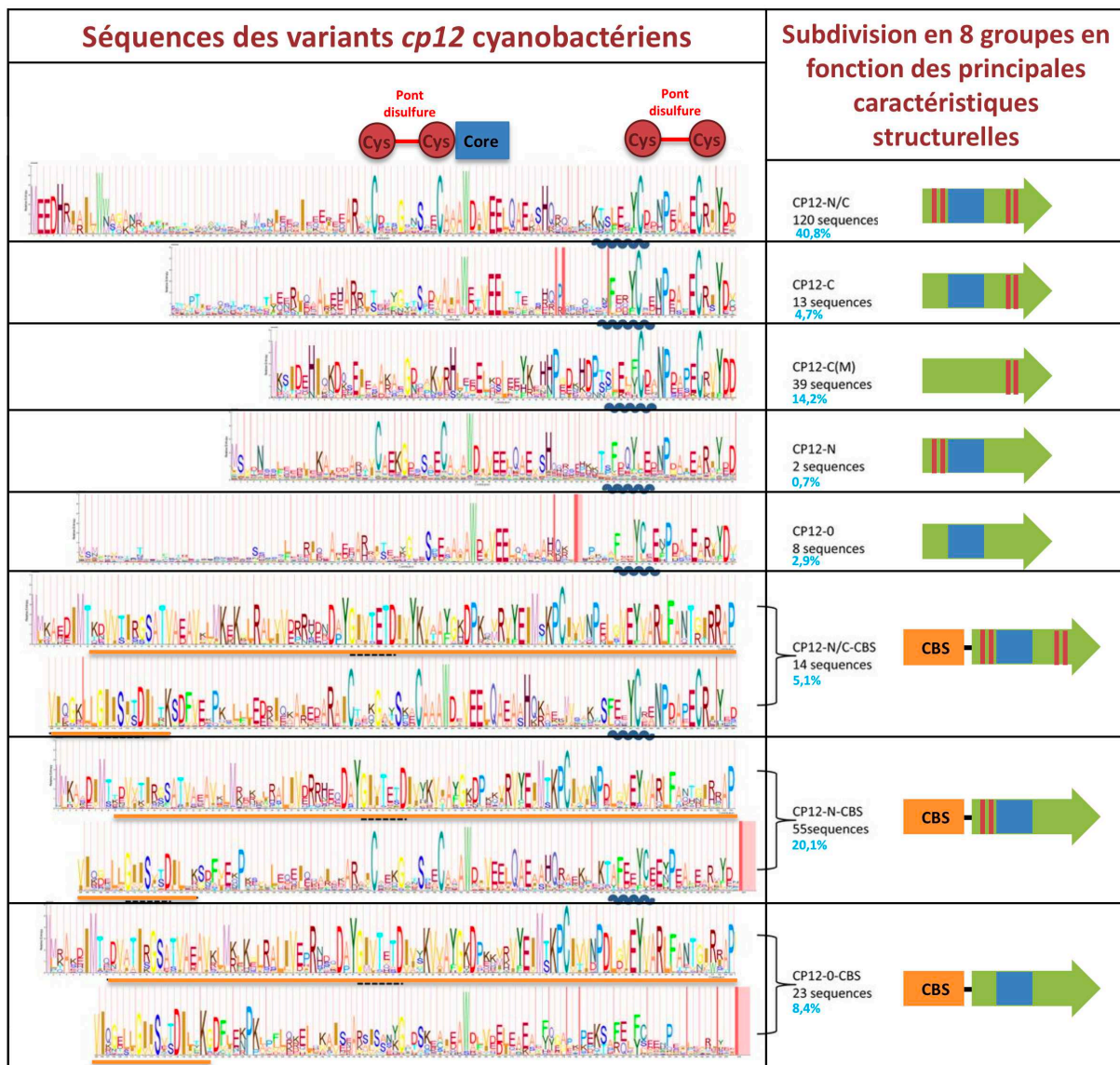


Figure 132. Séquences de variants cyanobactériens CP12 classés en 8 groupes en fonction des principales caractéristiques structurales.

Logos HMM (Hidden Markov model) des séquences de CP12. Les domaines CBS sont indiqués par des traits pleins en orange. L'hélice bleue indique le segment correspondant à l'hélice α prédite. Schématisation et subdivision en 8 groupes en fonction des principales caractéristiques structurales (motifs) : les paires de cystéines N- et C-terminales (paire de traits rouges verticaux), la séquence core consensus AWD (rectangle bleu) ou bien la présence d'un domaine cystathionine- β -synthase (CBS) fusionné à la partie N-terminal de la protéine (rectangle orange). Figure adaptée de Stanley *et al.*, 2013 et de leur analyse comparative de 274 séquences de variants *cp12* issues de 126 génomes cyanobactériens. Les données en bleu cyan correspondent aux ratios de séquences appartenant à un sous-groupe sur les 274 séquences analysées.

En comparant avec d'autres espèces de la lignée photosynthétique ou bien au niveau de la phylogénie des cyanobactéries, quelques observations de ces regroupements en fonction des caractéristiques structurales sont intéressantes à noter.

- Plus d'un tiers (92/274) des variants CP12 des cyanobactéries portent un domaine CBS fusionné à l'extrémité N-terminale (contrairement à la proportion retrouvée chez les CP12 des algues ou des plantes).

- Les séquences protéiques CP12 dépourvues des cystéines en N-ter et du core AWD conservées habituellement (le groupe CP12-C(M)), sont retrouvées exclusivement chez les cyanobactéries picoplanctoniques marines et parfois en plusieurs copies.
- À ce jour il n'existe aucune cyanobactérie qui possède les huit classes différentes de protéines de type CP12.
- En revanche, à l'exception des cyanobactéries picoplanctoniques marines, chaque génome cyanobactérien contient au moins une copie canonique de CP12 (López-Calzagno *et al.*, 2014 et Figure 3 Stanley *et al.*, 2013 en Annexe 1.).
- Le domaine N-terminal, qui interagit avec PRK est globalement moins conservé que le domaine C-terminal interagissant avec GAPDH.

B. Les fonctions encore énigmatiques des domaines CBS fusionnés au gène *cp12*.

Les domaines cystathionine- β -synthase (CBS) sont généralement associés à des fonctions régulatrices, généralement en deux ou quatre copies en tandem par protéine, et sont assez répandus au sein de tous les domaines de la vie (espèces animales, protistes, plantes). Ces domaines restent encore peu caractérisés et leurs fonctions sont assez énigmatiques, mais ils restent souvent associés avec des protéines à fonctions variées telles que : les protéines canal, les kinases, les protéines de transduction du signal ou les protéines membranaires (Bateman, 1997).

Les domaines CBS existent particulièrement chez les souches de cyanobactéries ayant en commun la formation de colonies denses, et impliquées par exemple dans la formation de blooms, nappes, écume (des environnements présentant des gradients de lumière prononcés) comme les cyanobactéries symbiotiques marines. Ces protéines fusions CBS-CP12 pourraient avoir évoluées pour faire face à la nécessité de déclencher des voies de synthèse métabolique en réponse à des environnements fluctuant rapidement.

Les domaines CBS pourraient accomplir des fonctions supplémentaires et avoir un rôle à jouer dans la régulation du métabolisme (Jeong *et al.*, 2013). En effet, ils sont de prépondérants capteurs de l'état énergétique cellulaire et sont connus pour se lier avec une multitude de ligands différents agissant comme des régulateurs (activateurs ou inhibiteurs). Ils sont capables de se dimériser en se fixant à des nucléotides tels que l'AMP (grande spécificité), mais ne se lie pas avec l'ADP, l'ATP et cAMP.

Les domaines CBS sont exclusivement fusionnés à l'extrémité N-terminale des protéines CP12 et présentent une coévolution notable avec les motifs (paire de cystéines en N-ter et core 'AWD') de cette région (Figure 132. ci-dessus). Chez les cyanobactéries, il a également été montré que les protéines CP12 fusionnées avec le module CBS sont généralement moins désordonnées que les protéines CP12 dépourvues de fusion (Stanley *et al.*, 2013). Des études permettant la modélisation *in silico* de protéines fusions CBS-CP12 ont montré qu'elles sont incapables d'interagir avec GAPDH, et donc de former un complexe ternaire, et qu'elles pourraient avoir d'autres rôles à jouer.

Il est intéressant de noter que des *cbs-cp12* sont fréquemment trouvés dans l'opéron *hox* des cyanobactéries comme chez *Anabaena variabilis* (Pohlmeyer *et al.*, 1996) ou *Synechococcus* sp. PCC 7002.

Chez *Arabidopsis thaliana*, dans des conditions de stress, il a été montré qu'une protéine composée de deux CBS en tandem, active les Trxs chloroplastiques pour diminuer la production

de ROS (Yoo *et al.*, 2011). Chez *Microcystis aeruginosa*, CBS-CP12 est produite avec TrxA et forme des hexamères qui lient l'AMP, mais pas l'ATP. Il a été montré que CBS-CP12 régule l'activité de PRK en tandem avec l'AMP (indépendamment du recrutement de GAPDH) en venant neutraliser l'activité des TrxA. CBS-CP12 fonctionne ainsi comme un senseur redox-dépendant des niveaux intracellulaires d'AMP et comme inhibiteur des TrxA dans la régulation des processus dépendant de la lumière lorsque les niveaux d'énergie de la cellule sont faibles, en permettant la détection et la transmission de l'état de l'énergie cellulaire via l'AMP. CBS-CP12 ne pouvant former de supracomplexes avec les deux enzymes du CCB, l'hexamère vient directement inhiber PRK en contrant les effets des TrxA.

Ce cluster de gènes *cbs-cp12* est très présent chez les cyanobactéries formant des colonies denses dans des environnements présentant des gradients de lumière prononcés (Figure 132.) (Hackenberg *et al.*, 2018). Chez les plantes supérieures par exemple, aucun domaine CBS n'a été trouvé fusionné à un domaine de type CP12 (Kushwaha *et al.*, 2009).

Une analyse bio-informatique des protéines de fusion CBS-CP12 dans 333 génomes cyanobactériens a révélé la présence de cinq variants de CBS-CP12, coexistant tous avec un ou plusieurs gènes CP12 (Figure 133. (Hackenberg *et al.*, 2018) :

- les CBS-CP12-N/C : contenant les deux paires de cystéines dans les domaines N et C-terminal de CP12
- les CBS-CP12-N : contenant la paire de cystéines uniquement dans la région N-terminale
- les CBS-CP12 : sans aucune paire de cystéines
- les CBS-CP12-N-tr : contenant un domaine CP12 tronqué avec la paire de cystéines en N-terminale
- les CBS-CP12-tr : contenant qu'un court domaine CP12 sans paires de cystéine

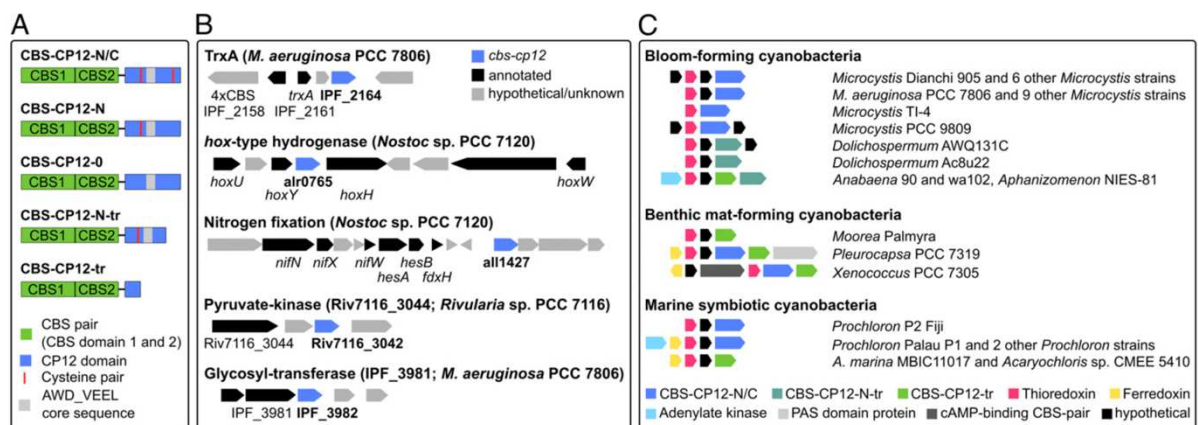


Figure 133. Les variants CBS-CP12 cyanobactériens

A. L'organisation des domaines conservés des variants CBS-CP12 cyanobactériens **B.** La conservation de la région génomique autour de certains domaines CBS-CP12 **C.** La conservation de 12 gènes clusters incluant les gènes *cbs-cp12* et *TrxA* (Extrait de Hackenberg *et al.*, 2018).

C. Les études in vitro et in vivo de la protéine CP12 chez divers organismes photosynthétiques.

À ce jour, trois études ont montré les effets de niveaux réduits de la protéine CP12 *in vivo* et son rôle important dans la régulation du métabolisme, néanmoins les phénotypes résultants diffèrent selon les organismes. Pour Tamoi *et al.*, 2005, l'analyse s'est faite au niveau d'un

knockout de l'un des gènes non canoniques codants pour CP12 de la cyanobactérie *Synechococcus* sp. PCC 7942, pour Howard *et al.*, 2011a, au niveau un knockdown d'un asRNA ciblé vers l'un des trois gènes canoniques *cp12* de la plante *Nicotiana tabacum* et enfin pour López-Calcastro *et al.*, 2017 le rôle de chacun des gènes CP12 chez *Arabidopsis thaliana* a été étudié phénotypiquement.

Chez une variété d'organismes photosynthétique (plantes supérieures, algues, cyanobactéries) ces études *in vivo* ainsi qu'un certain nombre d'autres études *in vitro* suggèrent que les protéines CP12 ne se limitent probablement pas à la simple régulation de l'activité de la PRK et de la GAPDH et pourraient jouer un rôle plus large (López-Calcastro *et al.*, 2014, Hackenberg *et al.*, 2018, McFarlane *et al.*, 2019).

1) Les cyanobactéries

Chez les cyanobactéries, l'importance de la protéine CP12 a été mise en évidence *in vivo* chez *Synechococcus* sp. PCC 7942 (qui possède deux gènes *cp12*) par une étude physiologique sur un mutant de délétion de la copie non canonique codant pour une protéine sans la paire de cystéines en N-terminal. Les phénotypes mis en évidence sur ce mutant ont montré une diminution de la croissance lors de l'alternance de cycles jour/nuit et une consommation réduite d'O₂ dans l'obscurité par rapport à la souche WT. Ces observations sont cohérentes avec l'hypothèse selon laquelle CP12 est nécessaire pour synchroniser les flux de carbones pendant les cycles jour-nuit (Tamoi *et al.*, 2005 ; López-Calcastro *et al.*, 2014. La formation du complexe ternaire, sous l'influence de l'environnement rédox (par l'alternance lumière/obscurité) régule via la protéine CP12, les activités des deux enzymes GAPDH et PRK, et donc les activités du cycle de Calvin et le flux de carbone jusqu'aux voies cataboliques et la voie oxydative du pentose phosphate (OPP). Ces résultats sont corrélés avec une modification de l'allocation du carbone (augmentation du RuBP et diminution des teneurs en F6P sous des régimes d'obscurité).

Les génomes cyanobactériens peuvent porter plusieurs gènes codants pour une variété de protéines CP12, ce qui peut interroger sur leurs différents rôles. En effet, chez les cyanobactéries, la protéine CP12 pourrait être impliquée dans d'autres voies métaboliques que celle du cycle de Calvin et jouer d'autres rôles que celui de la formation du supracomplexe avec PRK et GAPDH.

Chez certaines espèces, une conservation de régions génomiques est observée autour de domaines CBS-CP12 (Figure 132, 133 ; et Hackenberg *et al.*, 2018). Chez la souche *Nostoc* sp. PCC 7120 par exemple, deux gènes CBS-CP12 sont coexprimés avec les gènes de l'hydrogénase de type *hox* (Sjöholm *et al.*, 2007) et un groupe de gènes de fixation de l'azote *nif* (Ehira *et al.*, 2003) et chez la souche *Rivularia* sp. PCC 711, avec une pyruvate kinase.

Une autre étude centrée sur l'infection des picocyanobactéries marines (des genres *Prochlorococcus* et *Synechococcus*) par les cyanophages a montré que la plupart de ces virus possèdent un gène *cp12*, tous codants pour des protéines CP12 similaires à celles de leurs hôtes, c'est-à-dire ne conservant que la paire de cystéines en C-terminal. Chez ces phages cyanobactériens, le gène *cp12* est exprimé de pair avec d'autres gènes impliqués dans la régénération de Ru5P et la biosynthèse de dNTP au cours de l'infection précoce, en mimant les conditions d'obscurité (environnement oxydant), ceci afin d'exploiter le mécanisme de régulation de leurs cellules hôtes en diminuant l'activité du CCB, en économisant du carbone organique, et en régulant à la hausse la voie des pentoses phosphates, en utilisant le pool de pouvoir réducteur NADPH de la cellule hôte pour leur répllication (Thomson *et al.*, 2011).

2) Les algues

Chez les eucaryotes (algues et plantes supérieures), la protéine CP12 est une protéine codée par des gènes nucléaires qui est ensuite transportée dans le chloroplaste de la cellule. Pour l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*, un seul gène codant pour la CP12 canonique a été identifié (Groben *et al.*, 2010 ; Gontero et Maberly, 2012).

En plus de sa fonction rédox, CP12 agit comme une protéine chaperonne spécifique de la GAPDH de *Chlamydomonas reinhardtii*, par un mécanisme qui n'est donc pas rédox-dépendant, car CP12 interagit dans son état oxydé ou réduit en empêchant l'inactivation thermique *in vitro* et l'agrégation de GAPDH de manière stable et non transitoire. En effet, CP12 ne devient pas insoluble lorsqu'elle est chauffée, car sa structure manque de core hydrophobiques. Il a été montré que le site d'interaction entre les deux protéines se situe au niveau du S-loop de GAPDH et de l'acide aminé C66 de CP12 (Erales *et al.*, 2009).

Il a également été montré que CP12 de *C. reinhardtii* pouvait se lier à d'autres enzymes du Calvin cycle, comme la fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FBA) impliquant une participation additionnelle de la protéine au niveau de la régulation du CCB (Erales *et al.*, 2008).

Les protéines CP12 peuvent aussi se lier à des ions métalliques comme l'ion cuivre (Cu^{2+}) avec une affinité quand même assez faible ($K_D = 26 \mu\text{M}$), l'ion nickel (Ni^{2+} , $K_D = 11 \mu\text{M}$) (Delobel *et al.*, 2005) et l'ion calcium Ca^{2+} , (Rocha *et al.*, 2013). Il a été montré chez *Chlamydomonas*, que les ions (Cu^{2+}) aidaient à la formation des ponts disulfures de la protéine CP12, mais qu'ils n'étaient pas essentiels à la formation du complexe ternaire avec GAPDH et PRK chez *Synechococcus* sp. PCC 7942 et *Chlamydomonas reinhardtii* (Erales *et al.*, 2009b; Matsumura *et al.*, 2011).

3) Les plantes supérieures

Les plantes supérieures présentent deux isoformes de tétramères GAPDH (A_2B_2 la forme prédominante et A_4) qui se composent de deux sous unités : GapA et GapB. La différence majeure entre les deux sous-unités est que l'unité GapB présente une extension C-terminale qui est homologue avec la partie C-terminale de CP12 et qui contient des résidus de cystéine permettant sa régulation rédox, tandis que GapA n'en contient pas et ne peut donc pas être rédox-réglée. En outre, il a été suggéré que l'isoforme GapA pourrait ainsi être régulé par la formation d'un supra complexe PRK-CP12-GAPDH à défaut d'être régulé au niveau des résidus cystéines (Trost *et al.*, 2006). De cette manière, les résidus cystéines de GapA sont supplémentés par CP12. Chez les algues et les plantes, GapB est donc une isoforme autoréglée de GapA (Wedel *et al.*, 1998).

Les plantes supérieures peuvent encoder jusqu'à 3 gènes *cp12* au sein de leurs génomes. Néanmoins, à la différence des cyanobactéries où la famille de protéines CP12 est très diverse (classification en huit groupes), chez les plantes supérieures angiospermes (comme *Arabidopsis thaliana* ou *Nicotiana tabacum*), les protéines CP12 sont codées par une petite famille de gènes et sont regroupées selon deux types de protéines : CP12-type I et CP12-type II (Singh *et al.*, 2008; Groben *et al.*, 2010).

Chez la plante *Nicotiana tabacum*, un knockdown d'un asRNA ciblé vers l'un des trois gènes canoniques *cp12* est à l'origine de l'observation *in vivo* d'un phénotype de croissance sévère (nanisme) résultant d'un partage incorrect du carbone (Howard *et al.*, 2011). Cependant, seule une légère diminution des activités maximales de PRK et GAPDH a été observée dans

une lignée transgénique sans changement au niveau de la fixation photosynthétique du CO₂ (ce que nous avons observé en collaboration avec Brigitte Gontero chez *Synechocystis* sp. PCC 6803).

Chez *Arabidopsis thaliana* qui encode 3 gènes *cp12* : *cp12-1* et *cp12-2* (CP12-type I) et *cp12-3* (CP12-type II), le rôle de chacun des gènes a été étudié *in vivo* au niveau de leurs phénotypes de croissance et de leurs performances photosynthétiques, de par la création de mutants d'ADN-T permettant l'expression d'ARNi ciblé sur un ou plusieurs gènes *cp12* López-Calcano *et al.*, 2017.

Il est observé que les mutants uniques de gènes *cp12* ne développent pas de phénotype lié à la photosynthèse ou de croissance sévère, en revanche des mutants simultanés des copies *cp12-1* et *cp12-2* entraînent des réductions de la capacité photosynthétique, du rendement en graines et une croissance retardée. Ces phénotypes suggèrent une redondance fonctionnelle de ces protéines. Chez *A. thaliana*, la protéine CP12 est exprimée dans une variété de tissus, y compris des tissus non-photosynthétique comme les racines qui ne reçoivent généralement pas de lumière, indiquant encore une fois que le rôle de ces protéines ne se limite pas uniquement à la formation d'un supracomplexe (Singh *et al.*, 2008).

Une diminution des niveaux de transcrits des gènes *cp12* (chez les mutants uniques et multiples sauf *cp12-3*) conduit également à une réduction des niveaux de protéines PRK (mais pas des transcrits PRK) et suggère un niveau de régulation post-traductionnel et, par conséquent, un rôle potentiel supplémentaire pour CP12 (López-Calcano *et al.*, 2017). La protéine CP12 pourrait ainsi être impliquée dans la stabilisation de la PRK lors de sa synthèse ou la protéger de la dégradation.

Contrairement à la plante *Nicotiana tabacum* (Howard *et al.*, 2011), d'autres études *in vitro* chez *Arabidopsis* ont montré que lors de la formation du supracomplexe avec CP12, les activités des enzymes PRK et GAPDH étaient fortement réduites (Wedel *et al.*, 1997 ; Marri *et al.*, 2005).

IV. Le chevauchement des voies glycolytiques et anaboliques en mixotrophie et le rôle de la protéine CP12

A. Le métabolisme du carbone

Le CBB fournit aux cellules des hydrates de carbone pour la biosynthèse et le stockage sous forme de réserves carbonées (PHB, glycogène). Leur dégradation est possible au niveau de trois voies glycolytiques alternatives chez les cyanobactéries (et les plantes) : la voie Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), la voie oxydative du pentose phosphate (OPP) ou la voie Entner-Doudoroff (ED) (Figure 134.). Chez les cyanobactéries, une quatrième voie glycolytique, la voie de la phosphokétolase (PK) a été identifiée (Alagesan *et al.*, 2013 ; Xiong *et al.*, 2015).

Ces quatre voies glycolytiques partagent toutes des réactions et des métabolites avec le CCB et fournissent les intermédiaires carbonés, du NAD(P)H et de l'ATP, pour la synthèse de futurs acides aminés, nucléotides et acides gras.

phosphate; Zwf = glucose-6- phosphate déshydrogénase; 2PGA = 2-phosphoglycérate; 3PGA = 3-phosphoglycérate; 6PGL = 6- phosphogluconolactone; 6PGA = 6-phosphogluconate; 6PGD = 6-phosphogluconate déshydrogénase.

Il a été montré que les voies glycolytiques jouent un rôle dominant lors de conditions de croissance photoautotrophe. Lors d'états de transition et de conditions de lumière fluctuantes, les voies glycolytiques viennent piocher sur les réserves de glucides des cyanobactéries en formant des 'shunts anaplérotiques' qui viennent réapprovisionner le CCB (Makowka *et al.*, 2020). Il existe donc une régulation du métabolisme des cyanobactéries par bidirectionnalité des voies anaboliques et catabolique. Sous des conditions photoautotrophiques, les voies cataboliques viennent affiner la fixation du CO₂. Ces voies permettent la production d'ATP et de NAD(P)H venant finement réguler les variations en apport énergétique constante de la cyanobactérie au sein de son environnement (nature et abondance en lumière et en composés organiques).

Il existe donc un chevauchement au niveau des réactions du CCB et des voies glycolytiques qui fonctionnent dans des directions opposées. La Figure 135. ci-dessous met en évidence les réactions des différentes voies présentant un risque élevé d'inhibition mutuelle en présence d'un CCB actif.

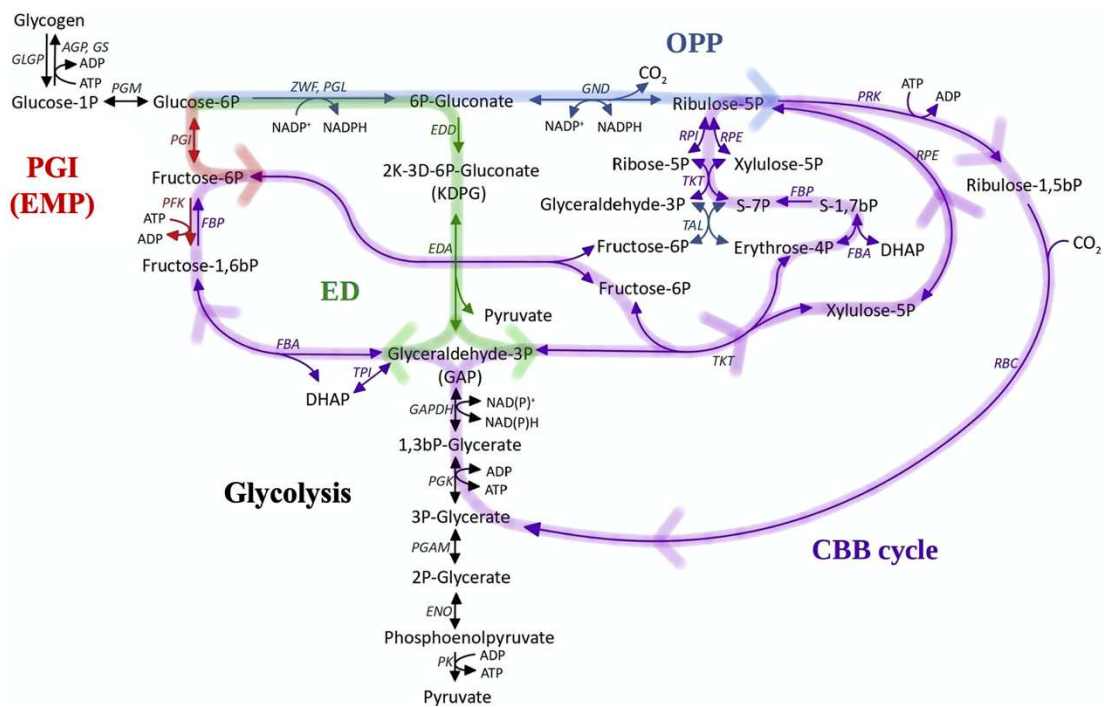


Figure 135. Chevauchement entre les voies glycolytiques et le CCB

Le cycle de Calvin-Benson-Bassham (CCB) est représenté en violet. Les voies glycolytiques : Emden-Meyerhof-Parnas (EMP) en rouge, Voie Entner-Doudoroff (ED) en vert, oxydative du pentose phosphate oxydatif en bleu et la glycolyse inférieure en noir.

B. Les 4 voies glycolytiques

1) La voie Embden-Meyerhof-Parnas (EMP)

La première réaction de la voie EMP est catalysée par l'enzyme phosphofructokinase (PFK) (unique à la voie EMP), qui vient phosphoryler deux fois le glucose pour former du fructose bisphosphate (FBP). Ensuite, le FBP est clivé en glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P) et dihydroxyacétone phosphate (DHAP), deux trioses-phosphates. La succession de réactions en aval de la voie, notamment des réactions de phosphorylation, permet la production d'ATP à partir des intermédiaires DHAP et G3P.

2) La voie oxydative des pentoses phosphates (OPP)

La voie oxydative des pentoses phosphates (OPP) permet la redirection du 6-phosphogluconate (6PGA) qui sont convertis en trioses phosphates par les activités transkétolase et transaldolase. Il existe deux voies des pentoses phosphate, une voie oxydative permettant l'oxydation des glucides et une voie réductive intégrée au CCB permettant la fixation du CO₂ qui est étroitement régulée. Chez les cyanobactéries, il a été montré que la délétion de la voie OPP conduit à des mutants incapables de se développer dans des conditions hétérotrophes LAHG (light activated heterotrophic growth : présence de 5 min de lumière chaque jour) ou conditions photohétérotrophiques (Scanlan *et al.*, 1995 ; Jansen *et al.*, 2010). De plus, des analyses de flux métaboliques ont montré que le glucose est principalement métabolisé par la voie OPP à l'obscurité (Yang *et al.*, 2002 ; Wan *et al.*, 2017).

3) La voie Entner-Doudoroff (ED)

La voie Entner-Doudoroff (ED) est l'une des seules voies glycolytiques ne chevauchant aucune réaction et ne partageant aucun intermédiaire de réaction avec le CCB. Dans la voie ED, le glucose est phosphorylé en glucose-6P (G6P) puis converti en 6-phosphogluconate (6PGA) et en 2-céto-3-désoxy-6-phospho-gluconate (KDPG) (un métabolite unique à la voie de l'ED), qui est à son tour clivé en pyruvate et G3P, permettant la génération d'ATP (Figure 135.). L'intermédiaire 6P-gluconate de la voie ED est connu pour se lier au site actif de la RuBisCO en tant qu'activateur à de faibles concentrations, mais agit comme un inhibiteur compétitif du substrat RuBP à des concentrations plus élevées (Badger et Lorimer, 1981 ; Matsumura *et al.*, 2012).

La voie ED est nécessaire pour un catabolisme optimal du glycogène en parallèle du bon fonctionnement du CCB (Makowka *et al.*, 2020). En effet, il a été montré que la suppression de la voie ED seule diminuait la croissance photoautotrophe en lumière continue de la souche *Synechocystis* sp. PCC 6803. Il a été montré néanmoins qu'en régimes mixotrophique et hétérotrophique les flux de la voie ED sont négligeables chez la souche *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Wan *et al.*, 2017).

Par comparaison avec la voie EMP, la voie ED nécessite 3,5 fois moins de protéines enzymatiques pour atteindre le même flux glycolytique. Cependant, le catabolisme d'une molécule de glucose par la voie ED génère également deux fois moins de molécules d'ATP et de NADH que la voie EMP, mais permet la production d'une molécule de NADPH. Cependant, généralement, les cyanobactéries dépendent plus de la voie ED que de la voie EMP, car elles sont plus souvent limitées en nutriments plutôt qu'en ATP (Veaudor *et al.*, 2020).

4) La voie phosphokétolase (PK)

La voie phosphokétolase (PK) récemment identifiée n'a pas encore été décrite chez les plantes. L'enzyme clé de cette voie est la phosphocétolase (XFP), une protéine ayant le potentiel de cliver les sucres phosphorylés tels que xylulose-5P, le fructose-6P ou le séduheptulose-7P en acétylphosphate (Krüseemann *et al.*, 2018). Chez les cyanobactéries la voie PK contribue également au métabolisme hétérotrophique (Xiong *et al.*, 2015). *Synechocystis* sp. PCC 6803 possède deux isoenzymes XFP codées par *slr0453* (*pket1*) et *sll0529* (*pket2*) qui ont très récemment été caractérisées *in silico* (Bachhar & Jablonsky, 2020). Cette étude montre que dans des conditions d'autotrophie au CO₂ ambiant, pour Δ *pket1* une réduction du flux de 17 % via la RuBisCO est observée, et pour Δ *pket2* une diminution de la croissance de 11,2 à 14,3 %. Les résultats de l'étude attestent que la voie PK joue un rôle crucial dans ces conditions en atténuant la décarboxylation se produisant au niveau de la voie OPP et la conversion du pyruvate en acétyl-CoA liée à la glycolyse EMP dans un environnement pauvre en carbone.

C. Le devenir du carbone assimilé

1) Molécules plateformes / carrefour du métabolisme

Le catabolisme par les voies glycolytiques permet la dégradation de nombreuses molécules complexes (glucides, lipides, protéines) en molécules dites « carrefour » ou plateformes telles que le G3P, le pyruvate (précurseur de la synthèse de certains pigments photosynthétiques et d'acides aminés) et l'acétyl-CoA (précurseur de la synthèse des lipides), pour venir alimenter les seconds cycles métaboliques, de Krebs et de l'urée.

2) Molécules de réserves carbonées : les PHB et le glycogène

Chez les cyanobactéries, en photoautotrophie le carbone peut être stocké continuellement en réserves carbonées qui prennent la forme de polymères de carbohydrates agglomérés en granules intracellulaires insolubles comme les polymères de poly- β -hydroxybutyrates (PHB) synthétisés notamment à partir d'acétyl-CoA ou le glycogène synthétisé à partir de G3P via la néoglucogenèse. Ces polymères contribuent à préserver l'intégrité des cellules lorsque les conditions sont défavorables (obscurité, conditions oxydantes) en alimentant le métabolisme de précurseurs carbonés en énergie.

La synthèse de ces polymères est stimulée en réponse notamment à des carences en azote ou en phosphore par exemple (Asada *et al.*, 1999). Lors d'une carence en azote, un déséquilibre de la balance C/N induit une accumulation d' α -kétoglutarate (α -KG) (précurseur du glutamate) initiateur d'une cascade de régulation médiée par la protéine P_{II}, régulateur global de la balance C/N et l'activation des effecteurs permettant l'accumulation de granules intracellulaires de PHB. Chez *Synechocystis* sp. PCC 6803, la formation des granules dépend des thiorédoxines via l'état rédox de leurs cystéines et de l'approvisionnement en NADPH (Hauf *et al.*, 2014). Les PHB sont synthétisés en 3 étapes à partir de 2 molécules d'acétyl-CoA (Hein *et al.*, 1998 ; Taroncher-Oldenburg *et al.*, 2000). Elles sont tout d'abord condensées en acétoacétyl-CoA par la β -cétothiolase (PhaA) qui est ensuite réduite en hydroxybutyryl-CoA par l'acétoacétyl-CoA réductase (PhaB) puis polymérisée par la PHB synthase (PhaEC). D'un point de vue appliqué, les PHB sont aussi des précurseurs pour la synthèse de plastiques biodégradables. Chez *Synechocystis* sp. PCC 6803, dans certaines conditions de carences nutritives combinées à de l'ingénierie génétique, les PHB peuvent représenter plus de 30% du poids sec des cellules (Khetkorn *et al.*, 2016 ; Koch *et al.*, 2020)

Le glycogène est également synthétisé en 3 étapes : la conversion du glucose-1-phosphate en ADP-glucose par GlgC, la polymérisation de l'ADP-glucose par les deux isoformes GlgA1 et GlgA2, puis la ramification du glycogène en branches 1,6 alpha par GlgB (Preiss, 1984, Yoo *et al.*, 2014). Chez *Synechocystis* sp. PCC 6803, le glycogène joue également un rôle important dans le maintien de la balance C/N au sein de la cellule (Cano *et al.*, 2018).

D. Le rôle de la protéine CP12 dans la régulation fine du chevauchement des réactions anaboliques et cataboliques

En conditions mixotrophiques ou bien lors de l'alternance de lumière-obscurité, une régulation fine doit s'exercer entre les voies glycolytiques et le CCB qui se chevauchent (métabolites en commun). En raison de la compétition entre les voies OPP et du CCB notamment, une formation du complexe PRK/CP12/GAPDH est essentielle.

Le ribulose-5-phosphate (Ru5P) est un intermédiaire à la fois dans le CCB (le substrat de la PRK) et dans la voie OPP (le substrat de la ribulose-5-phosphate épimérase/isomérase, RPE/RPI), cela implique que la PRK est en compétition avec la RPE/RPI pour le Ru5P. Dans des conditions oxydantes (à l'obscurité), les cyanobactéries dépendent de la voie OPP pour générer du pouvoir réducteur principalement sous la forme NADPH. Si pour une raison ou une autre, la formation du complexe entre les 3 protéines n'est pas réalisée, la voie OPP est inhibée et il y a redirection au niveau du CCB via l'assimilation du Ru5P par la PRK ; en conséquence, à l'obscurité le pouvoir réducteur décroît et la croissance cellulaire est entravée. Ce n'est pas le cas sous conditions réductrices (en lumière continue) où le pool de pouvoir réducteur est sans cesse renouvelé par la phase photochimique.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

La compréhension de la balance énergétique et des réactions d'oxydoréductions qui régulent le CCB est essentielle pour considérer la redirection des flux de carbone au sein du CCB. Chez les plantes supérieures, les algues et les cyanobactéries, la protéine intrinsèquement désordonnée, CP12 est impliquée dans la régulation du CCB.

La grande variabilité des séquences CP12 suggère une diversification des fonctions jouées par CP12 *in vivo*. Cependant, leur étude est rendue difficile, car la plupart des organismes photosynthétiques possèdent de multiples copies du gène qui peuvent avoir des rôles redondants.

La cyanobactérie *Synechocystis* sp. PCC 6803, nous a paru être un très bon modèle pour étudier les relations/structures fonctions de CP12, car elle possède une seule copie canonique du gène *cp12* (*ssl3364*). C'est également la cyanobactérie la plus étudiée jusqu'à présent et considérée comme une souche modèle pour laquelle de nombreux outils génétiques ont été développés au laboratoire (Cassier-Chauvat *et al*, 2021).

La construction et l'analyse d'une souche dépourvue de protéine CP12, $\Delta cp12$, est essentielle pour obtenir des informations sur les fonctions *in vivo* de la protéine canonique chez les cyanobactéries. De plus, grâce à une approche génétique nous avons l'opportunité de substituer le gène *cp12* sauvage par des versions mutées en les introduisant chez le mutant dépourvu de CP12. La comparaison avec la souche parentale, éclairera sur le rôle des acides aminés mutés dans ces « variants » de CP12.

I. Stratégie de construction de la souche *Synechocystis* sp. PCC 6803 $\Delta cp12$ et des variants

A. Construction de la souche *Synechocystis* sp. PCC 6803 $\Delta cp12$

Le gène codant pour la version unique et canonique de CP12 chez *Synechocystis* sp. PCC 6803 a donc été ciblé et une cassette de délétion a été construite. Elle contient 300 bp de la région amont et 300 bp de la région en aval du gène *cp12* (*ssl3364*), qui a été remplacé par un gène de résistance à la kanamycine (Km^R) (Figure 136.). Les régions amont et aval servent de plateformes pour la recombinaison homologue. La cassette a été clonée dans le vecteur pGEM-T. Le plasmide résultant a été nommé pGEM-T_ *cp12*:: Km^R (Tableau 18. de souche et Tableau 19. des amorces) La construction a été vérifiée par PCR et séquençage (Figure 136).

La souche *Synechocystis* sp. PCC 6803 sauvage (WT) a été ensuite transformée avec le vecteur pGEM-T_ *cp12*:: Km^R pour remplacer le gène *cp12* par la cassette de résistance à la kanamycine (Km^R). Les transformants Km^R ont été cultivés en présence Km de concentration croissante (Km 50 $\mu g/mL$ à Km 300 $\mu g/mL$) pendant plusieurs générations pour favoriser la propagation de la substitution sur les copies chromosomiques WT et leur ségrégation (Figure 136.). Les analyses de vérification PCR (complétées par le séquençage) de ces clones ne détectant pas le locus WT (gène *cp12*), mais uniquement la présence de la cassette Km^R , et ce, avec ou sans pression de sélection, révèlent que toutes les copies chromosomiques WT ont été irréversiblement éliminées. La souche mutante obtenue $\Delta cp12$ est donc homoploïde ce qui

montre que le gène *cp12* n'est pas essentiel chez *Synechocystis* sp. PCC 6803 en conditions standard du laboratoire.

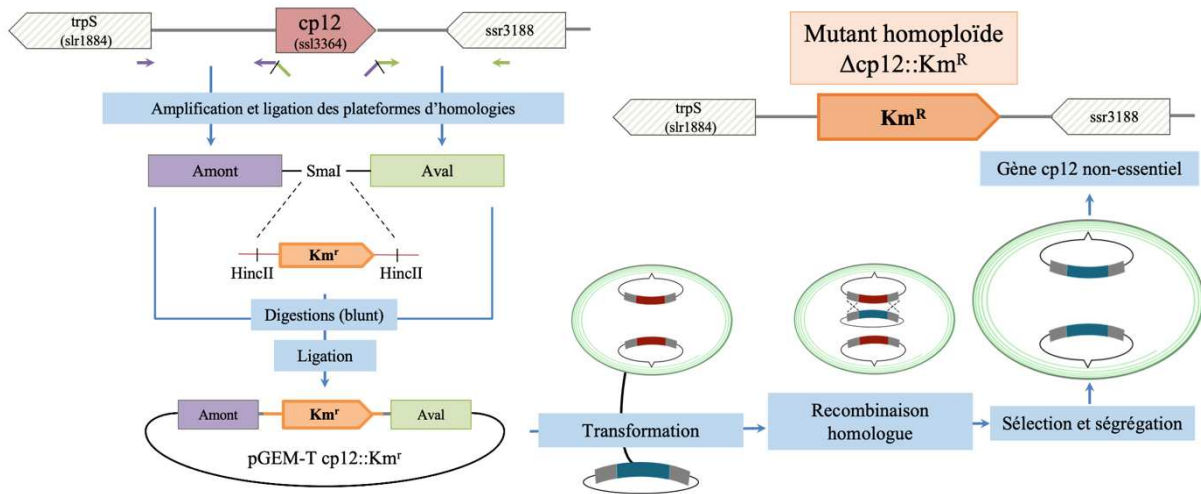


Figure 136. Stratégie de construction de la cassette de délétion $\Delta cp12::Km^R$ et transformation au sein de la souche sauvage de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Construction de la cassette de délétion $\Delta cp12::Km^R$ pour la délétion du gène *cp12* de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (*ssl3364*, boîte rouge). Les gènes adjacents *ssr3188* et *slr1884* sont représentés par des boîtes blanches hachurées pointant dans la direction de transcription du gène. La cassette $cp12::Km^R$ a été clonée dans le plasmide pGEM-T. La cassette a été intégrée dans le chromosome de la souche sauvage de *Synechocystis* sp. PCC 6803 par recombinaison homologue (transformation naturelle). Après sélection et ségrégation des copies chromosomiques, un mutant homoploïde $\Delta cp12::Km^R$ de *Synechocystis* sp. PCC 6803 est obtenu.

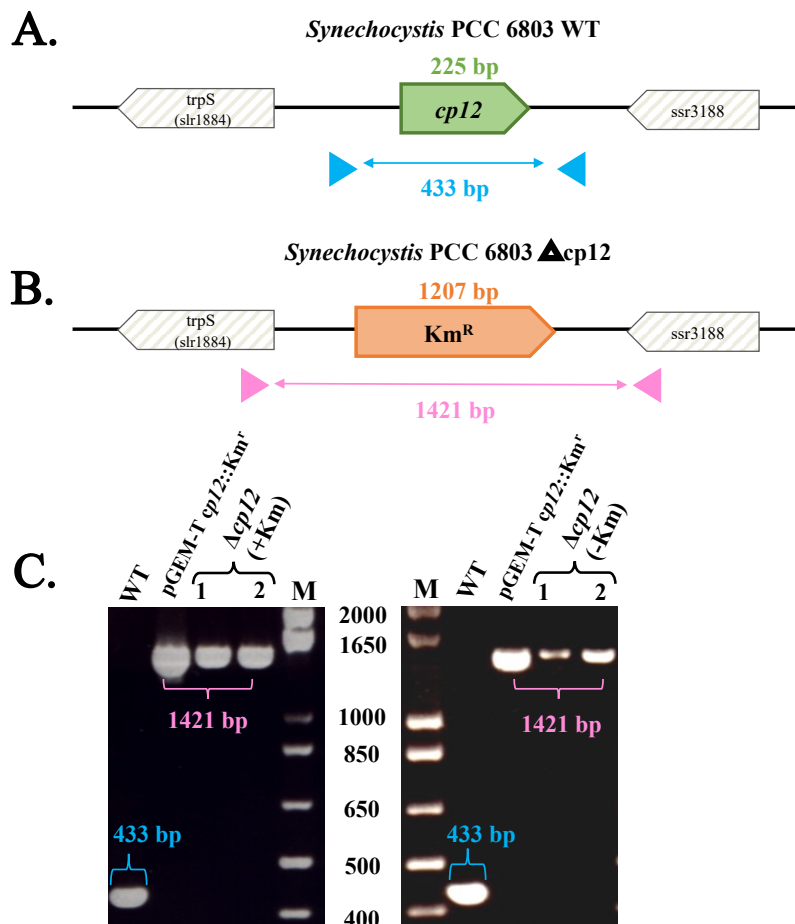


Figure 137. Régions génomiques et vérifications par PCR de la souche mutante *Synechocystis sp.* PCC 6803 $\Delta cp12$

(A. et B.) Représentations schématiques des régions génomiques et des amplifications PCR ainsi que (C.) des photographies sous UV des gels d'agarose montrant les produits d'amplification par PCR avec les amorces cp12_up_fw et cp12_down_rv pour la souche mutante *Synechocystis sp.* PCC 6803 $\Delta cp12$ (en rose) et pour la souche sauvage *Synechocystis sp.* PCC 6803 WT (en bleu). Le marqueur de poids moléculaire (M) = 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); les puits « H₂O » et WT correspondent respectivement aux contrôles de produit, sans matrice et de taille. Le plasmide utilisé pour transformer les cellules WT a également été utilisé comme contrôle positif pour la taille du produit PCR (voie pGEM-T cp12::Km^r). Deux clones indépendants (c1 et c2) cultivés en présence de kanamycine (+ Km) ont été analysés. Pour vérifier la ségrégation complète, ces deux clones ont également été cultivés sans pression sélective (-Km).

B. Stratégie de construction des variants de la protéine CP12 de *Synechocystis sp.* PCC 6803

L'analyse relation structure fonction de la protéine CP12, distribuée dans la totalité des lignées photosynthétiques a été initiée en mutant les résidus conservés au sein de sa séquence primaire : deux paires de cystéines au niveau N-terminal et C-terminal ainsi qu'une séquence consensus fortement chargée. J'ai poursuivi le travail initié par Théo Veaudor (délétion du gène *cp12*) avec la création de 7 souches mutantes de *Synechocystis sp.* PCC 6803, des résidus très conservés pour spécifier le rôle de ces motifs dans l'activité/rôle de la protéine CP12.

- $\Delta cp12$: la souche délétée pour le gène *cp12* codant pour la protéine CP12,

- WTr : la souche WT reconstituée, utilisée comme contrôle pour éliminer les artefacts génétiques qui pourraient être causés par l'événement de recombinaison homologue,
- $\Delta 4\text{Cys}$: la souche dont la protéine CP12 est dépourvue de ses 4 cystéines,
- *Core* : la souche dont la protéine CP12 est mutée dans la séquence consensus centrale au niveau de trois substitutions des résidus chargés négativement (Asp (D) et Glu (E)) du consensus central (AWDAVEEL) en Ala (A), formant la séquence mutée : AWAAVAAL,
- CBS-*cp12*(S7002) : la souche dont le gène codant pour la protéine CP12 de *Synechococcus* sp. PCC 7002 possédant un domaine CBS (Cystathionine- β -synthase) en N-terminal remplace le gène canonique *cp12* de *Synechocystis* sp. PCC 6803
- $\Delta 2\text{CysN-ter}$: la souche dont la protéine CP12 est dépourvue de la paire de cystéines au niveau N-terminal
- $\Delta 2\text{CysC-ter}$: la souche dont la protéine CP12 est dépourvue de la paire de cystéines au niveau C-terminal

La création de mutations ciblées de la protéine CP12 permettra de comprendre l'implication des cystéines (remplacés par des alanines) sur la structure de CP12 et ses conséquences sur le rôle physiologique de la protéine (mutant $\Delta 4\text{Cys}$), mais aussi de cibler le(s) rôles que jouent chaque paire de cystéines formant des ponts disulfures de part et d'autre de la séquence protéique (N-terminale et C-terminale) dans l'interaction de CP12 avec des protéines hétérologues ($\Delta 2\text{CysN-ter}$ et $\Delta 2\text{CysC-ter}$). Le rôle de la séquence consensus centrale a été analysé avec la construction du mutant *Core* dont les résidus consensus acide aspartique et acide glutamique sont mutés en résidus non chargés alanine. Le gène CBS-*cp12* de *Synechococcus* sp. PCC 7002 contenant une paire de Cys en N-terminal, la séquence centrale (AWAMVEEL) et une seule cystéine à l'extrémité C-terminale (CBS-*cp12*(S7002)).

La stratégie de construction des souches mutantes *Synechocystis* sp. PCC 6803 présentant des variants de la protéine CP12 a été la suivante :

- Un vecteur de clonage (pEX-A SmSp^R *cp12-dwn*) a été conçu avec un gène conférant la résistance à la streptomycine/spectinomycine (SmSp^R) flanqué de terminateurs transcriptionnels/traductionnels (TT), suivi de la région située en aval de *cp12*, et précédée de sites de restriction uniques *NcoI* et *PstI* (voir séquence en Annexe 3.).
- Un deuxième vecteur de clonage (pEX-A SmSp^R *cp12-up*) a été conçu avec une région amont *cp12* suivi de l'ORF CP12 avec les diverses mutations, flanquées entre deux sites de restriction uniques *NcoI* et *PstI* (voir séquences en Annexe 4.).

Après digestion des deux vecteurs par les enzymes de restriction *NcoI* et *PstI* et ligation, les différentes cassettes pEX-A-*cp12*::Sm^R/Sp^R sont établies pour la construction de chaque mutants de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (voir séquences en Annexes 5-13).

Ainsi, la souche mutante délétée pour le gène *cp12* est utilisée comme souche parentale pour réintroduire les différentes versions du gène *cp12* : les cassettes sont introduites (par transformation) dans le mutant $\Delta cp12$::Km^R pour remplacer (par recombinaison homologue) le marqueur Km^R par les différentes cassettes *cp12*-Sm^R/Sp^R, possédant les différents mutants ponctuels du gène *cp12*. Les transformants Sm^R/Sp^R ont été ensuite cultivés sous une pression de sélection de Sm + Sp pendant plusieurs générations pour favoriser la propagation des copies de chromosomes portant les diverses « formes » de *cp12* et leur ségrégation (Figure 138.).

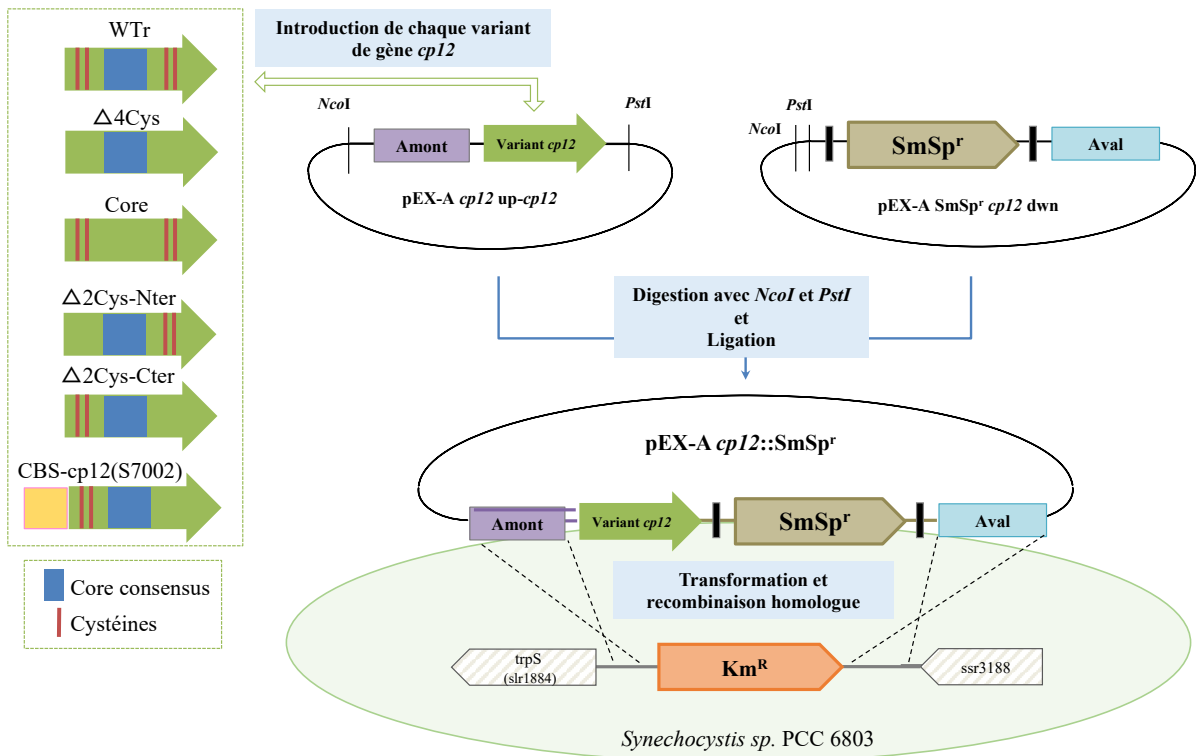
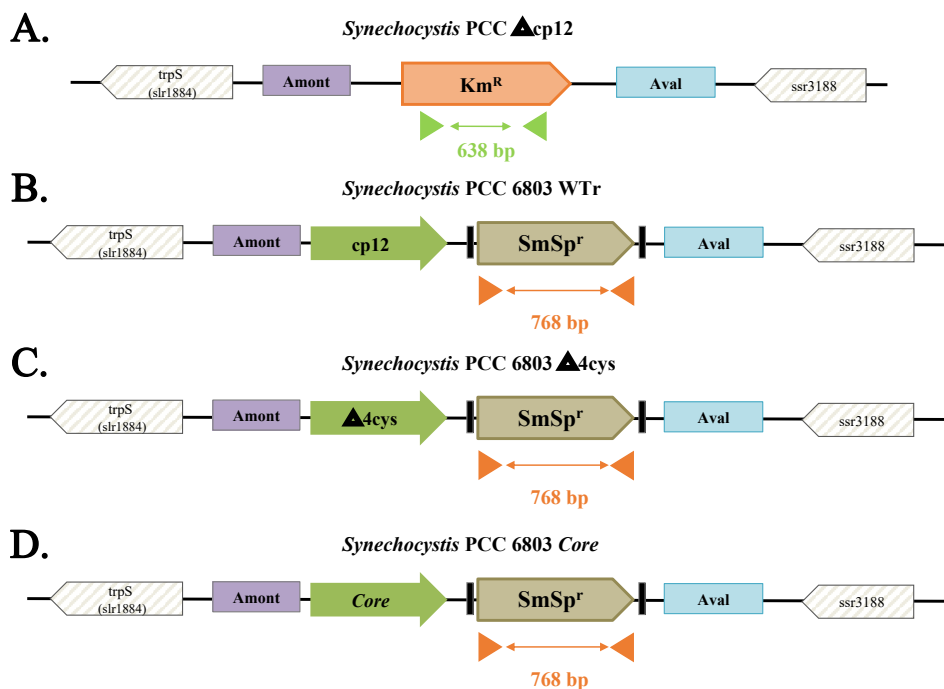


Figure 138. Stratégie de construction des mutants ponctuels du gène *cp12* chez *Synechocystis sp.* PCC 6803

Les analyses de vérifications PCR (complétées par le séquençage) de ces clones ne détectent pas la cassette *Km^R*, mais uniquement la présence de la cassette *Sm^R/Sp^R*, et ce, avec ou sans pression de sélection, révèlent que toutes les copies chromosomique *Km^R* ont été irréversiblement éliminées. Les souches mutantes obtenues WTr, $\Delta 4\text{Cys}$, Core, $\Delta 2\text{CysN-ter}$, $\Delta 2\text{CysC-ter}$ et CBS-*cp12*(S7002) sont homoploïdes (Figure 139. et 140. ci-dessous).



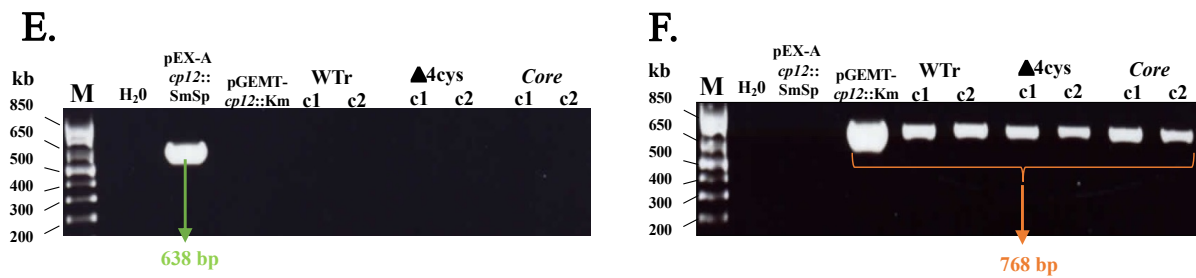


Figure 139. Régions génomiques et vérifications PCR des souches mutantes *Synechocystis* sp. PCC 6803 *WTr*, $\Delta 4cys$ et *Core*

A-D : Représentation schématique des régions génomiques et des amplifications PCR (**A.**) $\Delta cp12$ (**B.**) *WTr* (**C.**) $\Delta 4cys$ et (**D.**) *Core*. **E-F** : Photographies sous UV des gels d'agarose montrant les produits d'amplification par PCR (**E.**) avec les amorces *Km_Fw* et *Km_Rv* (en vert) (**F.**) et avec les amorces *SmSp_Fw* et *SmSp_Rv* (en orange) pour les diverses souches mutantes *Synechocystis* sp. PCC 6803. Le marqueur de poids moléculaire (M) = 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); les puits « H₂O », pGEMT *cp12::Km* and pEX-A *cp12::SmSp* correspondent aux contrôles de produit sans matrice et de taille, respectivement. Pour chaque souche, deux clones indépendants (c1 et c2), cultivés en présence de streptomycine/spectinomycine (5 μ g/mL et 5 μ g/mL) ont été analysés.

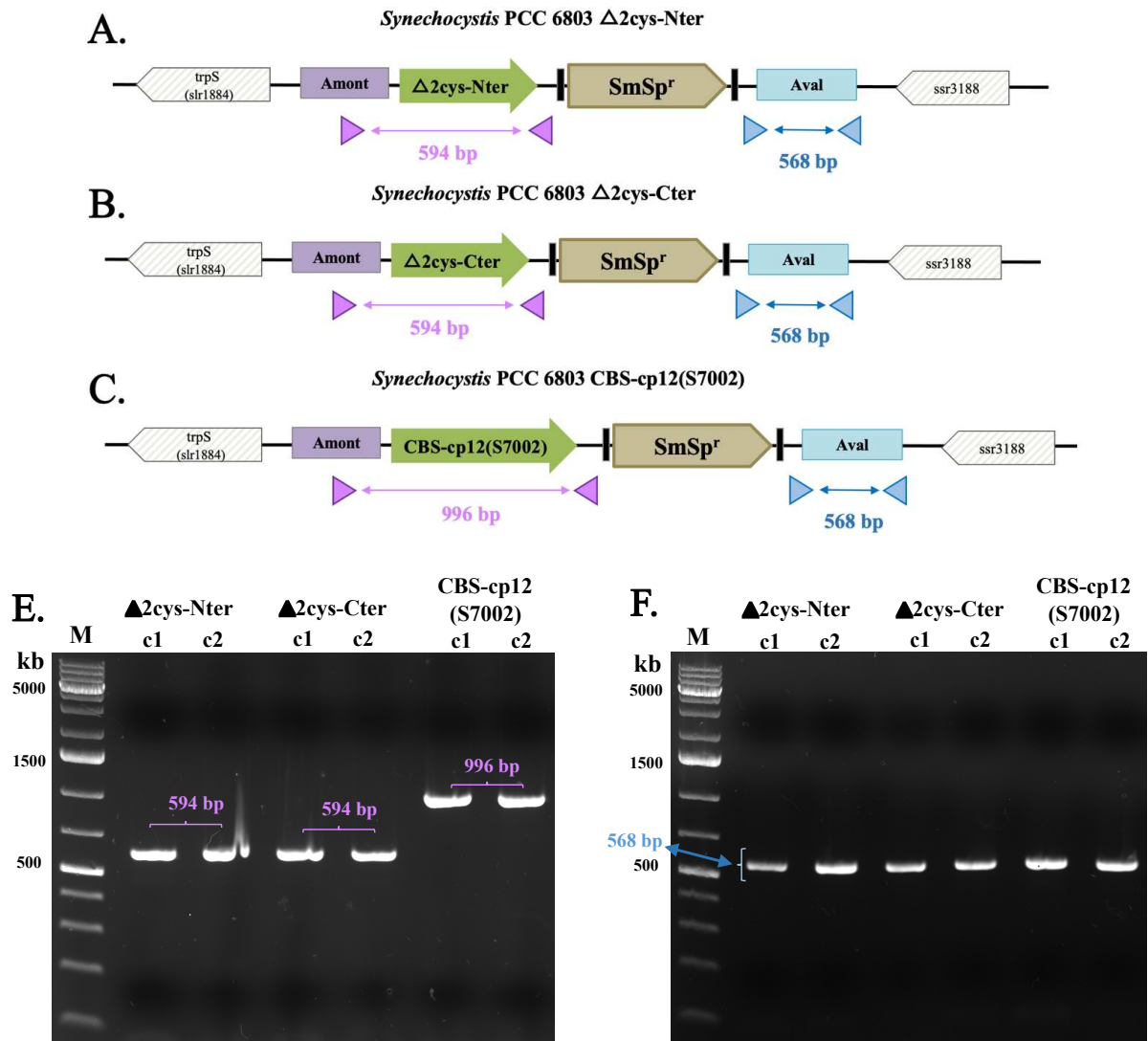


Figure 140. Régions génomiques et vérifications par PCR des souches mutantes *Synechocystis* sp. PCC 6803 $\Delta 2cys$ -Nter, $\Delta 2cys$ -Cter et CBS-cp12(S7002)

Représentation schématique des régions génomiques et des amplifications PCR ainsi que des photographies sous UV des gels d'agarose montrant les produits d'amplification par PCR de la région amont (E.) avec les amorces *cp12_up_For* et *Sm/Sp_Rev2* (en violet) pour les souches (A.) $\Delta 2cys$ -Nter (B.) $\Delta 2cys$ -Cter et (C.) CBS-cp12(S7002) et les produits d'amplification par PCR de la région avale (F.) avec les amorces *Sm/Sp(stop)_For* et *cp12_down_rev* (en bleu) pour les souches (A.) $\Delta 2cys$ -Nter (B.) $\Delta 2cys$ -Cter et (C.) CBS-cp12(S7002). Le marqueur de poids moléculaire (M) est le GeneRuler™ 1Kb plus de ThermoScientific. Pour chaque souche, deux clones indépendants (c1 et c2), cultivés en présence de streptomycine/spectinomycine (5 μ g/mL et 5 μ g/mL), ont été analysés.

Cette stratégie offre l'avantage d'étudier différentes mutations ponctuelles dans le gène *cp12* WT, exprimé à partir de son promoteur naturel, dans un même environnement génétique, pour éviter tout biais d'expression entre les différentes souches mutantes. Ainsi, les phénotypes de ces 7 souches mutantes de la protéine CP12 ont été analysés et comparés dans diverses conditions de culture notamment pour caractériser le rôle de la protéine CP12 et de ses résidus dans le métabolisme du carbone.

II. Analyses phénotypiques de la souche *Synechocystis* sp. PCC 6803 $\Delta cp12$ et des variants de la protéine CP12

A. Analyses phénotypiques sous différents régimes photosynthétiques

1) Sous une lumière continue

Comme le montre la figure 141, la croissance en photoautotrophie dans les conditions standard du laboratoire (2500 lux, 30°C, MM) de la souche mutante $\Delta cp12$ et de la souche sauvage sont similaires aussi bien en culture liquide (Figure 141 panel A) que sur boîte (Figure 141 panel B). Des résultats similaires sont obtenus avec les quatre mutants (Figure 142).

Ces résultats indiquent que la protéine CP12 n'est pas essentielle à la croissance en photoautotrophie sous lumière continue. Ce résultat n'est pas étonnant ; en effet, en lumière continue, que la protéine CP12 soit absente ou inactive, les pools de substrats consommés par le CCB sont sans cesse renouvelés.

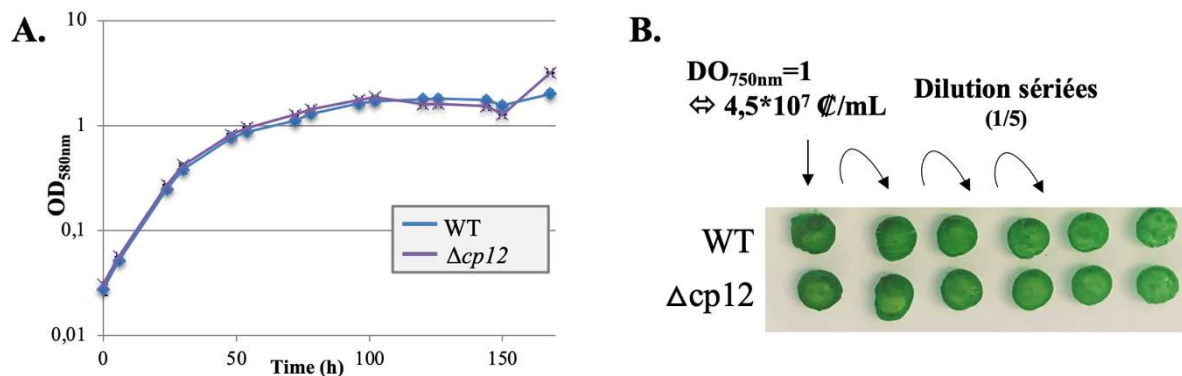


Figure 141. Comparaison de croissance sous conditions de photoautotrophie en lumière continue entre souche *Synechocystis* sauvage et la souche délétée pour le gène *cp12*.

Dans des conditions de photoautotrophie standard, sous 2500 lux, 30°C et MM la croissance de la souche sauvage et de la souche $\Delta cp12$ sont comparées **A.** en cultures liquides en erlenmeyers au sein d'un incubateur Infors sous 140 rpm d'agitation. Les barres d'erreur représentent l'écart-type moyen pour tous les échantillons ($N \geq 2$). **B.** Spots tests de dilutions sériées (1/5) partant d'une DO_{750nm} = 1 (soit $4,5 \cdot 10^7$ cellules/mL) sur un milieu MM agar des souches WT et $\Delta cp12$. La boîte de pétri est ensuite disposée dans une pièce lumineuse à 30°C sous 2500 lux, et la photo prise 6 jours après l'inoculation ($N = 2$).

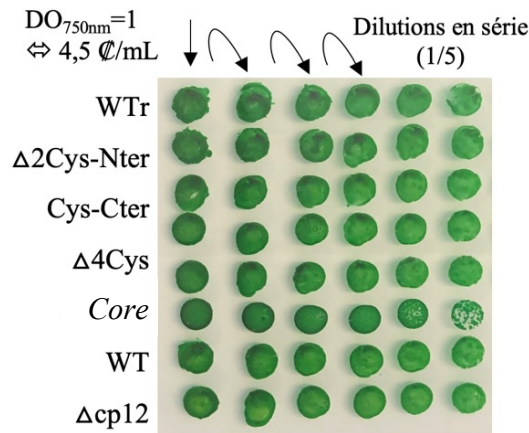


Figure 142. Croissance des différents mutants CP12 en conditions standard photoautotrophiques (MM, 2500 lux ($\approx 35 \mu E.m^{-2}.s^{-1}$) et 30°C)

Spots tests en dilutions sériées (1/5) partant d'une $DO_{750nm} = 1$ (soit $4,5.10^7$ cellules/mL) sur un milieu MM agar, des souches WT et des différents variants *cp12*. La boîte de pétrie est ensuite disposée dans une pièce lumineuse à 30°C sous 2500 lux, et la photo prise 6 jours après l'inoculation.

2) Sous une alternance jour/nuit

Chez *Synechocystis* sp. PCC 6803, la comparaison de la croissance sous des cycles d'alternance jour/nuit (8 heures de lumière/16 heures d'obscurité) ne montre pas de différence entre la souche $\Delta cp12$ par rapport à la sauvage, contrairement aux observations rapportées chez la souche *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Tamoi *et al.*, 2005).

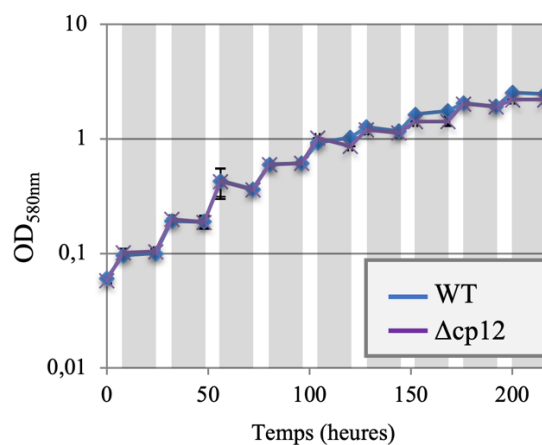


Figure 143. Croissance des souches $\Delta cp12$ et sauvage sous une alternance de cycle de lumière/obscurité (8h/16h).

Les densités optiques ont été relevées en mesurant l'absorbance à 580 nm, plusieurs fois par jour dans des conditions d'alternance jour (8h)/nuit(12h), sous agitation (140 rpm) dans un incubateur Infors à 30°C (Théo Veaudor). Les cycles d'obscurité sont représentés par des barres grises. Les barres d'erreur représentent l'écart-type moyen pour tous les échantillons ($N \geq 2$).

En conclusion, chez *Synechocystis* sp. PCC 6803, le gène *cp12* n'est pas nécessaire à la croissance photoautotrophique sous des régimes de lumière continue et de cycle alternant lumière/obscurité.

3) En conditions oxydantes, à l'obscurité

Sous conditions oxydantes, le complexe supramoléculaire formé entre la protéine CP12 et les deux enzymes du CCB, par recrutement séquentiel de GAPDH (Gap2 ; *via* les cystéines en C-ter de CP12) et PRK (*via* celles en N-ter) est modifié chez les mutants ponctuels de CP12. Dès lors, selon les mutants, les enzymes GAPDH (Gap2) et PRK vont, soit ne pas interagir (et donc rester libres), soit former un complexe binaire ou ternaire avec CP12. Le Tableau 13. ci-dessous s'appuie sur la littérature et les résultats de cette étude, pour établir les phénotypes théoriques de chacune des souches WT ou mutantes *cp12*, au niveau de la formation (complète, partielle ou absente) de complexe moléculaire entre CP12, Gap2 et PRK, et sur les activités enzymatiques en conditions oxydantes des enzymes du CCB.

Chez *Synechocystis* sp. PCC 6803 il existe en effet deux isoformes de GAPDH très divergentes : Gap1 et Gap2 qui sont coexprimées. Gap2 est impliquée dans les réactions du CCB et de la néoglucogenèse tandis que Gap1 dans les réactions de la glycolyse (Koksharova *et al*, 1998). En fonction de la formation (ou non) du complexe et du nombre de protéines qui le compose, l'accessibilité du site actif de Gap2 va être modifiée et différents types de substrats vont pouvoir interagir avec l'enzyme et induire les activités Gap2-NADPH (impliquée dans la néoglucogenèse et CCB) et/ou Gap2-NADH (exclusivement néoglucogenèse).

Tableau 13. Tableau récapitulatif de la formation de complexe moléculaire entre CP12, Gap2 et PRK et de leurs activités enzymatiques en conditions oxydantes, chez chacune des souches WT ou mutantes portant un variant de la séquence cp12.

Les données du tableau sont basées sur nos résultats ainsi que ceux publiés dans la littérature (Hackenberg, 2018; McFarlane *et al.*, 2019 ; Avilan *et al.*, 2012). La régulation du CCB en conditions oxydantes est réalisée via la formation de complexes moléculaire entre CP12 et les enzymes du CCB, Gap2 et PRK. Pour le mutant *Core*, l'activité de Gap2-NADPH dépend de l'importance du *Core* dans l'interaction avec la PRK : si il y a formation de complexe binaire (100%) ou de complexe ternaire (0%). Abréviations : S=S, pont disulfures, cys : cystéines, act^é : activité.

Hypothèses	WT et WTr	$\Delta 2\text{cys-Nter}$	<i>Core</i>	Δcp12	$\Delta 4\text{cys}$	$\Delta 2\text{cys-Cter}$	CBS-cp12(S7002)
Schéma du complexe							
Formats du(des) complexe(s) formés entre enzymes	Complexe ternaire	PRK libre Complexe binaire Complexe ternaire	Complexe binaire Complexe ternaire?	PRK libre GAPDH libre Complexe binaire Complexe ternaire	PRK libre GAPDH libre Complexe binaire Complexe ternaire	PRK libre GAPDH libre Complexe binaire Complexe ternaire	PRK libre GAPDH libre Complexe binaire Complexe ternaire
Activité de PRK 	0% activité En raison de : • La formation de S=S au niveau des cys (Nter notamment) chez la PRK libre (=> 10% act ^é restante) • + Formation du complexe ternaire (0%)	10% activité En raison de : • La formation de S=S au niveau des cys (Nter notamment) chez la PRK libre (=> 10% act ^é restante) • Core pas suffisant pour assurer l'interaction de cp12 avec le site actif de PRK.	Entre 0-10% act^é La délétion du core (au niveau Nter) diminue surement la stabilité de l'interaction avec PRK.	10% activité En raison de : • La formation de S=S au niveau des cys (Nter notamment) chez la PRK libre (=> 10% act ^é restante)	10% activité En raison de : • La formation de S=S au niveau des cys (Nter notamment) chez la PRK libre (=> 10% act ^é restante)	10% activité En raison de : • La formation de S=S au niveau des cys (Nter notamment) chez la PRK libre (=> 10% act ^é restante) → Mais pas de formation du complexe ternaire, car pas de formation de complexe binaire	10% activité • Le type 'CBS-cp12' ne forme pas de complexe ternaire (Hackenberg, 2018) Seulement 1 cys en Cter => donc pas de S=S en Cter => pas de complexe binaire avec GAPDH
Activités Gap2-NADPH et Gap2-NADH 	0% activité gap2-NADPH maintenue	100% activité gap2-NADPH maintenue	0% ou 100% activité gap2-NADPH maintenue	100% activité gap2-NADPH maintenue	100% activité gap2-NADPH maintenue	100% activité gap2-NADPH maintenue	100% activité gap2-NADPH maintenue
	0% activité gap2-NADH maintenue	0% activité gap2-NADH maintenue	0% activité gap2-NADH maintenue	100% activité gap2-NADH maintenue	100% activité gap2-NADH maintenue	100% activité gap2-NADH maintenue	100% activité gap2-NADH maintenue

III. Utilisation du fluoromètre DUAL PAM pour le suivi de la consommation de pouvoir réducteur (NAD(P)H des mutants de la protéine CP12

Chez plusieurs organismes, il a été démontré que les cystéines de la protéine CP12 sont rédox actives (voir introduction), ce qui permet une commutation rapide et efficace des enzymes du CCB, régie par l'activité photosynthétique.

Nous avons donc cherché à déterminer si cette coordination était affectée *in vivo* en absence de CP12 ou en présence de différents mutants de la protéine, en utilisant une approche fluorimétrique en collaboration avec Pierre Sétif (Laboratoire des Mécanismes fondamentaux de la Bioénergétique) au CEA de Saclay.

La mesure de la dynamique *in vivo* (par mesure de l'émission de fluorescence) du pool de NAD(P)H produit par la photosynthèse et consommé majoritairement par le CCB a été entreprise. En présence de lumière, leur réduction par la chaîne photosynthétique est très rapide (≈ 100 ms) tandis qu'à l'obscurité, leur oxydation est lente (≈ 2 s). La fluorescence émise exclusivement par ces cofacteurs réduits peut être mesurée et enregistrée par le fluoromètre DUAL PAM (Kauny et Sétif, 2014 et Figure 144. pour le principe).

Cette approche permet de mesurer l'état métabolique/état rédox des cellules, et ceci via l'observation de la consommation de NAD(P)H et la vitesse de diminution de l'émission de fluorescence. Cette vitesse de décroissance du signal est fonction de l'activation des voies métaboliques, elle-même proportionnelle à la durée d'éclairement des cellules.

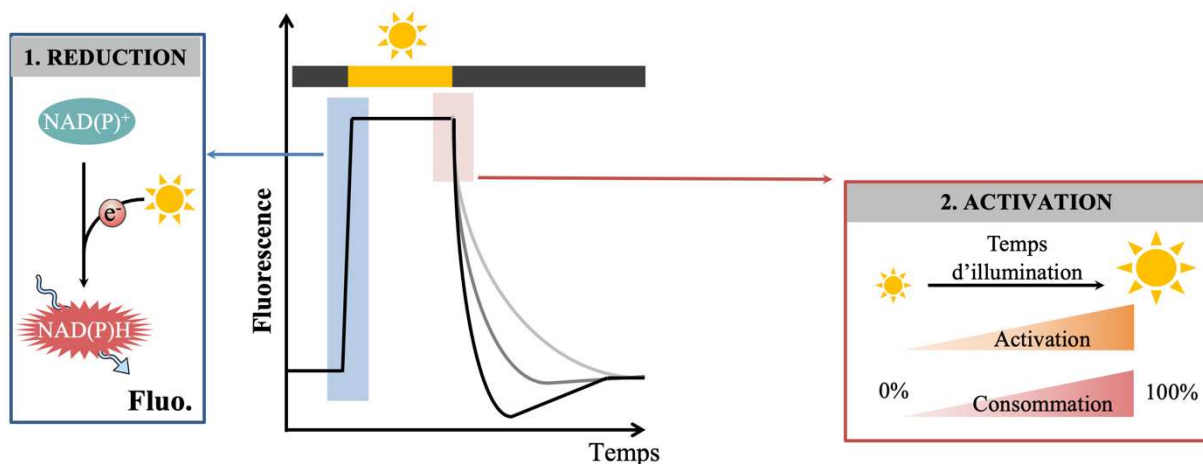


Figure 144. Principe de mesure de la dynamique du pouvoir réducteur par DUAL-PAM chez *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Thèse de Théo Veaudor)

Ainsi lors d'une longue illumination, l'activation des voies anaboliques, par le système de ferrédoxine/thiorédoxine (ou d'autres modifications post-traductionnelles) est complète induisant donc, pendant les toutes premières secondes d'obscurité, une baisse rapide de la fluorescence émise. Tandis que lors d'une courte illumination, toutes les voies anaboliques ne sont pas activées et donc pendant les toutes premières secondes d'obscurité, la vitesse de décroissance du signal, liée à la fluorescence émise, est plus lente.

Chez *Synechocystis* sp. PCC 6803, il a été montré que les voies sont pleinement activées pour des éclairages ≥ 16 secondes, tandis que lors d'un éclairage bref de 0,5 seconde, l'activation des voies est incomplète.

En amont de l'expérience de fluorométrie avec le DUAL PAM, les souches mutantes et sauvages de *Synechocystis* sp. PCC 6803 ont été cultivées sous conditions de photoautotrophie et les cultures repiquées plusieurs fois en phase exponentielle. En tout début d'expérience, un spectre d'absorption avec le spectrophotomètre a été effectué pour chaque souche (Figure 145.).

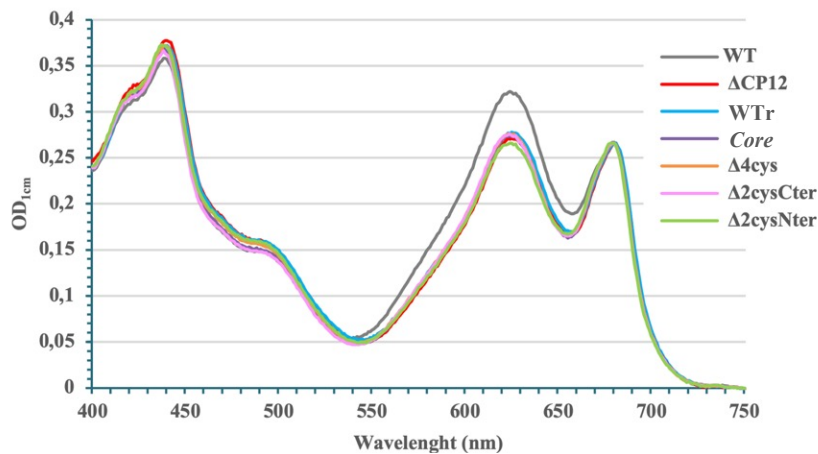


Figure 145. Spectre d'absorbance ($\lambda = 400-750\text{nm}$) de chacune des souches mutantes et WT de *Synechocystis* sp. PCC 6803 utilisée pour les mesures de Dual-PAM

Les absorbances des suspensions de cellules qui ont été utilisées pour les mesures de la fluorescence par le Dual-PAM ont été mesurées dans un spectrophotomètre Aminco DW2 de marque Olis. Toutes les suspensions ont présenté des absorbances comprises entre 0,22 et 0,29 à $\lambda = 680\text{nm}$. Sur la figure, les spectres ont été normalisés à une même DO=0.266 à $\lambda = 680\text{nm}$.

On observe sur les spectres d'absorption de la Figure 145. que le pic de phycocyanine à $\lambda \approx 625$ nm pour la souche WT est plus haut que l'ensemble des autres variants *cp12*. Les mutants (y compris la souche WTr) étant cultivés en présence d'antibiotiques, nous avons réitéré l'expérience cette fois-ci sans pression de sélection. Les souches mutantes WTr cultivées sans antibiotiques ont montré un pic de phycocyanine un peu plus important (données non montrées), que les cultures avec la pression de sélection, même si les cultures étaient bien moins visqueuses que les cultures avec antibiotiques (WTr et autres variants *cp12*) – elles sont aussi moins vert-jaune d'aspect et tendent plus vers le bleu vert à l'image de la WT. L'ajout d'antibiotique dans la culture a donc un effet minime sur la baisse du pic de phycocyanine. L'expression de la cassette de résistance à l'antibiotique des mutants pourrait être à l'origine du phénotype.

Les premiers résultats du laboratoire (thèse Théo Veaudor) ont montré chez la souche mutante $\Delta cp12$ (absence de production de la protéine CP12), que lorsque les cellules sont brièvement exposées à la lumière (0,5s) et donc que l'activation des voies anaboliques est faible, la souche mutante $\Delta cp12$ a une plus forte consommation de NAD(P)H que la souche sauvage, et égale à celle révélée lors d'un long temps d'exposition, lorsque l'activation des voies anaboliques est forte (Figure 146. ci-dessous). Autrement dit que la consommation de NAD(P)H chez le mutant $\Delta cp12$ est constitutive quelque soit l'activité photosynthétique et que donc lors de l'absence de la protéine CP12, il n'existe plus de coordination entre la photosynthèse et la consommation de pouvoir réducteur.

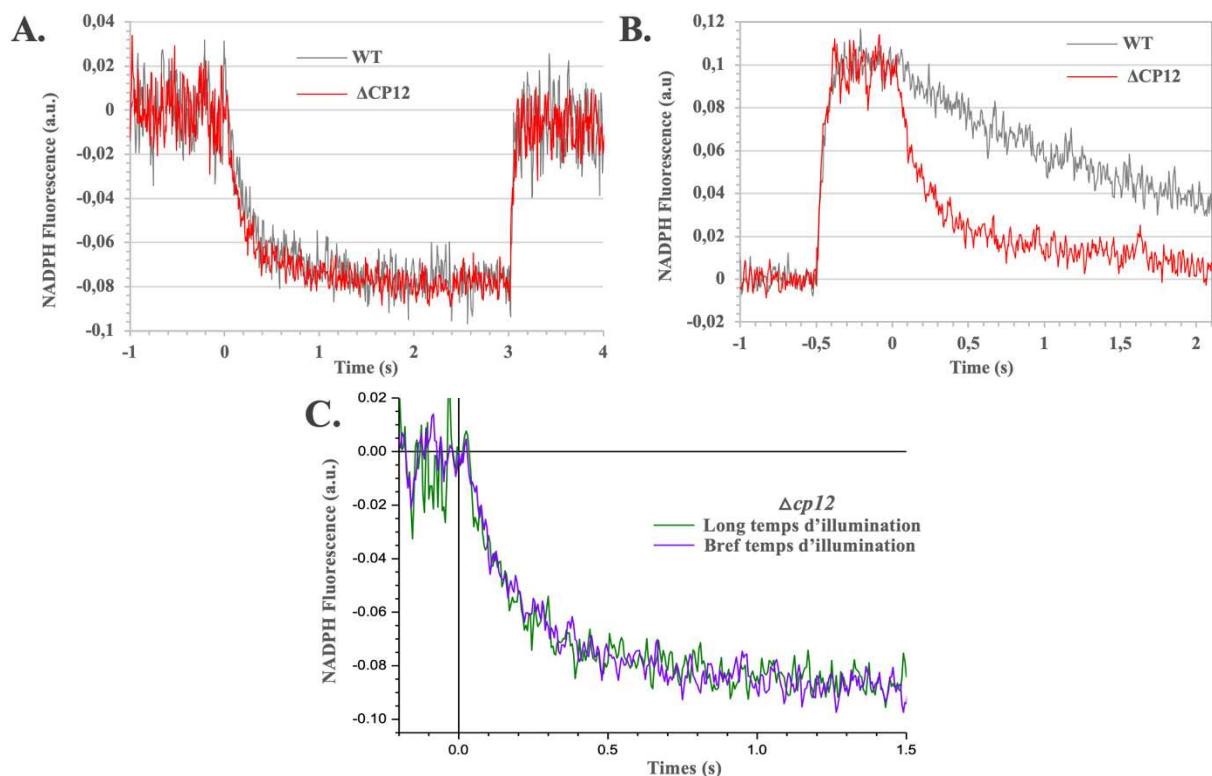


Figure 146. Cinétique de la fluorescence du NAD(P)H chez les souches *Synechocystis* sp. PCC 6803 WT et $\Delta cp12$

Les suspensions cellulaires ont été analysées à une concentration de 3,11-3,71 $\mu\text{g chl.a/mL}$. **A.** Cinétique de la fluorescence du NAD(P)H induite par des intervalles d'obscurité de 3 s sur fond d'illumination continue sous une intensité lumineuse actinique ($\lambda=630\text{nm}$) de 340 $\mu\text{moles photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ qui montre une activation complète du cycle de Calvin. Une moyenne de 20 acquisitions/mesures de la décroissance du signal de fluorescence du NADPH a été enregistrée pendant 3 s d'intervalle d'obscurité toutes les 20 s de lumière continue. Le niveau du signal avant l'intervalle d'obscurité (-3 à 0 s) a été fixé à 0. Le temps 0 a été fixé au début de l'intervalle d'obscurité. Les niveaux de signal, mesurés comme des amplitudes négatives à $t=2,5$ à 3 s, ont été normalisés par rapport aux données WT. **B.** Cinétique de la fluorescence du NAD(P)H induite par une période d'illumination de 0,5 s avec une intensité lumineuse actinique ($\lambda=630\text{nm}$) de 340 $\mu\text{moles photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ a été précédemment montrée pour permettre la formation totale du NADPH brièvement photoproduit (Kauny et Sétif, 2014). Une moyenne de 40 à 135 acquisitions/mesures de la décroissance du signal de fluorescence du NAD(P)H a été enregistrée après des impulsions lumineuses de 0,5 s, toutes les minutes. La ligne de base avant l'illumination est fixée à zéro. Le temps 0 est fixé à la fin de l'illumination. Les niveaux de signal à la fin de l'impulsion lumineuse ont été normalisés à un signal de 0,1. **C.** Les données sont normalisées à 0 à la fin de l'exposition à la lumière pour comparaison de la décroissance du signal de la souche $\Delta cp12$ après une longue et courte illumination.

En comparant la diminution de fluorescence émise des cellules des souches WT, WTr et $\Delta cp12$ à l'obscurité après avoir été brièvement exposées à la lumière (0,5s), on observe que la décroissance du signal de la demi-pente de consommation du NAD(P)H est respectivement 5 et 2 fois plus lente, pour les souches WT et WTr, par rapport à la souche $\Delta cp12$ (Figure 147. C. ci-dessous). Ainsi, la consommation de pouvoir réducteur de la souche WTr, après une brève exposition à la lumière (0,5s), est plus rapide que la souche WT (Figure 147. B. ci-dessous). L'effet de l'antibiotique sur la différence de consommation de NAD(P)H entre les souches WT et WTr est en tout cas quasi négligeable (résultats non présentés).

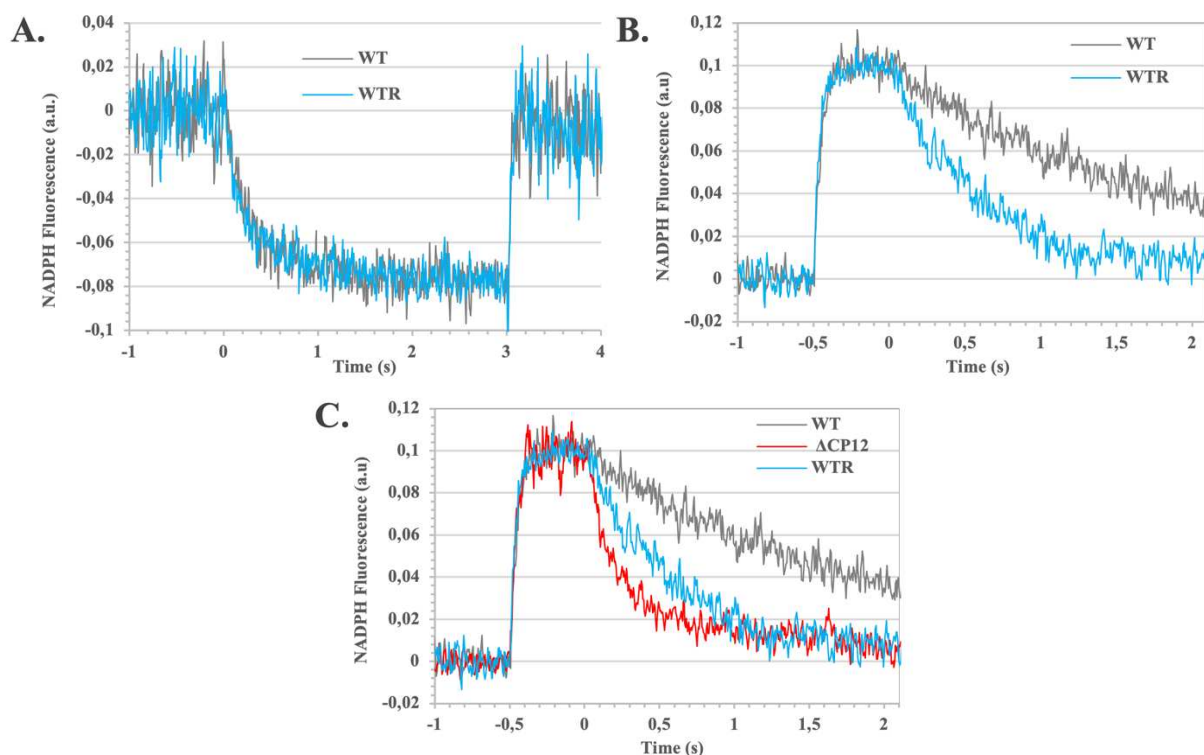


Figure 147. Cinétique de la fluorescence du NAD(P)H chez les souches *Synechocystis sp. PCC 6803* WT, WTr et $\Delta cp12$

Les suspensions cellulaires ont été analysées à une concentration de 3,11-3,71 $\mu\text{g chl.a/mL}$. **A.** Cinétique de la fluorescence du NAD(P)H induite par des intervalles d'obscurité de 3 s sur fond d'illumination continue sous une intensité lumineuse actinique ($\lambda=630\text{nm}$) de 340 $\mu\text{moles photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ qui montre une activation complète du cycle de Calvin. Une moyenne de 20 acquisitions/mesures de la décroissance du signal de fluorescence du NADPH a été enregistrée pendant 3 s d'intervalle d'obscurité toutes les 20 s de lumière continue. Le niveau du signal avant l'intervalle d'obscurité (-3 à 0 s) a été fixé à 0. Le temps 0 a été fixé au début de l'intervalle d'obscurité. Les niveaux de signal, mesurés comme des amplitudes négatives à $t = 2,5$ à 3 s, ont été normalisés par rapport aux données WT. **B.** Cinétique de la fluorescence du NAD(P)H induite par une période d'illumination de 0,5 s avec une intensité lumineuse actinique ($\lambda=630\text{nm}$) de 340 $\mu\text{moles photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ a été précédemment montrée pour permettre la formation totale du NADPH brièvement photoproduit (Kauny et Sétif, 2014). Une moyenne de 40 à 135 acquisitions/mesures de la décroissance du signal de fluorescence du NAD(P)H a été enregistrée après des impulsions lumineuses de 0,5 s, toutes les minutes. La ligne de base avant l'illumination est fixée à zéro. Le temps 0 est fixé à la fin de l'illumination. Les niveaux de signal à la fin de l'impulsion lumineuse ont été normalisés à un signal de 0,1. **C.** Comparaison des cinétiques de la fluorescence du NAD(P)H des souches WT, WTr et $\Delta cp12$ induite par une période d'illumination de 0,5 s.

Nos hypothèses s'orientent donc vers une possible modification de l'environnement génétique lors de la réinsertion du gène *cp12* avec la cassette de résistance à l'antibiotique en aval, de la souche WTr par rapport à la souche WT. Cette réinsertion a pu induire une modification de l'expression des gènes autour de cet environnement, une modification du transcriptôme (avec plus ou moins de régulation des ARNs), mais également de la stœchiométrie des protéines *in vivo*. En effet, si la protéine CP12 est légèrement moins exprimée chez la souche WTr, alors moins de complexes supramoléculaires sont formés avec les protéines GAPDH et PRK, et le CCB viendra donc 'tirer' davantage sur la consommation de NAD(P)H pour alimenter les réactions non photochimiques de son cycle.

Néanmoins, même si la souche WT reconstituée (WTr) n'a pas totalement le même phénotype que la souche sauvage, elle est le meilleur contrôle pour comparer l'ensemble des variants *cp12* créés au sein d'une même configuration génomique.

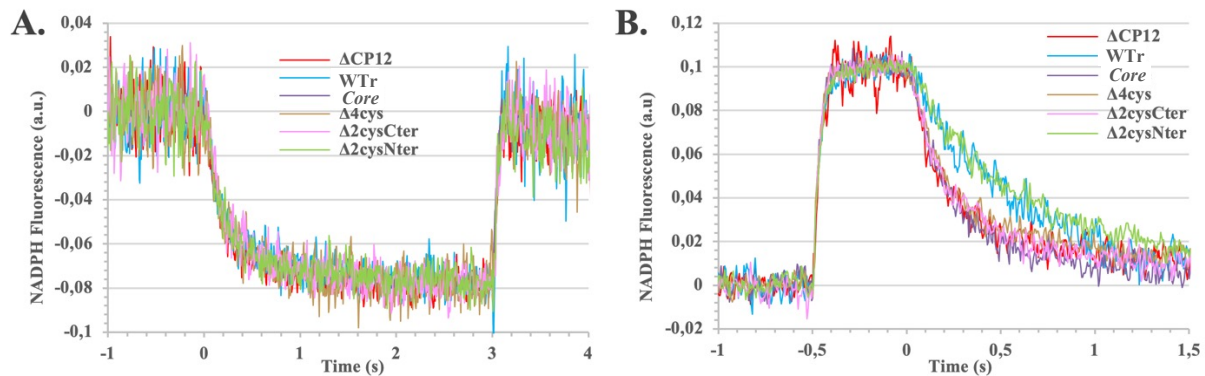


Figure 148. Cinétique de la fluorescence du NADPH chez les souches *Synechocystis sp. PCC 6803* $\Delta cp12$, *WTr*, *Core*, $\Delta 4cys$, $\Delta 2cys\text{-}Cter$, $\Delta 2cys\text{-}Nter$.

Les suspensions cellulaires ont été analysées à une concentration de 3,11-3,71 $\mu\text{g ch.}a/\text{mL}$. **A.** Cinétique de la fluorescence du NAD(P)H induite par des intervalles d'obscurité de 3 s sur fond d'illumination continue sous une intensité lumineuse actinique ($\lambda=630\text{nm}$) de 340 $\mu\text{moles photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ qui montre une activation complète du cycle de Calvin. Une moyenne de 20 acquisitions/mesures de la décroissance du signal de fluorescence du NADPH a été enregistrée pendant 3 s d'intervalle d'obscurité toutes les 20 s de lumière continue. Le niveau du signal avant l'intervalle d'obscurité (-3 à 0 s) a été fixé à 0. Le temps 0 a été fixé au début de l'intervalle d'obscurité. Les niveaux de signal, mesurés comme des amplitudes négatives à $t = 2,5$ à 3 s, ont été normalisés par rapport aux données WT. **B.** Cinétique de la fluorescence du NAD(P)H induite par une période d'illumination de 0,5 s avec une intensité lumineuse actinique ($\lambda=630\text{nm}$) de 340 $\mu\text{moles photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ a été précédemment montrée pour permettre la formation totale du NADPH brièvement photoproduit (Kauny et Sétif, 2014). Une moyenne de 40 à 135 acquisitions/mesures de la décroissance du signal de fluorescence du NAD(P)H a été enregistrée après des impulsions lumineuses de 0,5 s, toutes les minutes. La ligne de base avant l'illumination est fixée à zéro. Le temps 0 est fixé à la fin de l'illumination. Les niveaux de signal à la fin de l'impulsion lumineuse ont été normalisés à un signal de 0,1.

La comparaison des cinétiques de fluorescence du NAD(P)H induites par des intervalles d'obscurité de 3 s avec une intensité lumineuse continue montre une même tendance. Dans ces conditions en effet, les pentes de consommation de NAD(P)H sont similaires entre les souches WT, contrôles et celles des différents variants *cp12* (Figure 148. A.).

Concernant la comparaison des cinétiques de la fluorescence du NAD(P)H induite par une période d'illumination de 0,5 s, deux tendances de vitesse de décroissance du signal sont observées (Figure 148. B.). La première concerne les mutants ponctuels de la protéine CP12 dont les cystéines en C-ter ont été partiellement délétées : $\Delta cp12$, $\Delta 4cys$, $\Delta 2cys\text{-}Cter$, ainsi que le mutant dépourvu de la séquence centrale : *Core*, qui montre une consommation de NAD(P)H constitutive qu'il y ait activité photosynthétique ou non. La deuxième tendance concerne la souche $\Delta 2cys\text{-}Nter$ dont les cystéines en C-ter sont encore présentes et qui suit la même tendance que la souche contrôle WTr.

Ces résultats obtenus, en collaboration avec Pierre Sétif, montrent que la séquence consensus centrale et la paire de cystéines en C-ter de CP12, qui interagissent avec GAPDH au

niveau du complexe supramoléculaire, sont importantes au niveau du rôle redox qu'elles jouent sur la structure de la protéine CP12, la formation du complexe avec les enzymes du CCB en coordonnant la régulation entre l'activation des voies anaboliques (ex. CCB) en phase avec l'activité de la chaîne photosynthétique.

IV. La protéine CP12 est nécessaire pour préserver l'équilibre carbone/azote dans des conditions de mixotrophie

Les diverses souches mutantes de *Synechocystis* sp. PCC 6803 ont été soumises à des conditions favorisant les déséquilibres carbone/azote (C/N), notamment en mixotrophie. Ainsi les souches ont été cultivées dans un milieu de culture possédant deux sources de carbone, une source de CO₂ donc de carbone inorganique et atmosphérique et une source organique le glucose.

Dans ces conditions de mixotrophie, l'ATP et le pouvoir réducteur sont ainsi produits simultanément par deux voies différentes : la photosynthèse et le catabolisme des sucres qui doivent être finement régulés les uns par rapport aux autres pour éviter la production de stress oxydant ; notre laboratoire a d'ailleurs montré que la culture en mixotrophie avec la supplémentation de glucose sous forte lumière de la souche *Synechocystis* sp. PCC 6803, entraîne une réduction de l'activité du CCB (qui consomme des électrons photosynthétiques pour l'assimilation du CO₂) (Narainsamy *et al.*, 2013). En effet, le glucose entraîne une reprogrammation métabolique globale, et en diminuant l'assimilation du CO₂ qui consomme des électrons, il déclenche un stress oxydatif en permettant au trop-plein d'électrons libres de se recombinaison avec l'O₂ et de générer des ROS. Mais ce ralentissement du CCB est nécessaire pour le catabolisme des sucres via les voies oxydatives du pentose phosphate (OPP) et de la glycolyse qui partagent certaines enzymes communes avec le CCB, permettant respectivement le catabolisme du Ru5P en G3P et le G3P en PGA.

A. Croissance en mixotrophie des différents mutants de la protéine CP12 avec le glucose comme source de carbone.

1) La protéine CP12 est essentielle pour métaboliser correctement le glucose

Afin de déterminer si la régulation de ces flux antagonistes était affectée chez le mutant $\Delta cp12$, nous avons comparé la croissance sous différents régimes de photosynthèse, en mixotrophie avec la présence de glucose (5 mM ou 55 mM) sous des intensités lumineuses faibles (1000 lux) ou standard (2500 lux), et également en photohétérotrophie, en supplémentant les cultures à faible intensité lumineuse (1000 lux) avec du DCMU (ou diuron), un inhibiteur du PSII venant bloquer le transfert d'électron au sein de la chaîne photosynthétique en empêchant la réduction du plastoquinone (PQ), le premier accepteur d'électrons suivant le PSII.

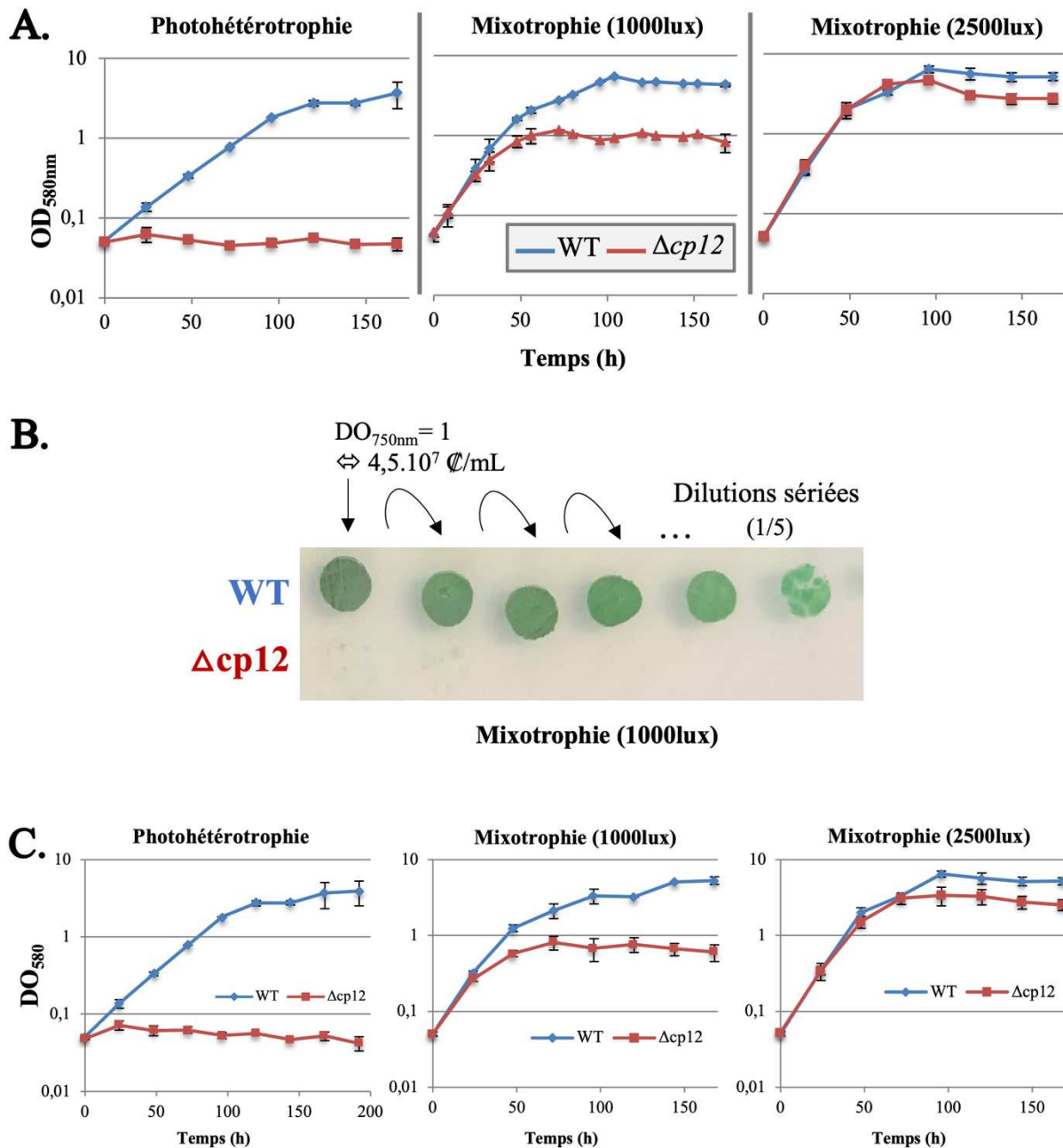


Figure 149. Analyse de la croissance des souches WT et $\Delta cp12$ sous différents régimes de photosynthèse.

La croissance en mixotrophie a été obtenue en ajoutant 5 ou 55 mM de glucose au milieu MM des cultures sous des intensités lumineuses faibles (1000 lux) ou standard (2500 lux) à 30°C. La photohétérotrophie correspond ajout de 10 μ M de DCMU (diuron), un inhibiteur du PSII, aux cultures sous faible lumière (1000 lux) à 30°C en présence de glucose. Croissance des souches WT et $\Delta cp12$ en culture liquide sous les différents régimes mixotrophiques avec 5 mM (A.) et 55 mM (C.) de glucose. Les barres d'erreur représentent l'écart-type moyen pour tous les échantillons (N = 2). (B.) Spots tests de dilutions sériées (1/5) partant d'une DO_{750nm} = 1 (soit $4,5 \cdot 10^7$ cellules/mL) sur un milieu MM agar supplémenté en glucose (5 mM) des souches WT et $\Delta cp12$. Les boîtes de pétri sont ensuite disposées dans une pièce lumineuse à 30°C sous 1000 lux, et la photo prise 6 jours après l'inoculation.

Sous un régime photohétérotrophique lorsque le PSII est inhibé par le DCMU, seule la souche WT est capable de croître aux dépens du glucose (aux concentrations initiales de 5 et 55 mM) avec un temps de génération d'environ 24 heures, tandis que la croissance de la souche $\Delta cp12$ est abolie (Figure 149. A, B, C). Le mutant $\Delta cp12$ est capable de croître sous un régime mixotrophique (donc en absence de DCMU) en présence de glucose (5 mM ou 55 mM) à faible intensité lumineuse (1000 lux), mais sa croissance est très ralentie par rapport à la souche sauvage. Enfin, lorsque l'intensité lumineuse est augmentée au niveau utilisé pour une croissance standard en conditions photoautotrophiques (2500 lux), la croissance du mutant est restaurée, mais reste légèrement inférieure en phase stationnaire par rapport à celle des cellules WT.

Les phénotypes observés du mutant $\Delta cp12$ suggèrent que la protéine CP12 est essentielle à la croissance aux dépens du glucose et donc qu'elle participe au catabolisme du glucose de manière directe ou indirecte.

2) Certains résidus conservés de la protéine CP12 exercent un rôle important pour que *Synechocystis* sp. PCC 6803 métabolise correctement le glucose

Afin d'étudier plus précisément le rôle des différents résidus conservés de la protéine CP12, les phénotypes des mutants ponctuels de la séquence de la protéine de *Synechocystis* sp. PCC 6803 ont été étudiés sous différents régimes de photosynthèse en présence de glucose à différentes concentrations (5 et 55 mM) et en milieu MM liquide ou solide.

a) En régime photohétérotrophique aux dépens du glucose

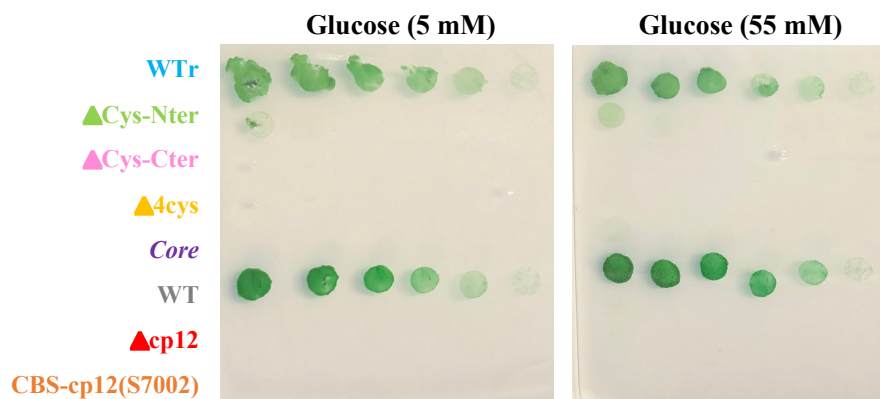


Figure 150. Croissance en photohétérotrophie aux dépens du glucose des souches WT et mutantes *Synechocystis* sp. PCC 6803 portant différents variants *cp12*.

Spots tests de dilutions sériées (1/5) partant d'une $DO_{i750nm} = 1$ (soit $4,5 \cdot 10^7$ cellules/mL) sur un milieu MM agar supplémenté en DCMU (10 μ M) et en glucose (5 mM sur le panel de gauche et 55 mM sur le panel de droite) des différentes souches WT et mutantes *Synechocystis* sp. PCC 6803. Les boîtes de pétries sont ensuite disposées dans une pièce lumineuse à 30°C sous 1000 lux, et les photos sont prises 6 jours après l'inoculation.

Les résultats obtenus montrent que lorsque le PSII est inhibé par le DCMU, seule la souche mutante WTr est capable de croître uniquement aux dépens du glucose à l'image de la souche WT. La croissance des souches des mutants ponctuels de la séquence *cp12* est complètement abolie à l'exception du mutant $\Delta 2cys-Nter$ dont on observe une légère croissance (Figure 150.).

Les cystéines en C-ter sont donc indispensables pour la croissance en photohétérotrophie aux dépens du glucose. En effet, l'inhibition du transport des électrons au niveau du PSII chez les mutants dépourvus de cystéines en C-ter, dont le CCB fonctionne alors de manière constitutive, entraîne une déplétion du pool d'électrons pour la production du pool de pouvoir réducteur qui alimente le cycle.

b) Régime mixotrophique supplémenté de 5 mM de glucose

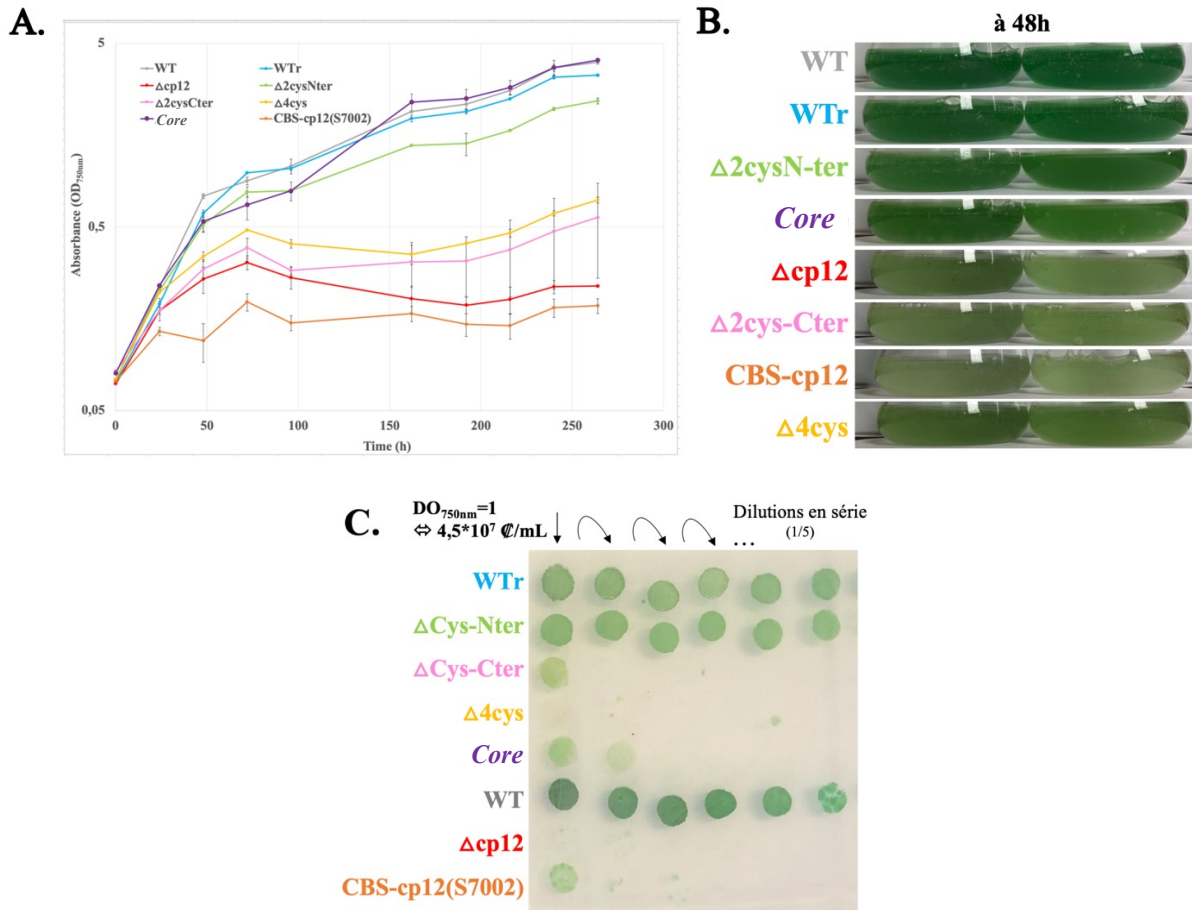


Figure 151. Croissance en mixotrophie (5 mM de glucose) des souches WT et mutantes *Synechocystis* sp. PCC 6803 portant différents variants *cp12*.

Croissance en mixotrophie en MM supplémenté de glucose (5 mM), sous 30°C et 1000 lux d'intensité lumineuse ($\approx 12,5 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) des souches WT et mutantes $\Delta cp12$, WTr, Core, $\Delta 4\text{Cys}$, $\Delta\text{CysN-ter}$, $\Delta\text{CysC-ter}$ et CBS-*cp12*(S7002) de *Synechocystis* sp. PCC 6803. **A.** Courbes de croissance par mesure de l'absorbance ($\lambda=750\text{nm}$) en fonction du temps (en heures) des différentes souches WT et mutantes de *cp12* chez *Synechocystis* sp. PCC 6803 *cp12*. Les barres d'erreur représentent l'écart-type moyen pour tous les échantillons (N = 2). **B.** Photos à 48h de croissance en mixotrophie des cultures liquides en erlenmeyers (duplicats). **C.** Spots tests de dilutions sériées (1/5) partant d'une DO_{i750nm} = 1 (soit 4,5·10⁷ cellules/mL) sur un milieu MM agar supplémenté en glucose (5 mM) des différentes souches WT et mutantes *Synechocystis* sp. PCC 6803. Les boîtes de pétri sont ensuite disposées dans une pièce lumineuse à 30°C sous 1000 lux, et la photo prise 6 jours après l'inoculation (N = 2).

Les résultats de croissance en mixotrophie supplémenté avec 5 mM de glucose montrent un phénotype de croissance pour les souches WTr, $\Delta 2\text{cys-Nter}$ et Core (seulement en liquide) que la souche WT. En revanche, les mutants ponctuels dépourvus des 2 cystéines en C-ter (c'est le cas des mutants $\Delta cp12$, $\Delta 4\text{cys}$, $\Delta 2\text{cys-Cter}$ et CBS-*cp12*(S7002)), montrent une croissance bien

plus ralentie. Ces phénotypes suggèrent que les cystéines en C-ter sont essentielles à la fonction régulatrice de CP12 et donc probablement à sa structuration en réponse à l'état rédox (ponts disulfures) pour que le catabolisme du glucose s'effectue normalement. Concernant, le mutant *Core*, dont les acides aminés chargés négativement ont été substitués au niveau de la séquence consensus centrale, on observe deux phénotypes selon le mode de culture. En milieu liquide, le mutant se comporte comme la souche WT tandis qu'en spots tests en milieu solide, le mutant *Core* ne suit pas exactement la même tendance que les mutants dépourvus de leurs cystéines en C-ter, et présente une croissance partiellement restaurée.

c) Régime mixotrophique supplémenté de 55 mM de glucose

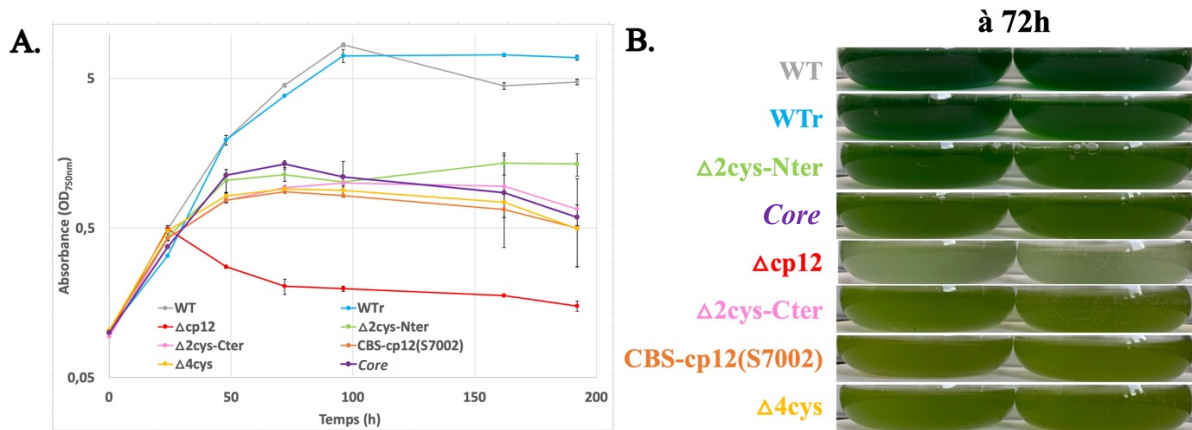


Figure 152. Croissance en mixotrophie (55 mM de glucose) des souches WT et mutantes *Synechocystis sp. PCC 6803* portant différents variants *cp12*.

Croissance en mixotrophie en MM supplémenté de glucose (55 mM), sous 30°C et 1000 lux d'intensité lumineuse ($\approx 12,5 \mu E m^{-2} s^{-1}$) des souches WT et mutantes $\Delta cp12$, WTr, *Core*, $\Delta 4Cys$, $\Delta CysN$ -ter, $\Delta CysC$ -ter et CBS-*cp12*(S7002) de *Synechocystis sp. PCC 6803*. **A.** Courbes de croissance par mesure de l'absorbance ($\lambda=750nm$) en fonction du temps (en heures) des différentes souches WT et mutantes *Synechocystis sp. PCC 6803* portant différents variants *cp12*. Les barres d'erreur représentent l'écart-type moyen pour tous les échantillons (N = 2). **B.** Photos à 72h de croissance en mixotrophie des cultures liquides en erlenmeyers en duplicats (N = 2).

Lorsque les mutants dépourvus de leurs cystéines en C-ter sont cultivés en présence de glucose en concentration plus importante (55 mM), ils présentent en plus de leur défaut de croissance, un phénotype de dépigmentation qui tend vers le jaune-vert (Figures 153 et 154. (spectre)). Dans ces conditions, les phénotypes du mutant *Core* suivent la même tendance. Les souches WT, WTr et $\Delta 2cys-Nter$ quant à elle, conservent leurs colorations vert-bleu.

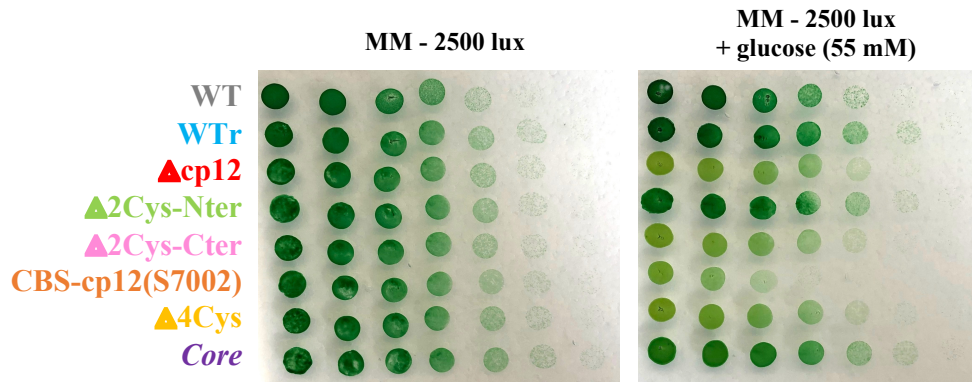


Figure 153. Croissance en mixotrophie (55 mM de glucose) sous lumière standard (2500 lux) des souches WT et mutantes *Synechocystis* sp. PCC 6803 portant différents variants *cp12*.

Croissance en mixotrophie de spots tests en dilutions sériées (1/5) partant d'une $DO_{i750nm} = 1$ (soit $4,5 \cdot 10^7$ cellules/mL) sur un milieu MM agar supplémenté en glucose (55mM) des différentes souches WT et mutantes $\Delta cp12$, WTr, Core, $\Delta 4Cys$, $\Delta 2Cys-Nter$, $\Delta 2Cys-Cter$ et CBS-*cp12*(S7002) de *Synechocystis* sp. PCC 6803. Les boîtes de pétri sont ensuite disposées dans une pièce lumineuse à 30°C sous 2500 lux, et les photos sont prises 6 jours après l'inoculation (N = 2).

L'analyse des spectres d'absorbance confirme ces différences de phénotypes (Figure 154.) où deux tendances sont observées : la première réunit les souches $\Delta 4cys$, Core, $\Delta 2Cys-Cter$, CBS-*cp12*(S7002) dont les contenus en pigments des cellules : phycocyanine, chlorophylle a, et caroténoïdes sont altérés. Cette dépigmentation des cellules est dû au phénomène de chlorose initiée par un dérèglement de la balance C/N. Ce phénomène implique les souches mutantes dépourvues de la séquence consensus ou bien de leurs cystéines en C-ter soit les souches : Core, $\Delta cp12$, $\Delta 4Cys$, $\Delta 2Cys-Cter$, CBS-*cp12*(S7002).

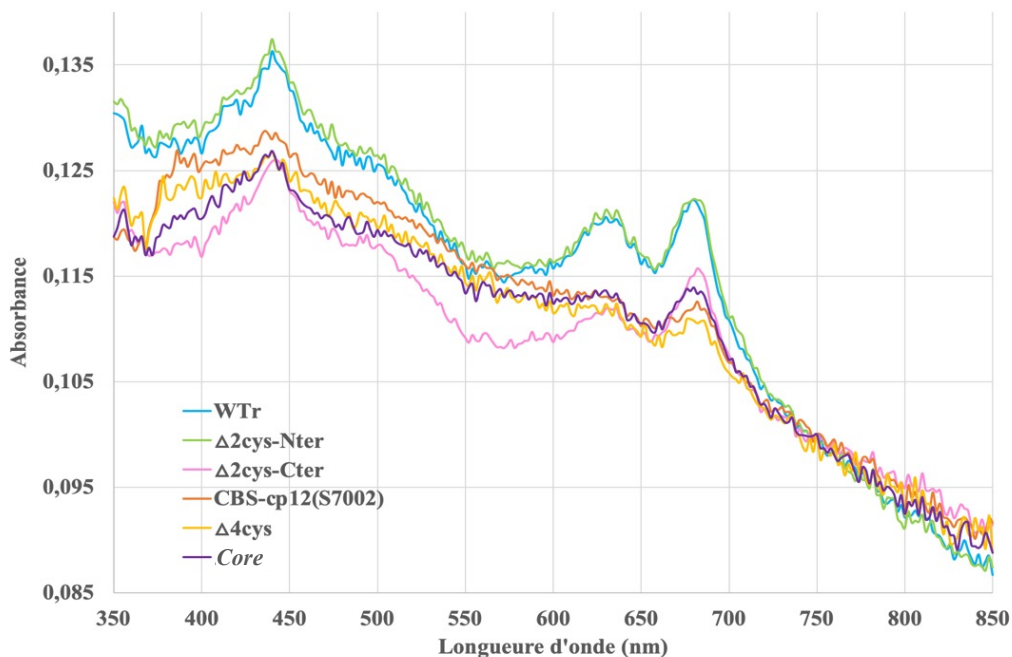


Figure 154. Spectres d'absorption (350-850 nm) des diverses souches mutantes de *cp12*.

Les cellules sont prélevées depuis des spots cultivés sur boîte MM + agar supplémenté en glucose (5 mM), sous 2500 lux ($\approx 35 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) et à 30°C. Les données brutes sont normalisées à $DO_{750nm} = 0,1$.

En conclusion:

- Certains résidus conservés de la protéine CP12 chez *Synechocystis* sp. PCC 6803 semblent exercer un rôle important dans la fonction de CP12 impliquée (directement ou indirectement) dans la croissance en présence de glucose sous divers régimes photosynthétique.
- Les cystéines en C-ter semblent essentielles à la régulation exercée par CP12 et semblent jouer un rôle crucial pour la croissance en mixotrophie et donc sur la régulation du catabolisme du glucose.
- La séquence *Core* consensus semble également jouer un rôle, (moindre cependant) au niveau de la régulation exercée par CP12. Le modèle proposé par Graciet *et al.*, 2003 implique que les charges négatives du motif interviendraient au niveau de la formation du supracomplexe, par l'attraction électrostatique de la PRK (charges positives). Ainsi, la séquence consensus apporterait une fonction « support » renforçant les effets de la régulation par CP12, tandis que les cystéines en C-ter lui sont indispensables. Ces résultats suggèrent que CP12 ou GAPDH (Gap2) joue un rôle plus complexe qu'attendu et pourrait intervenir de manière directe ou indirecte dans le catabolisme du glucose.

B. La protéine CP12 est nécessaire pour préserver l'équilibre carbone/azote (C/N) dans des conditions de mixotrophie.

1) Analyse de la réponse transcriptionnelle des cellules de la souche Δ cp12 en mixotrophie

Théo Veaudor a dans sa thèse réalisé une analyse approfondie de la réponse transcriptionnelle des cellules mutant Δ cp12 vs la souche WT après 24 heures de culture en mixotrophie au dépens du glucose (55 mM) sous faible intensité lumineuse (1000 lux). Les résultats révèlent que certains gènes sont plus ou moins bien exprimés selon les souches, et soulignent un véritable remodelage du métabolisme du carbone pour la souche mutante.

L'abondance de certains ARNm impliqués dans le catabolisme et le stockage du carbone organique augmente...

- *gap1* qui code pour la GAPDH glycolytique
- *gnd* qui code pour la 6-phosphogluconate déshydrogénase (6PGD) au niveau de la voie des pentoses phosphates
- *glgP* qui code pour la glycogène phosphorylase
- *phaABC* et *ssl2501* (codant pour la phasine PhaP Hauf *et al.*, 2015) impliqués dans la biosynthèse des PHB.
- *rbcS* qui code pour la petite sous-unité de la RuBisCO (alors que *rbcL* (grande sous-unité) reste constante malgré leur organisation en opéron)

... et diminue pour certains ARNm impliqué dans la phase régénérative du CCB pour le Ru5P:

- *cfxE* qui code pour l'épimérase Rpe
- *fda* qui code pour l'aldolase

Ces résultats suggèrent que le flux de carbone n'est pas canalisé vers la régénération du Ru5P (\downarrow *fda*, \downarrow *cfxE*), mais à travers la voie de la glycolyse (\uparrow *gap1*) et la voie oxydative des pentoses phosphate (\uparrow *gnd*) pour la production de trioses phosphates. Aussi, l'augmentation combinée

de certains transcrits ($\uparrow rbcS$ et $\uparrow gap1$) pourrait entraîner une accumulation de 3-PGA et leur dégradation en pyruvate. L'accumulation de ce dernier en concert avec $\uparrow phaABC$ et $\uparrow ssl2501$, indiquent que les cellules de la souche mutante $\Delta cp12$ redirigent le flux de carbone vers la synthèse de PHB en aval de la glycolyse.

Aussi, l'abondance de certains ARNm impliqués dans le métabolisme de l'azote et de sa régulation augmente :

- *glnB* qui code pour la protéine ba le régulateur global de la balance C/N.
- *prp1-2* qui code pour des protéases dégradant les inhibiteurs de la glutamine synthase (GS), eux même codées par les ARNm *gifB* (qui diminue)
- *dapA* impliqué dans la synthèse de la lysine
- *nblA* qui code pour une protéase nécessaire à la dégradation des phycobilisomes lors d'une carence d'azote.

Certains ARNm impliqués au niveau de la synthèse de pigments et composants de la chaîne photosynthétique sont réprimés...

- *cpcC₁C₂G₁G₂T* impliqués dans la synthèse de phycocyanine
- *apcABCEF* impliqués dans la synthèse d'allophycocyanine
- *hemABEFLN₁*, *por*, *ho1* et *chlA_{II}LN* impliqués dans la synthèse de chlorophylle
- *rubA* impliqué dans l'assemblage des photosystèmes I
- *psbBCDMONVZ* et *psb29* impliqués dans l'assemblage des photosystèmes II

... et d'autres surexprimés :

- *ocp* qui code pour la protéine caroténoïde orange et qui est impliquée dans la photoprotection

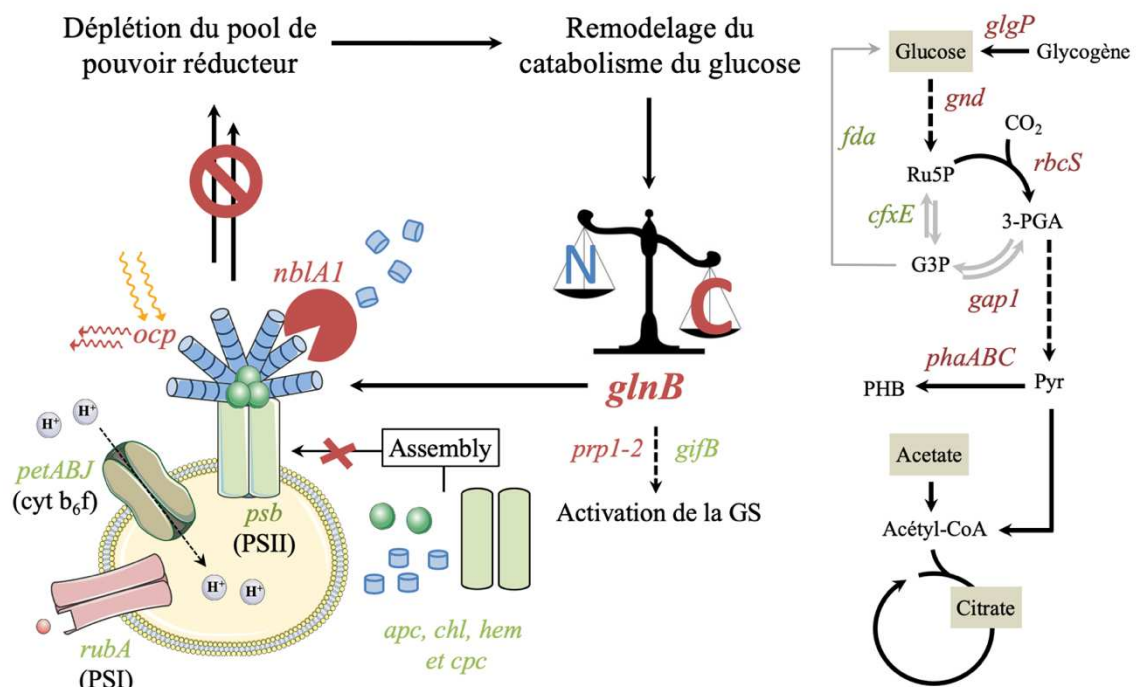


Figure 155. Représentation schématique de la réponse transcriptionnelle de la souche $\Delta cp12$ cultivée (24h) sous un régime mixotrophique à faible lumière. Extrait de la thèse de Théo Veaudor).

prp = processing proteases; *gifB* = facteur d'inactivation de la Glutamine-Synthétase (GS) B ; *apc* = allophycocyanine; *cpc* = C-phycocyanine.

Une souche $\Delta cp12$ dépourvue de protéine CP12, implique que pas (ou peu) de supracomplexes sont formés avec les enzymes du CCB, Gap2 et PRK. Qu'importe l'activité photosynthétique, Gap2 est alors libre de réagir dans le CCB qui n'est plus régulé par la protéine CP12, tandis que PRK reste rédox-réglée (indépendamment de la présence de CP12). Le fonctionnement du CCB est alors dérégulé entraînant notamment une déplétion du pool de NADPH.

Ainsi en régime mixotrophique, le métabolisme du carbone est profondément remodelé pour soulager le manque de pouvoir réducteur. Ceci se traduit par une accélération de l'activité de ses voies cataboliques pour la production de pouvoir réducteur et d'ATP, qui va favoriser l'accumulation de métabolites carbonés notamment comme l' α -kétoglutarate (α -KG). Celui-ci va alors déclencher la cascade de régulation médiée par la protéine P_{II} (\uparrow *glnB*), le régulateur global de la balance C/N, et l'activation des effecteurs de la carence d'azote comme l'accumulation de granules intracellulaires de PHB, ou les variations d'abondance des transcrits impliqués dans le métabolisme de l'azote et de la biosynthèse des protéines composant la chaîne photosynthétique. Cette cascade de régulation initiée par la protéine P_{II} va entraîner, la dégradation des composants (PSI, PSII, phycobilisomes, sous unités de cytochromes) et pigments (phycocyanine, allophycocyanine ou chlorophylle) de la chaîne photosynthétique ainsi que stimuler les mécanismes de photoprotection (protéines caroténoïdes orange).

Ce remaniement global du carbone et de l'azote (remobilisation de l'azote contenu dans les phycobilisomes qui peut représenter jusqu'à 50% des protéines solubles (Schwarz *et al.*, 2005), résulte chez la souche $\Delta cp12$ d'un arrêt de la photosynthèse, révélé par des phénotypes de défauts de croissance et de dépigmentation.

2) Accumulation de granules de polyhydroxybutyrates (PHB) visibles par la coloration au Nile red chez certains mutants de CP12

Les granules intracellulaires de PHB sont considérées comme étant des marqueurs de la carence en azote (Galmozzi *et al.*, 2007, Troschl *et al.*, 2017) et peuvent être aisément mises en évidence à l'aide de Nile Red, un fluorophore lipophile qui colore les polymères PHB *in vivo*, qui peuvent ensuite être observés au microscope.

Les images obtenues après 24h de culture de la souche $\Delta cp12$ en régime mixotrophique à faible lumière, et marquage des cellules au Nile Red 24h, révèle que le mutant produit massivement des PHB contrairement à la WT, et semble donc répondre à un déséquilibre C/N (Figure 156.). Dans les mêmes conditions, on observe que le mutant $\Delta 2cys$ -Cter accumule des granules intracellulaires PHB tandis que le mutant $\Delta 2cys$ -Nter se comporte comme la souche WT (données non montrées). Ces résultats montrent une fois de plus que les cystéines C-ter sont importantes pour la régulation/gestion du catabolisme du glucose. En régime mixotrophique avec une lumière standard (2500 lux), les souches WT et $\Delta cp12$ en produisent un peu et de manière comparable.

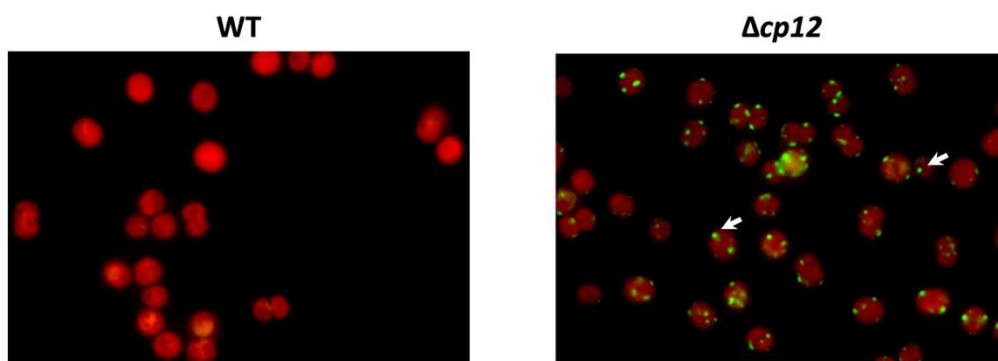


Figure 156. Coloration au Nile Red des cellules des souches WT et $\Delta cp12$ cultivées en mixotrophie
 Les granules de PHB ont été colorés avec du Nile Red et apparaissent comme des points verts (indiqués par des flèches blanches) tandis que la fluorescence rouge est émise par la chlorophylle. Le marquage des cellules au Nile Red est effectué après 24h de culture en conditions mixotrophique sous une faible lumière (1000 lux) aux dépens du glucose (55 mM) chez la souche WT (panneau de gauche) et $\Delta cp12$ (panneau de droite).

Ainsi, sous un régime mixotrophique à faible lumière, l'accumulation de PHB (visualisée par marquage au Nile red des cellules de la souche $\Delta cp12$ *in vivo*), confirment les résultats de la réponse transcriptionnelle et notre hypothèse de dérèglement de la balance C/N, et de remodelage du métabolisme du carbone et de carence en azote provoqué par le catabolisme du glucose. Ces résultats sont aussi en accord avec les données transcriptomiques qui montrent que sous conditions de mixotrophie, les transcrits de la protéine CP12 s'accumulent au sein des cellules WT (You *et al.*, 2015).

Cette cascade physiologique est néanmoins une impasse pour les cellules de la souche $\Delta cp12$ et pour celles dépourvues de leurs cystéines en C-ter, qui engendrent phénotypes de dépigmentation et d'arrêt de croissance.

C. Régimes mixotrophiques avec des acides organiques (acétate de sodium ou de citrate) comme sources de carbone

Les souches WT et mutantes ont également été cultivées sous deux autres régimes mixotrophes supplémentées avec d'autres sources de carbone à la place du glucose : le citrate et l'acétate de sodium. Ces acides organiques sont métabolisés en aval de la glycolyse et de la voie oxydative des pentoses phosphate (OPP), respectivement via le cycle de l'acide citrique (TCA) ou la conversion en acétyl-CoA.

Afin d'étudier plus précisément le rôle des différents résidus conservés de la protéine CP12 dans le catabolisme de ces acides organiques chez *Synechocystis* sp. PCC 6803, les phénotypes des mutants ponctuels de la séquence de la protéine ont été étudiés sous différents régimes de photosynthèse en présence d'acétate (0,5 mM) ou de citrate (0,5 mM) sous une intensité lumineuse faible ou standard (Figure 157.).

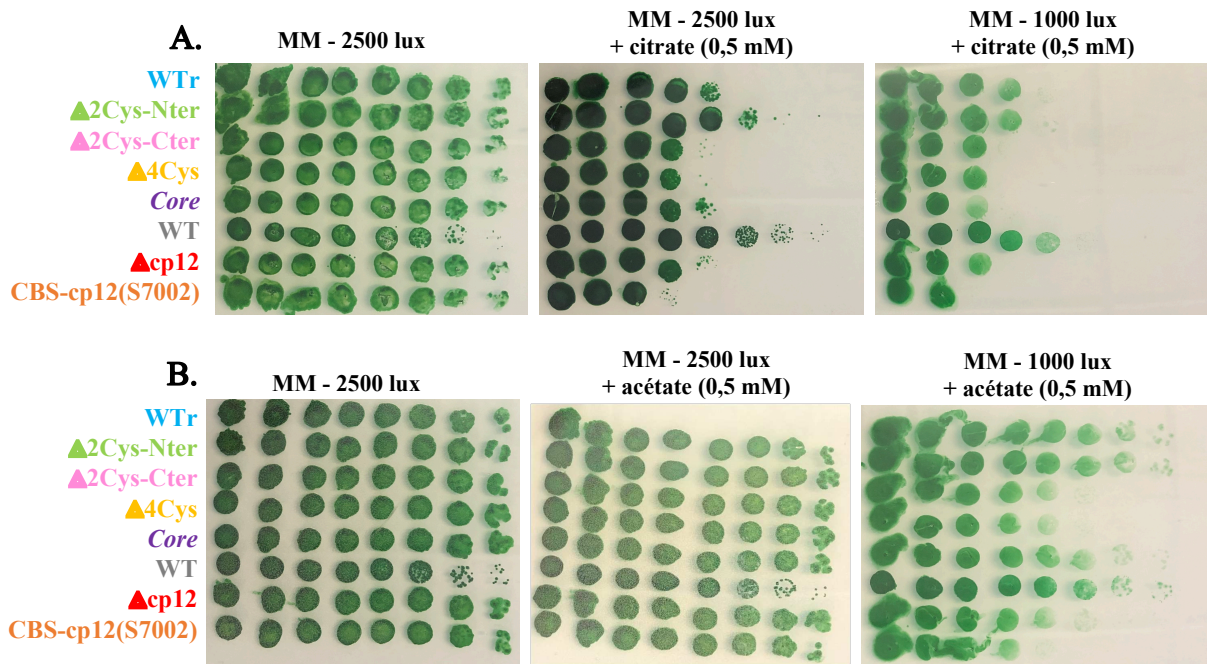


Figure 157. Croissance en mixotrophie des souches WT et mutantes de la protéine CP12 avec les substrats carbonés acétate ou citrate.

Spots tests de dilutions sériées (1/5) partant d'une $DO_{i750nm} = 1$ (soit $4,5 \cdot 10^7$ cellules/mL) sur un milieu MM agar supplémenté A. en citrate (0,5 mM) ou B. en acétate des différentes souches WT et mutantes de la protéine CP12 de *Synechocystis* sp. PCC 6803. Les boîtes de pétri sont ensuite disposées dans une pièce lumineuse à 30°C sous 1000 lux ($\approx 12,5 \mu E m^{-2} \cdot s^{-1}$) ou 2500 lux, et les photos sont prises 9 jours après l'inoculation.

Les résultats obtenus en spots tests montrent que les mutants de la protéine CP12 dépourvus de leurs 2 cystéines en C-ter ont une croissance altérée en présence des acides organiques acétate de sodium (à 1000 lux) et citrate (à 1000 et 2500 lux). Ces résultats soulignent encore une fois le rôle des cystéines en C-ter au sein de la protéine CP12 et leurs implications directes ou indirectes dans des interactions avec des protéines du catabolisme des substrats carbonés acétate de sodium et citrate.

Pour les mutants *Core* dépourvus de leurs séquences centrales, il y a encore une fois un phénotype intermédiaire, soulignant une fonction du motif non pas essentielle, mais plutôt qualifiée de « support ». En régime mixotrophique supplémenté en acétate, la souche mutante *Core* se comporte comme la souche WT, comme avec supplémentation en glucose ; tandis que pour le citrate la souche *Core* se comporte comme les mutants dépourvus de leurs cystéines en C-ter.

La croissance en présence de citrate en lumière standard (2500 lux) semble créer un stress oxydant pour l'ensemble des cellules des souches en spot test. L'accumulation de biomasse est accrue par rapport aux dilutions en séries sur la boîte de référence MM à 2500lux : les spots sont plus intenses, plus verts et quasiment noirs (Figure 157. A.). À la différence des substrats du glucose et du citrate, l'addition d'acétate de sodium au milieu n'induit pas de stress oxydant chez les souches contrôles et mutantes en lumière standard (2500 lux).

En régime mixotrophique à faible lumière (1000 lux) en revanche pour les deux substrats, deux tendances de phénotypes émergent : les mutants dépourvus de leurs cystéines en C-ter et de la

séquence centrale, qui présentent un défaut de croissance, par rapport aux souches WT, WTr et $\Delta 2cys$ -Nter qui croient normalement.

Les souches $\Delta cp12$, $\Delta 4cys$, $\Delta 2cys$ -Cter, CBS-*cp12*(S7002) ont en commun une GAPDH libre (pas en complexe moléculaire) dont les activités Gap2-NADH et Gap2-NADPH sont ainsi maintenues à 100% (Tableau 13.). Les activités dérégulées de Gap2 NADPH-dépendante et Gap2 NADH-dépendante, sont également sûrement impliquées dans une mauvaise redirection du carbone, avec possiblement des interférences Gap2/Gap1, inhibant la glycolyse, et redirigeant les flux de métabolisation du citrate ou de l'acétate de sodium vers la gluconéogenèse (activité Gap2-NAD(P)H-dépendante), et de surcroît pour l'alimentation du CCB dérégulé, entraînant une déplétion du pool de pouvoir réducteur. Le cycle de Krebs pourrait alors également être inhibé, d'une part, par l'activité de Gap2 NAD(P)H-dépendante au niveau de la gluconéogenèse et d'autre part, par le non-retour des flux de carbone au niveau de la glycolyse dans le cycle de Krebs, puisque Gap1 est sûrement inhibée/interférée par l'activité de Gap2 (NAD(P)H-dépendante). En plus de la déplétion du pouvoir réducteur, la conversion des oxoacides en acides aminés est donc sûrement également inhibée.

Chez *Arabidopsis*, il est d'ailleurs intéressant de noter que l'analyse de plants de tabac antisens CP12 présentant un phénotype foliaire sévère a révélé des modifications de l'activité de deux autres enzymes, la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) et la malate déshydrogénase chloroplastique (MDH), respectivement impliquée au sein du cycle de Krebs et au niveau de la première réaction enzymatique de l'OPP. La modification des activités de ces enzymes pourrait également avoir un impact au niveau de l'assimilation des composés carbonés glucose, citrate et acétate (Howard *et al.*, 2011 ; López-Calcano *et al.*, 2017).

Pour les souches WT et WTr, leurs enzymes CP12 sont en complexe ternaire avec PRK et GAPDH, ce qui implique que les activités de la PRK, Gap2-NADH et Gap2-NADPH ne sont pas maintenues (Tableau 13.). Il y a donc un bon équilibre, entre une activité raisonnable du CCB sans déplétion du pool de NADPH, un catabolisme du citrate ou d'acétate de sodium actif, une glycolyse active, un cycle de Krebs actif, n'entraînant pas de défaut de croissance avec le substrat acétate de sodium, et pour le citrate, uniquement un défaut de croissance léger par rapport aux conditions en MM sans ajout substrat en raison du stress oxydatif provoqué par le citrate.

Pour le mutant $\Delta 2cys$ -Nter, la PRK est libre et la GAPDH est en complexe binaire et son activité Gap2-NADPH (partagée entre néoglucogenèse et CCB) est maintenue (Tableau 13.). Gap2-NADPH vient donc sûrement compenser l'activité Gap2-NADH manquante au niveau de la gluconéogenèse, et donc même si l'activité de la PRK est maintenue l'activité au niveau du CCB n'est pas constitutive. L'activité de Gap2 rentrerait donc moins en interférence avec celle de Gap1, entraînant pas/peu d'inhibition de la glycolyse et pas/peu de déplétion du pool NADPH en raison d'une activité « raisonnable » du CCB. Il en résulte un phénotype à l'image des souches WT et WTr.

V. Création de souches mutantes dépourvues de protéines CP12 combinant la production de terpènes

Au vu des effets de la protéine CP12 soulignés et de ses conséquences sur la dérégulation du CCB (par son activation constitutive), ainsi que sur le remodelage du métabolisme central du carbone, il nous a semblé alors intéressant d'orienter également le projet vers une thématique plus appliquée et d'utiliser le châssis prometteur $\Delta cp12$ de *Synechocystis* sp. PCC 6803 pour la production de terpènes. Nos hypothèses considérant que l'inactivation du gène *cp12* au sein des souches mutantes productrices de terpènes, permettrait une augmentation du flux de carbone vers le CCB, et pourrait engendrer une assimilation plus conséquente de CO₂, mais aussi, que de par l'intégration de terpènes synthases hétérologues, la redirection du flux de carbone serait orientée vers le pool de pyruvate, la voie MEP et la production de molécules de terpènes conduisant à une amélioration des rendements.

A. Stratégie de construction des souches $\Delta cp12$ productrices de terpènes

Afin de modifier génétiquement le châssis cyanobactérien *Synechocystis* sp. PCC 6803 $\Delta cp12::Km^R$ pour la production de terpènes, des plasmides permettant l'expression de terpènes synthase ont été introduits par conjugaison (Marraccini *et al.*, 1993 ; Chauvat *et al.*, 1988). Chaque plasmide permettant une expression constitutive (pC) soit de la limonène synthase (pCLS), la farnésène synthase (pCFS), la bisabolène synthase (pCBS) ou de la santalène synthase (pCSS) ont ainsi pu être introduits indépendamment au sein d'une souche *Synechocystis* sp. PCC 6803 $\Delta cp12::Km^R$ (Figure 158.). Les conjuguants ont été obtenus en sélectionnant les clones résistants à la streptomycine/spectinomycine et kanamycine (Sm/Sp/Km^R), puis ont été vérifiés par PCR et séquençage ADN (Figure 159.).

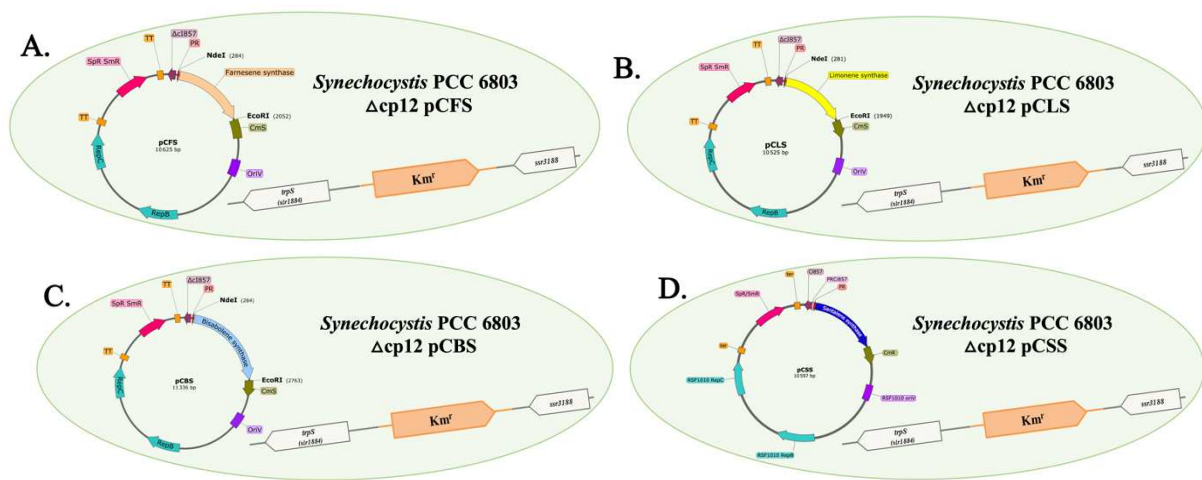


Figure 158. Composition génomique des différentes souches *Synechocystis* sp. PCC 6803 $\Delta cp12$ productrices de terpènes

Après conjugaison, chaque plasmide à expression constitutive « pC » exprimant A. la farnésène synthase (pCFS), B. la limonène synthase (pCLS), C. la bisabolène synthase (pCBS) et D. la santalène synthase (pCSS) ont ainsi pu être introduits au sein d'une souche *Synechocystis* sp. PCC 6803 $\Delta cp12::Km^R$.

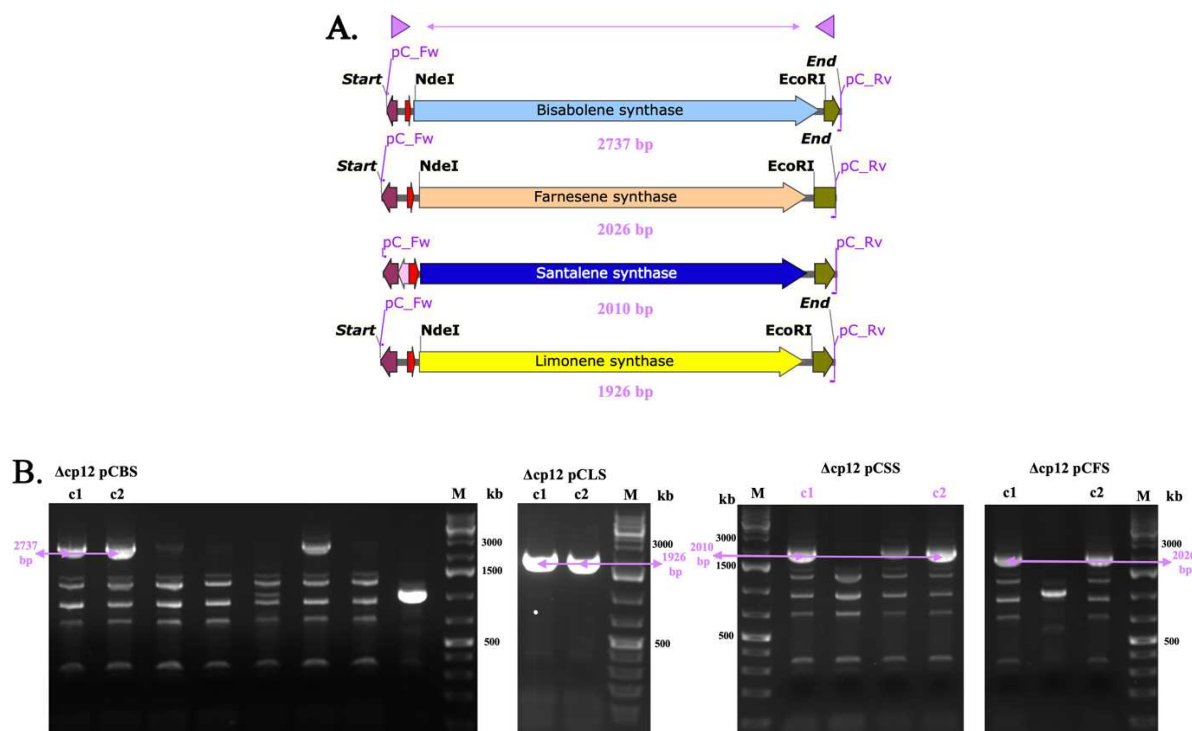


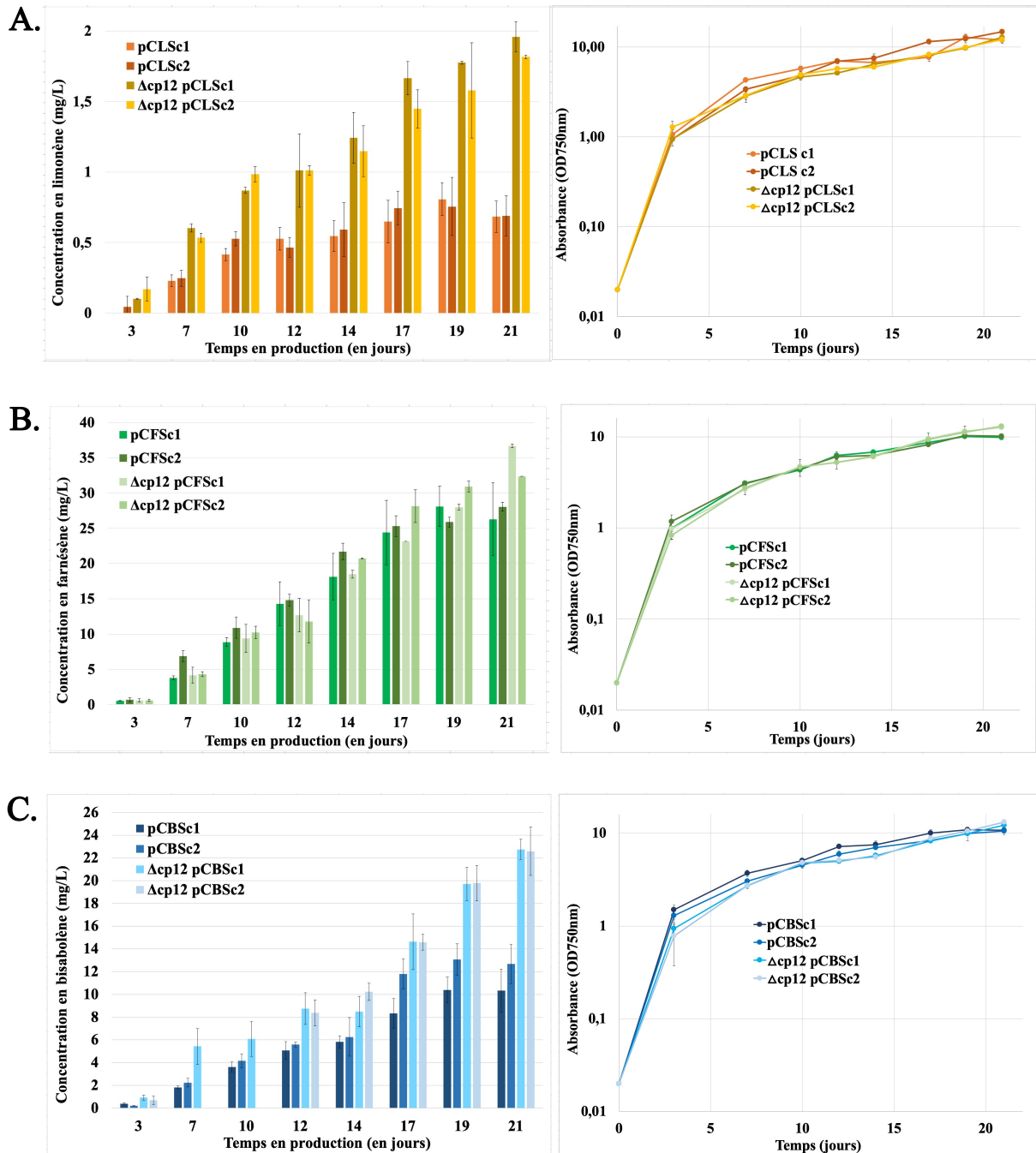
Figure 159. Vérifications PCR des différentes souches mutantes $\Delta cp12$ productrice de terpènes
A. Représentation schématique des amplifications PCR avec les amorces pC_Fw et pC_Rv (en violets)
B. Photographie des gels d'agarose montrant les produits d'amplification par PCR (amorces pC_Fw et pC_Rv) des différents vecteurs d'expression contenant les gènes codants pour les terpènes synthases (pCLS, pCBS, pCFS et pCSS) chez *Synechocystis* sp. PCC 6803 $\Delta cp12$. Le marqueur de poids moléculaire (M) est le GeneRulerTM 1Kb plus de ThermoScientific.

B. Analyse du rôle de CP12 sur la production de monoterpènes (en C10) et sesquiterpènes (en C15)

Chez le tabac et *Arabidopsis thaliana*, le « knockout antisens » de *cp12* modifie la répartition du carbone, le fonctionnement du CCB et limite la croissance (Howard *et al.*, 2011 ; López-Calcano *et al.*, 2017). En revanche, chez les cyanobactéries, une étude récente d'intérêt biotechnologique a utilisé cette stratégie de délétion du gène *cp12* chez la souche *Synechococcus* sp. PCC 7942 pour la production de 2,3-butanediol, qui a permis l'amélioration du flux de carbone au sein du CCB (Kanno *et al.*, 2017).

Des études antérieures avec *Synechocystis* sp. PCC 6803 ont également montré que dans des conditions de croissance photosynthétique, les substrats de la voie MEP ne sont pas strictement le pyruvate et le G3P et d'autres substrats provenant d'autres voies métaboliques comme ceux de la voie oxydative du pentose phosphate ou du Cycle de Calvin peuvent entrer un peu plus tard dans la voie MEP pour la biosynthèse des précurseurs des terpènes IPP et DMAPP (Ershov *et al.*, 2002 ; Poliquin *et al.*, 2004). Certains résultats montrent que dans un système acellulaire les sucres phosphorylés tels que G3P, DHAP, G6P, FR6P, 6PGA, E4P et Ru5P stimulent la synthèse des isoprénoïdes et pourraient rentrer dans la voie MEP sous la forme de Ru5P et/ou X5P et être convertis par une cascade de réactions en IPP et DMAPP.

Ainsi, la délétion du gène *cp12* et l'activation constitutive du CCB chez des souches productrices de terpènes peut venir « renflouer » la voie MEP non pas uniquement au niveau des substrats pyruvate et G3P, mais également par une partie de ces molécules carbonées issues notamment de la régénération du Ru5P.



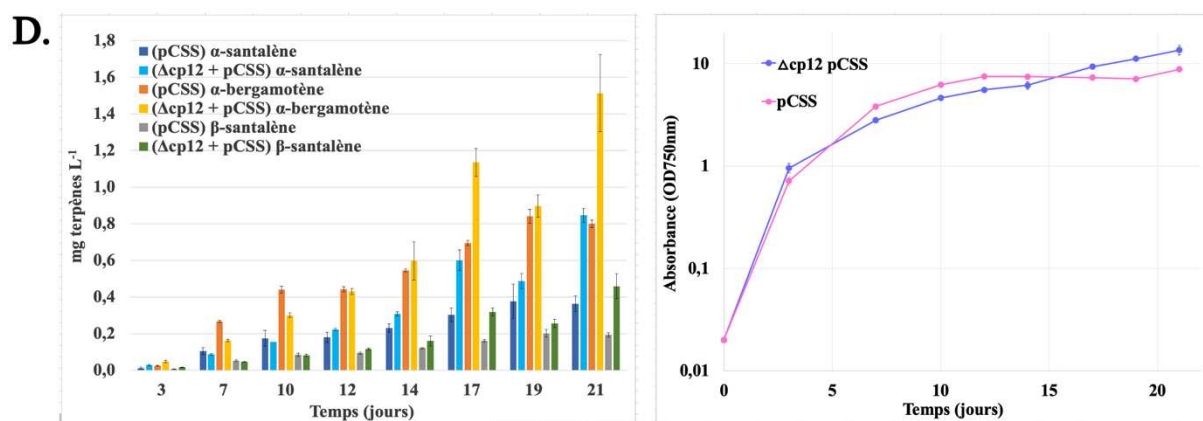


Figure 160. Comparaison de la production en monoterpènes et sesquiterpènes de la souche *Synechocystis* sp. PCC 6803 $\Delta cp12$ par rapport aux souches contrôles.

Les résultats de production et courbes de croissance (suivis sur 21 jours) des souches mutantes *Synechocystis* sp. PCC 6803 dépourvue ou non de la séquence codante *cp12*, et productrice de terpènes sont présentés respectivement au niveau des panels **A.** pour le limonène (pCLS et $\Delta cp12$ pCLS), **B.** pour le farnésène (pCFS et $\Delta cp12$ pCFS), **C.** pour le bisabolène (pCBS et $\Delta cp12$ pCBS) et **D.** pour le α -santalène, α -bergamotène et epi- β -santalène (pCSS et $\Delta cp12$ pCSS). Ces souches mutantes sont cultivées en conditions standard : MM en présence de dodécane (20% v/v), 2500 lux, sous agitation 140 rpm dans un incubateur Infors, 30°C, en erlenmeyers (V=50 mL) et à une DOi = 0,02). Les données présentent pour chaque construction, deux clones indépendants (c1 et c2) réalisés en duplicats et moyennés. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts-types standard de chaque duplicats.

Abréviations : pC correspond au plasmide répliquatif dérivé de RSF1010 hébergeant le promoteur fort pR pour l'expression forte et constitutive des gènes clonés en aval; LS correspond au gène codant pour la limonène synthase ; BS au gène codant pour la bisabolène synthase, FS au gène codant pour la farnésène synthase, SS au gène codant pour la santalène synthase.

Nos hypothèses se sont confirmées à la vue des résultats obtenus (Figure 160.) ; en effet, chez une souche dépourvue de protéine CP12 permettant une activation constitutive du CCB et de l'assimilation du CO₂, l'augmentation des flux de carbone a ensuite pu être redirigée au niveau de la voie MEP (production de substrats des terpènes synthases) et donc a permis une meilleure production de terpènes.

Les rendements de production en terpènes par la souche *Synechocystis* sp. PCC 6803 ont été augmentés d'un facteur variant de 1,3 à 2,5 pour tous les terpènes sans pour autant que la redirection des flux de carbone ait un impact négatif sur la croissance et l'accumulation de biomasse des mutants (Figure 160.).

Après 21 jours, les productions de limonène, farnésène, bisabolène, α -santalène, α -bergamotène et epi- β -santalène des souches *Synechocystis* sp. PCC 6803 dépourvues de protéines CP12 ont ainsi pu être augmentées respectivement d'un facteur **3** pour $\Delta cp12$ pCLS, **1,3** pour $\Delta cp12$ pCFS, **2** pour $\Delta cp12$ pCBS, **2,5** en α -santalène pour $\Delta cp12$ pCSS, **2** en α -bergamotène pour $\Delta cp12$ pCSS, **2,5** en epi- β -santalène pour $\Delta cp12$ pCSS par rapport aux souches *Synechocystis* sp. PCC 6803 contrôles productrices de terpènes dans un contexte génétique sauvage (pCLS, pCFS, pCBS, pCSS).

On observe également que pour la production de limonène, bisabolène, α -santalène, α -bergamotène et epi- β -santalène, l'effet de la dérégulation par la protéine CP12 est plus marqué après un certain temps de culture, quand l'intensité lumineuse par cellule est plus faible

(phénomène « d'ombrage » quand la densité cellulaire augmente) et/ou que la quantité de carbone dans le milieu devient limitante. Par comparaison avec les souches contrôles (présence de CP12), la dérégulation induite du CCB chez les souches où la protéine CP12 est absente (le cycle fonctionnant alors de manière constitutive) permet aux flux de CO₂ constitutivement assimilés, qu'importe l'environnement rédox, d'être redirigé vers la voie MEP, et les précurseurs des enzymes hétérologues produites. Chez ces dernières, le contraste de cette dérégulation par absence de la CP12 est alors plus important en fin de culture (- de carbone, - de lumière, environnement oxydant) où le flux de carbone redirigé est constitutif, et phénotypiquement, visible par une augmentation plus importante de la production en terpènes, par rapport aux souches contrôles où les rendements stagnent.

La plus légère différence de production observée entre la souche contrôle pCFS et la souche $\Delta cp12$ pCFS, pourrait être attribuée à une fenêtre d'observation trop restreinte, et un suivi de culture qu'il aurait dû continuer au-delà de 21 jours pour pouvoir potentiellement observer les effets de la délétion de *cp12* sur la production de farnésène.

Par comparaison avec les souches contrôles, dans un environnement plus oxydant (moins de lumière pour les cellules), les cellules des souches $\Delta cp12$ auront l'avantage d'avoir une activation constitutive du CCB (sans régulation par des CP12 oxydées) combinée à une plus abondante assimilation du CO₂ venant outrepasser la déplétion du carbone inorganique supplémenté initialement au milieu (MM).

Dans une optique de mise à l'échelle industrielle, l'élimination de cette régulation rédox par la délétion de *cp12* devrait permettre une meilleure fixation du CO₂ indépendamment des conditions de lumière, et est donc intéressante par exemple pour la culture en bassin avec une alternance naturelle J/N, qui est économique.

Une autre stratégie pour intensifier le flux de carbone au sein du CCB, l'assimilation du CO₂ et la redirection vers la voie MEP pour la production de terpènes seraient de coupler la souche $\Delta cp12$ productrice de terpènes à la surexpression des gènes et/ou opérons codants pour la PRK et la RuBisCO, cela a été fait récemment par Kanno *et al.*, 2017 pour accroître les rendements de production de 2,3 butanediol chez *Synechococcus* sp. PCC 7942, mais dans un milieu également supplémenté en glucose et couplé à l'expression de gènes hétérologues pour le catabolisme du glucose.

CONCLUSIONS

Dans cette étude, nous avons ainsi démontré que la protéine CP12 est un régulateur majeur de l'anabolisme chez *Synechocystis* sp. PCC 6803 *in vivo*.

L'expression du gène *cp12* semble être non essentielle pour la croissance photoautotrophique, y compris sous des cycles lumière/obscurité, dans des conditions standard de laboratoire. Ce dernier phénotype était contradictoire avec ce qui avait été récemment publié dans la littérature chez *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Tamoi *et al.*, 2005). Mais ces deux souches ont des métabolismes du carbone assez différents (notamment au niveau de l'assimilation du glucose) qui pourraient expliquer ces différences de phénotypes. La mesure de la dynamique de pouvoir réducteur *in vivo* des différents mutants de la protéine a néanmoins montré que la consommation de pouvoir réducteur des voies anaboliques (notamment le CCB, principal consommateur d'ATP et de NADPH issus de la photosynthèse) chez des mutants dépourvus de leurs cystéines en C-ter, était constitutive même en conditions d'oxydation. Ainsi, sous régime photosynthétique, il existe une certaine dérégulation des processus lumière-dépendant, mais ces phénotypes ne sont en tout cas pas visibles au niveau de la croissance en lumière continue ou discontinue en conditions standard de laboratoire. Dans des environnements naturels, avec des fluctuations de lumière et des disponibilités changeantes de nutriment, une fine régulation par la protéine CP12 peut-être nécessaire. Aussi, des mécanismes supplémentaires de régulation post-traductionnels comme la glutathionylation ou la nitrosylation pourraient réguler les enzymes du CCB.

Sous d'autres régimes de photosynthèse (photohétérotrophique ou mixotrophique) nous avons également montré que la protéine CP12 et ses cystéines en C-terminales notamment sont essentielles pour métaboliser le carbone organique sous différentes formes : glucose, citrate, acétate de sodium et ceci pour économiser le pouvoir réducteur et maintenir une balance C/N au sein de la cellule. Sous un régime mixotrophique à faible lumière, nous avons pu visualiser par un marquage avec une fluorophore lipophile, une accumulation de granules de PHB, qui est un des marqueurs de la carence en azote chez *Synechocystis* sp. PCC 6803.

L'effet de la séquence centrale consensus de CP12, qui diffère selon la source du substrat, pourrait être à l'origine d'un désordonnement intrinsèque inhabituel de la protéine, et donc générer de nouveaux interactants avec divers partenaires.

Le rôle de régulateur majeur de CP12 pour canaliser le carbone organique dans les voies cataboliques sous régime mixotrophique suggèrent également que la protéine pourrait avoir d'autres rôles ou pourrait interagir avec d'autres protéines du catabolisme. Une des hypothèses pourrait être que Gap1 interagisse avec CP12 directement ou indirectement avec Gap2. Dans une souche $\Delta cp12$ dépourvue de protéine CP12, la dérégulation de Gap2 venant épuiser le pool de pouvoir réducteur, pourrait interférer avec l'activité de Gap1 et ainsi inhiber la glycolyse et stimuler encore plus les voies de gluconéogenèse et de réduction du carbone inorganique. Ceci est soutenu par les résultats transcriptomiques (donnant indirectement des informations sur la métabolomique) qui montrent que la réponse cellulaire implique : une production accrue de Ru5P (*gnd*), la récupération et la canalisation de G3P et 3-PGA vers la glycolyse (*gap1*, *rbcS* et *cfxE*, *fda*), la mobilisation des réserves de carbone (*glgP*, gènes *pha*). La redirection du flux de carbone vers la conversion des oxoacides en acides aminés serait donc également inhibée, mais il pourrait emprunter la voie Entner Doudoroff pour dégrader les hexoses en pyruvate et établir des réserves carbonées en stockant le carbone en granules de PHB ou de glycogène.

Chapitre 6. Matériels et méthodes

PARTIE 1. Matériel

I. Souches *E. coli* utilisées et conditions de cultures

A. Souches *E. coli* TOP10, NEB10 β , Rosetta et CM404

- La souche *E. coli* TOP 10 commercialisée par Invitrogen™ est dérivée de la souche DH10B™. Son génotype est le suivant : *F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 nupG recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ* . Les cellules sont chimiquement compétentes et adaptées à la transformation (haute efficacité : 1×10^9 cfu/ μ g d'ADN plasmidique pour les cellules compétentes commerciales).
- La souche *E. coli* NEB10 β commercialisée par New England BioLabs® Inc. est dérivée de la souche DH10B™. Son génotype est le suivant : *Δ (ara-leu) 7697 araD139 fhuA Δ lacX74 galK16 galE15 e14- ϕ 80dlacZ Δ M15 recA1 relA1 endA1 nupG rpsL (Str^R) rph spoT1 Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC)*. Les cellules sont chimiquement compétentes et adaptées à la transformation (haute efficacité : $1-3 \times 10^9$ cfu/ μ g pUC19 d'ADN plasmidique) pour une variété d'applications.
 - Les deux souches bactériennes *E. coli* ci-dessus ont été utilisées pour amplifier les plasmides utilisés pour les constructions génétiques au sein des différents châssis cyanobactériens (voir Tableau 18. Plasmides). Les cellules compétentes commerciales ainsi que des cellules compétentes réalisées à partir du protocole du laboratoire ont été utilisées.
- La souche hôte Rosetta (DE3) est dérivée de la souche BL21 et conçue pour améliorer l'expression de protéines dont les séquences primaires sont composées de codons rarement utilisés dans *E. coli* (codons AUA, AGG, AGA, CUA, CCC et GGA), ceux-ci sont fournis par le plasmide pRARE porté par les souches. En fournissant des codons rares, les souches Rosetta assurent une traduction « universelle », où la traduction serait autrement limitée par l'utilisation des codons d'*E. coli*. DE3 indique que la souche est un lysogène de λ DE3, et porte donc une copie chromosomique du gène de l'ARN polymérase T7 sous le contrôle du promoteur lacUV5. Ces souches conviennent à la production de protéines par induction avec IPTG, à partir de gènes clonés dans des vecteurs pET par exemple.
 - Cette souche a été utilisée pour la surproduction et la purification de la protéine Phosphoribulokinase (PRK) de *Synechocystis* sp. PCC 6803 en collaboration avec l'IBPC à Paris.
- La souche *E. coli* CM404 dérivée de la souche HB101 possède le plasmide mobilisateur autotransférable pRK2013 (Km^R) disposant du système de transfert IncP1 (Powell *et al.*, 1989) nécessaire à l'introduction de plasmides répliatifs chez les cyanobactéries (*Synechocystis* sp. PCC 6803, *Synechococcus* sp. PCC 7942 et *Synechococcus* sp. PCC 7002) par conjugaison (Mermet-Bouvier *et al.*, 1993). La répliation du vecteur pRK2013 (Km^R) étant thermosensible, la température de culture de la souche CM404 est de 30°C.

B. Conditions et milieux de culture des souches *E. coli*

L'ensemble des souches d'*E. coli* sont cultivées en milieu Luria-Bertani (LB) liquide ou solide à 30°C ou 37°C en présence d'antibiotique adéquat pour la sélection des plasmides à propager (Tableau 15. Concentrations en antibiotiques utilisés).

Pour les souches compétentes, la culture est effectuée dans un milieu plus riche en nutriments comme le milieu SOC (Super Optimal broth avec répression catabolique de composition : tryptone 2%, extrait de levure 0,5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM et glucose 20 mM) pour obtenir de meilleurs résultats de transformation.

C. Conservation des souches d'*E. coli*

Les cultures des diverses souches d'*E. coli* sont conservées par congélation dans du glycérol à 20% final à -80°C. Le mélange culture de cellules/glycérol est aliquoté dans des tubes 'NUNC' en polypropylène permettant la conservation des échantillons à -80°C.

II. Souches de cyanobactéries modèles utilisées et leurs conditions de culture

A. Souches de cyanobactéries modèles utilisées : *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Synechococcus* sp. PCC 7942 et *Synechococcus* sp. PCC 7002

Les souches *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Synechococcus* sp. PCC 7942 et *Synechococcus* sp. PCC 7002 sont toutes issues de la collection de cyanobactéries de l'Institut Pasteur (PCC ; <https://webext.pasteur.fr/cyanobacteria/>).

B. Conditions et milieux de cultures des souches de cyanobactéries modèles

1) Conditions de culture

En conditions standard du laboratoire, les souches *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Synechococcus* sp. PCC 7942 et *Synechococcus* sp. PCC 7002 sont cultivées sous une lumière blanche continue fournie par des néons 'cool white' (Sylvania) d'une intensité fixée à 2500 lux soit environ 35 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ dont l'intensité lumineuse est mesurée à l'aide d'un luxmètre (Testo 545), sous une température de 30°C, une agitation continue (140 rpm) dans un agitateur orbital à rampes lumineuses (Infors HT Multitron II). Les cultures liquides sont réalisées en erlenmeyers (avec un ratio 1 : 5 soit 25 mL de culture dans un erlenmeyer de 125 mL).

2) Milieux de culture

Les souches *Synechocystis* sp. PCC 6803 et *Synechococcus* sp. PCC 7942 sont cultivées dans du milieu BG11 enrichi de 3,78 mM de Na₂CO₃, ci-après désigné milieu minéral (MM) (Tableau 16.). *Synechococcus* sp. PCC 7002 est cultivée dans un milieu salin enrichi en nitrate et en vitamine B12 (4 $\mu\text{g}/\text{L}$) appelé milieu A+ (Tableau 17.). Le milieu est tamponné à pH = 8,2 en ajoutant 8,26 mM de Tris (Trizma base, Sigma-Aldrich). Le milieu solide est obtenu par ajout de Bacto Agar (Difco) à 10 g.L⁻¹ aux différents milieux.

La concentration cellulaire est ensuite déterminée par mesure de la densité optique (DO) par un spectrophotomètre (JENWAY) à une longueur d'onde de 750 nm mesurant ainsi spécifiquement la turbidité cellulaire au sein du milieu de culture (Tableau 14. Correspondances unités de DO_{750nm} et Figure 161. Spectre d'absorbance).

Tableau 14. Correspondance entre une unité de DO ($\lambda=750\text{nm}$) mesurée par le spectrophotomètre JENWAY et le nombre de cellules par mL de culture des 3 souches cyanobactériennes modèles.

Souches cyanobactériennes	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002
DO _{750nm} = 1	4,5.10 ⁷ cellules/mL	7.10 ⁷ cellules/mL	1.10 ⁸ cellules/mL

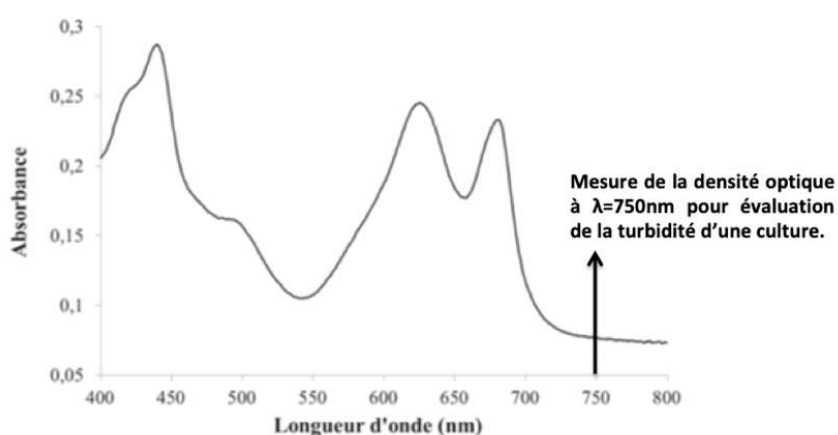


Figure 161. Spectre d'absorbance des cellules de la souche *Synechocystis* sp. PCC 6803

Pour les souches mutantes, une pression de sélection est ajoutée au milieu de culture (solide ou liquide) via l'ajout d'antibiotiques adéquats (Tableau 15.) pour la sélection des plasmides ou des cassettes de délétion ou d'expression.

Tableau 15. Concentrations en $\mu\text{g/mL}$ des antibiotiques utilisés pour sélectionner et maintenir les diverses souches mutantes. ND = non déterminé

Antibiotiques	<i>E. coli</i>	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002
Ampicilline (Amp)	100 $\mu\text{g/mL}$			
Kanamycine (Km)	50 $\mu\text{g/mL}$	50-300 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$
Streptomycine/ Spectinomycine (Sm/Sp)	25/75 $\mu\text{g/mL}$	5/5 $\mu\text{g/mL}$	5/5 $\mu\text{g/mL}$	50/50 $\mu\text{g/mL}$
Chloramphenicol (Cm)	25 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	ND	ND

a) *Milieu de culture MM*

Le milieu MM correspond à un milieu minéral BG11 (Rippka *et al.*, 1979 supplémenté avec 3,78 mM de Na₂CO₃) et Domain *et al.*, 2004, tamponné à pH 7 avec 3 mM d'HEPES (acide N-2-hydroxyéthylepipérazine-N'-éthane-sulfonique). Sa composition détaillée en minéraux et éléments traces est donnée dans le Tableau 16. ci-dessous.

Tableau 16. Composition du MM en minéraux et en éléments traces

Composé	Concentration (mg/L)	Concentration molaire en (mM)
Nitrate de sodium (NaNO ₃)	3000	17,65
Hydrogénophosphate de dipotassium (K ₂ HPO ₄)	80	0,18
Sulfate de magnésium, heptahydraté (MgSO ₄ .7H ₂ O)	150	0,30
Chlorure de calcium, dihydraté (CaCl ₂ .2H ₂ O)	72	0,25
Acide citrique (C ₆ H ₈ O ₇)	12	0,029
Citrate d'ammonium ferrique ((Fe(NH ₄)C ₃ H ₅ O ₇)	12	0,016
Acide éthylène diamine tétra acétique de sodium ou EDTA (C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈)	2	0,003
Carbonate de sodium (NaCO ₃)	400	3,78
Solution A5	2 mL/L	
Composé de la solution A5)	Concentration massique de la solution A5 (g/L)	Concentration dans le MM (µM)
Acide borique (H ₃ BO ₃)	2,86	46
Chlorure de manganèse, tétrahydraté (MnCl ₂ .4H ₂ O)	1,81	9,2
Sulfate de zinc, heptahydraté (ZnSO ₄ .7H ₂ O)	0,222	0,77
Mobdylate de sodium, dihydraté (Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O)	0,390	1,60
Sulfate de cuivre, pentahydraté (CuSO ₄ .5H ₂ O)	0,079	0,32
Nitrate de cobalt, hexahydraté (Co(NO ₃).6H ₂ O)	0,0494	0,17

b) Milieu de culture A⁺

Le milieu A⁺ correspond à un milieu salin (eau salée), il est utilisé pour la mise en culture de la souche euryhaline *Synechococcus* sp. PCC 7002 (Stevens *et al.*, 1973). Sa composition détaillée en minéraux et éléments traces est donnée dans le tableau 17. ci-dessous.

Tableau 17. Composition du milieu A⁺ en minéraux et en éléments traces métalliques.

Composé	Concentration molaire
Chlorure de sodium (NaCl)	308 mM
Chlorure de potassium (KCl)	8,05 mM
Nitrate de sodium (NaNO ₃)	11,8 mM
Sulfate de magnésium, heptahydraté (MgSO ₄ .7H ₂ O)	20 mM
Phosphate de potassium monobasique (KH ₂ PO ₄)	0,37 mM
Chlorure de calcium (CaCl ₂)	2,52 mM
Tetra sodium éthylène diamine tétra acétate (NaEDTA tetra)	0,08 mM
Tris (100g/L, pH 8,2)	8,26 mM
Composés traces	1 mL/L (voir ci-dessous)
Chlorure de fer II, hexahydraté (FeCl ₃ .6H ₂ O)	0,014 mM
Solution des éléments traces du milieu A⁺	Concentration molaire finale dans le milieu A⁺ (μM)
Acide borique (H ₃ BO ₃)	554
Chlorure de manganèse II, tétrahydraté (MnCl ₂ .4H ₂ O)	22
Sulfate de zinc, heptahydraté (ZnSO ₄ , 7H ₂ O)	1,1
Mobdylate de sodium (MoO ₃)	0,02
Sulfate de cuivre, pentahydraté (CuSO ₄ .5H ₂ O)	0,01
Chlorure de cobalt, hexahydraté (CoCl ₂ .6H ₂ O)	0,05

Pour réaliser un milieu solide, A⁺, 3 g de thiosulfate de sodium pentahydraté (Na₂S₂O₃, 5H₂O) et 15 g de Bacto agar seront ajoutés par litre de milieu A⁺. Pour la culture de mutants altérés pour la photosynthèse, 2,5 mL de glycérol (80%) seront ajoutés par litre de milieu A⁺.

Les pH des milieux liquides et solides sont ensuite ajustés à 8,2, puis ceux-ci sont autoclavés et refroidis à 50°C pour la supplémentation en antibiotiques et en vitamine B12 (ajout de 1mL/L d'une solution concentrée à 4mg/L soit une concentration finale de 4μg/L dans le milieu A⁺) ; cette dernière est sensible à la lumière et doit donc être ajoutée au dernier moment. Les milieux A⁺ solides et liquides sont ensuite prêts à l'emploi.

C. Conservation des souches cyanobactériennes

Les cultures de cyanobactéries bien denses (DO_{750nm}≈2) sont conservées par congélation dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) à 5% final. Le mélange cellules/DMSO est aliquoté dans des tubes en polypropylène permettant la conservation des échantillons en températures

cryogéniques (azote liquide : -196°C). Un tube entier est utilisé pour ensemercer une culture à partir de la cryoconservation il est donc nécessaire de congeler plusieurs tubes par souches.

III. Plasmides

A. Plasmides de clonage et d'expression

1) Plasmide de clonage pET3-d de Novagen™

Le plasmide de clonage et d'expression pET3d (4,637 pb) de Novagen™ à l'origine pBR322 contient une région d'expression T7 (promoteur T7, site d'initiation de transcription T7, séquence Tag codante T7 en N-terminal et un terminateur T7) ainsi qu'un marqueur de résistance à l'ampicilline (Figure 162. et 163.).

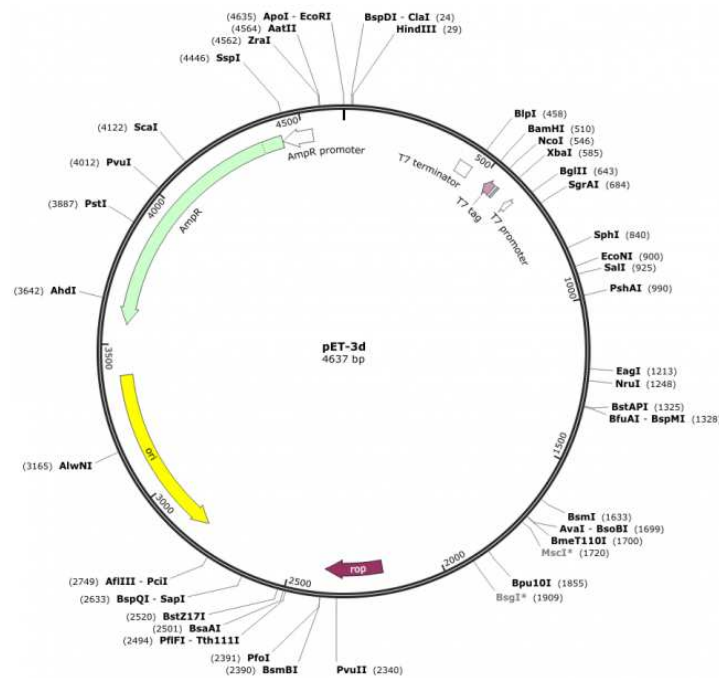


Figure 162. Carte du vecteur plasmidique pET3-d de Novagen™.

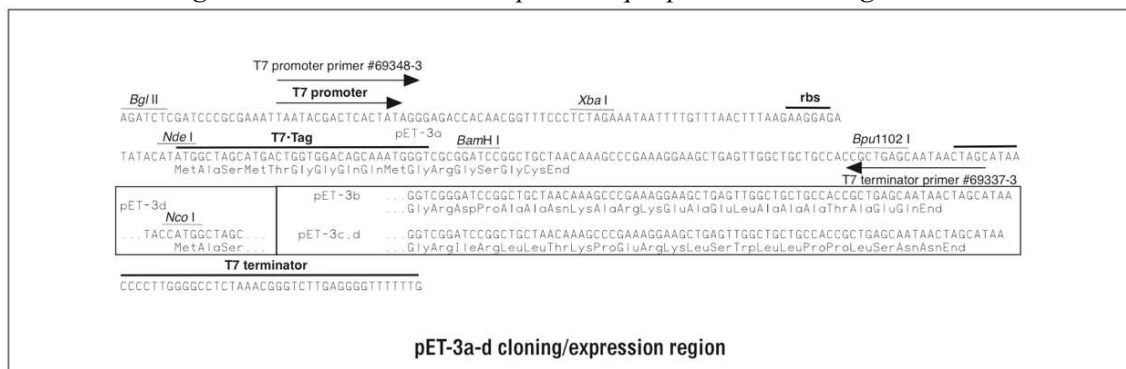


Figure 163. Région de clonage et d'expression du vecteur plasmidique pET3-d de Novagen™.

- Dans le cadre de ma thèse, ce plasmide a été utilisé pour une étude *in vitro* de la surproduction et la purification de la phosphoribulokinase (PRK) de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (ajout d'un tag His6).

2) Plasmide de clonage pTwist Amp Medium Copy de Twist Bioscience™

Le pTwist Amp Medium Copy (2,161 pb) de Twist Bioscience™ est un plasmide de clonage avec l'origine de réplication du p15A et contenant un gène marqueur de résistance à l'ampicilline (Figure 164.).

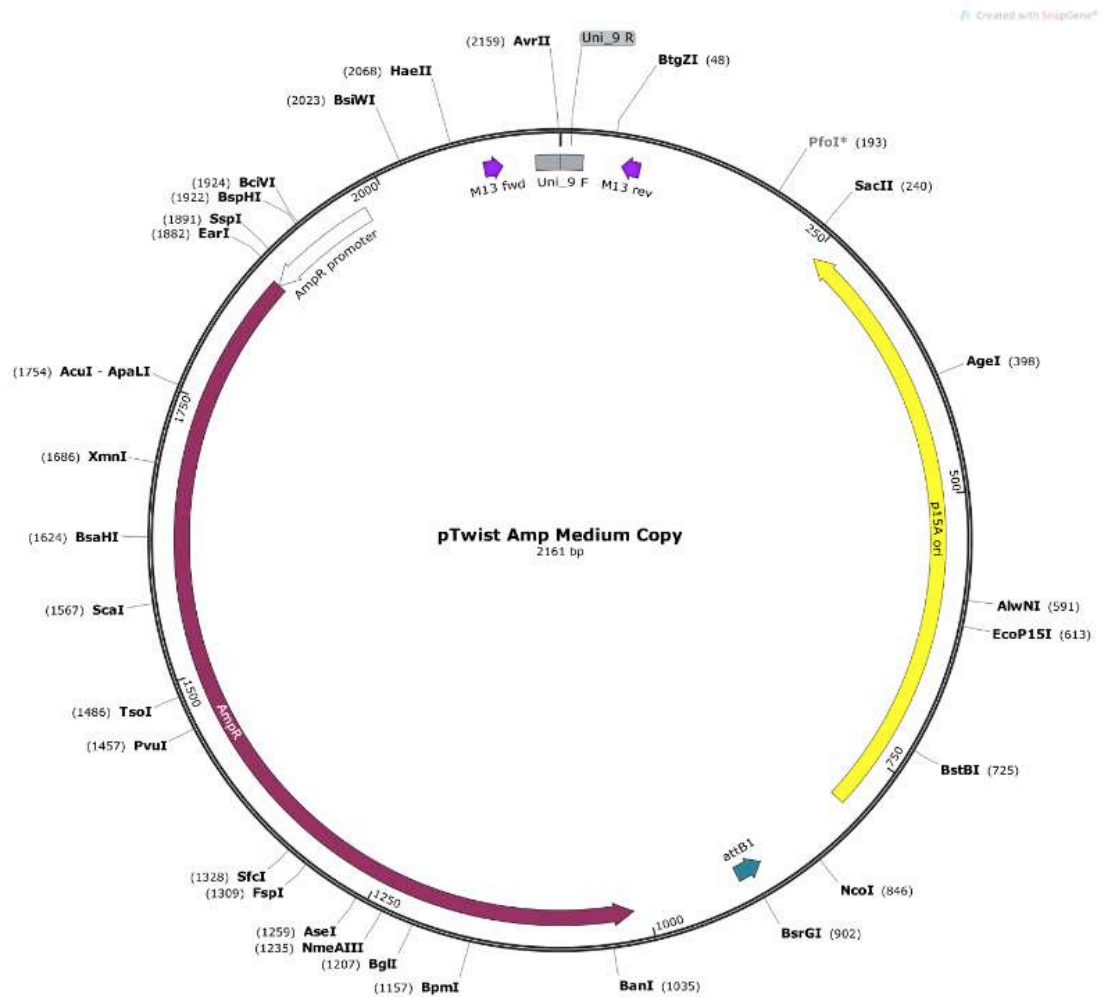


Figure 164. Carte du vecteur plasmidique pTwist Amp Medium Copy de Twist Bioscience™

- Dans le cadre de ma thèse ce plasmide a été utilisé dans un premier temps pour le clonage de cassettes (portant un promoteur fort ainsi qu'un marqueur de sélection) et leurs intégrations en amont de gènes ciblés à surexprimer au sein du chromosome de châssis cyanobactériens. Dans un deuxième temps, ce plasmide a été utilisé pour l'intégration de cassettes de surproduction de différents terpènes synthases chez différents châssis cyanobactériens au niveau de *loci* ciblés qualifiés comme 'site neutres'.

3) Plasmide de clonage pEX-A128 de Eurofins Genomics™

Le pEX-A128 (2,450 pb) d'Eurofins Genomics™ est un plasmide de clonage dérivé du pUC et contenant un gène marqueur de résistance à l'ampicilline (Figure 165.).

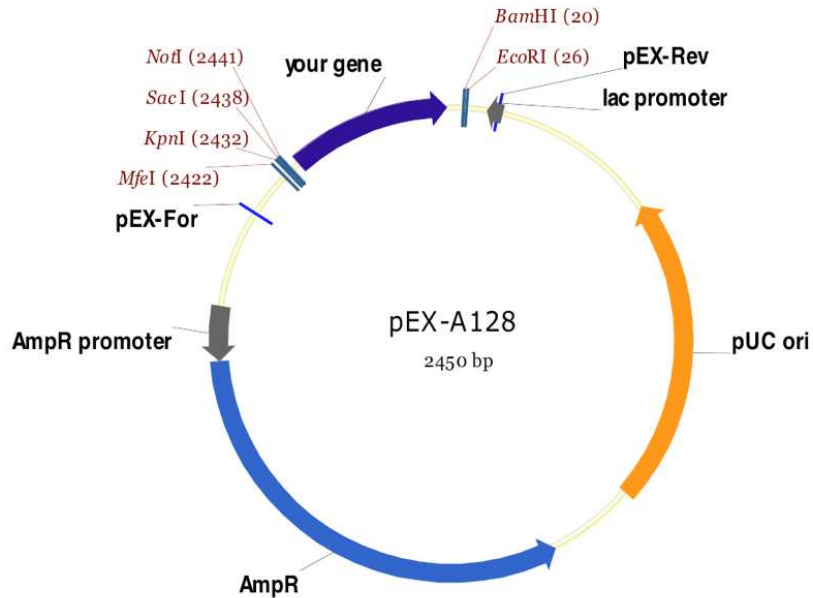


Figure 165. Carte du vecteur plasmidique pEX-A128 d'Eurofins Genomics™

- Dans le cadre de ma thèse ce plasmide a été utilisé pour la création de mutants de la protéine CP12 régulatrice de l'activité de deux enzymes du CCB dans la souche *Synechocystis* sp. PCC 6803.

B. Plasmide répliatif d'expression thermorégulé (pFC1, pT) ou constitutif (pC)

Le pFC1 est un vecteur répliatif d'expression thermorégulée développé au laboratoire et dérivé du plasmide RSF1010 à large spectre d'hôtes (Mermet-Bouvier and Chauvat, 1994). Il se réplique de manière autonome (une dizaine de copies par cellule) grâce à sa propre machinerie de répliation au sein des microorganismes *E. coli* et de nombreuses cyanobactéries.

Le pFC1 ou pT porte les gènes de résistance aux antibiotiques streptomycine et spectinomycine (Sm^R/Sp^R) et chloramphénicol (Cm^R) et comporte un système d'expression thermorégulé provenant du bactériophage λ . Le pT contient un promoteur fort, le P_R , qui est contrôlé par un répresseur thermosensible qui est lui-même codé par le gène cl_{857} . La fonction régulatrice du répresseur est proportionnelle à la température. C'est-à-dire qu'à 30°C la répression est maximale et l'activité du P_R nulle et à 39°C le répresseur est dénaturé et l'activité du P_R devient maximale. A des températures intermédiaires l'expression est modérée.

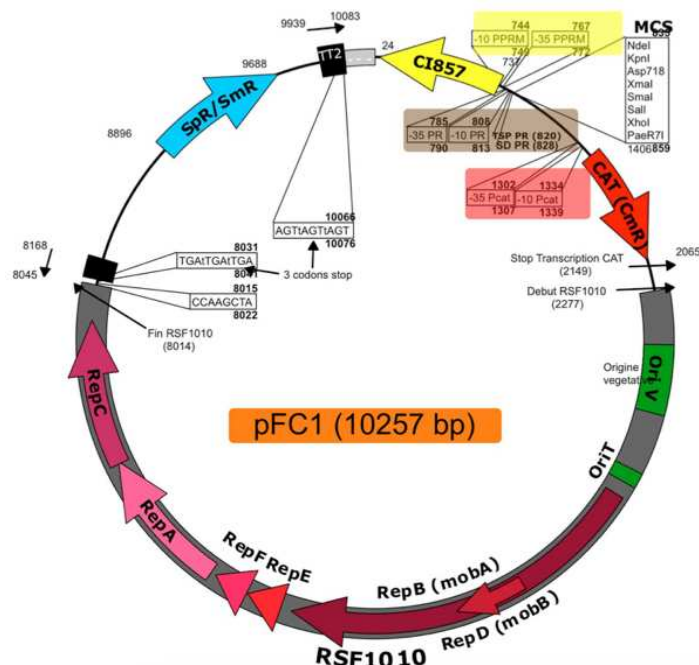


Figure 166. Carte du vecteur d'expression thermorégulé pFC1 développé au laboratoire.

Une version dérivée du pFC1 est le pC qui porte uniquement le marqueur Sm^R/Sp^R et qui permet une expression constitutive des gènes intégrés en aval du P_R . Le pC est obtenu par digestion *PsiI* du pT (comportant 2 sites de restrictions *PsiI* soit doublement digéré) puis religation de ce dernier ; le gène cl_{857} est alors tronqué et son expression est alors inactivée ; le P_R a donc une activité maximale et constitutive et ceci indépendamment de la température.

Ces deux versions (pT et pC) comportent un MCS, une 'région de clonage multiple', avec notamment un site de restriction *NdeI* qui permet de cloner des gènes directement en phase avec le promoteur fort.

- Dans le cadre de ma thèse ces vecteurs (pT et pC) ont été utilisés pour la surexpression de gènes et d'opérons codants pour différentes versions des protéines

Phosphoribulokinase et RuBisCO (séquences primaires issues de différentes souches de cyanobactéries), au sein de différents châssis cyanobactériens.

IV. Table des plasmides

Tableau 18. Table des plasmides

Plasmides	Caractéristiques	Références
Vecteurs de clonage et construction de cassettes d'ADN		
pGEM-T	AT-cloning vector with Ap ^r marker	Promega
pEX-A	Default subcloning vector for synthetic fragments with Ap ^r marker	Eurofins
pUC4K	Vector used for PCR amplification of the Km ^r cassette without TT	Pharmacia
pFC1	Vecteur d'expression dérivant du RSF1010 et contenant le promoteur fort <i>pR</i> contrôlé par le répresseur <i>ci857</i> pour une expression thermocontrôlée des gènes clonés en aval de ce promoteur (SpR/SmR,CmR)	
pTwist	Amp ^R medium copy number plasmid	Twist Biosciences
pET3d	Amp ^R vector was used for production of <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803's phosphoribulokinase.	IBPC Paris
Délétion et intégrations ciblées des gènes <i>cp12</i> chez <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803		
pGEM-T <i>cp12::Km^r</i>	pGEM-T with the Km ^r marker flanked by the up- and downstream regions of the <i>cp12</i> (<i>ssl3364</i>) gene of <i>Synechocystis</i> . The construct allows complete replacement of the ORF by the Km ^r cassette (+1 to +225 relative to the start codon)	This study
pEX-A MCS-SmSp ^r - <i>cp12_{down}</i>	pEX-A with the SmSp ^r + TT marker followed by the downstream region of the <i>cp12</i> gene of <i>Synechocystis</i> and preceded by <i>NcoI</i> and <i>PstI</i> restriction sites. This MCS allows subcloning of other pEX-A constructs (<i>cp12</i> upstream region + mutated <i>cp12</i> gene) below.	This study
pEX-A <i>cp12_{up}</i> - <i>cp12_{WT}</i>	pEX-A with the WT <i>cp12</i> ORF preceded by the <i>cp12</i> upstream region and flanked by <i>NcoI</i> and <i>PstI</i> restriction sites.	This study
pEX-A <i>cp12_{up}</i> - <i>cp12Δ4Cys</i>	pEX-A with the <i>cp12Δ4Cys</i> ORF preceded by the <i>cp12</i> upstream region and flanked by <i>NcoI</i> and <i>PstI</i> restriction sites.	This study
pEX-A <i>cp12_{up}</i> - <i>cp12Δ2CysN</i>	pEX-A with the <i>cp12ΔCysN</i> ORF preceded by the <i>cp12</i> upstream region and flanked by <i>NcoI</i> and <i>PstI</i> restriction sites.	This study
pEX-A <i>cp12_{up}</i> - <i>cp12Δ2CysC</i>	pEX-A with the <i>cp12ΔCysC</i> ORF preceded by the <i>cp12</i> upstream region and flanked by <i>NcoI</i> and <i>PstI</i> restriction sites.	This study
pEX-A <i>cp12_{up}</i> - <i>cp12_{Core}</i>	pEX-A with the <i>cp12ΔCore</i> ORF preceded by the <i>cp12</i> upstream region and flanked by <i>NcoI</i> and <i>PstI</i> restriction sites.	This study
pEX-A <i>cp12_{up}</i> -CBS- <i>cp12</i>	pEX-A with CBS- <i>cp12</i> ORF preceded by the <i>cp12</i> upstream region and flanked by <i>NcoI</i> and <i>PstI</i> restriction sites.	This study
pEX-A <i>cp12_{WT}</i> ::SmSp ^r	pEX-A with the WT <i>cp12</i> ORF cloned after <i>NcoI</i> and <i>PstI</i> digestion. This construct allows replacement of the Km ^r marker of the <i>Δcp12</i> mutant by the <i>cp12_{WT}</i> gene followed by the SmSp ^r cassette.	This study
pEX-A <i>cp12Δ4Cys</i> ::SmSp ^r	pEX-A with the <i>cp12Δ4Cys</i> ORF cloned after <i>NcoI</i> and <i>PstI</i> digestion. This construct allows replacement of the Km ^r marker of	This study

	the $\Delta cp12$ mutant by a mutated <i>cp12</i> gene (Cys to Ala substitutions) and followed by the SmSp ^r cassette.	
pEX-A cp12 Δ 2CysN::SmSp ^r	pEX-A with the <i>cp12</i> Δ CysN ORF cloned after <i>NcoI</i> and <i>PstI</i> digestion. This construct allows replacement of the Km ^r marker of the $\Delta cp12$ mutant by a mutated <i>cp12</i> gene (Cys to Ala substitutions) and followed by the SmSp ^r cassette.	This study
pEX-A cp12 Δ 2CysC::SmSp ^r	pEX-A with the <i>cp12</i> Δ CysC ORF cloned after <i>NcoI</i> and <i>PstI</i> digestion. This construct allows replacement of the Km ^r marker of the $\Delta cp12$ mutant by a mutated <i>cp12</i> gene (Cys to Ala substitutions) and followed by the SmSp ^r cassette.	This study
pEX-A cp12_Core::SmSp ^r	pEX-A with the <i>cp12</i> Δ Core ORF cloned after <i>NcoI</i> and <i>PstI</i> digestion. This construct allows replacement of the Km ^r marker of the $\Delta cp12$ mutant by a mutated <i>cp12</i> gene (Asp and Glu to Ala substitutions) and followed by the SmSp ^r cassette.	This study
pEX-A CBS-cp12::SmSp ^r	pEX-A with CBS- <i>cp12</i> ORF cloned after <i>NcoI</i> and <i>PstI</i> digestion. This construct allows replacement of the Km ^r marker of the $\Delta cp12$ mutant by the CBS- <i>cp12</i> gene of <i>Synechococcus sp.</i> PCC7002 and followed by the SmSp ^r cassette.	This study

Plasmide pFC1 (pT) dérivé de RSF1010, cloné avec l'opéron *rbc* ou le gène *prk* de différentes cyanobactéries.

pT-rbcLXS_Scy6803	RSF1010-derived plasmid pFC1 (pT) (Sp/Sm ^R , Cm ^S) with the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) encoding operon (<i>rbcLXS</i>) from <i>Synechocystis</i> PCC 6803 cloned in between the <i>NdeI</i> and <i>EcoRI</i> restriction sites.	This study
pT-rbcLS_Sco7942	RSF1010-derived plasmid pFC1 (pT) (Sp/Sm ^R , Cm ^S) with the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) encoding operon (<i>rbcLS</i>) from <i>Synechococcus</i> PCC 7942 cloned in between the <i>NdeI</i> and <i>PvuII</i> restriction sites.	This study
pT-rbcLXS_Sco7002	RSF1010-derived plasmid pFC1 (pT) (Sp/Sm ^R , Cm ^S) with the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) encoding operon (<i>rbcLXS</i>) from <i>Synechococcus</i> PCC 7002 cloned in between the <i>NdeI</i> and <i>PvuII</i> restriction sites.	This study
pT-rbcLXS_Cya7425	RSF1010-derived plasmid pFC1 (pT) (Sp/Sm ^R , Cm ^S) with the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) encoding operon (<i>rbcLXS</i>) from <i>Cyanothece</i> PCC 7425 cloned in between the <i>XhoI</i> and <i>BspEI</i> restriction sites.	This study
pT-prk_Scy6803	RSF1010-derived plasmid pFC1 (pT) (Sp/Sm ^R , Cm ^S) with the phosphoribulokinase encoding gene (<i>prk</i>) from <i>Synechocystis</i> PCC 68803 cloned in between the <i>NdeI</i> and <i>EcoRI</i> restriction sites.	This study
pT-prk_Sco7002	RSF1010-derived plasmid pFC1 (pT) (Sp/Sm ^R , Cm ^S) with the phosphoribulokinase encoding gene (<i>prk</i>) from <i>Synechococcus</i> PCC 7002 cloned in between the <i>NdeI</i> and <i>EcoRI</i> restriction sites.	This study
pT-prk_Cya7425	RSF1010-derived plasmid pFC1 (pT) (Sp/Sm ^R , Cm ^S) with the phosphoribulokinase encoding gene (<i>prk</i>) from <i>Cyanothece</i> PCC 7425 cloned in between the <i>NdeI</i> and <i>EcoRI</i> restriction sites.	This study

Plasmide pC dérivé de pFC1 (pT) portant l'opéron *rbc* ou le gène *prk* de différentes cyanobactéries.

pC-rbcLXS_Scy6803	pC derivative plasmid (Sp/Sm ^R , Cm ^S) with the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) encoding operon (<i>rbcLXS</i>) from <i>Synechocystis</i> PCC 6803 cloned in between the <i>NdeI</i> and <i>EcoRI</i> restriction sites. pT-rbcLXS_Scy6803 derivative harboring a truncated <i>cl857</i> repressor gene (<i>PstI</i> digestions) for constitutive gene expression.	This study
pC-rbcLS_Sco7942	pC derivative plasmid (Sp/Sm ^R , Cm ^S) with the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) encoding operon (<i>rbcLS</i>) from <i>Synechococcus</i> PCC 7942 cloned in between the <i>NdeI</i>	This study

	and <i>PvuII</i> restriction sites. pT- rbcLS_Sco7942 derivative harboring a truncated <i>cl₈₅₇</i> repressor gene (<i>PsiI</i> digestions) for constitutive gene expression.	
pC-rbcLXS_Sco7002	pC derivative plasmid (Sp/Sm ^R , Cm ^S) with the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) encoding operon (<i>rbcLXS</i>) from <i>Synechococcus</i> PCC 7002 cloned in between the <i>NdeI</i> and <i>PvuII</i> restriction sites. pT- rbcLXS_Sco7002 derivative harboring a truncated <i>cl₈₅₇</i> repressor gene (<i>PsiI</i> digestions) for constitutive gene expression.	This study
pC-rbcLXS_Cya7425	pC derivative plasmid (Sp/Sm ^R , Cm ^S) with the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) encoding operon (<i>rbcLXS</i>) from <i>Cyanothece</i> PCC 7425 cloned in between the <i>XhoI</i> and <i>BspEI</i> restriction sites. pT- rbcLXS_Cya7425 derivative harboring a truncated <i>cl₈₅₇</i> repressor gene (<i>PsiI</i> digestions) for constitutive gene expression.	This study
pC-prk_Cya7425	C derivative plasmid (Sp/Sm ^R , Cm ^S) with the phosphoribulokinase encoding gene (<i>prk</i>) from <i>Cyanothece</i> PCC 7425 cloned in between the <i>NdeI</i> and <i>EcoRI</i> restriction sites. pT- prk_Cya7425 derivative harboring a truncated <i>cl₈₅₇</i> repressor gene (<i>PsiI</i> digestions) for constitutive gene expression.	This study

Vecteurs de clonage avec les régions amont et aval de plusieurs sites neutres de cyanobactéries

pTwist_ab_NSslr0168	Amp ^R medium copy number plasmid harboring two homologous regions of 300bp, upstream and downstream of <i>slr0168</i> neutral site locus in <i>Synechocystis</i> PCC 6803 genome. An <i>EcoRV</i> restriction site has been added in between the homologous platforms for cloning genes in the targeted neutral site.	Twist Biosciences
pTwist_ab_NSpCC5.2	Amp ^R medium copy number plasmid harboring two homologous regions of 300bp, upstream and downstream of NS <i>pCC5.2</i> neutral site locus in <i>Synechocystis</i> PCC 6803 genome. An <i>EcoRV</i> restriction site has been added in between the homologous platforms for cloning genes in the targeted neutral site.	Twist Biosciences
pTwist_ab_NSpCA2.4	Amp ^R medium copy number plasmid harboring two homologous regions of 300bp, upstream and downstream of NS <i>pCA2.4</i> neutral site locus in <i>Synechocystis</i> PCC 6803 genome. An <i>EcoRV</i> restriction site has been added in between the homologous platforms for cloning genes in the targeted neutral site.	Twist Biosciences
pTwist_ab_NS7942	Amp ^R medium copy number plasmid harboring two homologous regions of 500bp, upstream and downstream NSI <i>S7942</i> neutral site locus in <i>Synechococcus</i> PCC 7942 genome. An <i>SmaI</i> restriction site has been added in between the homologous platforms for cloning genes in the targeted neutral site.	Twist Biosciences
pTwist_ab_NS7002	Amp ^R medium copy number plasmid harboring two homologous regions of 500bp, upstream and downstream of A0935-A0936 neutral site locus in <i>Synechococcus</i> PCC 7002 genome. An <i>EcoRV</i> restriction site has been added in between the homologous platforms for cloning genes in the targeted neutral site.	Twist Biosciences

Vecteurs avec les régions amonts et avals de plusieurs sites neutres de cyanobactéries, clonés avec la cassette d'expression de l' α -farnésène synthase de *Picea abies*.

pTwist_ab_NSslr0168-FS	Km ^R Amp ^R medium copy number plasmid harboring two homologous regions of 300bp, upstream and downstream of <i>slr0168</i> neutral site locus in <i>Synechocystis</i> PCC 6803 genome, with the <i>Picea abies</i> α -farnesene synthase encoding gene coupled with a kanamycin resistance expression cassette under the control of the strong <i>p_R</i> promoter cloned at the <i>EcoRV</i> restriction site.	This study
pTwist_ab_NSpCC5.2-FS	Km ^R Amp ^R medium copy number plasmid harboring two homologous regions of 300bp, upstream and downstream of NS <i>pCC5.2</i> neutral site locus in <i>Synechocystis</i> PCC 6803 genome, with the <i>Picea abies</i> α -farnesene synthase encoding gene coupled	This study

	with a kanamycin resistance expression cassette under the control of the strong <i>p_R</i> promoter cloned at the <i>EcoRV</i> restriction site.	
pTwist_ab_NSpCA2.4-FS	Km ^R Amp ^R medium copy number plasmid harboring two homologous regions of 300bp, upstream and downstream of NS_pCA2.4 neutral site <i>locus</i> in <i>Synechocystis</i> PCC 6803 genome, with the <i>Picea abies</i> α -farnesene synthase encoding gene coupled with a kanamycin resistance expression cassette under the control of the strong <i>p_R</i> promoter cloned at the <i>EcoRV</i> restriction site.	This study
pTwist_ab_NS7942-FS	Km ^R Amp ^R medium copy number plasmid harboring two homologous regions of 300bp, upstream and downstream of NSI neutral site <i>locus</i> in <i>Synechococcus</i> PCC 7942 genome, with the <i>Picea abies</i> α -farnesene synthase encoding gene coupled with a kanamycin resistance expression cassette under the control of the strong <i>p_R</i> promoter cloned at the <i>SmaI</i> restriction site.	This study

Vecteurs avec les régions amonts et avalés de plusieurs sites neutres de cyanobactéries, clonés avec la cassette d'expression de la E- α -bisabolène synthase d'*Abies grandis*.

pTwist_ab_NSs1r016 8-BS	Km ^R Amp ^R medium copy number plasmid harboring two homologous regions of 300bp, upstream and downstream of <i>slr0168</i> neutral site <i>locus</i> in <i>Synechocystis</i> PCC 6803 genome, with the <i>Abies grandis</i> E- α -bisabolene synthase encoding gene coupled with a kanamycin resistance expression cassette under the control of the strong <i>p_R</i> promoter cloned at the <i>EcoRV</i> restriction site.	This study
pTwist_ab_NSpCC5.2-BS	Km ^R Amp ^R medium copy number plasmid harboring two homologous regions of 300bp, upstream and downstream of NS_pCC5.2 neutral site <i>locus</i> in <i>Synechocystis</i> PCC 6803 genome, with the <i>Abies grandis</i> E- α -bisabolene synthase encoding gene coupled with a kanamycin resistance expression cassette under the control of the strong <i>p_R</i> promoter cloned at the <i>EcoRV</i> restriction site.	This study
pTwist_ab_NSpCA2.4-BS	Km ^R Amp ^R medium copy number plasmid harboring two homologous regions of 300bp, upstream and downstream of NS_pCA2.4 neutral site <i>locus</i> in <i>Synechocystis</i> PCC 6803 genome, with the <i>Abies grandis</i> E- α -bisabolene synthase encoding gene coupled with a kanamycin resistance expression cassette under the control of the strong <i>p_R</i> promoter cloned at the <i>EcoRV</i> restriction site.	This study

Vecteur avec la région amont et avalé du site neutre de *Synechococcus* sp. PCC 7002, cloné avec la cassette d'expression de la 4S-limonène synthase de *Mentha spicata*.

pTwist_ab_NS7002-LS	Km ^R Amp ^R medium copy number plasmid harboring two homologous regions of 500bp, upstream and downstream of A0935-A0936 neutral site <i>locus</i> in <i>Synechococcus</i> PCC 7002 genome, with the <i>Mentha spicata</i> 4S-limonene synthase encoding gene coupled with a kanamycin resistance expression cassette under the control of the strong <i>p_R</i> promoter cloned at the <i>EcoRV</i> restriction site.	This study
---------------------	---	------------

Vecteurs avec les régions amonts et avalés de plusieurs sites neutres de cyanobactéries, clonés avec la cassette d'expression de la santalène synthase de *Santalum album*.

pTwist_ab_NSs1r016 8-SS	Km ^R Amp ^R medium copy number plasmid harboring two homologous regions of 300bp, upstream and downstream of <i>slr0168</i> neutral site <i>locus</i> in <i>Synechocystis</i> PCC 6803 genome, with the <i>Santalum album</i> santalene synthase encoding gene coupled with a kanamycin resistance expression cassette under the control of the strong <i>p_R</i> promoter cloned at the <i>EcoRV</i> restriction site.	This study
pTwist_ab_NSpCC5.2-SS	Km ^R Amp ^R medium copy number plasmid harboring two homologous regions of 300bp, upstream and downstream of NS_pCC5.2 neutral site <i>locus</i> in <i>Synechocystis</i> PCC 6803 genome, with the <i>Santalum album</i> santalene synthase encoding gene coupled with a kanamycin resistance expression cassette under the control of the strong <i>p_R</i> promoter cloned at the <i>EcoRV</i> restriction site.	This study
pTwist_ab_NSpCA2.4-SS	Km ^R Amp ^R medium copy number plasmid harboring two homologous regions of 300bp, upstream and downstream of	This study

	<i>NS pCA2.4</i> neutral site locus in <i>Synechocystis</i> PCC 6803 genome, with the <i>Santalum album</i> santalene synthase encoding gene coupled with a kanamycin resistance expression cassette under the control of the strong p_R promoter cloned at the <i>EcoRV</i> restriction site.	
pTwist_ab_NS7942-SS	Km ^R Amp ^R medium copy number plasmid harboring two homologous regions of 300bp, upstream and downstream of <i>NSI</i> neutral site locus in <i>Synechococcus</i> PCC 7942 genome, with the <i>Santalum album</i> santalene synthase encoding gene coupled with a kanamycin resistance expression cassette under the control of the strong p_R promoter cloned at the <i>SmaI</i> restriction site.	This study
pTwist_ab_NS7002-SS	Km ^R Amp ^R medium copy number plasmid harboring two homologous regions of 500bp, upstream and downstream of <i>A0935-A0936</i> neutral site locus in <i>Synechococcus</i> PCC 7002 genome, with the <i>Santalum album</i> santalene synthase encoding gene coupled with a kanamycin resistance expression cassette under the control of the strong p_R promoter cloned at the <i>EcoRV</i> restriction site.	This study

Vecteurs pC portant différents gènes codants pour différentes terpènes synthase

pC-SS	pC derivative plasmid (Sp/Sm ^R , Cm ^S) with the <i>Santalum album</i> santalene synthase encoding gene cloned in between the <i>NdeI</i> and <i>EcoRI</i> restriction sites	Thèse de Célia Chenebault
pC-LS	pC derivative plasmid (Sp/Sm ^R , Cm ^S) with the <i>Mentha spicata</i> 4S-limonene synthase encoding gene cloned in between the <i>NdeI</i> and <i>EcoRI</i> restriction sites	(Chenebault <i>et al.</i> , 2020)
pC-FS	pC derivative plasmid (Sp/Sm ^R , Cm ^S) with the <i>Picea abies</i> α -farnesene synthase encoding gene cloned in between the <i>NdeI</i> and <i>EcoRI</i> restriction sites	Thèse de Célia Chenebault
pC-BS	pC derivative plasmid (Sp/Sm ^R , Cm ^S) with the <i>Abies grandis</i> E- α -bisabolene synthase encoding gene cloned in between the <i>NdeI</i> and <i>EcoRI</i> restriction sites	Thèse de Célia Chenebault

Clonage de la PRK de *Synechocystis* sp. PCC 6803 pour une surproduction dans *E. coli* et une analyse du CCB *in vitro* (ANR).

pET3d-His6-PRK	Amp ^R pET3d vector was cloned with <i>Synechocystis</i> PCC 6803's phosphoribulokinase encoding gene synthesized by PCR phusion polymerase from <i>Synechocystis</i> PCC 6803 genome with primers (His6tag_PRK_For (harboring a His6tag) and PRK_Rev) both harboring an <i>NcoI</i> restriction site in their flanking sequences. Ligation was then performed after digestions of both insert and pET-3d with <i>NcoI</i> HF enzyme.	This study
----------------	---	------------

Introduction d'une cassette de surexpression (promoteur fort) dans le chromosome de différentes cyanobactéries en amont du gène *prk* ou de l'opéron *rbc*.

pTwist-ab_rbcS6803	Amp ^R medium copy number plasmid harboring two homologous regions of 300bp, upstream <i>rbc</i> operon genes from <i>Synechocystis</i> PCC 6803. This plasmid will be used as platform tools for chromosomal overexpression after cloning (by restriction ligation between these ab regions) of a selection/overexpression cassette in between.	Twist Biosciences
pTwist-ab_rbcS7942	Amp ^R medium copy number plasmid harboring two homologous regions of 300bp, upstream <i>rbc</i> operon genes from <i>Synechococcus</i> PCC 7942. This plasmid will be used as platform tools for chromosomal overexpression after cloning (by restriction ligation between these ab regions) of a selection/overexpression cassette in between.	Twist Biosciences
pTwist-ab_rbcS7002	Amp ^R medium copy number plasmid harboring two homologous regions of 300bp, upstream <i>rbc</i> operon genes from <i>Synechococcus</i> PCC 7002. This plasmid will be used as platform tools for chromosomal overexpression after cloning (by restriction ligation between these ab regions) of a selection/overexpression cassette in between.	Twist Biosciences

pTwist-ab_prkS6803	Amp ^R medium copy number plasmid harboring two homologous regions of 300bp, upstream <i>prk</i> gene from <i>Synechocystis</i> PCC 6803. This plasmid will be used as platform tools for chromosomal overexpression after cloning (by restriction ligation between these ab regions) of a selection/overexpression cassette in between.	Twist Biosciences
pTwist-ab_prkS7942	Amp ^R medium copy number plasmid harboring two homologous regions of 300bp, upstream <i>prk</i> gene from <i>Synechococcus</i> PCC 7942. This plasmid will be used as platform tools for chromosomal overexpression after cloning (by restriction ligation between these ab regions) of a selection/overexpression cassette in between.	Twist Biosciences
pTwist-ab_prkS7002	Amp ^R medium copy number plasmid harboring two homologous regions of 300bp, upstream <i>prk</i> gene from <i>Synechococcus</i> PCC 7002. This plasmid will be used as platform tools for chromosomal overexpression after cloning (by restriction ligation between these ab regions) of a selection/overexpression cassette in between.	Twist Biosciences

V. Table des amorces

Tableau 19. Table des amorces
Liste et caractéristiques des amorces utilisées dans cette étude.

Amorces pour le projet de surexpression des gènes <i>prk</i> et opérons <i>rbc</i> codants pour deux enzymes du CCB, et clonés au sein des plasmides réplicatifs pC et pT		
Nom de l'amorce	Séquence (5' -> 3')	Caractéristiques
Amorces pour l'amplification PCR des gènes <i>prk</i> et opérons <i>rbc</i> de différentes souches de cyanobactéries		
rbcLXS_S6803_For(long)	GTACTACATATGGTACAAGCCAAAGCAGGGTTTAA GGC	Amorce forward utilisée pour l'amplification PCR du gène (<i>rbcLXS</i>) codant pour la RuBisCO de la souche <i>Synechocystis</i> PCC 6803, et permettant l'intégration de sites de restrictions NdeI en amont et EcoRI en aval des fragments synthétisés
rbcLXS_S6803_Rev(long)	TACGTAGAATTCTTAGTAACGGCCTTGGTTTTGGTT GGGT	Amorce reverse utilisée pour l'amplification PCR du gène (<i>rbcLXS</i>) codant pour la RuBisCO de la souche <i>Synechocystis</i> PCC 6803, et permettant l'intégration de sites de restrictions NdeI en amont et EcoRI en aval des fragments synthétisés
rbcLXS_S7002_For(long)	GTACTACATATGGTTCAGACCAAATCTGCTGGGTTT AAT	Amorce forward utilisée pour l'amplification PCR du gène (<i>rbcLXS</i>) codant pour la RuBisCO de la souche <i>Synechococcus</i> PCC 7002, et permettant l'intégration de sites de restrictions NdeI en amont et PvuII en aval des fragments synthétisés
rbcLXS_S7002_Rev(long)	TACGTACAGCTGTTAGTAACGGGTTTGGTTGGGCTT GTAAAC	Amorce reverse utilisée pour l'amplification PCR du gène (<i>rbcLXS</i>) codant pour la RuBisCO de la souche <i>Synechococcus</i> PCC 7002, et permettant l'intégration de sites de restrictions NdeI en amont et PvuII en aval des fragments synthétisés
rbcLS_S7942_For	GTACTACATATGCCCAAGACGCAATCT	Amorce forward utilisée pour l'amplification PCR du gène (<i>rbcLS</i>) codant pour la RuBisCO de la souche <i>Synechococcus</i> PCC 7942, et permettant l'intégration de sites de restrictions NdeI en amont et PvuII en aval des fragments synthétisés

rbcLS_S7942_Rev	TACGTACAGCTGTTAGTAGCGGCCGGGACG	Amorce reverse utilisée pour l'amplification PCR du gène (rbcLS) codant pour la RuBisCO de la souche Synechococcus PCC 7942, et permettant l'intégration de sites de restrictions NdeI en amont et PvuII en aval des fragments synthétisés
rbcC7425_For	GTACTACTCGAGATGTCCTACGCTCAAACA	Amorce forward utilisée pour l'amplification PCR du gène (rbcLXS) codant pour la RuBisCO de la souche Cyanothecce PCC 7425, et permettant l'intégration de sites de restrictions XhoI en amont et BspEI en aval des fragments synthétisés
rbcC7425_Rev	TACGTATCCGGATTAGTAGCGATAGCCACC	Amorce reverse utilisée pour l'amplification PCR du gène (rbcLXS) codant pour la RuBisCO de la souche Cyanothecce PCC 7425, et permettant l'intégration de sites de restrictions XhoI en amont et BspEI en aval des fragments synthétisés
PRK6803_For	CATATGACCACACAGCTAGAC	Amorce forward utilisée pour l'amplification PCR du gène (prk) codant pour la phosphoribulokinase de la souche Synechocystis PCC 6803, et permettant l'intégration de sites de restrictions NdeI en amont et EcoRI en aval des fragments synthétisés
PRK6803_Rev	GGAATTCTTACACAGAGGCCGGGA	Amorce reverse utilisée pour l'amplification PCR du gène (prk) codant pour la phosphoribulokinase de la souche Synechocystis PCC 6803, et permettant l'intégration de sites de restrictions NdeI en amont et EcoRI en aval des fragments synthétisés
PRK_S7002_Fwd	GTACTACATATGACCAGTCAGACAGACCGT	Amorce forward utilisé pour l'amplification PCR du gène (prk) codant pour la phosphoribulokinase de la souche Synechococcus PCC 7002, et permettant l'intégration de sites de restrictions NdeI en amont et EcoRI en aval des fragments synthétisés
PRK_S7002_Rev	TACGTAGAATTCCTATACGCTTGCGGCGAT	Amorce reverse utilisée pour l'amplification PCR du gène (prk) codant pour la phosphoribulokinase de la souche Synechococcus PCC 7002, et permettant l'intégration de sites de restrictions NdeI en amont et EcoRI en aval des fragments synthétisés

PRK_S7942_Fwd	GTACTACATATGAGCAAGCCAGATCGTGTT	Amorce forward utilisée pour l'amplification PCR du gène (prk) codant pour la phosphoribulokinase de la souche <i>Synechococcus</i> PCC 7942, et permettant l'intégration de sites de restrictions NdeI en amont et EcoRI en aval des fragments synthétisés
PRK_S7042_Rev	TACGTAGAATTCCTAGACGCTAGCGGCGAC	Amorce reverse utilisée pour l'amplification PCR du gène (prk) codant pour la phosphoribulokinase de la souche <i>Synechococcus</i> PCC 7942, et permettant l'intégration de sites de restrictions NdeI en amont et EcoRI en aval des fragments synthétisés
PRK_C7425_Fwd	GTACTACATATGACCTCTAAGCCAGACCGT	Amorce forward utilisée pour l'amplification PCR du gène (prk) codant pour la phosphoribulokinase de la souche <i>Cyanothece</i> PCC 7425, et permettant l'intégration de sites de restrictions NdeI en amont et EcoRI en aval des fragments synthétisés
PRK_C7425_Rev	TACGTAGAATTCCTACACCACAGCGGGTTC	Amorce reverse utilisée pour l'amplification PCR du gène (prk) codant pour la phosphoribulokinase de la souche <i>Cyanothece</i> PCC 7425, et permettant l'intégration de sites de restrictions NdeI en amont et EcoRI en aval des fragments synthétisés
Amorces pour vérifications des tailles et des séquences des cassettes d'expression clonées au sein des plasmides pC et pT		
pFC1_PRA1	GGCGACGTGCGTCCTCAAGC	Amorce forward pour vérifier l'insertion d'une cassette dans le pFC1 (pT) ou pC au niveau du MCS entre les deux sites de restriction NdeI et EcoRI et autres. L'amorce est située au niveau de la région du gène de résistance au chloramphénicol (Cm).
pFC1_ReR1	GTGTAACAAGGGTGAACAC	Amorce reverse pour vérifier l'insertion d'une cassette dans le pFC1 (pT) ou pC au niveau du MCS entre les deux sites de restriction NdeI et EcoRI et autres. L'amorce est située au niveau de la région du gène de résistance au chloramphénicol (Cm).
pFC1_seq_rev_Theo	CGTTTCAGTTTGCTCATGGA	Amorce reverse pour PCR et séquençage des inserts (rbc ou prk) dans le pFC1. Dans le pFC1, en aval de l'insert (rbc ou prk).
pFC1_Pra1_VBG	TCATAAATTGCTTTAAGGCG	Amorce forward pour PCR et séquençage des inserts (rbc ou prk) dans le pFC1. Dans le pFC1, en amont de l'insert (rbc ou prk).
pFC1_RER1_Celia	CGTAGCACCAGGCGTTTAAG	Amorce reverse pour PCR et séquençage des inserts (rbc ou prk) dans le pFC1. Dans le pFC1, en aval de l'insert (rbc ou prk).

pFC1_RbcS6803(rv_intra)	TAATTGGTAAATTGCTGTCG	Amorces internes pour VERIF interne opéron RBC dans pFC1 (PRK : les Amorces pFC1_Pra1&ReR1 suffisent)
pFC1_RbcS7002(rv_intra)	AGCTGCTGACTAATTAGACG	Amorces internes pour VERIF interne opéron RBC dans pFC1 (PRK : les Amorces pFC1_Pra1&ReR1 suffisent)
pFC1_RbcS7942(rv_intra)	ATGTGCCACACGTGGATAC	Amorces internes pour VERIF interne opéron RBC dans pFC1 (PRK : les Amorces pFC1_Pra1&ReR1 suffisent)
pFC1_RbcC7425(rv_intra)	TGGTTGTATCTTTGGATATT	Amorces internes pour VERIF interne opéron RBC dans pFC1 (PRK : les Amorces pFC1_Pra1&ReR1 suffisent)

Amorces pour l'expression de terpènes synthases au sein de sites neutres de différents châssis cyanobactériens

Amorces pour la vérification des plasmides plateformes pTwist+Amp+MC+a_b TwistBiosciences© qui seront utilisés pour le clonage de différentes cassettes d'expression

M13_Fwd	GTAAAACGACGGCCAGT	Amorce forward pour vérification de l'intégration de cassette d'expression (et séquençage) au sein du plasmide pTwist+Amp+MC+a_b de TwistBiosciences©
M13_Rev	CAGGAAACAGCTATGAC	Amorce forward pour vérification de l'intégration de cassette d'expression (et séquençage) au sein du plasmide pTwist+Amp+MC+a_b de TwistBiosciences©

Amorces pour l'assemblage Gibson et l'intégration de cassettes d'expression pour la production de terpènes au sein de sites neutres de différentes cyanobactéries

Pr-fwd-6803-pCA2.4	ctattggcactaagaatgatTTGACTATTTTACCTCTGGC	Amorce forward pour amplification PCR de la biobrique terpène FS, LS ou BS ainsi que son promoteur PR constituant la cassette d'expression PR-FS, PR-LS ou PR-BS présentes au sein des plasmides pCFS, pCLS ou pCBS. L'amorce chevauche la région a du SN NS_pCA2.4 (en 5') et le PR (en 3').
Pr-fwd-6803-pcc5 .2	aattgctggggaactgagatTTGACTATTTTACCTCTGGC	Amorce forward pour amplification PCR de la biobrique terpène FS, LS ou BS ainsi que son promoteur PR constituant la cassette d'expression PR-FS, PR-LS ou PR-BS présentes au sein des plasmides pCFS, pCLS ou pCBS. L'amorce chevauche la région a du SN NS_pCC5.2 (en 5') et le PR (en 3').

Pr-fwd-6803-slr0168	tactgtgaattaatctgatTTGACTATTTTACCTCTGG	Amorce forward pour amplification PCR de la biobrique terpène FS, LS ou BS ainsi que son promoteur PR constituant la cassette d'expression PR-FS, PR-LS ou PR-BS présentes au sein des plasmides pCFS, pCLS ou pCBS. L'amorce chevauche la région a du SN slr0168 (en 5') et le PR (en 3').
Pr-fwd-7942	gacgagcagggactcgaccTTGACTATTTTACCTCTGGC	Amorce forward pour amplification PCR de la biobrique terpène FS, LS ou BS ainsi que son promoteur PR constituant la cassette d'expression PR-FS, PR-LS ou PR-BS présentes au sein des plasmides pCFS, pCLS ou pCBS. L'amorce chevauche la région a du SN NS_7942 (en 5') et le PR (en 3').
Pr-fwd-7002	acttaaaaactgagtaagatTTGACTATTTTACCTCTGGC	Amorce forward pour amplification PCR de la biobrique terpène FS, LS ou BS ainsi que son promoteur PR constituant la cassette d'expression PR-FS, PR-LS ou PR-BS présentes au sein des plasmides pCFS, pCLS ou pCBS. L'amorce chevauche la région a du SN NS_7002 (en 5') et le PR (en 3').
Pr-LS-rev	cctgcaggtcTTAAGCAAAGGGCTCAAAC	Amorce reverse pour amplifier la biobrique terpène PR-LS via le plasmide pCLS. L'amorce chevauche la fin du gène LS (en 3') et le début du gène KmR (en 5').
Pr-FS-rev	cctgcaggtcTTACATGGGAACGGGTTC	Amorce reverse pour amplifier la biobrique terpène PR-FS via le plasmide pCFS. L'amorce chevauche la fin du gène FS (en 3') et le début du gène KmR (en 5').
Pr-BS-rev	cctgcaggtcTTATAGTGGCAACGGTTC	Amorce reverse pour amplifier la biobrique terpène PR-BS via le plasmide pCBS. L'amorce chevauche la fin du gène BS (en 3') et le début du gène KmR (en 5').
Pr_SS_rev_SS-Km	gcaggtcgacTTATTCTTCTCCTAAAGGAATTG	Amorce reverse pour amplification PCR de la biobrique Pr-SS. L'amorce chevauche la fin du gène SS (en 3') et le début du gène KmR (en 5').
KM-LS-fwd	cttgcttaaGACCTGCAGGGGGGGGGG	Amorce forward pour amplification de la biobrique KmR via le plasmide pUC4K. L'amorce chevauche la fin du gène LS (en 3') et le début du gène KmR (en 5').
KM-FS-fwd	tcccatgtaaGACCTGCAGGGGGGGGGG	Amorce forward pour amplification de la biobrique KmR via le plasmide pUC4K. L'amorce chevauche la fin du gène FS (en 3') et le début du gène KmR (en 5').

KM-BS-fwd	gccactataaGACCTGCAGGGGGGGGGG	Amorce forward pour amplification de la biobrique KmR. Chevauche la fin du gène BS (en 3') et le début du gène KmR (en 5').
KmR_fwd_SS-Km	agaagaataaGTCGACCTGCAGGGGGGGG	Amorce forward pour amplification de la biobrique KmR. Chevauche la fin du gène SS (en 3') et le début du gène KmR (en 5').
KM-rev-6803-pCA2.4	cttggggaacctgaaagatGACCTGCAGGGGGGGGGG	Amorce reverse pour amplification de la biobrique KmR via le plasmide pUC4K. L'amorce chevauche la région b du SN NS_pCA2.4 (en 5') et la fin du gène KmR (en 3').
KM-rev-6803-pcc5.2	ctagggactctgactaagatGACCTGCAGGGGGGGGGG	Amorce reverse pour amplification de la biobrique KmR via le plasmide pUC4K. L'amorce chevauche la région b du SN NS_pCC5.2 (en 5') et la fin du gène KmR (en 3').
KM-rev-6803-slr0168	ccgataatgccctgaggatGACCTGCAGGGGGGGGGG	Amorce reverse pour amplification de la biobrique KmR via le plasmide pUC4K. L'amorce chevauche la région b du SN slr0168 (en 5') et la fin du gène KmR (en 3').
KM-rev-7002	aaaacgagataaaataggatGACCTGCAGGGGGGGGGG	Amorce reverse pour amplification de la biobrique KmR via le plasmide pUC4K. L'amorce chevauche la région b du SN NS_7002 (en 5') et la fin du gène KmR (en 3').
KM-rev-7942	cttctgctccagaagccccGACCTGCAGGGGGGGGGG	Amorce reverse pour amplification de la biobrique KmR via le plasmide pUC4K. L'amorce chevauche la région b du SN NS_7942 (en 5') et la fin du gène KmR (en 3').
Pr_SS_fwd_NS-slr0168 Pr_BS_fwd_NS-slr0168 Pr_FS_fwd_NS-slr0168	tactgttgaattaatctgatTTGACTATTTTACCTCTGG	Amorce forward pour amplification PCR de la biobrique terpène SS ou BS ou FS et son promoteur PR constituant la cassette d'expression PR-SS, ou PR-BS ou PR-FS présente au sein du pCSS, ou pCBS ou pCFS. L'amorce chevauche la région a du SN slr0168 (en 5') et le PR (en 3').
Pr_SS_fwd_NS-pCA2.4 Pr_BS_fwd_NS-pCA2.4 Pr_FS_fwd_NS-pCA2.4	ctattggcactaagaatgatTTGACTATTTTACCTCTGG	Amorce forward pour amplification PCR de la biobrique terpène SS et son promoteur PR constituant la cassette d'expression pCSS, ou pCBS ou pCFS présentes au sein du pCSS, ou pCBS ou pCFS. L'amorce chevauche la région a du SN NS_pCA2.4 (en 5') et le PR (en 3').

Pr_SS_fwd_NS-pCC5.2 Pr_BS_fwd_NS-pCC5.2 Pr_FS_fwd_NS-pCC5.2	aattgctggggaactgagatTTGACTATTTTACCTCTGG	Amorce forward pour amplification PCR de la biobrique terpène SS et son promoteur PR constituant la cassette d'expression PR-SS ou PR-BS, ou PR-FS présente au sein du pCSS, ou pCBS ou pCFS. L'amorce chevauche la région a du SN NS_pCC5.2 (en 5') et le PR (en 3').
Pr_SS_fwd_NS-S7942 Pr_FS_fwd_NS-S7942	gacgagcagggactcgaccTTGACTATTTTACCTCTGG	Amorce forward pour amplification PCR de la biobrique terpène SS et son promoteur PR constituant la cassette d'expression PR-SS ou PR-FS présente au sein du pCSS, ou pCFS. L'amorce chevauche la région a du SN NS_7942 (en 5') et le PR (en 3').
Pr_SS_fwd_NS-S7002 Pr_LS_fwd_NS-S7002	acttaaaaactgagtaagatTTGACTATTTTACCTCTGG	Amorce forward pour amplification PCR de la biobrique terpène SS et son promoteur PR constituant la cassette d'expression PR-SS ou PR-LS présente au sein du pCSS, ou pCLS. L'amorce chevauche la région a du SN NS_7002 (en 5') et le PR (en 3').
Amorces standard de part et d'autre du MCS du plasmide plateforme (pTwist Biosciences©) pour vérification du clonage de cassettes d'expression		
M13_Fwd	GTAAAACGACGGCCAGT	Amorce forward pour PCR et séquençage des cassettes d'expression des terpènes synthases. Dans le ptwist en aval de la région b (quel que soit le châssis).
KmA9_For	ACGTTTCCCGTTGAATATGGCTC	Amorce reverse pour PCR et séquençage des cassettes d'expression des terpènes synthases. Dans le ptwist en aval de la région b (quel que soit le châssis).
Amorces internes à la cassette d'expression de la Bisabolène synthase (BS) pour séquençage au sein des châssis <i>E. coli</i> et cyanobactériens		
Bisabolene_Fw2	TGAGACCGACCAAGATAGC	Amorce forward pour séquençage de la cassette d'expression de la BS. Dans le gène de la BS.
Bisabolene_Fw3	TAGGCATTGGAACGAGCG	Amorce forward pour séquençage de la cassette d'expression de la BS. Dans le gène de la BS.
Bisabolene_Fw4	TATGACACCTACGGTACC	Amorce forward pour séquençage de la cassette d'expression de la BS. Dans le gène de la BS.
Bisabolene_Rv5	CAAGAACTCAAGGCACTTC	Amorce reverse pour séquençage de la cassette d'expression de la BS. Dans le gène de la BS.

Bisabolene_Rv6	GCGGTGTCATAGGCTGAT	Amorce reverse pour séquençage de la cassette d'expression de la BS. Dans le gène de la BS.
Amorces internes à la cassette d'expression de la Farnésène synthase (FS) pour séquençage au sein des châssis <i>E. coli</i> et cyanobactériens		
Farnesene_Fw2	TTGCTCCGCGCGAGTTACAT	Amorce forward pour séquençage de la cassette d'expression de la BS. Dans le gène de la FS.
Farnesene_Fw3	CCAAGGCCGTGATATGTTGA	Amorce forward pour séquençage de la cassette d'expression de la BS. Dans le gène de la FS.
Farnesene_Rv4	TCGAAAGTTGGTTAGCCAC	Amorce reverse pour séquençage de la cassette d'expression de la BS. Dans le gène de la FS.
Amorces internes à la cassette d'expression de la Limonène synthase (LS) pour séquençage au sein des châssis <i>E. coli</i> et cyanobactériens		
LS_Rv3	GATAGGCCCATGCGTTGAAGAT	Amorce reverse pour séquençage de la cassette d'expression de la LS. Dans le gène de la LS.
LS_Fw3	TGTCCGATTATAATGCCTCCG	Amorce forward pour séquençage de la cassette d'expression de la LS. Dans le gène de la LS.
Amorces internes à la cassette d'expression de la Santalène synthase (SS) pour séquençage au sein des châssis <i>E. coli</i> et cyanobactériens		
pCSS_Fw1	CTCGCTGGTTTATTGAGGCC	Amorce forward pour séquençage de la cassette d'expression de la SS. Dans le gène de la SS.
pCSS_Rv2	TGACCACATGTAGCTCTGCA	Amorce reverse pour séquençage de la cassette d'expression de la SS. Dans le gène de la SS.
pCSS_Rv1	TACTGTTCACCCAAGCT	Amorce reverse pour séquençage de la cassette d'expression de la SS. Dans le gène de la SS.
Amorces pour la vérification de l'introduction et de la ségrégation des cassettes d'expression au sein des copies génomiques de différents sites neutres de plusieurs souches cyanobactériennes		
Vérification de l'introduction et de la ségrégation des cassettes d'expression au sein des copies génomiques de la souche <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803		
NSslr0168_a_Fwd	GTTTACACCAGTAATATTGAACCTC	Amorce forward pour la vérification de l'introduction et de la ségrégation des cassettes d'expression clonées au sein du site neutre slr0168 de l'ensemble des copies génomiques de la souche <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803.

NSslr0168_b_Rv	TGGAGACTATCCAGGTAAACG	Amorce reverse pour la vérification de l'introduction et de la ségrégation des cassettes d'expression clonées au sein du site neutre slr0168 de l'ensemble des copies génomiques de la souche <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803.
NSpCA2.4_a_Fwd	ATTTTTGGCTTTAAATTCGTC	Amorce forward pour la vérification de l'introduction et de la ségrégation des cassettes d'expression clonées au sein du site neutre NS_pCA2.4 de l'ensemble des copies génomiques de la souche <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803.
NSpCA2.4_b_Rv	GGGGATAGTTGACGCAGTA	Amorce reverse pour la vérification de l'introduction et de la ségrégation des cassettes d'expression clonées au sein du site neutre NS_pCA2.4 de l'ensemble des copies génomiques de la souche <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803.
NSpCC5.2_a_Fwd	TAGCTATCTTGAAAGGAACTG	Amorce forward pour la vérification de l'introduction et de la ségrégation des cassettes d'expression clonées au sein du site neutre NS_pCC5.2 de l'ensemble des copies génomiques de la souche <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803.
NSpCC5.2_b_Rv	TAGGTATGGAGCCTCAACC	Amorce reverse pour la vérification de l'introduction et de la ségrégation des cassettes d'expression clonées au sein du site neutre NS_pCC5.2 de l'ensemble des copies génomiques de la souche <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803.
Vérification de l'introduction et de la ségrégation des cassettes d'expression au sein des copies génomiques de la souche <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942		
NS7942_a_Fwd	CACAGACATCTAGATAGTCCTCAA	Amorce forward pour la vérification de l'introduction et de la ségrégation des cassettes d'expression clonées au sein du site neutre NS_7942 de l'ensemble des copies génomiques de la souche <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942.
NS7942_a_Rv	CTGAAGCGGACATTGCTA	Amorce reverse pour la vérification de l'introduction et de la ségrégation des cassettes d'expression clonées au sein du site neutre NS_7942 de l'ensemble des copies génomiques de la souche <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942.
Vérification de l'introduction et de la ségrégation des cassettes d'expression au sein des copies génomiques de la souche <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002		

NS7002_a_Fwd	ATTGGGGAATAGTGCGAC	Amorce forward pour la vérification de l'introduction et de la ségrégation des cassettes d'expression clonées au sein du site neutre NS_7002 de l'ensemble des copies génomiques de la souche <i>Synechococcus</i> sp. PCC7002.
NS7002_b_Rv	ATGTGCTTTCAGCAAAAGTT	Amorce reverse pour la vérification de l'introduction et de la ségrégation des cassettes d'expression clonées au sein du site neutre NS_7002 de l'ensemble des copies génomiques de la souche <i>Synechococcus</i> sp. PCC7002.

Amorces pour le projet CP12		
Nom de l'amorce	Séquence (5'-> 3')	Caractéristiques
pEX_For	GGAGCAGACAAGCCCGTCAGG	Amorce forward utilisée pour la vérification de la taille et de la séquence des fragments clonés au sein du MCS du plasmide pEX.
pEX_Rev	AGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGC	Amorce reverse utilisée pour la vérification de la taille et de la séquence des fragments clonés au sein du MCS du plasmide pEX.
cp12 Fw	GGGCTGAACTCCAGAAAGGA	Amorces forward et reverse utilisées pour l'amplification de la région amont du gène cp12 et ajout du site de restriction SmaI
cp12 SmaI Rv	CCATCAGCCCCCGGGAAAGTTTAACCGCCTACGA TTGTCTACAGA	
cp12 SmaI Fw	GTAAACTTTCCCGGGGGGCTGATGGGGCAAACC CAATGGCCGCAA	Amorces forward et reverse utilisées pour l'amplification de la région aval du gène cp12 et ajout du site de restriction SmaI
cp12 Rv	GGCTACTCCATCAAGGGGAC	
SP6	TATTTAGGTGACACTATAG	Amorces forward et reverse utilisées pour la vérification de la taille et de la séquence des produits clonés dans le vecteur pGEM-T.
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	
cp12 up Fw	GGTCAGCAAAGTGAGGAAAA	Amorces forward et reverse utilisées pour contrôler la ségrégation dans les clones Δcp12::Kmr.
cp12 dwn Rv	AGGTAATTGTCACTGCTTCA	
5' Km Fw	TCGAGGCCGCGATTAAATTC	Amorces forward et reverse utilisées pour contrôler l'élimination du marqueur Kmr dans les clones cp12::SmSpr
3' Km Rv	GCGATTCCGACTCGTCCAAC	
5' SmSp Fw	AAGCGGTGATCGCCGAAGTA	

3' SmSp Rv	TGGTGATCTCGCCTTTCACG	Amorces forward et reverse utilisées pour contrôler l'élimination du marqueur SmSpr dans les clones cp12::SmSpr
Km <i>HincII</i> Fw	ACCTGCAGGGGGT CGAC GGAAAGCCAC	Forward and reverse primers used for Km ^r cassette amplification and <i>HincII</i> restriction sites addition
Km <i>HincII</i> Rv	GGCGCTGAGG TCGAC CTCGTGAAGAAG	
Sm/Sp_Rev2	GGCATCCAAGCAGCAAGC	Amorce reverse utilisée avec cp12_up_For pour vérification de la taille de la région avale
Sm/Sp(stop)_For	GCATTTGGTACAGCGCAG	Amorce forward utilisée avec cp12_down_rev pour vérification de la taille de la région amont

Amorces pour le projet de surproduction de la PRK de *Synechocystis* PCC 6803 dans *E. coli* et analyse du CCB *in vitro* (ANR).

Nom de l'amorce	Séquence (5'→ 3')	Caractéristiques
His6Tag_PRK_For	GTACTACCATGGATGCACCACCACCACCACCATAT GACCACACAGCTA GAC	Amorce forward permettant l'amplification PCR de la Phosphoribulokinase (PRK) de la souche <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 ainsi que l'intégration d'un tag His6 en amont de la séquence.
PRK_Rev(EcoRI)	GTACCATGGGAATTCTTACACAGAGGCCGGGA	Amorce reverse permettant l'amplification PCR de la Phosphoribulokinase (PRK) de la souche <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 ainsi que l'intégration d'un site de restriction enzymatique EcoRI en aval de la séquence.
T7_promoter_Amorce	TAATACGACTCACTATAGGG	Forward Amorce pour vérification de l'insertion (et le séquençage) de la Phosphoribulokinase (PRK) au sein du MCS du plasmide X.
T7_terminator_Amorce	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	Reverse Amorce pour vérification de l'insertion (et le séquençage) de la Phosphoribulokinase (PRK) au sein du MCS du plasmide X.

Chapitre 2. Méthodes

I. Biologie moléculaire

A. Extraction et purification des acides nucléiques

1) Resuspension des acides nucléiques

Les acides nucléiques synthétiques commandés à une entreprise tierce (EurofinsTM, Twist BioscienceTM), plasmides, fragments PCR et ADN génomique sont remis en suspension dans un tampon Tris-EDTA (TE) exempt de nucléase à pH 8,0 ou dans un tampon Tris-HCl 10 mM à pH 8,0 à la concentration souhaitée.

2) Extraction d'ADN plasmidique et génomique

a) Extraction de l'ADN plasmidique

L'extraction des plasmides portés par une culture *E. coli* est réalisée à l'aide du kit *NucleoSpin Plasmid Easypure* (Macherey-NagelTM) en suivant les instructions du fournisseur. Brièvement, quelques cellules sont mises en culture durant la nuit en LB à 37°C (ou 30°C pour les vecteurs d'expression thermorégulée) avec la pression de sélection adéquate. La culture est ensuite centrifugée et le culot bactérien resuspendu dans le tampon de resuspension (A1). Un tampon de lyse (A2) est ensuite ajouté afin de réaliser une lyse alcaline des cellules et permettre la libération des ADN chromosomiques, plasmidique et des protéines. Un tampon de neutralisation (A3) est alors ajouté pour interrompre la réaction de lyse et permettre la précipitation des protéines et de l'ADN chromosomique. La réaction est alors centrifugée ceci afin de séparer surnageant (contenant l'ADN plasmidique) et culot (contenant débris cellulaires et autres précipités). Le surnageant est alors déposé sur une colonne contenant une membrane de silice ; celle-ci présentant une forte affinité pour l'ADN, il va alors y avoir adsorption de l'ADN plasmidique sur la membrane. Un tampon de lavage (AQ) contenant de l'éthanol est ensuite ajouté afin de laver la colonne des impuretés (l'ADN n'est pas élué, car non soluble dans l'éthanol). Enfin, l'ADN plasmidique est élué de la membrane de silice via l'addition d'un tampon d'éluion (AE).

b) Extraction de l'ADN génomique

L'extraction de l'ADN génomique (ADNg) des châssis cyanobactériens est effectuée à partir de cultures en phase exponentielle de croissance ($DO_{750nm} \approx 0,6-1$). Les cellules sont centrifugées puis lavées dans de l'eau stérile 2-3X puis lysées avec un programme préconfiguré sur un thermocycleur *96 puits HID Veriti*TM d'Applied BiosystemsTM qui consiste en une succession de chocs thermiques (5min à 96 °C, 1min30 à 50 °C, 1min30 à 96 °C, 1min à 45 °C, 1min à 96 °C et 1min à 40 °C.). Les cellules lysées sont ensuite centrifugées et le surnageant utilisé comme support pour amplification PCR des fragments souhaités pour clonage ultérieur.

3) Purification des acides nucléiques

La purification des produits PCR (100pb-10kb) obtenus est ensuite réalisée à l'aide du kit *QIAquick PCR Purification* (Qiagen) en suivant les instructions du fabricant. Ce kit permet la purification des solutions d'acides nucléiques via l'élimination des sous-produits et des réactifs PCR communément utilisés : oligos, enzymes ou buffers.

Un spectrophotomètre à microvolumes (*NanoDrop*, Thermo Scientific™) est utilisé pour déterminer la concentration et la pureté d'une solution d'ADN. Un volume de 0,5-2 µL de la solution permet la quantification via la mesure de la densité optique à une longueur d'onde de 260 nm (zone d'absorbance maximale des acides nucléiques) ; d'autres mesures à 280 nm et 230 nm permettent de contrôler la pureté de l'extraction, à savoir la contamination protéique est déterminée par le ratio DO_{260}/DO_{280} et la contamination organique est déterminée par le ratio DO_{260}/DO_{230} . Les valeurs de ces ratios devant être comprises entre 1,8-2,0 et 2,0-2,2, respectivement.

4) Stockage des acides nucléiques

Le stockage des acides nucléiques à long terme (jusqu'à un an environ) est réalisé par congélation de l'ADN à -20 °C, pour un stockage encore plus long, ceux-ci seront congelés à -80 °C.

B. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Les réactions de polymérisation en chaîne (PCR) ont plusieurs fonctions : la synthèse de fragments d'ADN, leur assemblage et leurs analyses. Différentes polymérases peuvent être utilisées : la *Taq Polymérase* (Invitrogen) en routine (screening) et la *Phusion High-Fidelity Polymérase* (Thermo Fisher) ayant une activité de 'proof reading' pour la synthèse de fragments destinés à l'assemblage ou bien au séquençage. Cette dernière enzyme permet une amplification PCR rapide et à haute-fidélité (52X celle de la *Taq Polymérase*) de longs fragments (jusqu'à 20kbp) pouvant former des structures secondaires ou bien comporter des régions riches en GC difficiles à synthétiser sans erreurs. Les matrices d'appuis de PCR sont multiples : ADNg, plasmides, fragments d'ADN, les couples d'amorces (amorce sens et anti-sens) quant à eux sont uniques pour permettre une hybridation ciblée au segment de la matrice que l'on souhaite amplifier (voir Tableau 19. pour l'ensemble des amorces utilisées).

1) Synthèse de fragments synthétiques d'acides nucléiques

La PCR permet l'amplification de fragments synthétiques d'ADN qui seront ensuite assemblés ultérieurement pour la construction de cassettes d'expression ou de délétion.

2) Analyse des produits PCR

La PCR permet la vérification quantitative et qualitative des fragments amplifiés c'est-à-dire une vérification de leurs tailles, concentrations approximatives (par comparaison avec un marqueur à poids moléculaires de référence), orientations et de séquences.

L'analyse des produits PCR est réalisée après migration électrophorétique sur gel d'agarose dans un bain de tampon Tris-Borate-EDTA 0,5X (TBE) par application d'un champ électrique (voltage \approx 120V) afin de séparer les matrices d'acides nucléiques en fonction de leur taille

(poids moléculaire). La visualisation des produits PCR est possible après révélation du gel sous lampe UV grâce à l'agent intercalant de l'ADN, le bromure d'éthidium (BET). L'estimation de la taille des produits PCR est possible par comparaison des bandes fluorescentes avec le marqueur de poids moléculaire de référence *GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder* de Thermo Scientific™.

Pour les châssis *E. coli* et cyanobactériens, les PCR peuvent être réalisées à partir de cellules entières : le principe est appelé PCR colonies. Les colonies sont ramassées avec des pointes stériles et mises dans 25 µL de H₂O mQ. Les cellules sont ensuite lysées pour libérer l'ADN plasmidique et génomique puis le protocole de PCR standard du fabricant de la polymérase est finalement suivi.

C. Analyse des produits : séquençage

Une fois la matrice amplifiée par PCR, celle-ci est envoyée avec les primers adéquates à une entreprise tierce (Eurofins Genomics™) pour séquençage. Le kit utilisé est le *Mix2seq* d'Eurofins Genomics™, la matrice d'ADN purifiée peut-être envoyée sous deux formats : en produits PCR ou plasmidique en concentrations finales de 50-100ng/µL et 10 ng/µL respectivement.

D. Assemblage de l'ADN

1) Par restriction enzymatique puis ligation

Les matrices d'ADN à assembler (vecteur plasmidique ou fragments d'ADN) sont digérées au niveau d'une séquence de nucléotides spécifique appelée site de restriction par des enzymes de restriction New England BioLabs™. La ligation est ensuite réalisée grâce au kit *Quick Ligation*™ de New England BioLabs™ et la T4 DNA ligase qui permet d'accoler des fragments d'acides nucléiques à bouts francs ou cohésifs en quelques minutes à température ambiante (25°C).

2) Par la méthode d'assemblage GIBSON

L'assemblage GIBSON est une méthode de clonage moléculaire en une seule étape permettant la jonction de fragments d'ADN comportant des séquences d'appariement les uns avec les autres, grâce à la génération de bouts cohésifs. Cette méthode d'assemblage a été réalisée grâce au kit *NEBuilder® Hi-Fi DNA Assembly* de New England BioLabs™ (Figure 167.).

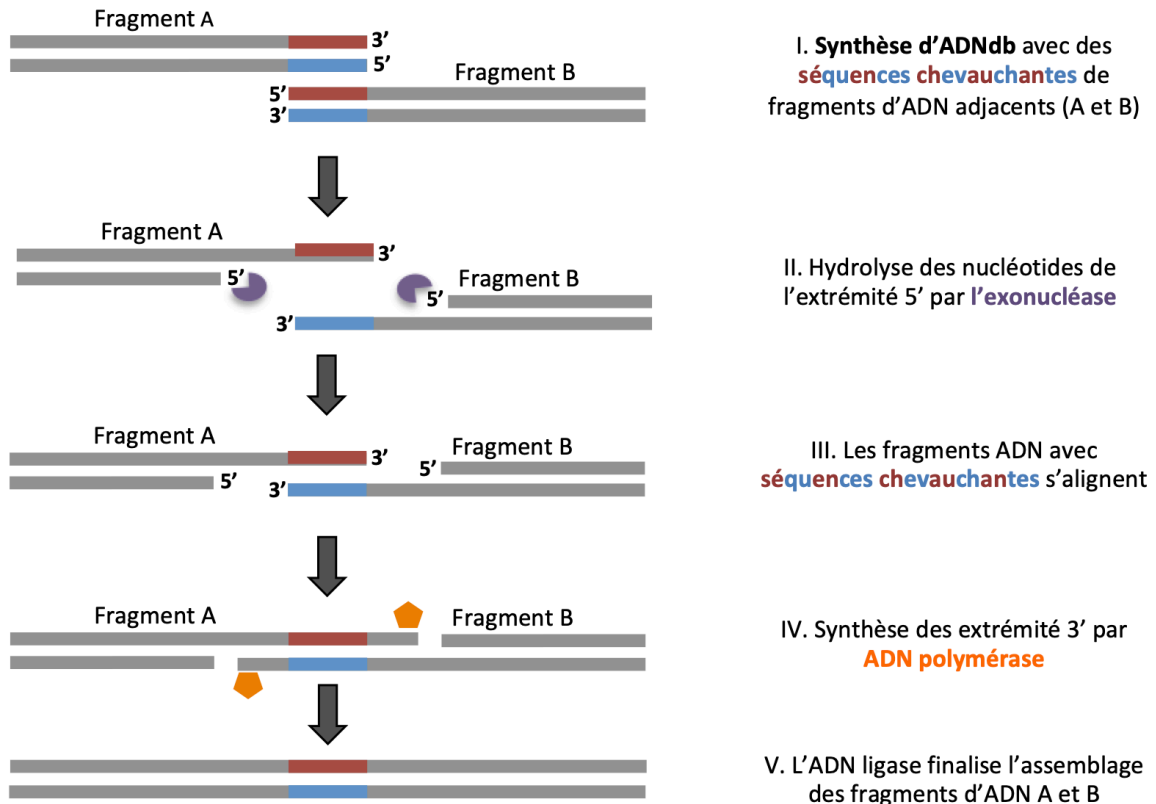


Figure 167. Principe de l'assemblage GIBSON

Au sein d'une unique réaction sont ajoutés les fragments d'ADN contenant de part et d'autre des séquences d'appariement de 15-30 pb (amplifiées par PCR), ainsi qu'un mélange réactionnel pourvu par le *NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix* avec une exonucléase T5, une ADN polymérase et ADN ligase. Le mélange réactionnel est incubé à 50°C pendant 15-60 minutes en fonction du nombre de fragments à assembler. Dans un premier temps, l'exonucléase vient catalyser l'hydrolyse des nucléotides de l'extrémité 5' des fragments d'ADN double brin, l'ensemble des fragments d'ADN ajoutés arbore des séquences simple brin aux extrémités 3'. A l'issue de cette étape il va y avoir reconnaissance par hybridation entre les extrémités cohésives et complémentaires des différents fragments d'ADN. Les fragments d'ADN appariés, l'ADN polymérase réalise alors la synthèse des extrémités 3'. L'ADN ligase finalise l'assemblage en catalysant la formation des liaisons phosphodiester entre deux fragments d'ADN. Cette réaction est rendue possible par le fait que l'ADN polymérase et l'ADN ligase sont thermostables, dès que la température d'incubation s'élève l'exonucléase T5 est dégradée. Le mélange réactionnel peut ensuite immédiatement être utilisé pour transformer les cellules compétentes *E. coli* ou bien stocké à -20°C.

- Calculs détaillés pour déterminer la concentration des différents fragments d'ADN pour l'assemblage GIBSON :

Pour un assemblage de 2-3 fragments, le ratio molaire d'ADN recommandé par le fabricant est vecteur:insert = 1:2 ; avec 0,03-0,2 pmols d'ADN final au sein du mélange réactionnel. Pour calculer le nombre de pmols de chaque fragment (en se basant sur leurs tailles et leurs poids) cette formule est utilisée :

$$\text{pmols} = (\text{poids en ng}) \times 1000 / (\text{paires de bases} \times 650 \text{ daltons})$$

Sachant que 50 ng de 5000 bp DNAdb est équivalent à 0,015 pmols et que 50 ng de 500 bp DNAdb est équivalent à 0,15 pmols.

Le kit d'assemblage GIBSON a été utilisé dans cette étude avec le vecteur pTwist Amp Medium Copy linéarisé pour la construction de différentes cassettes de surexpression de terpènes synthases (voir Tableau 18. Plasmides).

E. Transformation de *E. coli*

Les cellules des souches bactériennes de clonage (NEB10 β , TOP 10) sont rendues compétentes (capacité d'incorporation de l'ADN) par un traitement au chlorure de rubidium permettant la perméabilisation puis stockées à -80°C (Hanahan, 1985).

➤ Principe de la transformation

La transformation permet l'intégration d'une matrice d'ADN étrangère au sein d'une cellule receveuse hôte (voir Figure 168. ci-dessous). Dans le cadre de cette étude, la matrice d'ADN est à chaque fois sous la forme d'un vecteur plasmidique que l'on cherche à amplifier par transformation et culture bactérienne pour utilisation ultérieure au sein de souches cyanobactériennes.

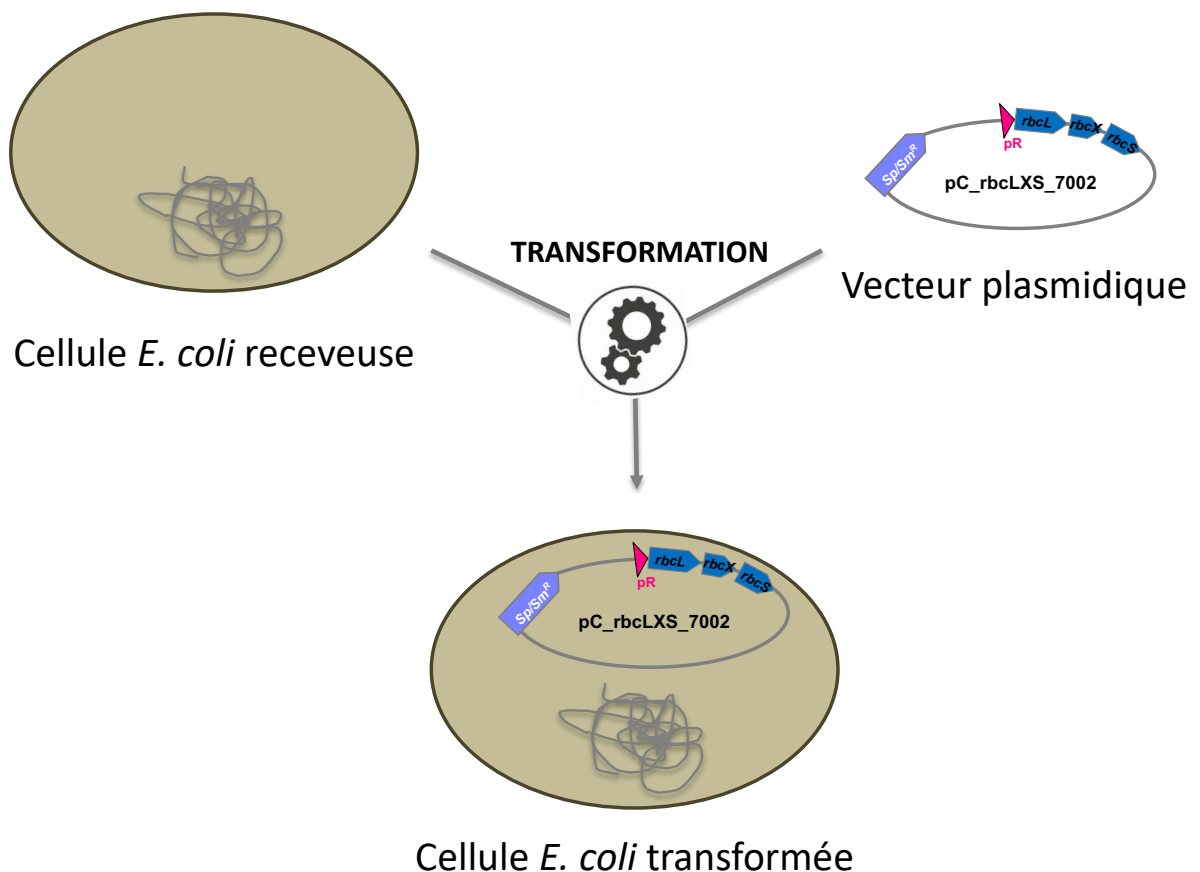


Figure 168. Principe de la transformation chez *E. coli*

Un vecteur plasmidique est intégré au sein d'une cellule bactérienne receveuse par le processus de transformation. A l'issue de la transformation, la cellule transformée comporte son ADNg (en gris) et le vecteur plasmidique.

➤ Protocole

Le mélange d'ADN assemblé (par restriction-ligation ou assemblage GIBSON) est mis en contact avec les cellules *E. coli* compétentes pendant 30 minutes à 4°C (adsorption de l'ADN sur la paroi des cellules) puis les cellules sont transformées par choc thermique à 42°C pendant 30 secondes (TOP 10, NEB10β) pour déstabiliser la paroi de l'ADN puis refroidies brutalement à 4°C pendant 5 minutes. Un milieu riche (LB ou SOC) est ensuite ajouté au mélange qui est incubé pendant 1 heure sous agitation à 30 ou 37°C (selon que le plasmide introduit est thermosensible ou non) pour permettre une régénération de la paroi des cellules. Les cellules sont ensuite étalées sur milieu solide LB avec les antibiotiques adéquats comme pression de sélection puis incubées durant la nuit à 30°C ou 37°C. Les clones 'transformants' apparus le lendemain sont analysés en suivant le protocole de 'PCR colonies' détaillé précédemment.

VI. Manipulation génétique chez les cyanobactéries

A. La transformation naturelle chez les cyanobactéries

1) Principe de la transformation naturelle

Les cellules des souches cyanobactériennes *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Synechococcus* sp. PCC 7942 et *Synechococcus* sp. PCC 7002 sont naturellement compétentes pour la transformation c'est-à-dire qu'elles sont capables de récupérer de l'ADN libre de leur environnement sans traitements induits de perméabilisation des cellules (Labarre *et al.*, 1989 ; Stevens and Porter, 1980).

Si l'ADN exogène intégré dans les cellules comporte des régions d'homologies avec le génome des cyanobactéries alors un phénomène de recombinaison homologue advient au niveau de ces plateformes. C'est sur ce principe que l'ingénierie du génome par transformation des cyanobactéries pour la délétion de gènes et l'intégration de cassettes d'expression est notamment rendue possible. La sélection des cellules alors génétiquement modifiées (ayant subi l'événement de recombinaison homologue) est ensuite réalisée via l'application d'une pression de sélection (antibiotique par ex). En effet, lors de manipulations génétiques dirigées, les cassettes hétérologues amenées contiennent un marqueur de sélection (cassette de résistance à un antibiotique par ex) flanqué entre ces plateformes d'homologies amont-avales. Les cyanobactéries étant des organismes polyploïdes, en comportant, en phase exponentielle de croissance, jusqu'à une dizaine de copies du chromosome par cellules. Lorsqu'un événement de recombinaison homologue intervient sur une copie chromosomique de la cellule il est alors nécessaire de propager cette copie mutée avec l'ensemble des copies sauvages pour obtenir un mutant totalement ségrégué ; ceci est opéré en intensifiant la pression de sélection (augmentation de la concentration en antibiotique par ex). Si des copies sauvages subsistent au sein des cellules, malgré la pression de sélection, on parle alors d'hétéropléidie et ceci peut être traduit par l'essentialité du *loci* génétiquement modifié (voir Figure 169. Ci-dessous du principe de la transformation).

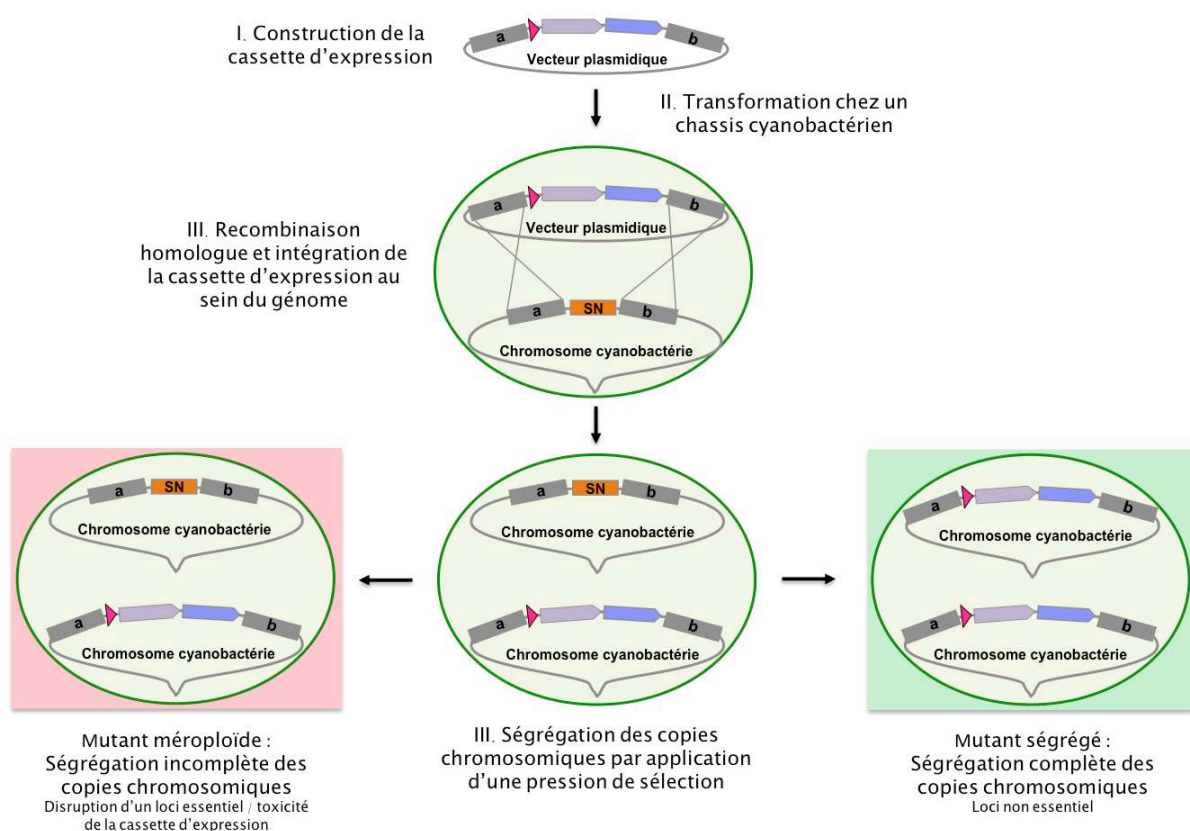


Figure 169. Principe de la transformation et de recombinaison homologue chez un châssis cyanobactérien

Les cassettes d'expression construites et portées par un vecteur plasmidique sont introduites au sein du châssis cyanobactérien par transformation. L'intégration de la cassette d'expression au sein d'un site ciblé du génome de la cyanobactérie désigné comme 'site neutre' (SN) s'effectue par recombinaison homologue au niveau des plateformes d'homologies amont (a) et aval (b). Le génome des cyanobactéries étant polyploïde, c'est-à-dire composée de plusieurs copies chromosomiques par cellules, il est nécessaire de propager les copies chromosomiques mutées (touchées par la recombinaison homologue) à l'ensemble des copies chromosomiques. Ceci est réalisé par l'application d'une pression de sélection maintenue pendant plusieurs générations. Deux issues se dégagent, celle d'un mutant méropléide où la ségrégation des copies chromosomiques est incomplète résultant de la disruption d'un locus essentiel à la viabilité cellulaire, et celle d'un mutant ségrégué avec une ségrégation complète des copies chromosomiques et pour qui le locus disrupté est non essentiel à la viabilité cellulaire.

2) Intégration de cassettes d'expression au sein de sites ciblés du génome désignés comme 'site neutre' (SN)

L'appellation 'site neutre' désigne une région génomique qui a été identifiée et utilisée de manière standardisée au sein d'un microorganisme dans laquelle l'intégration de séquences/gènes n'affecte pas la viabilité cellulaire, ni ne cause de modification métabolique identifiable (pour l'instant décrite ou observée dans la littérature).

Les régions génomiques des différents sites neutres sélectionnés pour les souches *Synechocystis* sp. PCC 6803 (1 pour intégration chromosomique et 2 pour intégration sur 2 petits plasmides endogènes : pCA2.4 et pCC5.2), *Synechococcus* sp. PCC 7942 (1 site neutre pour intégration chromosomique) et *Synechococcus* sp. PCC 7002 (1 site neutre pour intégration chromosomique) sont détaillées dans le Chapitre 4 « Résultats et Discussion », Partie 2.

3) Protocole de la transformation naturelle chez les 3 cyanobactéries modèles

Tableau 20. Protocole de transformation et analyse des transformants chez 3 châssis cyanobactériens modèles.

<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002
Mise en phase exponentielle (3X) (c'est-à-dire à $DO_{750nm} = 0,6-1$) de cultures de $V=25mL$ (en MM + antibiotique adéquat)		Mise en phase exponentielle (3X) (c'est-à-dire à $DO_{750nm} = 0,6-1$) de cultures de $V=25mL$ (en milieu A^+ + vitamine B12 + antibiotique adéquat)
Centrifugation des cultures (10 min, 5,000 rpm, RT)		
Resuspension des culots dans 10mL de MM 'neuf' et vortex		Resuspension des culots dans 10mL de milieu A^+ + vitamine B12 'neuf' et vortex
Centrifugation (bis) puis resuspension des culots dans 5mL de milieu MM 'neuf' et vortex		Centrifugation (bis) puis resuspension des culots dans 10mL de milieu A^+ + vitamine B12 'neuf' et vortex
Répartition des resuspensions en aliquots de 1mL		
Ajout de la solution d'ADN ($Cf=1 \mu g/mL$) dans 100 μL de tampon <i>T0,1 E</i> $pH=7,5$ puis doux vortex de 10-15s		Ajout de la solution d'ADN ($Cf=1,5 \mu g/mL$) dans 100 μL de tampon <i>T/0,1 E</i> $pH=7$ puis doux vortex de 10-15s
Incubation pendant 1h30 à 3500 luxes sans agitation (ouvrir les bouchons pour l'échange gazeux)		
Étaler 100 μL de la suspension par boîtes de MM + 1% Bacto Agar Difco avec ou sans pression de sélection (selon le génotype de la souche à transformer)		Étaler 100 μL de la suspension par boîtes de A^+ (+ vitamine B12) + 1% Bacto Agar Difco avec ou sans pression de sélection (selon le génotype de la souche à transformer)
Incubation des boîtes pendant 20h en pièce lumineuse à 30°C et 2500-3000 luxes		Incubation des boîtes pendant 20h en pièce lumineuse à 30°C et 3000-3500 luxes
Le lendemain, 400 μL d'antibiotiques sont ajoutés en dessous de la gélose des boîtes pour diffusion verticale progressive de la pression de sélection (pour la kanamycine par ex. 400 μL d'une solution à 4mg/mL sont ajoutés pour une concentration finale égale à 32 $\mu g/mL$ dans le milieu).		Le lendemain, 400 μL d'antibiotiques sont ajoutés en dessous de la gélose des boîtes pour diffusion verticale progressive de la pression de sélection (pour la kanamycine par ex. 400 μL d'une solution à 7mg/mL sont ajoutés pour une concentration finale égale à 56 $\mu g/mL$ dans le milieu).
Après 7-10 jours d'incubation, des transformants commencent à apparaître → ces clones sont alors resuspendus en spots sur milieu neuf avec antibiotique(s) de sélection adéquats en concentrations standards (ex : Km50) et plus élevées en parallèle pour commencer à ségréger les copies mutantes (ex : Km300).		
Après 2-3 jours, ces clones sont une nouvelle fois resuspendus en spots sur milieu neuf + antibiotique(s) en concentrations plus élevées (ex : Km300) seulement. Une fois la biomasse suffisante, une première PCR#1 est réalisée pour valider la ségrégation de la cassette au sein des multiples copies de chromosome des souches cyanobactériennes.		
Enfin, les transformants sont resuspendus sur un milieu sans pression de sélection (X2) puis le non-retour de copies sauvages du chromosome des souches cyanobactériennes est vérifié par PCR#2.		

Le cas de la transformation naturelle au sein des plasmides endogènes du génome de la souche *Synechocystis* sp. PCC 6803 est sensiblement différent. En raison du nombre de copies plus élevé des plasmides endogènes pCA2.4 et pCC5.2 par copies chromosomique, des resuspensions supplémentaires des clones sont réalisées ainsi qu'une augmentation de la concentration en antibiotiques ; ceci, afin d'augmenter les chances de ségrégation complète des transformants.

B. La conjugaison chez les cyanobactéries

La conjugaison chez les cyanobactéries est un système de transfert de matériel génétique réalisé en tripartit entre une souche d'*E. coli* portant le plasmide répliatif d'intérêt dérivé du plasmide RSF1010 (IncQ) qui peut se répliquer au sein d'un grand nombre de cyanobactéries, une souche d'*E. coli* CM404 portant le plasmide mobilisateur pRK2013 (un plasmide mobilisateur autotransférable dérivé du plasmide IncP1, qui ne se réplique pas au sein des cyanobactéries et qui est nécessaire au transfert par conjugaison) et une souche cyanobactérienne receveuse. Cette méthode a été développée au laboratoire chez la souche modèle *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Mermet-Bouvier et Chauvat, 1994). La conjugaison à 3 partenaires s'établit de la manière suivante : en premier lieu le plasmide pRK2013 porté par les cellules *E. coli* CM404 est transféré spontanément au sein des cellules *E. coli* portant le plasmide d'intérêt ; ce plasmide codant pour un ensemble de gènes appelé 'F factor' permet *in fine* le transfert du plasmide d'intérêt vers le châssis cyanobactérien par contact physique entre cellules donneuses et receveuses via un mécanisme encore mal connu qui générerait un transfert de matériel génétique par l'intermédiaire d'un pili.

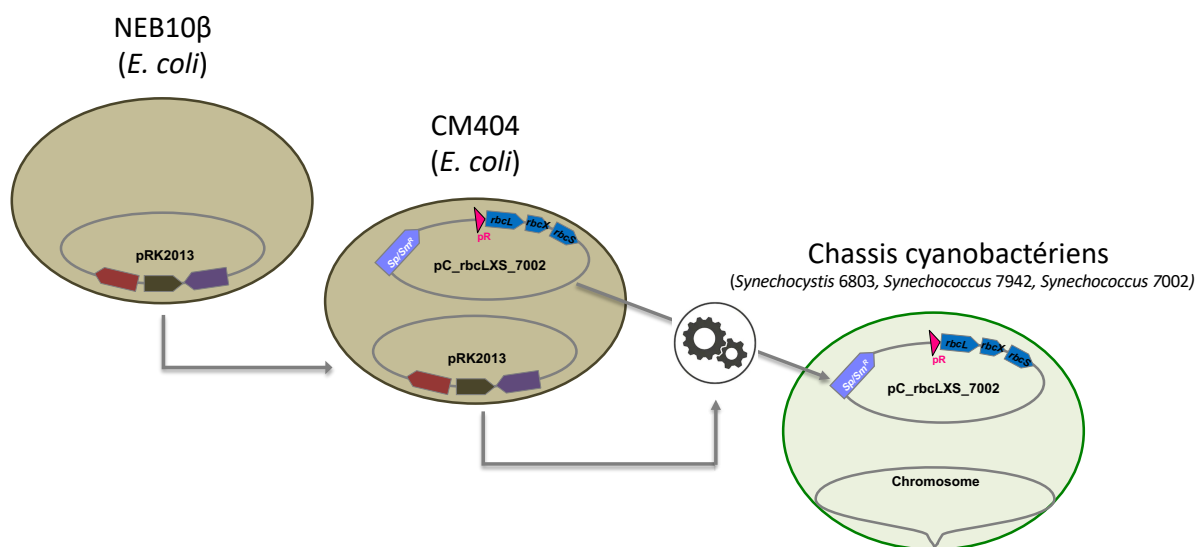


Figure 170. Principe de la conjugaison à 3 partenaires

Les souches des 3 partenaires sont dans un premier temps mises en culture, durant la nuit en LB pour les souches *E. coli* et 2-3X en phases exponentielles en MM ou milieu A⁺ + vitamine B12 selon les souches cyanobactériennes. Ces cultures sont ensuite récoltées puis centrifugées et lavées 2 fois dans du milieu frais pour être ensuite toutes trois mélangées à raison de 3.10⁸ cellules par souche. 30 µL de cette coculture sont déposés en spots sur boîte MM sans pression de sélection et incubés pendant à 2500 lux ($\approx 35 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) et 30°C pendant 24h pour *Synechocystis* sp. PCC6803, 48h pour *Synechococcus* sp. PCC7942 et 72h pour *Synechococcus* sp. PCC7002. Le spot de conjugaison est ensuite resuspendu et étalé sur boîte MM ou A⁺ + vitamine B12 avec la pression de sélection adéquate. Les clones conjuguant apparaissent généralement au bout de 7-10 jours de croissance. La vérification par PCR est ensuite réalisée pour déterminer la présence du plasmide d'intérêt au sein des conjuguant obtenus.

- Dans cette étude la conjugaison a été utilisée pour (sur)exprimer des gènes codants pour des enzymes du CCB, ou bien des terpènes synthases (pour la production de santalène, farnésène, bisabolène, limonène) et ceci au sein de vecteurs réplicatifs autonomes sans affecter l'intégrité chromosomique des châssis cyanobactériens (voir Tableau 19. Plasmides).

Chapitre 3. Analyses phénotypiques des souches mutantes de l'étude

I. Test de croissance

Les comparaisons de croissance entre souches sauvages et souches mutantes de différents châssis cyanobactériens sont réalisées soit en conditions standard (2500 lux, 30°C) soit en modifiant ces paramètres (intensité lumineuse, température) soit en modifiant leur milieu de culture standard (MM ou A+ selon la souche étudiée) ou bien leur composition (concentration et source en carbone, azote *etc.*).

En milieu liquide, les comparaisons de croissance sont opérées après plusieurs passages (2-3X) en phase exponentielle ($DO_{750nm}=0,6-1$) des souches à étudier. Les cultures sontensemencées dans du milieu 'neuf' à une DO_{750nm} initiale (DO_i) appropriée à l'expérience. Les cultures sont ensuite suivies dans le temps par prise de DO_{750nm} , photos, spectres d'absorbance *etc.*

En milieu solide, les tests de croissance sont réalisés en spots tests c'est-à-dire en dépôt de gouttes à dilutions sériées (facteur de dilution = 5) sur boîtes contenant du milieu solidifié. Les souches à suivre sont également amenées plusieurs fois en phase exponentielle avant d'être 'spottées' sur milieu solide. Les boîtes sont ensuite incubées dans une pièce lumineuse à 30°C et à l'intensité lumineuse souhaitée. Les concentrations cellulaires (intensité des spots/nombre de colonies) et pigmentations sont ensuite évaluées par la prise de photos au cours du temps afin de comparer les croissances des différentes souches.

II. Mesure du contenu en pigments des cyanobactéries

La mesure du contenu en pigments des cyanobactéries modèles est réalisée par spectre d'absorbance avec le spectrophotomètre JENWAY.

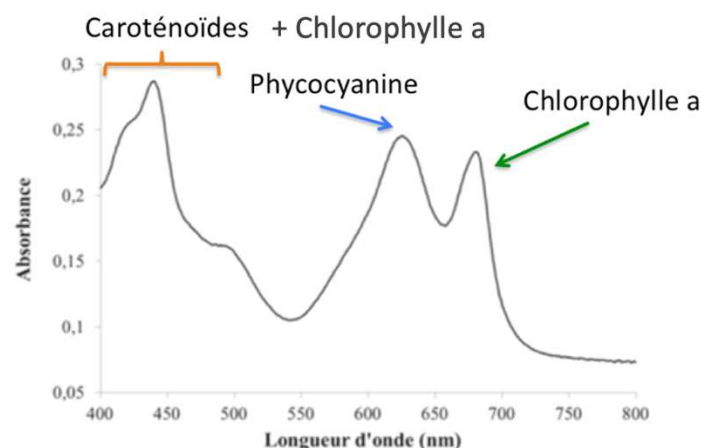


Figure 171. Spectres d'absorption des cellules de *Synechocystis*

III. Mesure de la production et de la consommation du pouvoir réducteur (NAD(P)H)

A. Principe

La fluorescence émise par les produits de la photosynthèse, le NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) et le NADH (nicotidamine adénine dinucléotide) réduits, peut-être mesurée *in vivo* avec l'aide d'un appareil de fluorométrie : le DUAL PAM équipé avec le module NADPH/9-AA (Walz, Germany). Ce principe permet ainsi la mesure de l'état métabolique des cellules à l'obscurité (après un court instant de flashes lumineux) via l'observation de la diminution émise de fluorescence par la consommation de NADPH.

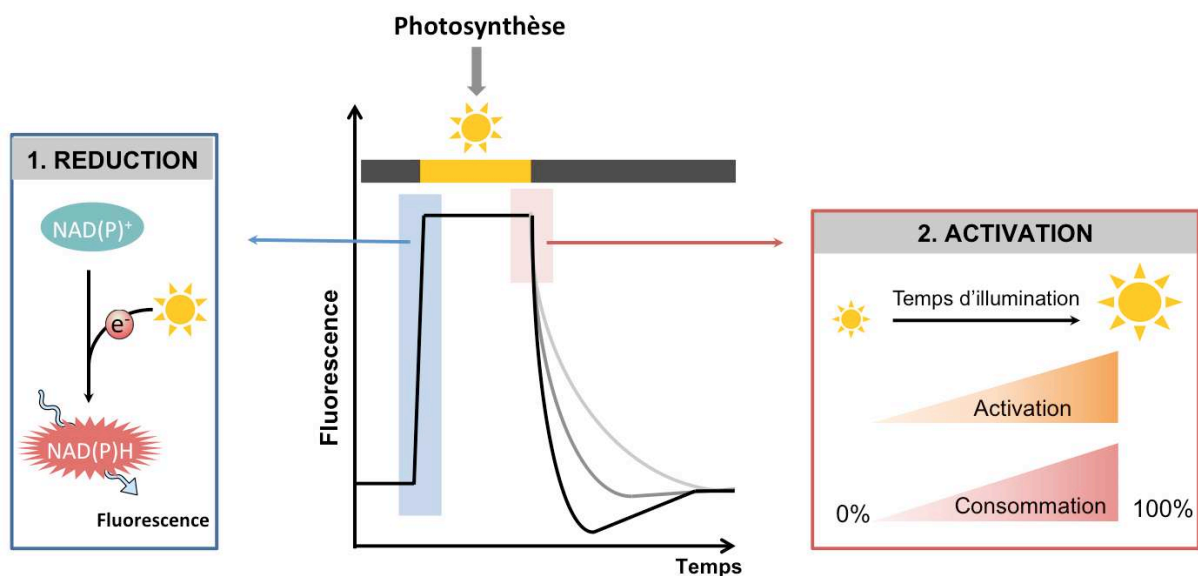


Figure 172. Principe de mesure par DUAL-PAM de l'état métabolique des cellules par la dynamique du pouvoir réducteur chez *Synechocystis sp. PCC 6803*.

En présence de lumière, la chaîne photosynthétique va être activée et les cofacteurs oxydés (NAD(P)⁺ et NAD(P)H) vont ainsi être réduits en pouvoir réducteur. Dans le montage expérimental, la lumière du soleil sera mimée par une lumière actinique saturante venant exciter les pigments photosynthétiques à une longueur d'onde de 365 nm. Sous leur forme réduite, ces cofacteurs vont émettre de la fluorescence et c'est cette fluorescence émise par NADPH et NADH, détectée entre les longueurs d'ondes 420-580 nm, qui est symbolisée en fonction du temps par la courbe. Cette production de pouvoir réducteur va induire progressivement une activation des voies anaboliques (Cycle de Calvin notamment) et donc la consommation du pool de NAD(P)H. Le retour de l'obscurité (lorsqu'il n'y a plus d'illumination) se traduit pas un arrêt de la production de NADPH par la chaîne photosynthétique. Enfin la consommation et production de NAD(P)H profilent un retour à l'équilibre (notamment par la voie des pentoses phosphate).

B. Protocole expérimental

L'expérience a été effectuée en collaboration avec Pierre Sétif du Laboratoire des Mécanismes fondamentaux de la Bioénergétique (LMB) du CEA Saclay. Les résultats de l'expérience seront détaillés dans le Chapitre 5.

Les cultures de cyanobactéries de la souche *Synechocystis sp. PCC 6803* sont amenées 2-3X en phase exponentielle ($DO_{750nm} \approx 1$ soit $2,6 \cdot 10^7$ cellules/mL) pour le jour de l'expérience. Les cyanobactéries sont cultivées dans du MM + FeCl₃ 2X concentré, soit 34 μ M final (au lieu de

des 17 μM du MM 'standard'). Les cellules sont lavées, centrifugées puis resuspendues à une $\text{DO}_{365\text{nm}} \approx 0,5$ (spectrophotomètre AmincoTM DW2) dans du milieu frais ; ceci, car une forte fluorescence de fond est excrétée par les cyanobactéries pendant la croissance.

Avant de lancer les acquisitions, la cuve contenant l'échantillon est mise à l'obscurité pendant 10 min sous agitation dans la chambre du spectrophotomètre afin que le flux d'électrons lié à la photosynthèse au niveau de la phase photochimique cesse (et qu'il n'y ait ainsi plus de production de pouvoir réducteur par la chaîne photosynthétique).

Pour chacun des échantillons des réplicats techniques seront accumulés sous le format 'd'acquisitions' afin d'améliorer le signal et réduire le bruit de fond.

Les pigments photosynthétiques sont excités par une lumière rouge actinique saturante (620-635nm) à une longueur d'onde de 365 nm et à une intensité lumineuse de 12 (échelle de 1 à 20). La fluorescence émise par NADPH et NADH est détectée entre les longueurs d'ondes 420-580 nm par un photomultiplicateur (filtre chromatique à bande large) à une fréquence de 5000 Hz durant les longues illuminations pour minimiser les effets actiniques de la lumière et diminuer le bruit de fond, mais elle est réduite à 100 Hz durant les courtes illuminations pour éviter une trop grande excitation des pigments au détriment de la précision.

Différents types et durées de flash lumineux sont appliqués :

- Flash lumineux long (45 secondes)
- Lumière continue avec des flashes d'obscurité de 3 secondes
- Flash lumineux court (0.5s)

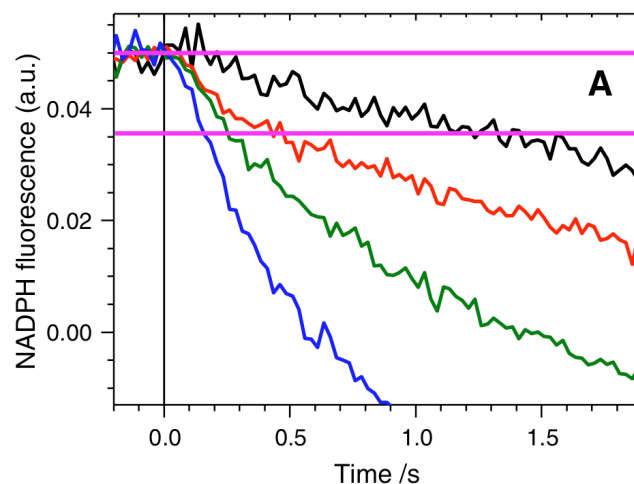


Figure 173. Fluorescence émise par les cofacteurs NAD(P)H après différents temps d'illuminations. Représentation des diminutions émises de fluorescence (et donc de la vitesse de consommation de NAD(P)H qui est proportionnelle à la durée d'illumination) après des temps d'illuminations de 0.5s pour la courbe noire, 2s pour la courbe rouge, 8s pour la courbe verte et 32s pour la courbe bleue. La fin de l'illumination correspond au temps 0.0s. Figure extraite de l'article de Kauny and Setif., 2014.

Le traitement et l'analyse des données (moyennage des acquisitions, mise en parallèle des résultats) ont été réalisés avec Excel, et sont détaillés dans le Chapitre 5.

VII. Microscopie à fluorescence pour observation des PHB par le Nile Red

A. Principe

L'observation au microscope inversé à fluorescence du marquage intracellulaire chez les cellules cyanobactériennes, de granules de polyhydroxybutyrate (PHB) a été réalisée avec le Nile Red, un fluorophore lipophile.

B. Préparation des cultures de cyanobactéries, de la solution de marquage et des échantillons

- Les cultures de cyanobactéries de la souche *Synechocystis* sp. PCC 6803 sont, dans un premier temps, amenées 2-3X en phase exponentielle avant l'expérience. La veille de l'observation au microscope à fluorescence, les cultures sontensemencées dans un milieu MM concentré à 55mM de glucose et incubées à 30°C sous faible intensité lumineuse (1500 luxes) pendant 24h (croissance en mixotrophie).
- La solution de marquage est élaborée grâce à 2 composés que sont le Nile Red, un fluorophore lipophile et l'heptane un solvant organique non miscible et plus léger que l'eau (masse volumique $\rho = 0,6$).
Afin d'optimiser le ratio signal/background une concentration affinée de la solution de Nile Red est établie à 10 $\mu\text{g/mL}$, soit 10 μg de Nile Red (Sigma) dissous dans 1mL d'heptane.
- Le jour de l'expérience, la préparation de l'échantillon est effectuée de la manière suivante : 1 mL d'une culture de cyanobactéries *Synechocystis* sp. PCC 6803 à $\text{DO}_{750\text{nm}} = 1$ est prélevée (soit environ $4,5 \cdot 10^7$ cellules) puis centrifugées (5 min, 10000 rpm, température ambiante). Les cellules sont ensuite resuspendues dans 450 μL d' H_2O mQ et 50 μL de la solution de marquage au Nile Red à 10 $\mu\text{g/mL}$ sont ajoutés. L'échantillon est ensuite incubé dans un thermomix (*Thermomixer comfort* d'Eppendorf™) à l'obscurité (10 min, 800 rpm, température ambiante) puis centrifugé (1 min, 10000 rpm, température ambiante) ; deux phases disjointes sont alors observées : le culot de culture et l'heptane (ce dernier devra être éliminé (par pipetages) en faisant attention à ne pas perdre trop de cellules). Les cellules sont finalement resuspendues dans 500 μL d' H_2O mQ (variable). 3 μL de cette suspension concentrée (cellules + solution de marquage) sont prélevés pour l'assemblage de la lame et le dépôt d'huile à immersion.
- Pour la préparation des échantillons de cellules cyanobactériennes sans marquage, 1 mL de culture est centrifugé (1 min, 13000 rpm, température ambiante) puis lavé et resuspendu dans 50 μL d' H_2O mQ). 3 μL de cette suspension concentrée sont prélevés pour l'assemblage de la lame et le dépôt d'huile à immersion.

C. Configuration du microscope inversé à fluorescence pour l'observation des PHB

L'observation est réalisée à l'aide d'un objectif x100 (Zeiss) monté sur un microscope inversé à fluorescence (Leica DM IRE2). En fonction du solvant de la solution de marquage au Nile Red, les spectres d'émission et d'absorption du Nile Red varient. L'heptane a ainsi été sélectionné comme solvant organique, car ses spectres d'excitation et d'émission concordent

avec le filtre : ‘Semrock FITC2024b-LSC-Zero’ (position verte) du microscope Leica DM IRED2 (voir Tableau 22. ci-dessous)

Pour les observations de cellules cyanobactériennes sans marquage, seul le filtre passe bande Semrock TxRed 4040c-LSC-Zero sera utilisé pour observer la fluorescence de la chlorophylle.

Tableau 21. Propriétés de fluorescence du Nile Red dans différents solvants organiques.

Le tableau est adapté de la publication de Greenspan *et al.*, 1985. Les propriétés de fluorescence du Nile Red ont été analysées à une concentration de 1µg/mL dans l’ensemble des solvants.

Solvant	Longueur d’onde d’excitation maximum (en nm)	Longueur d’onde d’émission maximum (en nm)	Intensité de fluorescence relative
Eau	591	657	18
Ethanol	559	629	355
Acétone	536	608	687
Chloroforme	543	595	748
Iso-amylacétate	517	584	690
Aylène	523	565	685
n-Dodécane	492	531	739
n-Heptane	484	529	585

Tableau 22. Configuration et propriétés optiques des filtres passe-bandes du microscope inversé à fluorescence Leica DM IRE2.

Position	Référence du filtre	Spectre d’excitation	Spectre d’émission
Bleu	Semrock DAPI 1160b-LSC-Zero	387 nm (± 11)	447 nm (± 60)
Vert	Semrock FITC 2024b-LSC-Zero	485 nm (± 20)	524 nm (± 24)
Rouge	Semrock TxRed 4040c-LSC-Zero	562 nm (± 40)	624 nm (± 40)
Rouge lointain	Semrock Cy5 4040c-LSC-Zero	628 nm (± 40)	692 nm (± 40)

Les photos des observations seront ensuite traitées à l’aide d’un logiciel de traitement d’image (Image J) et résulteront de la superposition des photos prises avec les filtres passe-bandes vert (marquage des PHB) et rouge (fluorescence de la chlorophylle) du microscope.

VIII. Mesure de la production de terpènes par de la chromatographie phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS)

Je vais présenter ici les différentes étapes de mise en culture des cyanobactéries productrices de terpènes, la préparation des échantillons pour le dosage des terpènes 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), mises au point par d'anciens membres du laboratoire : Xavier Kammerscheit, Encarnación Díaz-Santos, et Célia Chenebault.

A. Mise en culture des souches modèles de cyanobactéries dans un intérêt de production

1) Mise en culture des souches de cyanobactéries productrices de terpènes

Les souches modèles productrices de terpènes sont mise en culture en milieu liquide calibré à une DO_{i750nm} initiale de 0,02 correspondant respectivement 9×10^5 cellules/mL pour la souche *Synechocystis* sp. PCC 6803, $1,4 \times 10^6$ cellules/mL pour la souche *Synechococcus* sp. PCC 7942 et 2×10^6 cellules/mL pour la souche *Synechococcus* sp. PCC 7002.

Cette concentration cellulaire a été utilisée pour chaque souche de cyanobactérie afin d'avoir un aperçu de l'ensemble des phases de croissance (latence, exponentielle et stationnaire) sur une période de 3 semaines.

Ces cultures ont été préparées à partir de précultures repiquées plusieurs fois en milieu de phase exponentielle, afin que celles-ci soient dans leurs meilleurs états physiologiques avant la mise en production d'une part et pour d'autre part pouvoir standardiser nos expériences. Pratiquement, les inoculums sontensemencés dans 50mL de milieu neuf (avec antibiotiques) d'erlens en verre de 250mL avec des bouchons en papier standardisés permettant la standardisation des échanges gazeux entre l'intérieur de l'erlenmeyer et l'environnement extérieur.

Enfin, 10 mL de dodécane (Sigma Aldrich, 20 v/v_{tot}) sont ajoutés aux 50mL de culture. Le dodécane étant une molécule hydrophobe, son émulsion va permettre de piéger les molécules de terpènes volatiles synthétisées par les cyanobactéries. Les terpènes produits par les cyanobactéries sont alors concentrés 5 fois dans le dodécane par rapport à leur concentration dans le milieu de culture (soit $[C]$ en $mg/L_{dodécane} = 5 \times [C]$ $mg/L_{culture}$).

Les cultures en erlenmeyer sont placées dans un incubateur photolumineux de vitesse d'agitation 140rpm, à 30°C et 2500lux et suivies régulièrement sur 3 semaines par prise de DO_{750nm} et d'échantillons de 400 μ L de dodécane (2 à 3 fois par semaine) ; à l'arrêt de l'agitation, une couche de dodécane se forme à la surface de la culture permettant son prélèvement.

2) Suivi et quantification de la production en terpènes au cours de la croissance des cyanobactéries

Le suivi de la production de terpène par des cyanobactéries mutantes exprimant un gène codant pour une terpène synthase se décompose en plusieurs étapes (Figure 174.).

Au cours des phases de croissance des cyanobactéries, des échantillons de 400 μL de dodécane sont collectés des cultures deux à trois fois par semaine pendant une durée de 3 semaines : à J3, J7, J10, J12, J14, J17, J19 et J21. Le premier échantillon est prélevé seulement 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. Des échantillons sont ensuite préparés pour analyse GCMS. Pour chaque temps de prélèvement, 200 μL de dodécane (contenant les terpènes piégés produits par les souches productrices de terpènes) sont mélangés avec 0,01g/L d'étalon interne 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.

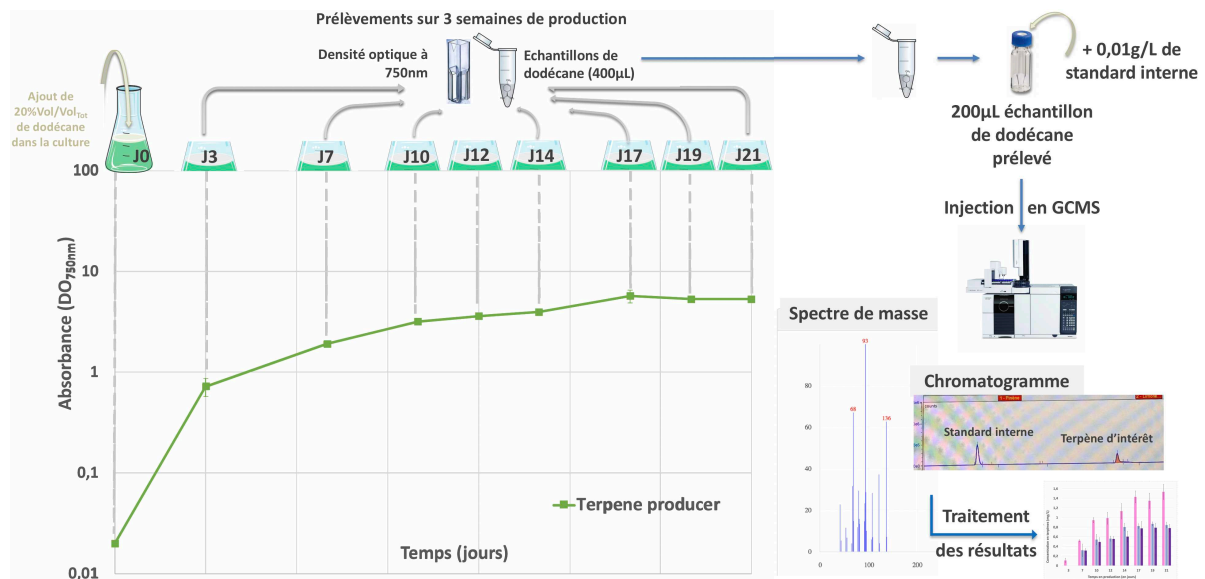


Figure 174. Schéma de synthèse du suivi de la production de terpènes des cyanobactéries mutantes, de la prise d'échantillons au traitement des résultats.

Les prises régulières d'échantillons de dodécane pendant les 3 semaines de production permettent un suivi de l'évolution de la production en terpènes par les châssis producteurs, mais entraîne une diminution du $\text{Vol}/\text{Vol}_{\text{tot}}$ de dodécane au sein des culture et donc une concentration des terpènes dans le dodécane au fur et à mesure du temps de production. Ce facteur est pris en compte dans le traitement de nos données pour calculer la production en $\text{mg}/\text{L}_{\text{culture}}$.

Tableau 23. Traitement des données issues des résultats d'analyse après injections en GCMS des échantillons préparés en chromacoles : de l'aire des pics chromatographiques aux concentrations en $\text{g}/\text{L}_{\text{culture}}$.

Temps	Aire terpène	Aire Standard Interne	$[C_{\text{dod}}]$ ($\text{g}/\text{L}_{\text{dodécane}}$)	$V_{\text{dodécane}}^{\text{prélevé}}$ (mL)	$V_{\text{dodécane}}^{\text{restant}}$ (mL)	$g_{\text{dodécane}} = g_{\text{culture}}$	V_{culture} (mL)	$[C_{\text{cult}}]$ ($\text{g}/\text{L}_{\text{culture}}$)
T_1	E_1	IS_1	$C_{1\text{dod}} = (E_1 / IS_1) / \text{coefficient directeur (gamme étalon)}$	0,35	$V_{\text{dod1}} = 10 \text{ mL}$	$g_1 = (C_{1\text{dod}} \times V_{\text{dod1}}) / 1000$	$V_{\text{cult1}} = 50 \text{ mL}$	$C_{\text{cult1}} = g_1 / V_{\text{cult1}} / 1000$

T ₂	E ₂	IS ₂	$C_{2dod} = (E_2 / IS_2) /$ coefficient directeur (gamme étalon)	0,35	$V_{dod2} =$ $V_{dod1} -$ 0,35	$g_2 = ((C_{2dod}$ $\times V_{dod2})$ $/1000) +$ $(C_{1dod} \times$ $0,35)/1000$	$V_{cult2} =$ $V_{cult1} -$ évaporati on	$C_{Cult2} = g_2 /$ $V_{cult2} / 1000$
----------------	----------------	-----------------	--	------	--------------------------------------	--	---	---

B. Préparation des échantillons de dodécane pour le dosage des terpènes par GC-MS.

Le prélèvement de dodécane est utilisé pour la quantification par GC-MS du terpène produit : 200 µL de l'échantillon de dodécane est transféré dans un chromacole (Fisherbrand™ Flacon de 8 mm à col vissant, verre transparent de 1,65 mL, insert de 200 µL) auquel 10 mg/L de standard interne sont ajoutés (voir Tableau 25. et 26).

Tableau 24. Liste des références des solutions mères utilisées pour le dosage des terpènes

Terpènes	Référence des solutions mères commerciales
S-(-)-limonène	62128, Supelco
α-pinène	80599, Supelco
Mix d'isomères de farnésène et de bisabolène	W383902 Sigma Aldrich
Huile de bois de santal	Firmenich
β-caryophyllène	75541 Supelco
Cis/trans-nerolidol	00459 Sigma Aldrich

Tableau 25. Concentrations et volumes des standards internes ajouté aux 200µL d'échantillon de dodécane collectés contenant les terpènes d'intérêt 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 aux 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

C. La quantification des terpènes par de la chromatographie phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS)

1) Principe de la GC-MS

La méthode analytique GC-MS combine les performances de la chromatographie en phase gazeuse, pour la séparation des composés d'un échantillon en molécules volatiles, et de la spectrométrie de masse, pour l'identification et la quantification des composés en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z).

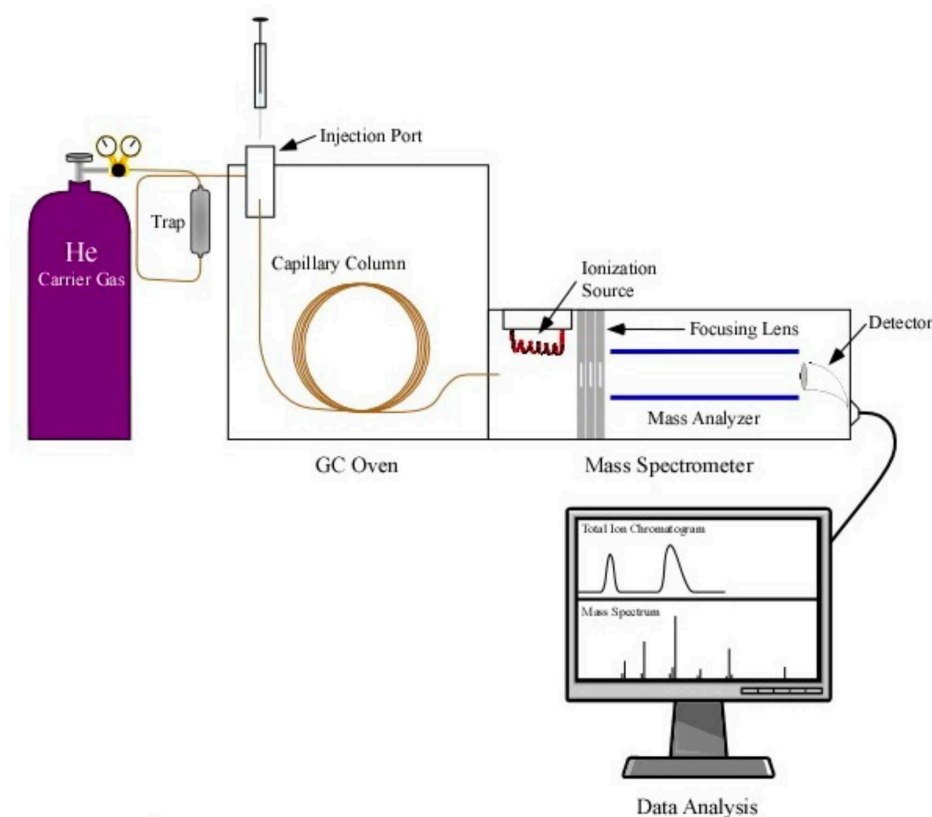


Figure 175. Représentation schématique du système de la chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse. Extrait de (Wu et al., 2012)

La technique de la chromatographie en phase gazeuse permet la volatilisation des molécules d'un l'échantillon introduit dans l'injecteur par une micro-seringue (en tête de colonne). La phase mobile gazeuse composée du gaz vecteur Hélium vient entraîner l'échantillon dans une colonne d'affinité placée dans un four dont la température est précisément programmable. C'est dans cette colonne que les éléments qui composent l'échantillon vont être séparés les uns des autres en fonction de leur affinité avec la phase stationnaire. La séparation des molécules repose ainsi sur la différence d'affinité pour la phase mobile et pour la phase stationnaire qui dépend de la polarité de la molécule et de celle de la phase stationnaire de la colonne. Différents programmes de montée en température doivent être testés, en fonction du niveau de séparation des composés désiré. En effet, plus la température du four est basse, meilleure sera la séparation des composés, mais plus longue sera l'analyse. Ces différents composés sont détectés en sortie de colonne par un détecteur, le spectromètre de masse.

La spectrométrie de masse permet l'identification et la quantification de molécule de par leur rapport masse sur charge (m/z) (ou masse moléculaire) après leur séparation par volatilisation puis ionisation. Le spectromètre de masse est composé d'un ionisateur ou source à impact électronique (EI) qui va venir volatiliser les molécules pour les séparer les unes des autres via le phénomène de sublimation permettant le passage des molécules à l'état gazeux ainsi que leur

ionisation par un faisceau d'électrons accéléré. Ainsi, pour chaque molécule ionisée, de nombreux ions spécifiques sont libérés. Les ions vont ensuite être séparés de manière progressive selon leurs rapports masse/charge en oscillant le long de l'analyseur de masse à quadripôle soumis à une tension continue (U) et une tension alternative ou variable (V). Enfin, un détecteur (placé en sortie de colonne) permet l'enregistrement du chromatogramme de par la détection/dénombrement des ions et la conversion en signal électrique en fonction du temps (caractéristique du passage progressif des différents composés). Le signal est ensuite traité pour visualisation du chromatogramme d'ions et de leur spectre de masse.

La durée écoulée entre l'injection et la sortie de colonne d'un composé est appelée temps de rétention qui est caractéristique d'une molécule, une co-injection d'un échantillon composé par exemple de la molécule à quantifier et de l'étalon interne ajouté permet leur identification, l'aire du pic est également proportionnelle à la masse du composé injecté.

2) Analyse quantitative des terpènes produits

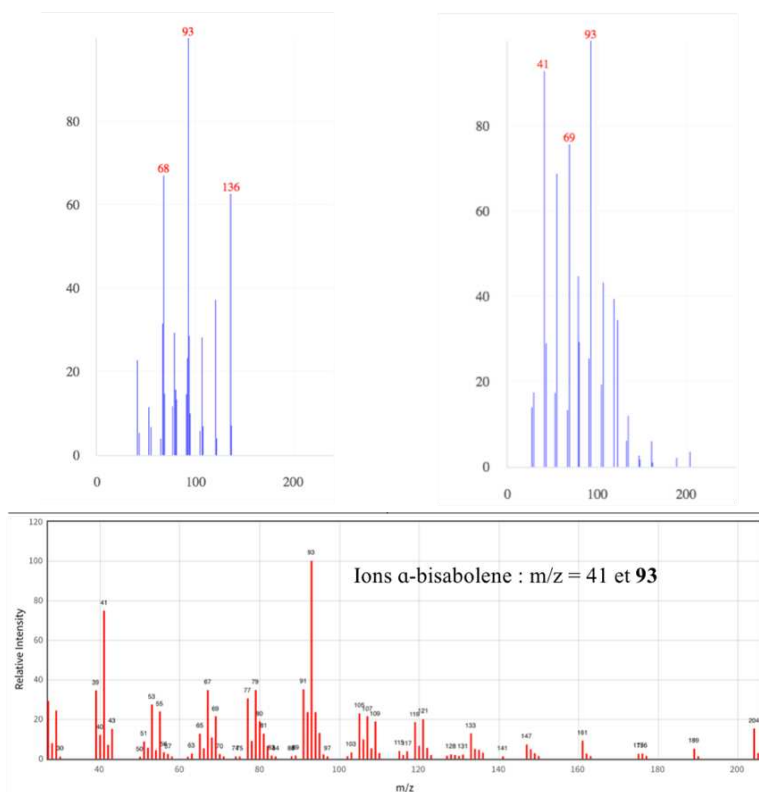
a) Paramètres et réglages spécifiques utilisés pour la détection des terpènes produits

Pour quantifier les différents terpènes (bisabolène, farnésène, limonène, pinène et santalène) produits une GC-MS (Trace1300 (GC) + ISQ LT (MS), ThermoScientific) a été utilisée. La GCMS est équipée d'une colonne capillaire de référence TG-5 MS, de phase stationnaire : 5% phényl polysilphénylène-siloxane et de dimension : 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm. Le gaz vecteur utilisé pour la phase mobile est le gaz inerte et apolaire Hélium (He) avec un débit de 1 mL/min (celui-ci influe sur le pouvoir de résolution de la GCMS). Le volume d'injection de l'échantillon par la microsiringue est de 1 µL. La source d'ionisation utilisée est de type EI (ionisation électronique) et permet la création d'un faisceau d'électrons accéléré (tension d'ionisation) de 70eV permettant l'ionisation de l'échantillon sous forme gazeuse. La température de la ligne de transfert est fixée à 250°C et la température de la source d'ions à 200°C.

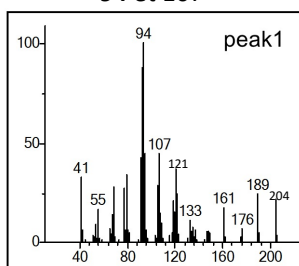
Ces paramètres ont été établis après une étude bibliographique (Davies *et al.*, 2014 ; Halfmann *et al.*, 2014a ; Kiyota *et al.*, 2014 ; Yang *et al.*, 2016) et les protocoles de quantification des terpènes ont été développés au laboratoire (Xavier Kammerscheit, Encarnación Díaz-Santos et thèse Célia Chenebault) avec l'aide de l'équipe Analyses du SCBM (Service de Chimie Bio-Organique et de Marquage).

Ions S-limonène : m/z = 68, 93 et 136

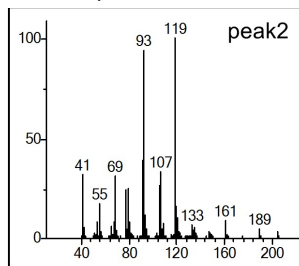
Ions α -farnésène : m/z = 41, 69 et 93



Ions α -santalène m/z =
94 et 107



Ions α -exo-bergamotène
m/z = **93 et 119**



Ion Epi- β -santalène
m/z = **94 et 122**

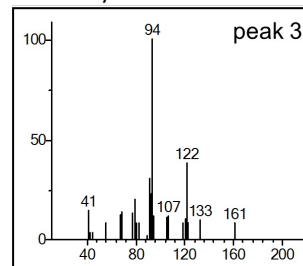


Figure 176. Les spectres d'ions des terpènes d'intérêt

À partir du chromatogramme d'ions obtenus d'un échantillon contenant le terpène produit et le standard interne, il est possible d'extraire le spectre de masse d'un ion en particulier à partir de son rapport m/z. L'analyse a été effectuée dans le mode de surveillance ionique masse/charge (m/z) = 50-650.

b) Les paramètres à déterminer pour le dosage de la production en terpènes par GC-MS

Il est possible de « jouer » sur les différents modes opératoires et paramètres de réglages de la GCMS pour optimiser le temps de l'analyse et la résolution de la chromatographie dans le but d'améliorer l'identification et la quantification des molécules à doser, notamment au niveau de la résolution et de la séparation des pics chromatographiques.

➤ Influence de la fonction Split/Splitless de l'injecteur de la GCMS

Le mode Split/Splitless peut être modifié pour éviter de surcharger la colonne si l'échantillon à doser est trop concentré. Ainsi en choisissant la fonction Split, seulement une fraction de l'échantillon injecté via une seringue sera entraîné vers la colonne, l'autre fraction sera éliminée de l'injecteur par une vanne ouverte 'de fuite'. Ainsi, plus le split est augmenté moins les pics considérés comme parasites seront nombreux, mais un équilibre doit être déterminé spécifiquement par composés pour toujours rester au-dessus de la limite de détection. Le mode Splitless en revanche est utilisé pour des échantillons où la concentration de la molécule à doser est plutôt faible, l'intégralité de l'échantillon injecté est alors vaporisée et entraîné grâce au gaz vecteur vers la colonne. En jouant sur ce mode il est possible d'optimiser la résolution des pics.

➤ Influence du débit de la phase mobile sur l'efficacité de séparation des molécules

Le débit de la phase mobile (ici le gaz vecteur est l'hélium) peut influencer la résolution des pics/aires du chromatogramme. En diminuant le débit de la phase mobile par exemple on peut augmenter la résolution des pics.

➤ Influence du rapport des phases mobiles et stationnaires sur le temps de rétention

A paramètres de mode opératoire GCMS identiques, les temps de parcours des composés d'un échantillon dans la colonne seront distincts si ceux-ci présentent des affinités différentes pour les phases stationnaires ou mobiles. Ainsi, plus le composé a une affinité pour la phase stationnaire, moins il est entraîné dans la colonne par le gaz vecteur. Leurs temps de rétention, caractérisés par la durée écoulée entre la sortie de colonne et sa détection au niveau du détecteur et son introduction au niveau de l'injecteur, seront alors dissemblables et permettront une bonne séparation des pics.

➤ Influence de la température et de programmes spécifiques du four (température en mode isotherme ou en mode gradient)

Plus la température du four est élevée, plus les composés d'un échantillon se déplacent rapidement avec la phase mobile au niveau de la colonne, mais moins ils interagissent avec la phase stationnaire ; ainsi, la séparation des pics est moins bonne, mais l'analyse est rapide. Inversement, quand la température du four est basse, la séparation des composés moléculaire est meilleure. Un équilibre doit donc être trouvé pour obtenir le niveau de séparation désiré en minimisant la durée de l'analyse par échantillon.

Pour la quantification des terpènes produits, une méthode 'gradient' (rampe de température) est utilisée pour le programme de température du four au cours de l'analyse, en effet en balayant une gamme de température, il est possible de cibler une gamme de volatilité de molécules pour optimiser spécifiquement la séparation des composés et l'obtention d'un chromatogramme de bonne résolution.

En amont des expériences de dosages des terpènes d'intérêt produits par les différentes souches cyanobactériennes mutantes, des manipulations préliminaires sont réalisées afin de détecter d'éventuels pics parasites pouvant altérer la résolution des pics d'intérêts à analyser. Divers échantillons sont injectés pour déceler de potentiels signaux perturbateurs : le solvant dodécane pur, le dodécane prélevé à la surface d'une culture de cyanobactéries sauvage (des composés hydrophobes pourraient être relargués par le métabolisme de la cyanobactérie), mais aussi le dodécane contenant le terpène d'intérêt (issu du standard commercial), le standard interne et les deux en même temps.

c) *Analyse quantitative des terpènes produits par la méthode de l'étalonnage interne.*

Pour déterminer la concentration massique d'un composé d'intérêt produisant un pic d'aire de manière reproductible sur un chromatogramme, il est nécessaire de disposer d'un étalon de concentration connue comme référence. Le choix s'est porté sur la méthode de l'étalonnage interne. Ainsi, afin de s'assurer de la bonne quantification des terpènes au sein de nos échantillons, des étalons internes y sont ajoutés en concentrations connues et co-injectés en GC-MS afin de standardiser chaque prise de mesures. En effet, de nombreux paramètres peuvent fluctuer d'une injection en GC-MS à une autre, que ce soit au niveau du volume d'injection, que de la séparation des molécules les unes des autres (colonne, température, débit du gaz vecteur...) ou de la détection par le spectrophotomètre. Ainsi la présence d'une molécule en tant que standard interne en co-injection avec les molécules à doser est nécessaire afin de s'affranchir des potentielles imprécisions et permettre une reproductibilité d'une injection à l'autre.

Pour chaque terpène à doser, différents standards internes ont donc été utilisés selon différents attributs. L'étalon interne à co-injecter doit présenter des propriétés physico-chimiques et structurales assez proches du terpène à doser, mais il ne doit pas exister initialement dans l'échantillon à doser, il doit pour chaque échantillon demeurer une espèce chimique inerte, avoir un pic chromatographique de bonne résolution, un temps de rétention suffisamment différent des molécules à doser et une concentration suffisamment proche du composé d'intérêt à doser. Ces différents standards internes ont donc été choisis selon leurs attributs ainsi qu'en se basant sur la littérature (Diaz-Chavez *et al.*, 2013 ; Peralta-Yahya *et al.*, 2011 ; Halfmann *et al.*, 2014a ; Yang *et al.*, 2016 ; Lee *et al.*, 2017).

Tableau 26. Les terpènes à quantifier et les standards internes choisis

Terpènes à quantifier		Standard interne choisi	Propriétés communes
Limonène		Pinène	Monoterpènes (C10) cycliques
Pinène		Limonène	Monoterpènes (C10) cycliques
Farnésène		β-caryophyllène	Sesquiterpènes (C15)
Bisabolène			
Huile de bois de santal (mix de terpènes/terpénoides)	α-santalène	Cis-trans-nérolidol	Sesquiterpènes/Sesquiterpénoïdes (C15)* *Le standard interne choisi est un sesquiterpénoïdes (groupement alcool), mais de tous ceux testés c'est le seul ayant eu un temps de rétention différent des composants de l'huile de bois de santal. L'objectif final étant de produire des santalols (constituant majeur de l'huile de bois de santal) et non du santalène.
	α-exo-bergamotène		
	β-santalène		
	Epi-β-santalène		

d) Synthèse de l'ensemble des paramètres retenus pour la quantification de chaque terpène produit dans cette étude

Les expériences préliminaires réalisées au laboratoire ont permis de retenir les différents paramètres (programmes du four, split) présentés ci-dessous en fonction des propriétés de chaque terpènes produits et étalon interne associé.

- Les paramètres retenus pour la quantification du limonène

Tableau 27. Synthèse des caractéristiques chromatographiques et des paramètres déterminés pour l'analyse quantitative d'isomères d'intérêts et la production de limonène

Terpène à quantifier	Masse molaire (g/mol)	Ion (m/z) majoritaire	Temps de rétention (min)	Température d'ébullition (°C)	Programme four	Split
Limonène (S-(-)-limonène)	136	68, 93 et 136	6,89	177-178	<ul style="list-style-type: none"> • 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 	10:1
Pinène (α -pinène)	136	93 et 136	5,41	155-156		

Les pics chromatographiques du S-(-)-limonène et de l' α -pinène sont bien séparés avec ce programme, respectivement des temps de rétention de 6,89 minutes et de 5,42 minutes.

- Les paramètres retenus pour la quantification du bisabolène et du farnésène

Afin de quantifier le bisabolène et le farnésène, un standard commercial présentant un mix d'isomères contenant les terpènes d'intérêt (farnésène et bisabolène) a été utilisé. Ceci, afin de retenir les paramètres les plus à même d'obtenir une bonne résolution et séparation des pics chromatographiques correspondant aux isomères des terpènes à doser et du standard interne le β -caryophyllène. Des expériences préliminaires au laboratoire ainsi que la littérature (Diaz-Chavez *et al.*, 2013 ; Lee *et al.*, 2017 ; Peralta-Yahya *et al.*, 2011 ; Halfmann *et al.*, 2014a ; Yang *et al.*, 2016) ont permis de jouer sur l'influence de différents paramètres : programmes de four (méthode gradient), modes split d'injection (5:1, 10:1, 25:1), concentrations du mix d'isomères farnésène et bisabolène injecté, sélection de l'ion majoritaire (m/z = 41, 69 ou 93) le plus adapté à la quantification.

Tableau 28. Synthèse des caractéristiques chromatographiques et des paramètres déterminés pour l'analyse quantitative d'isomères d'intérêts et la production de bisabolène et farnésène

Terpène à quantifier	Masse molaire (g/mol)	Ion (m/z) majoritaire	Temps de rétention (min)	Température d'ébullition (°C)	Programme four	Split
E- α -Bisabolène	204	41 et 93	20,83	262-280	<ul style="list-style-type: none"> • 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 2°C/min 	5:1
α -Farnésène	204	41, 69 et 93	19,6	260-280		

β -caryophyllène	204	41, 69, 93 et 133	17,31	262-264	<ul style="list-style-type: none"> • Passage de 150°C à 270°C à raison de 50°C/min • 270°C pendant 5 min 	
------------------------	-----	-------------------	-------	---------	--	--

Pour la quantification de l'E- α -bisabolène et de l' α -farnésène, aucun standard pur n'existe, ainsi une solution standard commercial d'un mix contenant de nombreux isomères a été utilisé. La proportion des isomères E- α -bisabolène et l' α -farnésène dans le mix n'étant pas connue, ceux-ci ont été identifiés selon la même stratégie décrite par Wichmann *et al.*, 2018. Au sein du mix d'isomères, l'E- α -bisabolène est présent à 19,31% \pm 0,9% et l' α -farnésène à 7,78% \pm 0,37%. Les paramètres suivants ont ainsi été sélectionnés pour la quantification : 38,6 mg/L_{dodécane} du mix d'isomère du farnésène/ bisabolène avec 10 mg/L de trans-caryophyllène (étalon interne) ont été injecté avec un split 5:1 et l'ion 93 a été sélectionné pour l'analyse quantitative.

➤ Les paramètres retenus pour le dosage du santalène

Tableau 29. Synthèse des caractéristiques chromatographiques et des paramètres déterminés pour l'analyse quantitative des isomères d'intérêts et la production de santalène

Les paramètres du programme du four utilisés sont similaires à ceux de (Diaz-Chavez *et al.*, 2013)

Terpène à quantifier	Masse molaire (g/mol)	Ion (m/z) majoritaire	Temps de rétention (min)	Température d'ébullition (°C)	Programme four	Split
α -santalène	204	94 et 107	17,23	251-253	<ul style="list-style-type: none"> • 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 	5:1
α -exo-bergamotène	204	93 et 119	17,62	258-260		
β -santalène	204	94 et 122	18,36	261-262		
Epi- β -santalène	204	94 et 122	19,1	261-262		
Cis et trans-nérolidol	222	41, 69 et 93	20,5 et 21,55	263-266		

Afin de quantifier le santalène, un standard commercial d'huile de bois de santal présentant un mix d'isomères contenant les isomères d'intérêt santalène (α , β et *epi*- β), mais également de nombreux isomères de santalols, été utilisé. Les paramètres suivants ont été sélectionnés pour la quantification : une forte concentration d'huile de bois de santal (car les isomères de santalène sont présents à faible concentration) ainsi que l'étalon interne Cis/trans nérolidol. Ceux-ci ont été injectés avec un split 5:1, et l'ion 93 a été sélectionné pour l'analyse quantitative.

➤ Principe et méthode de réalisation des gammes étalons pour la quantification de chaque terpène d'intérêt

Une gamme étalon est alors réalisée pour la quantification de chaque terpène produit, permettant d'obtenir une corrélation entre le rapport des aires du terpène à quantifier avec celle de son standard interne (axe des ordonnées) et la concentration du terpène à quantifier (axe des abscisses). L'aire du terpène d'intérêt obtenue est ainsi normalisée à chaque injection avec celle du standard interne, afin de s'affranchir des variations d'aires pouvant provenir de l'injection, séparation et quantification par la GC-MS. La gamme étalon fournit plusieurs informations :

son coefficient directeur permet de corrélérer le rapport d'aires obtenu avec la concentration du terpène d'intérêt, mais également de s'assurer de la répétabilité et reproductibilité de la méthode de par les facteurs de limite de détection et de linéarité obtenus (voir Tableau 30.).

La Figure 177. ci-dessous schématise la réalisation d'une gamme étalon pour la quantification d'un terpène d'intérêt avec son standard interne. Pour la réalisation de l'étalonnage interne, un composé appelé standard interne est ajouté en concentration fixe (0,01g/L) dans chaque solution étalon supplémentée par le composé à doser (le terpène d'intérêt) qui est ajouté en concentrations croissantes, dans une gamme de concentrations définies pour couvrir le composé d'intérêt à doser. Les différents points de gamme sont obtenus par prélèvement d'un aliquot de chaque solution étalon, dans un insert contenu dans un chromacole pour analyse en GCMS. La droite d'étalonnage est ensuite définie.

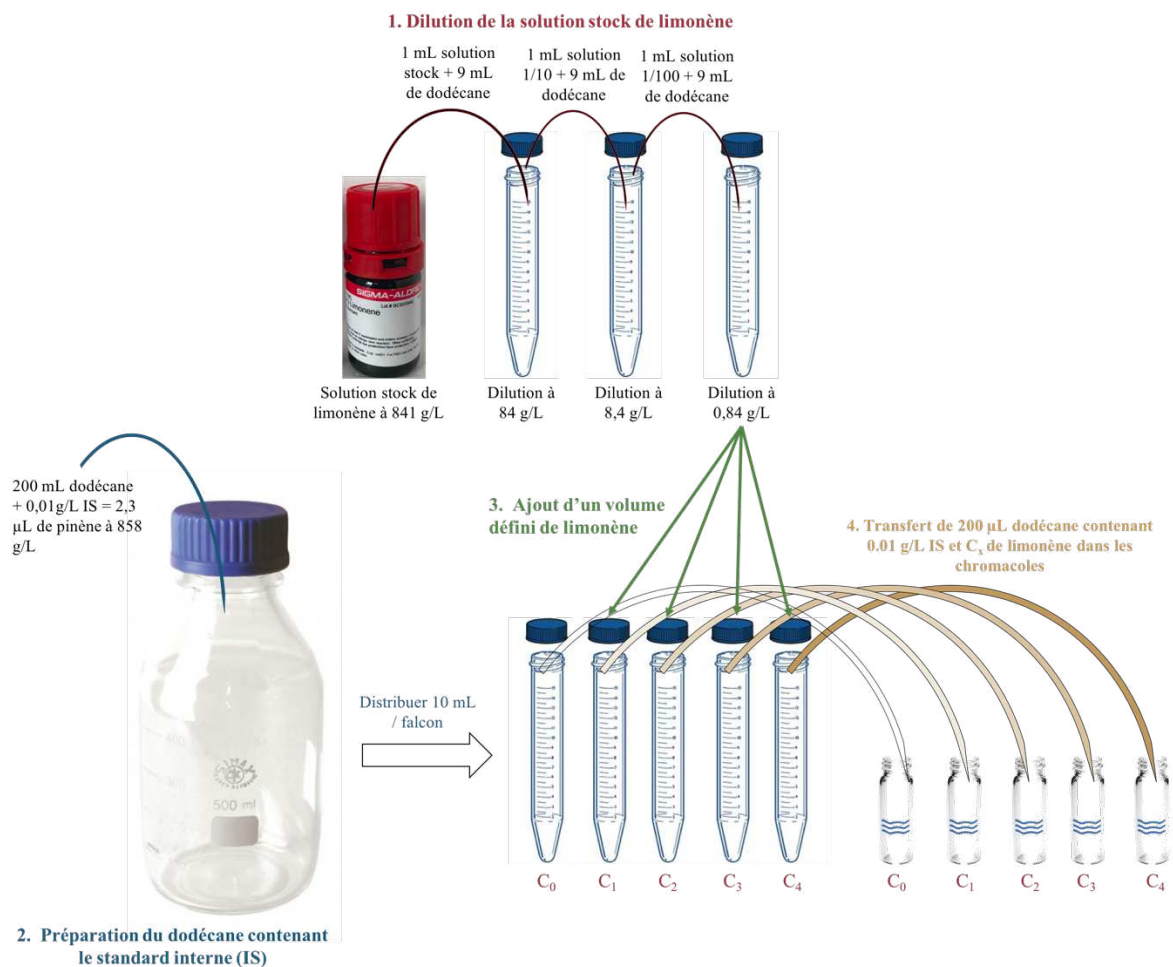


Figure 177. Réalisation de la gamme étalon nécessaire à la quantification des terpènes d'intérêt. Ici, le schéma montre la réalisation de la gamme étalon du S-(-)-limonène (Extrait de la thèse de Célia Chenebault).

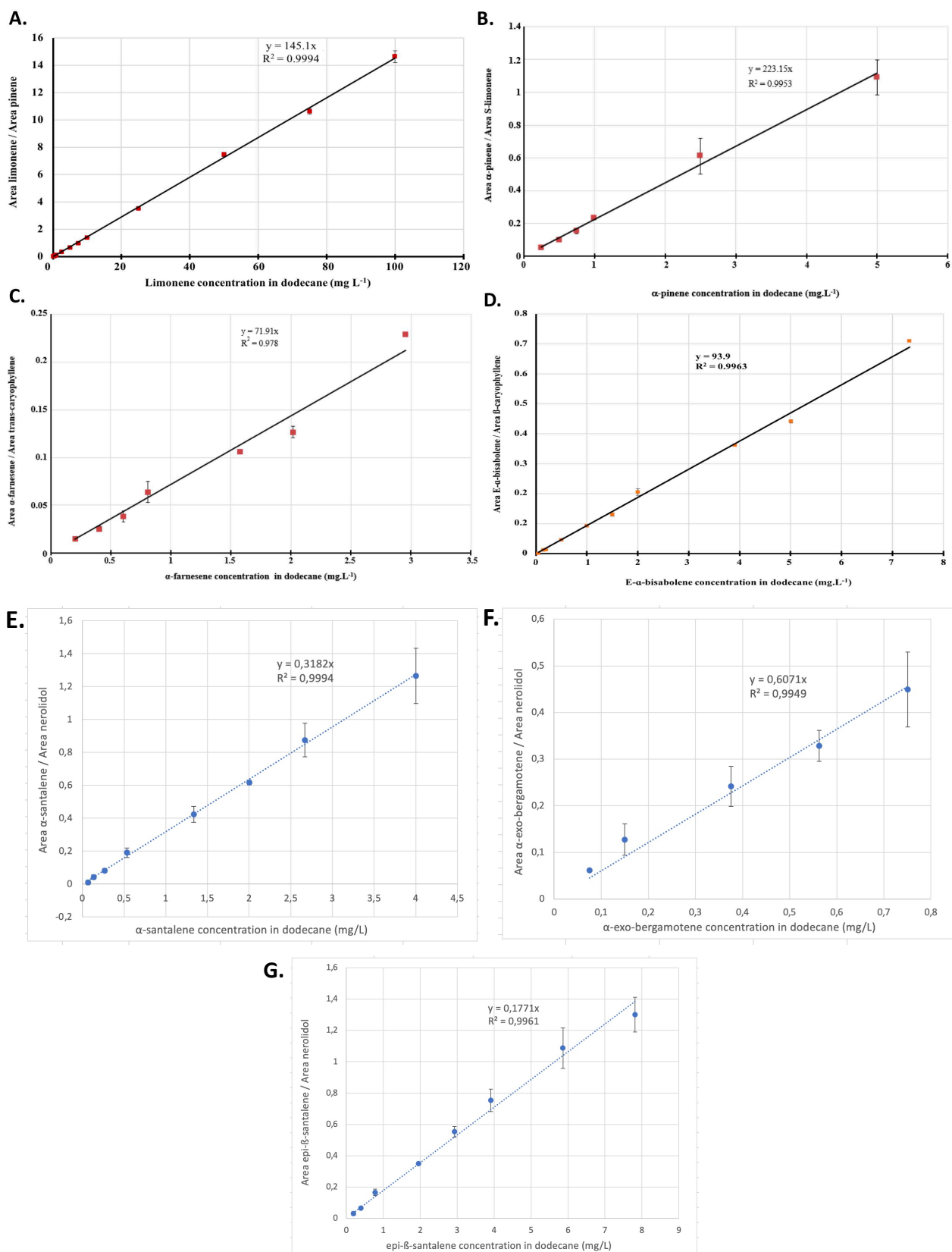


Figure 178. Gammes étalon permettant la quantification de *S*-(-)-limonène (A), l' α -pinène (B), l'*E*- α -bisabolène (C), l' α -farnésène (D), l' α -santalène (E), l' α -exo-bergamotène (F), et l'épi- β -santalène (G).

Avec en axe des ordonnées pour chaque gamme étalon : Aire du pic chromatographique du terpène / Aire du pic chromatographique de l'étalon interne, et en axe des abscisses : la concentration en mg.L^{-1} du terpène d'intérêt.

Tableau 30. Paramètres définis des différentes courbes étalons pour la quantification de chaque terpène d'intérêt

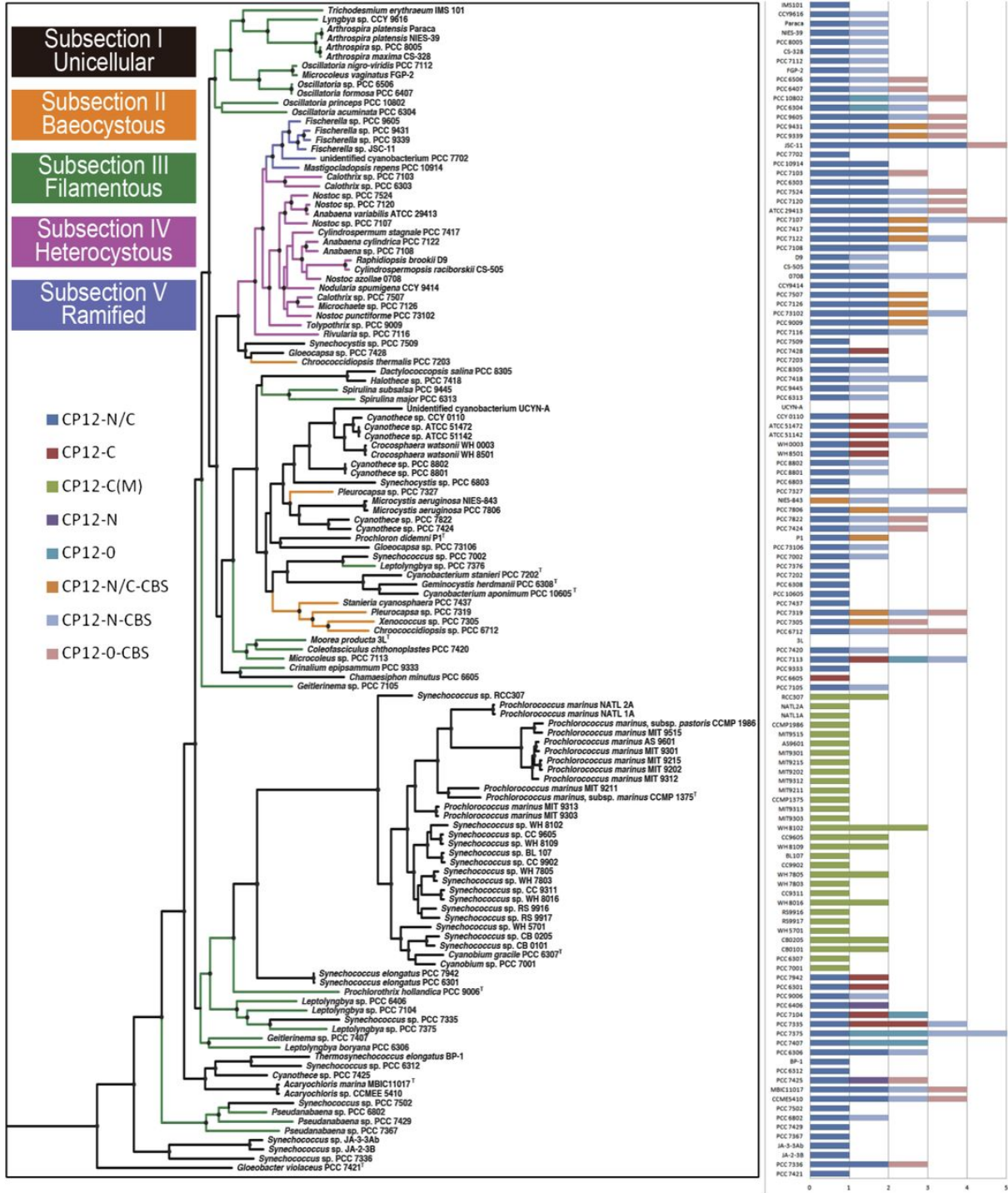
Paramètres courbes étalons pour la quantification de :	Coefficient directeur	[C _{standard_interne}] fixe = 10mg/L	[C _{terpène_intérêt}] en mg/L dodécane	Limite de détection	Limite de linéarité
S-(-)-limonène	145,1	α- pinène	$[C_{\text{terpène_lim}}] = \frac{A_{\text{pic_lim}}}{145,1} \times A_{\text{pic_pin}}$	0,1 mg/L _{dodécane} = 0,02 mg/L _{culture}	100 mg/L _{dodécane} = 20 mg/L _{culture}
α-pinène	223,15	S-(-)-limonène	$[C_{\text{terpène_pin}}] = \frac{A_{\text{pic_pin}}}{223,15} \times 5 \times A_{\text{pic_lim}}$	0,1 mg/L _{dodécane} = 0,02 mg/L _{culture}	5 mg/L _{dodécane} = 1 mg/L _{culture}
E-α-bisabolène	93,9	β- caryophyllène	$[C_{\text{terpène_bisa}}] = \frac{A_{\text{pic_bisa}}}{93,9} \times A_{\text{pic_caryo}}$	0,15 mg/L _{dodécane} = 0,03 mg/L _{culture}	7 mg/L _{dodécane} = 1,4 mg/L _{culture}
α-farnésène	71,9	β- caryophyllène	$[C_{\text{terpène_fam}}] = \frac{A_{\text{pic_fam}}}{71,9} \times A_{\text{pic_caryo}}$	0,2mg/L _{dodécane} = 0,04 mg/L _{culture}	3 mg/L _{dodécane} = 0,6 mg/L _{culture}
α-santalène	0,3182	Cis et trans- nérolidol	$[C_{\text{terpène_sant}}] = \frac{A_{\text{pic_sant}}}{0,3182} \times 2 \times A_{\text{pics_cis et trans-nérolidol}}$	0,0013 mg/L _{dodécane} = 0,00026 mg/L _{culture}	0,07 mg/L _{dodécane} = 0,014 mg/L _{culture}
α-exo- bergamotène	0,6071	Cis et trans- nérolidol	$[C_{\text{terpène_berg}}] = \frac{A_{\text{pic_berg}}}{0,6071} \times 71 \times A_{\text{pics_cis et trans-nérolidol}}$	0,00037 mg/L _{dodécane} = 0,00007 mg/L _{culture}	0,075 mg/L _{dodécane} = 0,015 mg/L _{culture}
épi-β- santalène	0,1771	Cis et trans- nérolidol	$[C_{\text{terpène_épi-sant}}] = \frac{A_{\text{pic_épi-sant}}}{0,1771} \times A_{\text{pics_cis et trans-nérolidol}}$	0,002 mg/L _{dodécane} = 0,0004 mg/L _{culture}	0,2 mg/L _{dodécane} = 0,04 mg/L _{culture}

TABLE des ANNEXES

Annexe 1. Nombre et type de variants de CP12 trouvés dans chaque génome de cyanobactérie regroupés phylogénétiquement.....	366
Annexe 2. Stratégie de clonage du gènes codant pour la PRK de Synechocystis PCC 6803 pour une surproduction dans E. coli et une analyse du CCB in vitro (ANR).....	367
Annexe 3. Carte et séquence du vecteur de clonage pEX-A SmSp ^R cp12-dwn.	369
Annexe 4. Carte et séquence du vecteur de clonage pEX-A128_a_cp12	371
Annexe 5. Carte et séquence du vecteur de clonage pEX-A128_a_cp12_Δ2CysN-ter	372
Annexe 6. Carte et séquence du vecteur de clonage pEX-A128_a_cp12_Δ2CysC-ter	373
Annexe 7. Carte et séquence du vecteur de clonage pEX-A128_a_cp12_Δ4Cys	374
Annexe 8. Carte et séquence du vecteur de clonage pEX-A128_a_cp12_Δ4Cys	375
Annexe 9. Carte et séquence du vecteur de clonage pEX-A128_a_cp12-Δ2CysNter_Sm ^R /Sp ^R _b.....	376
Annexe 10. Carte et séquence du vecteur de clonage pEX-A128_a_cp12-Δ2CysCter_Sm ^R /Sp ^R _b.....	378
Annexe 11. Carte et séquence du vecteur de clonage pEX-A128_a_cp12-Δ4Cys_Sm ^R /Sp ^R _b.	380
Annexe 12. Carte et séquence du vecteur de clonage pEX-A128_a_cp12_SmR/SpR_b	382
Annexe 13. Carte et séquence du vecteur de clonage pEX-A128_a_cp12-Core_Sm ^R /Sp ^R _b.	384
Annexe 14. Fréquence de codon du gène prk codant pour la phosphoribulokinase de 4 souches de cyanobactéries : Synechocystis PCC 6803, Synechococcus PCC 7942, Synechococcus PCC 7425 et Cyanothece PCC 7425.....	386
Annexe 15. Alignement des séquences en acides-aminés des protéines phosphoribulokinase de différents châssis cyanobactériens.....	388
Annexe 16. Alignement des séquences en acides-aminés des protéines RuBisCO de différents châssis cyanobactériens.....	389
Annexe 17. Revue publiée dans Life 2020 , 10, 71. Veaudor, T.; Blanc-Garin, V.; Chenebault, C.; Diaz-Santos, E.; Sassi, J.-F.; Cassier-Chauvat, C.; Chauvat, F. Recent Advances in the Photoautotrophic Metabolism of Cyanobacteria: Biotechnological Implications.	391
Annexe 18. Revue publiée dans Genes 2021 , 12, 500. Cassier-Chauvat,C.; Blanc-Garin, V.; Chauvat, F. Genetic, Genomics, and Responses to Stresses in Cyanobacteria: Biotechnological Implications.	417

ANNEXES

Annexe 1. Nombre et type de variants de CP12 trouvés dans chaque génome de cyanobactéries regroupées phylogénétiquement.
Extrait de Stanley et al., 2013



Annexe 2. Stratégie de clonage du gène codant pour la PRK de Synechocystis sp. PCC 6803 pour une surproduction dans E. coli et une analyse du CCB in vitro (ANR).

Dans le cadre de l'ANR CalvinDesign, j'ai également construit une souche d'*E. coli* permettant la surproduction et la purification de la PRK de *Synechocystis sp. PCC 6803* (ajout d'un tag His6 au gène *prk* et clonage dans un vecteur).

Julien Henri de l'IBPC Paris a repris la suite du projet en transformant les *E. coli* Rosetta avec le plasmide pET3-His6-PRK. Les cellules ont ensuite été cultivées jusqu'à DO=0,8 dans 15 mL de LB complétée par 150 µg/mL d'ampicilline. L'expression a été induite avec 500 µmol/L d'IPTG, puis l'extraction des protéines a été réalisée avec traitement par lysozyme-benzonase 15 min à RT (extrait total T). Les clarifications du lysat ont été réalisées par centrifugation à 15.3k rcf pendant 10 min (extrait soluble S). Une électrophorèse SDS-PAGE (avec 5 µL de solution chargée) a ensuite été réalisée (Figure 179.).

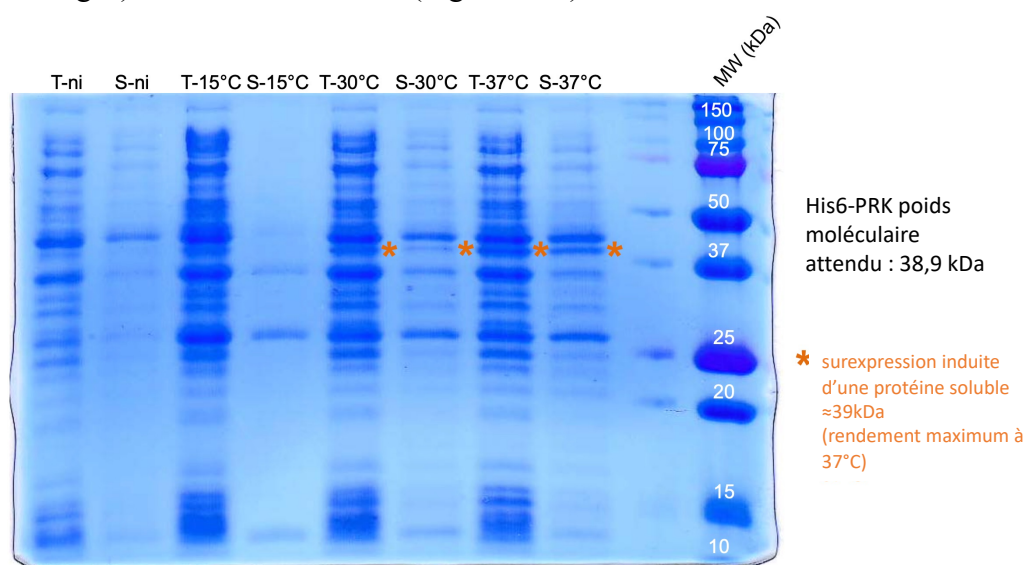
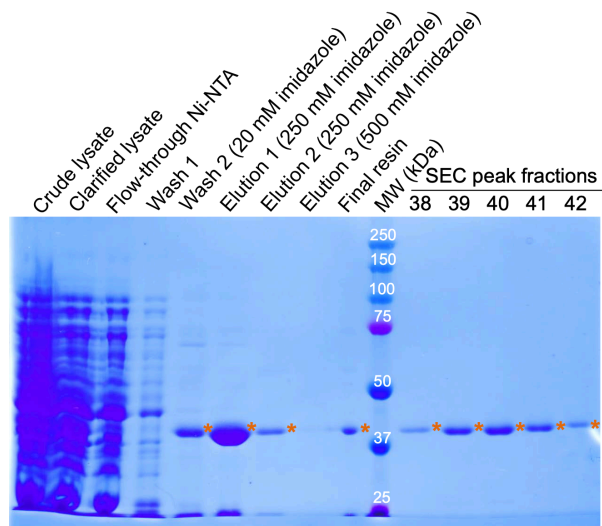


Figure 179. Gel du résultat d'électrophorèse SDS-page (ni= non induit, 15°C-on, 30/37°C-3h)

L'expérience a donc été renouvelée, avec une surexpression des gènes transcrits par T7 par induction IPTG (0,5 mM) pendant 3 h à 37 °C. Les cellules ont ensuite été récoltées, remises en suspension et lysées. Le lysat brut a été clarifié par une centrifugation de 20 min et 20000 ref et soumis à une chromatographie d'affinité His6 sur Ni²⁺-NTA (2 mL de résine). Les éluats ont ensuite été regroupés et soumis à une chromatographie d'exclusion de taille sur une colonne Superdex200 HL 26/60 élue de façon isocratique dans 20 mM de Tris à pH=7.9, 200 mM NaCl.

Un pic unique de protéine soluble a été détecté à une absorbance de longueur d'onde 280 nm entre les fractions 38 et 42 (4,5 mL chacune). 10 µL de chaque fraction ont été résolus sur gel SDS-(15 %)PAGE réducteur, colorés avec du bleu de coomassie (Figure 179.).



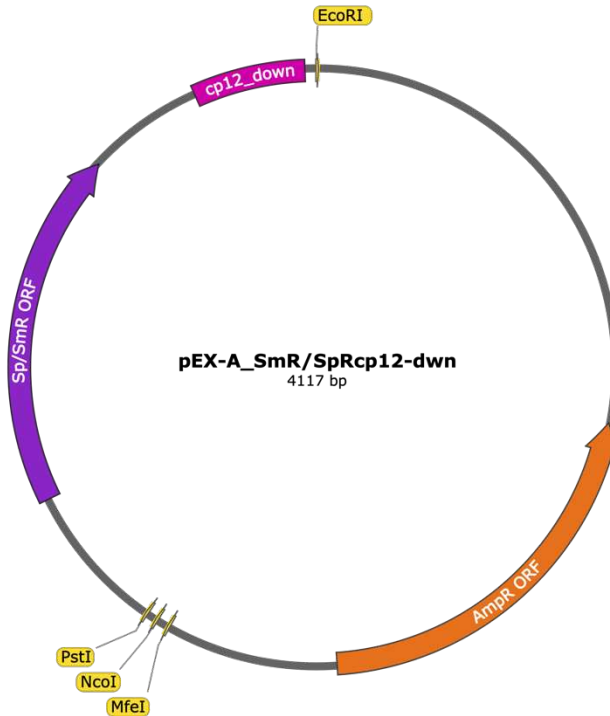
His6-PRK* expected molecular weight: 38.9 kDa

Figure 180. Gel du résultat d'électrophorèse SDS-(15 %)PAGE réducteur

La structure et les caractéristiques enzymatiques de la protéine ont ainsi pu être déterminées en collaboration avec l'IBPC, Paris (Résultats non publiés).

Annexe 3. Carte et séquence du vecteur de clonage pEX-A SmSp^R cp12-dwn.

Ce vecteur a été conçu avec un gène conférant la résistance à la streptomycine/ spectinomycine (SmSp^R) flanqué de terminateurs transcriptionnels/traductionnels (TT), suivis de la région située en aval de cp12, et précédée de sites de restriction uniques *NcoI* et *PstI*.



aattcctgtgtgaaattgttatccgctcacaattccacacaacatacagaccggaagcataaagtgtaaagcctgggggtgcctaatgagt
gagtaactcacattaattgcgttgcgctcactgcccgtttccagtcgggaaacctgctgtccagctgcattaatgaatcggccaacg
cgcggggagagggcgtttgcgtattgggcgctcttccgcttctcctcactgactgctgctcggctgctcggctgctcggcggagcg
gtatcagctcactcaaaggcggtaatacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaa
aaggccaggaaccgtaaaaaggccgcgttgctggcgttttccataggctccgccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaa
gtcagaggtggcgaaaccgacaggactataaagataccaggcgtttccccctggaagctcctcgtgcgctctcctgttccgacct
gccgcttaccggatacctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgcttttcatagctcacgctgtaggtatctcagttcgggtgtagg
tcgttcgctccaagctgggctgtgtgacgaacccccgttcagcccaccgctgcgccttatccggtaactatcgtcttgagtccaacc
cggtaagacacgacttatgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcgggtctacagagttctt
gaagtggggcctaactacggctacactagaagaacagtatfctgtatctgctcgtctgctgaagccagttaccttcgaaaaagagttgg
tagctcttgatccggcaaacaaaccaccgctggtagcgggtggtttttgttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctca
agaagatcctttgatctttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggattttggtcatgagattatcaaaaagg
atcttcacctagatccttttaaatataaaatgaagtttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaacttggtctgacagTTACCAATG
CTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTCCATCCATAGTTG
CCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCC
CAGTGCTGCAATGATACCGCGACTCCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCA
ATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCC
GCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAG
TTAATAGTTTGCACAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACAGCTCG
TCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACAT
GATCCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTC
AGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATT
CTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACC
AAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAA

TACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAA
ACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCCG
ATGTAACCCACTCGTGCACCCAACCTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTACCAGCGT
TTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGG
CGACACGGAAATGTTGAATACTCATactcttcttttcaatattattgaagcattatcaggggtattgtctcatgag
cggatacatatttgaatgatttagaaaaataaacaataggggttccgcgcacattccccgaaaagtgccacctgacgttaagaac
cattattatcatgacattaacctataaaaatagcgtatcacgagcccttctcgcgcggttcgggtgatgacggtgaaaacctgac
acatgcagctcccggagacgggtcacagcttgtctgtaagcggatgccgggagcagacaagcccgtcagggcgcgtcagcgggtgtt
ggcgggtgtcggggctggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgcaccaattggtcgacctcaggttaattaactg
a**CCATGG**TATTCCTGTTACGTACGTC**CTGCAG**caagctttatgcttgaaccgttttgtaaaaatttta
aaataaaaaggggaccttaggggtccccaatfaattagtaataataatctattaaaggtcattcaaaaggtcatccaccggatcaattccc
ctgcacctgaccgaacgcagcgggtgtaacggcgcagtgggcgggtttcatggcTTGTTAAtgactgtttttgggTACAGT
ctatgcctcgggcatccaagcagcaagcgcgttacgccgtgggtcgatgtttgatgttatggagcagcaacgatgttacgcagcaggg
cagtcgccctaaaacaagttaaacatcATGAGGGAAGCGGTGATCGCCGAAGTATCGACTCAAC
TATCAGAGGTAGTTGGCGTCATCGAGCGCCATCTCGAACCGACGTTGCTGGCCGT
ACATTTGTACGGCTCCGCAGTGGATGGCGGCCTGAAGCCACACAGTGATATTGAT
TTGCTGGTTACGGTGACCGTAAGGCTTGATGAAACAACGCGGCGAGCTTTGATCA
ACGACCTTTTGAAACTTCGGCTTCCCCTGGAGAGAGCGAGATTCTCCGCGCTGT
AGAAGTCACCATTGTTGTGCACGACGACATCATTCCGTGGCGTTATCCAGCTAAG
CGCGAACTGCAATTTGGAGAATGGCAGCGCAATGACATTCTTGCAGGTATCTTCG
AGCCAGCCACGATCGACATTGATCTGGCTATCTTGCTGACAAAAGCAAGAGAAC
ATAGCGTTGCCTTGGTAGGTCCAGCGGCGGAGGAACCTTTTGATCCGGTTCCTGA
ACAGGATCTATTTGAGGCGCTAAATGAAACCTTAACGCTATGGAACCTCGCCGCC
GACTGGGCTGGCGATGAGCGAAATGTAGTGCTTACGTTGTCCCGCATTGGTACA
GCGCAGTAACCGGCAAAATCGCGCCGAAGGATGTCGCTGCCGACTGGGCAATGG
AGCGCTGCCGGCCAGTATCAGCCCCTCATACTTGAAGCTAGACAGGCTTATCT
TGGACAAGAAGAAGATCGCTTGGCCTCGCGCGCAGATCAGTTGGAAGAATTTGT
CCACTACGTGAAAGGCGAGATCACCAAGGTAGTCGGCAAATAA**tgctacaacaattgg**
gagatatacatgaaaggctggcttttctgttatcgcaatagttggcgaagtaatcgcaacatccgcattaaaatctagcgagggttta
ctaagcTGATCCGGTGGATGACCTTTTGAATGACCTTTAATAGATTATATTACTAATT
AATTGGGGACCCTAGAGGTCCCCTTTTTTATTTTAAAAATTTTTTCACAAAACGGT
TTACAAGCATAAAGCTTGCTCAATCAATCACCGGATCGGGCTGATGGGGCAAACC
CAATGGCCGCAACTGGCGATCGCCAGGATTCCAAAACGATGTTTTTGGTTGAAG
CAGTGACAATTACCTGGGGGTTGTTACTGCTCTTTGCTGGTTTTGTTAAGGGATG
GTGGTAAAGGATATCTTCCCTGGGGTTAACCTAGGGACCTTCCAGGACCGCAGCT
TCCACGTCTTGGCGACTGAGGGAATATTTAAAGCTCCGCACCACTTTGCGTTGGG
GTTGGTGGGGGgtgggcgatcgctctagagctagcg

Légende :

NcoI surligné **en jaune**

PstI surligné **en bleu**

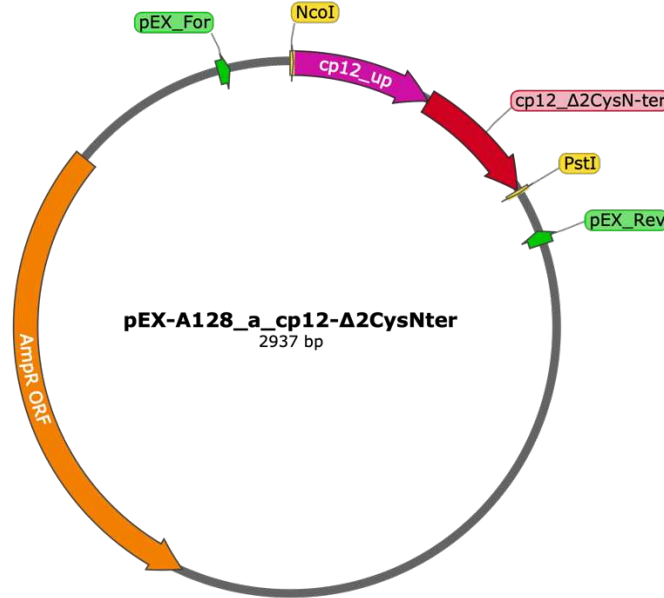
ORF AmpR **en orange**

ORF SpR/SmR **en violet**

Région cp12_dwn **en rose**

Annexe 5. Carte et séquence du vecteur de clonage pEX-A128_a_cp12_Δ2CysN-ter

Ce vecteur a été conçu avec une région amont cp12 suivie de l'ORF du variant cp12_Δ2CysN-ter flanquée entre deux sites de restriction uniques NcoI et PstI.



CCATGGATTAAACTTGGGAATCGGTGTAGTTGACCCCATGCTTCCCGGAGGAACTGTTGTGAACCTGTGATC
 ATTTTCACAATTTCTCATACTATCCCCGGTGGTGGCCCCAGGGCCGTATGGGGCAAGTTGAGGTCAGCAAAGT
 GAGGAAAACCCGATATTTCCCGTTTCCGTTTCTTCTACCCAAAGCCAACCAAAATTCGTAACATGAATGAGCCTT
 ACTCTCTGTAGACAATCGTAGGCGGTTAAACTTTATGAGCAATATTCAAGAAAAAATCGAACAGGAGCTAGCC
 AACGCTAGACAAGTTGCTAGTACCGATGAAGCCTCTCCGGCGGAGGCTGCGGCCTGGGATGCGGTGGAA
 GAGCTAGAAGCGGAAGCCGCCACCAACGTCAACAACATCCCACCCAAACTACCCTGGAAAAGTTCTGTGACG
 AAAACCCCGACGCTGCTGAGTGCCGCATTTACGACGACTAGCTGCAGactgcttttgcctgctggatccgaattcaagggtgaaatggt
 atccgctcacaattccacacaacatacagagccggaagcataaagtgtaaagcctggggtgcctaatgagtgagtaactcacattaatgctgtgctcactgcccccttcagctgg
 gaaactgtcgtgccagctgcatatgaatcgcccaacgcgcggggagagcggtttcgatattggcgctcttccgctctcctgctcactgactcgtcgtcggctgctggctg
 cggcgagcggatcagctcactcaaaagcggtaatacgggtatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaagccagcaaaagccaggaaccgtaaa
 aagcccgctgctgctgctgtttccatagctccgccccctgacgagcatcacaataatgacgctcaagtgcagaggtggcgaaccgacagactataaagataccagcgctt
 cccctggaagctccctcgtcgtcctcctgttccaccctgcccctaccggatacctgtccgctttctccctcgggaagcgtgctccttctcatagctcagctgtaggtatcag
 ttggtgtaggtcgtcgtccaagctgggctgtgtgcagaaacccccgttcagcccagaccgtgctcctatccggtaactatcgtctgagtcacaacccggaagacacgactatc
 gccactggcagcagccactggaacaggattagcagagcgaggtatgtagccggtgctacagagttcttgaagtgggtgcctaactacggctacactagaagaacagattttggtatct
 gcgctcgtgaaagccagttacctcggaaaaagagttgtagctcttgatccggcaaaacaccaccgctgtagcgggtgtttttgttcaagcagcagattaccgagcaaaaa
 aaggatctcaagaagatccttgccttttctacgggctgacgctcagtggaacgaaactacagctaaaggatgttggatcagattcaaaaaaggatctcacctagatcctttaaa
 taaaaatgaagtttaatacaatcaaaagtataatgatgtaaaactggtctgacagttaccaatgcttaacatgtaggacacatctcagcgatctgtctatcttctcattccatagttcctg
 actccccctgctgtagataactacgatacgggagggcttaccatctgccccagctgctgcaatgataccgagactcccagctcaccggctccagattatcagcaataaaccagcca
 gccggaaggccgagcgcagaaagtgtgctgcaactttatccgctccatcagctcttaattgttgcgggaagcctagagtaagtagttccaggttaaatagtttgcgcaacgttgg
 ccattgctacagcagcagctggtgtcagctcgtcgtttggtatggcttattcagctccgggttccaacgatcaaggcgagttacatgatccccatgtgtgcaaaaaagcggtagctcc
 ttgctcctccgatctgtcagaagtaagttggccgagctgtatcactcatggtatggcagcactgcataattcttactgcatgccatccgtaagatgctttctgtgactggtgagta
 ctcaaccaagtcattctgagaatagttatgctggcgaccgagttgctctgccccggcgtcaataaccgggataataccgcccacatagcagaactttaaagtgctcatattggaacg
 ttctcggggcgaactcctcaaggatctaccgctgtgagatccagttcagatgtaaccactcgtgacccaactgatcttcagatcttttacttccaccagcgtttctgggtgagcaaa
 aacaggaaaggcaaaatgccgcaaaaaagggaataaggcgcacacggaatggtgaatactcactctctcttccaatatttgaagcattatcaggggtattgtctcatgagccgat
 acatatttgaatgtatttagaaaaatacaaaatagggttccgagcatttccccgaaaagtgcacctgacgtcctaagaaccattatcatgacattaacctataaaaaataggcgt
 tcacaggcccttctcgcgcgtttccgggtgacgggtgaaaacctgcacatgacgtcaccggagacgggtcacagctgtctgtaagcggatccgggagcagacaagccc
 gtcagggcgcctcagcgggtgtgcccgggtgctgcttaactatcgccatcagagcagattgtactgagagaaaggcaattgggtaccgagctcggccgcaagc

Légende :

NcoI surligné en jaune

PstI surligné en bleu

ORF AmpR en orange

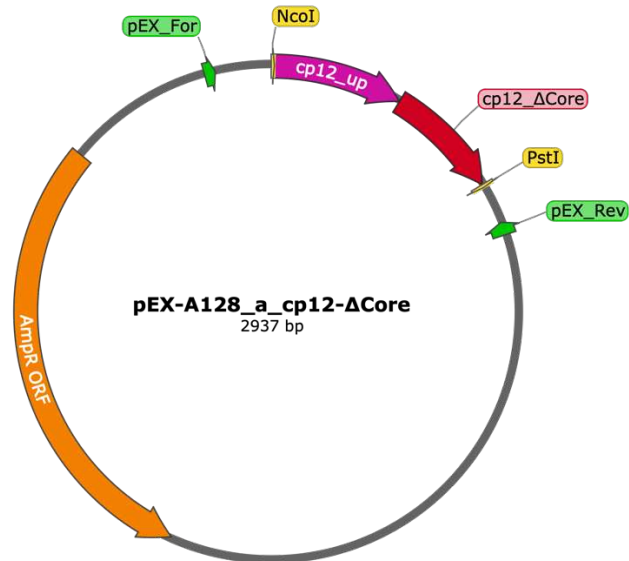
Région cp12_up en rose

ORF cp12_Δ2CysN-ter en rouge foncé

Substitution Cys – Ala surligné en vert

Annexe 8. Carte et séquence du vecteur de clonage pEX-A128_a_cp12_Δ4Cys

Ce vecteur a été conçu avec une région amont cp12 suivie de l'ORF du variant cp12_Δ4Cys flanquée entre deux sites de restriction uniques NcoI et PstI.



CCATGGATTAAACTTGGGAATCGGTGTAGTTGACCCCATGCTTCCCGGAGGAAACTGTTGTGAACCTGTGATC
 ATTTTCACAATTCTTACTACTATCCCCGGTGGTGGCCCCAGGGCCGTATGGGGCAAGTTGAGGTCAGCAAAGT
 GAGGAAAACCGCATATTCCTCGTTGTGGTTCCTTCTACCCAAAGCCAACCAAATTCGCTAACATGAATGAGCCTT
 ACTCTCTGTAGACAATCGTAGCGGTTAAACTTTATGAGCAATATTCAAGAAAAAATCGAAGCAGGAGCTAGCC
 AACGCTAGACAAGTTGCCAGTACCGATGAAGCCTCTCCGGCGGAGGCCGCTGCGGCCTGGGCCGGTGGCCG
 CCTAGAAGCGGAAGCCGCCACCAACGTCAACAACATCCACCCAAACTACCTGGAAAAAGTTCTGTGACGA
 AAACCCCGACGCTGCTGAGTGCCGCATTTACGACGACTAGCTGCAGacctgctttgctcgttgatccgaattcaagggtgaaattgtat
 ccgctcacaattccacacaacatacagaccggaagcataaaagtgtaaagcctgggtgcctaataagtgagtgactaacacattaattgcgttcgctcactgcccgttccagtcggg
 aaacctgctgcccagctgcattaatgaatcgccaacgcgcgggagagcggttgcgtattggcgctctccgcttctcgtcactgactgctgctgctgctgctgctg
 ggcgagcggatcagctcactcaaaagcggtaatacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaa
 aggccgctgctgctgctgtttccatagctccgccccctgacgagcatcacaanaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaccgacagactataaagataccagcgtttc
 cccctggaagctccctgctgctcctgcttccgacctgcccgttaccggatacctgtccgctttctccctcgggaagcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagt
 cgggtgtagctgctgctccaagctggctgctgtgcacgaacccccgttaccgcccaccgctgcgcttaccgtaactatcctgtgagtcacaaccggtgaagacagacttatcg
 ccaactggcagcagccactggaacaggttagcagagcaggtatgtaggcggctactacagagcttctgaagtggtggcctaactacggctacactagaagaacagattttggtatctg
 cgctctgctgaagcagttaccctcggaaaaagagttgtagctctgacccgcaaaacaaccaccgctgtagcgggtggtttttttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaa
 aggatcctaagaagatcttgcctttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaactcacgttaagggaatttggctcatgagattatcaaaaaggatctcacctagatcctttaa
 taaaaatgaagtttaatacactaaagtatatatgagtaaaactggctgacagttacaatgcttaacagtgaggcacctatctcagcagatctctatttctcatcatagttgctga
 ctccccgctgctgtagaatacagatacgggagggctaccatctgccccagtgctgcaatgataccgactcccagctcaccggctccagattatcagaataaaccagccag
 ccggaaggccgagcgcagaagtgctcctgcaactttaccgctccatcagctctataattggtccgggaagctagagtaagtagtccagtaataatggtgccaactgtgtgc
 cattgctacagcctcgtgctgctcagctcgtctgttggatgcttcaatcagctccggttcccaacgatcaaggcaggttacatgacccccatggtgtcaaaaaagcgggttagctct
 tcggtctccgctgctgctcagaagtaagttggccgaggttatcactcatggtatggcagcactgcataatctctactgctatgccatccgtaagatgctttctgactggtgagtac
 tcaaccaagtcattctgagaatagtgatgcccgcaccgagttgctcttcccgccgctcaatacgggataataaccgcccacatagcagaacttfaaaagtgctcatcattgaaaactg
 tcttccggcgcaaaactcaaggatctaccgctgttgagatccagttcagatgaacccaactgagcaaccaactgactctcagcatctttactttaccagcgtttctgggtgagcaaaa
 acaggaaaggcaaaatccgcgcaaaaaagggaataaggcgcacacgaaatgtgaataactatactcttctttcaatattatgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggata
 cataattgaaatgatttagaaaaatacaaaatagggttccgcccacattccccgaaaagtgcacactgacgtctaagaaccattattatcatgacattaacctataaaaaatggcgtat
 cagagggcccttctgctcgcgcttccggtgatgacggtaaaaactctgacacatgcagctcccggagacgggtcacagcttctgtgtaagcggatgccgggagcagacaagcccg
 tcagggcgctcagcgggtgctgctggggtgctggggtgcttaactatgcccacagagcagattgactgagagaaaggcaattgggtaccgagctcgcggccgcaagc

Légende :

NcoI surligné en jaune

PstI surligné en bleu

ORF Amp^R en orange

Régions cp12_up et cp12_down en rose

ORF cp12_Core en rouge foncé

Substitution Asp – Ala surligné en vert

Substitutions Glu – Ala surlignées en rose

cgctggtgataactacgatacgggagggtaccatctggccccagtgtgcaatgataccgcgactcccacgctaccggctccagattatcagcaataaaccagccagccgga
agggccgagcgcagaagtggctcgaacttatccgcctccatccagctatfaattgtgcccgggaagctagagtaagtagtccgagtaaatgttgcgcaacggtgtgcccattgc
tacaggcatcgtggtgtcacgctcgtcttggatggtctcattcagctccgggtcccaacgatcaaggcgagttacatgatccccatggtgcaaaaaagcggT agctcctcgt
cctccgatcgtgtcagaagtaagtggccgaggttatcactcatggtatggcagcactgcataatctcttactgtcatgccatccgtaagatgctttctgtactggtgagtactca
ccaagtcatctgagaafatgtatgcccgaccgagttgctctgcccggcgtcaatacgggataataccgcgccacatagcagaacttfaaaagtctcatcattgaaaaactcttc
ggggcgaaaaactcgaaggatctaccgctgtgagatccagttcgtatgaaccactcgtgcaccaactgatcttcagcatctttactttaccagcgtttctgggtgagcaaaaacag
gaaggcaaaatccgcaaaaaagggaataaggcgcacacggaaatgtgaatactcactctcttttcaatatttgaagcattatcagggttattgtctcatgagcggatacatat
ttgaatgtattgaaaaataaacaatagggggtccgacacattccccgaaaagtccacctgacgtctaagaaccattatcatgacattaacctataaaaaataggcgtatcag
aggcccttctgtctcgcgcttccggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctccggagacggtcacagcttctgtgtaagcggatgccgggagcagacaagcccgtcag
ggcgcgtcagcgggtgtgcccgggtcgggctggttaactatgcggcatcagagcagattgactgagagtgaccaattggtcaccctcaggttaattaacgta

Légende :

NcoI surligné en jaune

PstI surligné en bleu

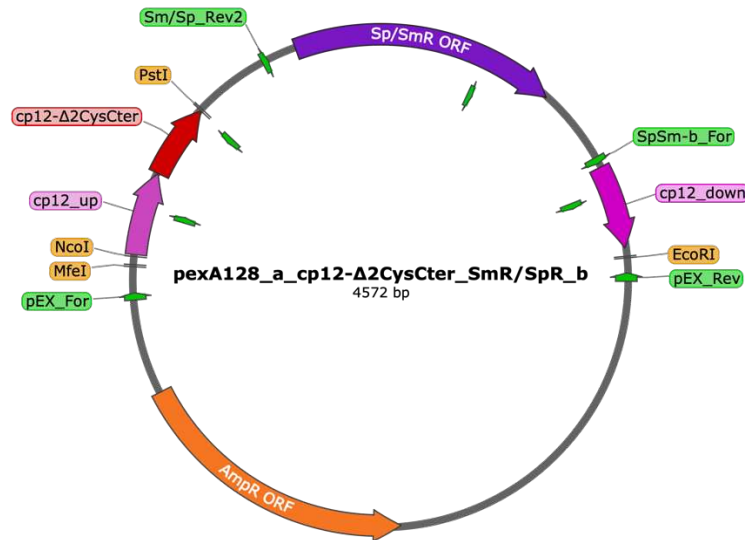
ORF Amp^R en orange

Régions cp12_up et cp12_down en rose

ORF cp12_Δ2CysN-ter en rouge foncé

Substitution Cys – Ala surligné en vert

Annexe 10. Carte et séquence du vecteur de clonage *pEX-A128_a_cp12-Δ2CysCter_Sm^R/Sp^R_b*. Ce vecteur a été conçu pour transformation chez la souche *Synechocystis* sp. PCC 6803 Δ*cp12*, et recombinaison homologue de la cassette Km^R du génome du mutant cyanobactérien au niveau des régions plateformes a (*cp12_up*) et b (*cp12_dwn*) et obtention de la souche *Synechocystis* sp. PCC 6803 Δ*2CysCter*, exprimant le gène *cp12* délété de ses cystéines en C-ter et portant une cassette de résistance à la Sm et Sp.



CCATGGATTAAACTTGGGAATCGGTGTAGTTGACCCCATGCTTCCCGGAGGAAACTGTTGTGAACCTGTGATC
 ATTTTCACAATTCCTTCATACTATCCCCGGTGGTGCCCCCAAGGCGCTATGGGGCAAGTTGAGGTCAGCAAAGT
 GAGGAAAACCGCATATTCCTCGTTGTGGTTCCTTCTACCCAAAGCCAACCAAATTCGCTAACATGAATGAGCCTT
 ACTCTCTGTAGACAATCGTAGGCGGTTAAACTTTATGAGCAATATTCAAGAAAAAATCGAACAGGAGCTAGCC
 AACGCTAGACAAGTTTGCAGTACCGATGAAGCCTCTCCGGCGGAGTGCCTGCGGCCTGGGATGCGGTGGAAG
 AGCTAGAAGCGGAAGCCGCCACCAACGTCAACAACATCCACCCAAACTACCCTGGAAAAGTTC**GCC**GACG
 AAAACCCCGACGCTGCTGAG**GCC**CGCATTTACGACGACTAG**CTGCAG**caagcttatgctgtaaaccttttgtaaaaaatttttaaata
 aaaaaggggacctctagggccccaaftaattagtaataatactattaaaggtcattcaaaaggtcatccaccggatcaattcccctgcacctgaccgaacgcagcgggtgtaacggc
 gcagtggcgggtttcatggcTTGTTAgtactgtttttggggTACAGTctatgcctcgggcatccaagcagcaagcgcgttacccggtggctgatgtttgatgttatggagc
 agcaacgatgttacgcagcaggcagctgccctaaaacaagttaaacatcATGAGGGAAGCGGTGATCGCCGAAAGTATCGACTCAACTATC
 AGAGGTAGTTGGCGTCATCGAGCGCCATCTCGAACCGACGTTGCTGGCCGTACATTTGTACGGCTCCGCGAGTG
 GATGGCGGCTGAAGCCACACAGTGATATTGATTTGCTGGTTACGGTGACCGTAAGGCTTGATGAAACAACGC
 GGCGAGCTTTGATCAACGACCTTTTGAAAACCTTCGGCTTCCCCTGGAGAGAGCGAGATTCTCCGCGCTGTAGA
 AGTCACCATTTGTTGTGCACGACGACATCATTCCGTGGCGTTATCCAGCTAAGCGCGAAGCTGCAATTTGGAGAAT
 GGCAGCGCAATGACATTTGCAGGTATCTTCGAGCCAGCCACGATCGACATTGATCTGGCTATCTTGCTGACA
 AAAGCAAGAAACATAGCTTGCCTTGGTTCAGTCCAGCGCGGAGGAACCTTTGATCCGGTTCCTGAACAGG
 ATCTATTTGAGGCGCTAAATGAAACCTTAACGCTATGGAACCTCGCCGCCGACTGGGCTGGCGATGAGCGAAA
 TGTAGTGCTTACGTTGTCCCGCATTTGGTACAGCGCAGTAACCGGCAAAATCGCGCCGAAGGATGTCGCTGCC
 GACTGGGCAATGGAGCGCCTGCCGGCCAGTATCAGCCCGTCATACTTGAAGCTAGACAGGCTTATCTTGGAC
 AAGAAGAAGATCGCTTGGCCTCGCGCGCAGATCAGTTGGAAGAATTTGTCCACTACGTGAAAAGCGGAGATCAC
 CAAGGTAGTCGGCAAATAAgtctacaacaacaattgggagatataatcatgaaagcgtgcttttctgtatcgcaatagttggcgaagtaatgcaacatccgcatt
 aaaatctagcagggtttactaagcTGATCCGGTGGATGACCTTTTGAATGACCTTTAATAGATTATATACTAATTAATTGG
 GGACCTTAGAGGTCCCCTTTTTATTTTAAAAAATTTTTTACAAAAACGGTTTACAAGCATAAAGCTTGCTCAAT
 CAATCACCGGATCGGGCTGATGGGGCAAACCAATGGCCGCAACTGGCGATCGCCAGGATTTCCAAAACGATG
 TTTTTGGTTGAAGCAGTGACAATTACCTGGGGGTTGTTACTGCTCTTTGCTGGTTTTGTTAAGGGATGGTGGTA
 AAGGATATCTTCCCTGGGGTTAACCTAGGGACCTTCCAGGACCGCAGCTTCCACGTCTTGGCGACTGAGGGAA
 TATTTAAAGCTCCGCACCACTTTGCGTTGGGGTTGGTGGGGGgtggcgatcgtcttagagctagcgaattcctgtgaaattgtatccgctc
 caatfccaacacaacatcagcgggaagcataaagtgaagcctgggtgctaatgagtgaactcacattaattgcttgcctcactgcccgttccagctcgggaacct
 gctgtccagctcattaatgaatcgccaacgcgcggggagagcgggttgcgtattggcgctcttccgtctcctcactgactcgtcgcctcggctgtccgctcggcga
 gcggtatcagctcactcaaaagcggtatccacagaatcagggtataacgcaggaaagaacatgtgacaaaagccagcaaaaagccaggaacagcgtaaaagggcc
 gcgttctggctttttccataggctcccccctgacgagcatcacaanaatcgacgtcaagtcagaggtggcgaacccgacaggactataaagataaccagcgtttcccccctg
 gaagctccctcgtgcctcctgttccgacctgcccgttaccggatacctgtccgcttctccctcgggaagcgtggcgttctcatagctcacgcttaggtatctcagttcgggtg
 aggtcgtcctcaagctgggtgtgtgcacgaacccccgtcagcccaccgctgcgcttaccggtaactatgctttagtccaacccggtaagacacgacttatccgactg
 gcagcagccactggaacaggattagcagagcaggtatgtagcgggtctacagagttctgaagtggtgcctaacctacggctacactagaagaacagatattgtatctcgcctc
 gctgaagccagttacctcggaaaaagattgtagctcttgatccggcaacaacaccgcgtgtagcgggtgtttttttgcaagcagcagattaccgcgagaaaaaaggat

ctcaagaagatcctttgatctttctacgggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgtaaggatfttggctcatgagattacaaaaggatctcacctagatcctftaaatataaa
atgaagtttaaatcaatctaaagtataatagtaaaacttggctgacagttaccaatgcttaacagtgaggcaccatctcagcgatctgtctattcgttccatagttgcctgactccc
cgtcgtgtagataactacgatacgggagggttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgactcccacgctcaccggctccagattatcagcaataaaccagccagccgga
agggccgagcgcagaagtggctctgcaactttatccgctccatccagctatfaattgttccgggaagctagagtaagtagtccagtaatagttgcgcaacgttggcattgc
tacaggcatcgtggtgacgctcgtctgttggatggctcattcagctccgggtcccaacgatcaaggcaggtacatgatccccatgttgcgcaaaaagcggfTagctcctcggf
cctccgatcgttgcagaagtaagtggccgagttatcaactcatggttatggcagcactgcataattcttactgtcatgcatccgtaagatgctttctgtgactggtgagtagtactca
ccaagtattctgagaatagtgtatcggcgaccgagttgctcttcccggcgtcaatacgggataataaccgcccacatagcagaactttaaagtctcatattgaaaacgttctc
ggggcgaactctcaaggatcttaccgcttggatccagttcgtatgaaccactcgtgcaccaactgatcttcagcatctttactttaccagcgttctgggtgagcaaaaacag
gaaggcaaatgcccaaaaagggaataaggcgcacggaaatgtgaatactcactcttccctttcaatattgaagcattatcaggggtattgtctcatgagcggatacatat
ttgaatgtattgaaaaataaacaatagggttccgcgacatttcccgaagtccactgacgtctaagaaccattatcatgacattaacctataaaaataggcgtatcag
aggcccttctcgcgcggttccggtgatgacggfgaaaacctctgacacatgcagctccggagacggtcacagcttgtctgtaagcggatgccgggagcagacaagcccgtcag
ggcgcgtcagcgggtgttggcgggtgctggggctggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgaccaattggtcagctcaggttaattaacgta

Légende :

NcoI surligné en jaune

PstI surligné en bleu

ORF Amp^R en orange

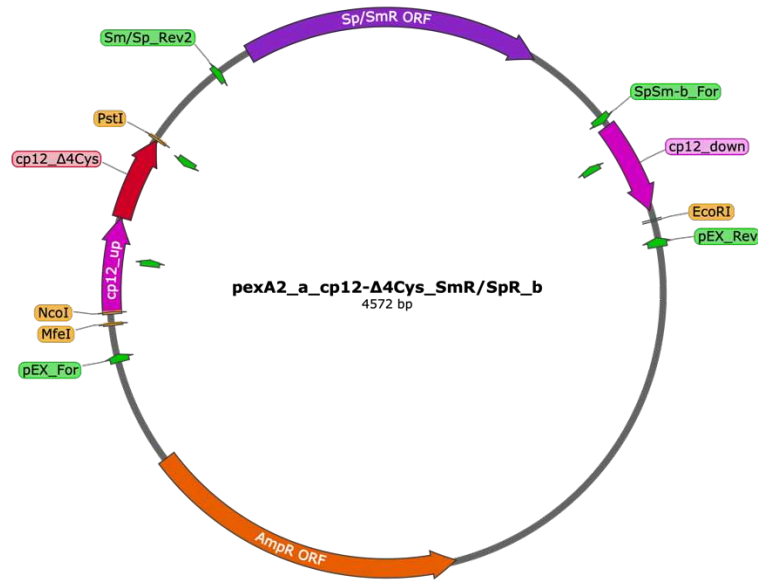
Régions cp12_up et cp12_down en rose

ORF cp12_Δ2CysC-ter en rouge foncé

Substitution Cys – Ala surligné en vert

Annexe 11. Carte et séquence du vecteur de clonage pEX-A128_a_cp12-Δ4Cys_Sm^R/Sp^R_b.

Ce vecteur a été conçu pour transformation chez la souche *Synechocystis* sp. PCC 6803 Δcp12, et recombinaison homologue de la cassette Km^R du génome du mutant cyanobactérien au niveau des régions plateformes a (cp12_up) et b (cp12_dwn) et obtention de la souche ***Synechocystis* sp. PCC 6803 Δ4Cys**, exprimant le gène cp12 délété de ses cystéines en C-ter et de ses cystéines en N-ter et portant une cassette de résistance à la Sm et Sp.



CCATGGATTAAACTTGGGAATCGGTGTAGTTGACCCCATGCTTCCCGGAGGAACTGTTGTGAACCTGTGATC
 ATTTTCACAATTCCTCATACTATCCCGGTGGTGGCCCCAGGGCCGTATGGGGCAAGTTGAGGTCAGCAAAGT
 GAGGAAAACCCGCATATTCCTCGTTGTGGTTCCCTTACCCAAAGCCAACCAAAATTCGTAACATGAATGAGCCTT
 ACTCTCTGTAGACAATCGTAGGCGGTTAAACTTTATGAGCAATATTCAAGAAAAAATCGAACAGGAGCTAGCC
 AACGCTAGACAAGTTGCCAGTACCGATGAAGCCTCTCCGGCGGAGGCCGCTGCGGCCTGGGATGCGGTGGAA
 GAGCTAGAAGCGGAAGCCGCCACCAACGTCAACAACATCCCACCAAACTACCCTGGAAAAGTTCGCCGAC
 GAAAACCCCGACGCTGCTGAGGCCCGCATTTACGACGACTAG**CTGCAG**caagctttatcctgtgtaaacggtttgtgaaaaattttaaat
 aaaaaaggggacctctagggtcccaataatagtaataataatcattaaaggtcattcaaaaggtcatccaccggatcaattcccctgcaacctgaccgaacgcagcgggtgtaacgg
 cgcagtggcggttttcatggcTTGTTAAtgactgtttttgggTACAGTctatgctccteggcacccaagcagcaagcgcggttacccgtgggtcgatgtttgatgttatggag
 cagcaacgatgttacgcagcaggcagtcgcctaaacaaggttaaacatcATGAGGGAAGCGGTGATCGCCGAAGTATCGACTCAACTAT
 CAGAGGTAGTTGGCGTTCATCGAGCGCCATCTCGAACCGGATTAACCGGCAAAAATCGCGCGAAGGATGTCGCTGCC
 GATGGCGGCCTGAAGCCACACAGTGATATTGATTTGCTGGTTACGGTGACCGTAAGGCTTGATGAAAACAACG
 CGGCGAGCTTTGATCAACGACCTTTTGAAAACCTTCGGCTTCCCCTGGAGAGAGCGAGATTCTCCGCGCTGTAGA
 AGTCACCATTTGTTGTGCACGACGACATCATTCCGTGGCGTTATCCAGCTAAGCGCGAACTGCAATTTGGAGAAT
 GGCAGCGCAATGACATTCTTGCAGGTATCTTCGAGCCAGCCACGATCGACATTGATCTGGCTATCTTGCTGACA
 AAAGCAAGAGAACATAGCGTTGCCTTGGTAGGTCCAGCGCGGAGGAACTCTTTGATCCGGTTTCTGAACAGG
 ATCTATTTGAGGCGCTAAATGAAACCTTAACGCTATGGAACCTGCCGCCCAGCTGGGCTGGCGATGAGCGAAA
 TGTAGTGTTACGTTGTCCTCGCATTGGTACAGCGCATTAACCGGCAAAAATCGCGCGAAGGATGTCGCTGCC
 GACTGGGCAATGGAGCGCCTGCCGCCCCAGTATCAGCCCGTCATACTTGAAGCTAGACAGGCTTATCTTGAC
 AAGAAGAAGATCGCTTGGCCTCGCGCGAGATCAGTTGGAAGAATTTGTCCACTACGTGAAAGGCGAGATCAC
 CAAGGTAGTCGCAATAAAtgtctacaacaacaattgggagatataatcatgaaagcgtgcttttctgtatcgaatagttgccaagtaacgcaacatccgcat
 aaaaactagcagggcttactaagcTGATCCGGTGGATGACCTTTTGAATGACCTTTAATAGATTATATACTAATTAATTGG
 GGACCTTAGAGGTTCCCTTTTTATTTTAAAAATTTTTTACAAAACGGTTTACAAGCATAAAGCTTGCTCAAT
 CAATCACCGGATCGGGCTGATGGGGCAAACCAATGGCCCAACTGGCGATCGCCAGGATTTCCAAAACGATG
 TTTTGGTTGAAGCAGTGACAATTACCTGGGGTGTACTGCTCTTTGCTGGTTTTGTTAAGGGATGGTGGTA
 AAGGATATCTTCCCTGGGGTTAACCTAGGGACCTTCCAGGACCGCAGCTTCCACGCTTGGCGACTGAGGGAA
 TATTTAAAGCTCCGCAACACTTTGCGTTGGGGTTGGTGGGGGgtggcgatcgtctagagctagcgaattcctgtgtgaaattgtatccgctc
 acaattccacacacatacagccggaagcataaagtgtaaagcctgggtgctaatgagtgagtaactcacattaatgctgtgctcactgccgcttccagtcgggaacct
 gtcgtgccagctcattaatgaatcgccaacgcgcggggagagcgggttgcgcttggcgctcttccgctcctcgtcactgactcgtcgcctcggctgctcggcgga
 gcggtatcagctcactcaagcggttaacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccggaacctgaaaagcc
 gogtgtcggcttttccataggtcctgccccctgacgagcatcaaaaatcagcgtcaagttagaggtggcgaaacccgacaggactataaagataaccagcgttccccctg
 gaagctccctgtgcgctcctgttccgacctgcccgttaccgatacctgccccttcccttcgggaagcgtggcgtttctcatagctcagctgtaggtatctcagttcgggtg
 aggtcgttcgctcaagctgggctgtgtgacgcaacccccgttcagccgaccgctgcgcttaccggtaactatcgtcttgagtcacaacccggtaagacacgacttatgccaactg
 gcagcagccactgtaacaggttagcagagcaggtatgtagccggtgctacagagtcttgaagtgtggcctaactacgctcactagaagaacagtattgtatctgcgctc

gctgaagccagttacctcggaaaaagatggtagctcttgatccggcaacaaccaccgctggtagcgggtgtttttgttgaagcagcagattacgcgagaaaaaggat
ctcaagaagatcctttgatctttctacgggctgacgctcagtggaacgaaactcaggttaaggatfttggtcatgagattatcaaaaaggatctcactagatccttttaataaaa
atgaagtttaaatcaactaaagtatatatagtaaaactggctgacagttaccaatgcttaacagtgaggcacctatctcagcgatctgctatttcgtcatccatagttgcctgactccc
cgtcgtgtagataactacgatacgggagggcttaccatctggcccagtgctgcaatgataccgcgactcccacgctcaccggctccagattatcagcaataaaccagccagccgga
aggccgagcgcagaagtggctcgaactttatccgctccatccagctatataatgttgccgggaagctagagtaagtgtcggcagftaatagtttgcgaacgftgttccattgc
tacaggcatcgtgggtgcacgctcgtcgtttggatggctcattcagctccgggtcccaacgatcaaggcgagttacatgatccccatgtgtgcaaaaaagggtT agctcctcgg
cctccgatcgtgtcagaagtaagtggccagtgttatcactcatggttatggcagcactgcataattcttactgtcatccatccgtaagatgcttttctgtgactggtgagtactca
ccaagtcatctgagaatagtgatgcggcaccgagttgctcttggccggcgaataaccgcgccacatagcagaacttfaaaagtctcatcattgaaaaacgttctc
ggggcgaactctcaaggatctaccgctgttgagatccagttc gatgtaaccactcgtgcaccaactgatcttcagcatctttactttaccagcgtttctgggtgagcaaaaacag
gaaggcaaatgcccaaaaaagggaataaggcgacacggaaatgttgaatactcactcttctttcaataatattgaagcattatcagggttattgtctcatgagcggatacatat
ttgaatgtattgaaaaataacaaataggggtccgcgcacattccccgaaaagtccacctgacgtctaaagaaccattatcatgacattaacctataaaaaataggcgtacag
aggcccttcgtctcgcgcgttccgggtgatgacgggtgaaaacctctgacacatgacgtcccggagacgggtcacagcttgtctgtaagcggatgccgggagcagacaagcccgtcag
ggcgcgtcagcgggtgttggcgggtgctgggcttaactatgcccacatcagacagattgtactgagagtgaccaattggtcgacctgagtttaftaacgta

Légende :

NcoI surligné en jaune

PstI surligné en bleu

ORF Amp^R en orange

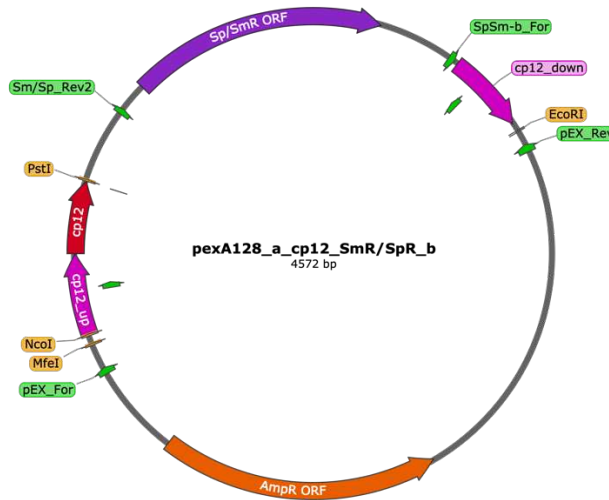
Régions cp12_up et cp12_down en rose

ORF cp12 en rouge foncé

Substitution Cys – Ala surligné en vert

Annexe 12. Carte et séquence du vecteur de clonage pEX-A128_a_cp12_SmR/SpR_b

Ce vecteur a été conçu pour transformation chez la souche *Synechocystis* sp. PCC 6803 Δcp12, et recombinaison homologue de la cassette Km^R du génome du mutant cyanobactérien au niveau des régions plateformes a (cp12_up) et b (cp12_dwn) et obtention de la souche *Synechocystis* sp. PCC 6803 WT_R, exprimant le gène cp12 sauvage et portant une cassette de résistance à la Sm et Sp.



CCATGGATTAAACTTGGGAATCGGTGTAGTTGACCCCATGCTTCCCGGAGGAAACTGTTGTGAACCTGTGATC
 ATTTTACAATTCTCATACTATCCCCGGTGGTGGCCCCAGGGCCGTATGGGGCAAGTTGAGGTCAGCAAAGT
 GAGGAAAACCGCATATTCCTCGTTGTGGTTCCTTCTACCCAAAGCCAACCAAATTCGCTAACATGAATGAGCCTT
 ACTCTCTGTAGACAATCGTAGGCGGTTAAACTTTATGAGCAATATTCAAGAAAAAATCGAACAGGAGCTAGCC
 AACGCTAGACAAGTTTGCAGTACCGATGAAGCCTCTCCGGCGGAGTGCCTGCGGCCTGGGATGCGGTGGAAG
 AGCTAGAAGCGGAAGCCGCCACCAACGTCAACAACATCCACCCAAACTACCCTGAAAAAGTTCTGTGACGA
 AAACCCCGACGCTGCTGAGTGCCGCAATTTACGACGACTAGCTGCAGcaagctttatgcttgaaccggtttgtgaaaaatttttaataaaa
 aaaggggaccttaggtcccaattaatagtaataataatctattaaggtcattcaaaaggtatccaccggatcaattcccctgcaccttgaccgaacgcagcgggtgaaccggcgc
 agtggcgggttttcatggcTTGTTAAtgactgtttttggggTACAGTctatgctcctgggcatcaagcagcaagcgcgttacccgtgggtcgatgtttgatgttatggagcag
 caacgatgttacgcagcagggcagtcgccctaaacaaagtaaacatcATGAGGGAAGCGGTGATCGCCGAAGTATCGACTCAACTATCA
 GAGGTAGTTGGCGTCATCGAGCGCCATCTCGAACCCGAGTTGCTGGCCGTACATTTGTACGGCTCCGCAGTGG
 ATGGCGCCTGAAGCCACACAGTGATATTGATTTGCTGGTTACGGTGACCGTAAGGCTTGATGAAACAACCGC
 GCGAGCTTTGATCAACGACCTTTTGAAACTTCGGCTTCCCCTGGAGAGAGCGAGATTCTCCGCGCTGTAGAA
 GTCACCATTGTTGTGCACGACGACATCATTCCGTGGCGTTATCCAGCTAAGCGCGAACTGCAATTTGGAGAATG
 GCAGCGCAATGACATTCTTGCAGGTATCTTCGAGCCAGCCACGATCGACATTGATCTGGCTATCTTGCTGACAA
 AAGCAAGAGAACATAGCGTTGCCTTGGTAGGTCACGGCGGAGGAACTCTTTGATCCGGTTCCTGAACAGGA
 TCTATTTGAGGCGCTAAATGAAACCTTAACGCTATGGAACCTCGCCGCCGACTGGGCTGGCGATGAGCGAAAT
 GTAGTGCTTACGTTGTCCCGCATTTGGTACAGCGCAGTAACCGGCAAAAATCGCGCCGAAGGATGTGCGTGCCG
 ACTGGGCAATGGAGCGCCTGCCGGCCAGTATCAGCCCGTCATACTTGAAGCTAGACAGGCTTATCTTGACAA
 AGAAGAAGATCGCTTGGCCTCGCGCGCAGATCAGTTGGAAGAATTTGTCCACTACGTGAAAGGCGAGATCACC
 AAGGTAGTCGGCAAATAAtgctacaacaaatfgggagatatafatgaaggtgctctttctgttatcgcaatagttggcgaagtaatcgcaatccgcattaa
 aatctagcagaggccttactaagcTGATCCGGTGGATGACCTTTTGAATGACCTTAATAGATTATATTACTAATTAATTGGG
 GACCTTAGAGGTTCCCTTTTTTATTTTAAAAATTTTTTACAAAAACGGTTTACAAGCATAAAGCTTGCTCAATC
 AATCACCGGATCGGGCTGATGGGGCAAAACCAATGGCCGAACCTGGCGATCGCCAGGATTTCCAAAACCGATGT
 TTTTGGTTGAAGCAGTGACAATTACCTGGGGGTTGTTACTGCTCTTTGCTGGTTTTGTTAAGGGGATGGTGGTA
 AAGGATATCTTCCCTGGGGTTAACCTAGGGACCTTCCAGGACCGCAGCTTCCACGCTTGGCGACTGAGGGAA
 TATTTAAAGCTCCGCACTTTGCGTTGGGGTTGGTGGGGGgtggcgatcgctctagactagcgaattcctgtgtgaaattgtatccgctc
 acaattccacacaacatacagccggaagcataaagtgtaaagcctggggtgctaatgagtgagtaactacattaattgctgtgcctcactgccgcttccagctcgggaaacct
 gctgtgccactgcattaatgaatcgccaacgcgcggggagagcgggttgcgattggcgctctccgctcctcctcactgactgcgctcggctgtccgctcggcga
 gcggtatcagctcactcaaaaggcgttaacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaacccgtaaaaaggcc
 ggtgtgtggcgttttccataggtcctcggccccctgacgagcatcaaaaaatcgactcaagtcagaggtggcgaaaccgacaggactataaagataaccaggcgttccccctg
 gaagctcccctgtgcgctcctctgttccgacctgaccgataactgtccgctcttcccttccctcgggaagcgtggcgttctcatagctcagctgtgtaggtatctcagctcgggtg
 aggtcgttcctcaagctggcgtgtgtgcacgaaccccccttcagccgacccgctgcgcttaccggtaactatcgtcttgagccaaccggtaagacacgactatcgccactg
 gcagcagccactgtaaacaggattagcagagcaggtatgtagcgggtctacagagttctgaagtggtggcctaactacggctacactagaagaacgattttgtatctgcgctc
 gctgaagccagttaccctcggaaaaagattggtagctcttgcacgcaaaacaccgctgtgtagcgggtgtttttgttgaagcagcagattacgcgcaaaaaaaggat
 ctcaagaagatccttgcattttctacgggctgacgctcagtggaacgaaaactcagctaaaggatgttgcagattatcaaaaaggatctcactagatcctttaaataaaa
 atgaagtttaaatcaatcaaaagtatatatgataaactgtctgacagttaccaatgcttaacagtgaggcacctatctcagcagatctgtctatttctcatccatagttgcctgactccc
 gctcgtgtagataactacgatacgggagggcttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgactcccacgctcaccggctccagatttatcagcaataaacccagccagccgga

aggccgagcgcagaagtggctctgcaactttatccgcctccatccagctctattaattgttgcgggaagctagagtaagtagtccagtaataagttgcgaacggtgtgaccattgc
tacaggcatcgtgggtgacgctcgtcgtttggatggcttcattcagctccgggtcccaacgatcaaggcgagttacatgatccccatggtgcaaaaaagcggT agctcctcggg
cctccgatcgtgtcagaagtaagtggccgagtggtatcactcatgggtatggcagcactgcataattcttactgtcatccatccgtaagatgctttctgtgactggtgagtactca
ccaagtcatctgagaatagtgatgcggcgaccgagtgctcttggccgctcaatcgggataataccgcccacatagcagaactttaaagtctcatattgaaaaactgtcttc
ggggcgaactctcaaggatctaccgctgtgagatccagttcgaatgaaccactcgtgcaccaactgatctcagcatctttactttaccagcgtttctgggtgagcaaacag
gaaggcaaatgccgcaaaaaagggaataaggcgacacggaaatggtgaatactcactcttctttcaatattatgaagcattatcaggggtattgtctcatgagcggatacatat
ttgaatgtatttagaaaaataaacaataaggggtccgcgcacatttccccgaaaagtccacctgacgtctaaagaaccattattatcatgacattaacctataaaaaatagggtatcag
aggcccttctcgcgcggttcggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcccggagacggtcacagcttgtctgtaagcggatgccgggagcagacaagcccgtcag
ggcgcgtcagcgggtgttggcgggtgcgggctggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgaccaattggtcgaacctcagtttaactaactgta

Légende :

NcoI surligné en jaune

PstI surligné en bleu

ORF Amp^R en orange

Régions cp12_up et cp12_down en rose

ORF cp12 sauvage en rouge foncé

cgctgtgtagataactacgatacgggagggtaccatctggccccagtgtgcaatgataccgcgactcccacgtcaccggctccagattatcagcaataaaccagccagccgga
agggccgagcgcagaagtggctcgaacttatccgcctccatccagctatfaattgtgccccggaagctagagtaagtgtcgcagtaaatgttgcgcaacggtgtgcccattgc
tacaggcatcgtggtgcacgctcgtgttgatggcttcattcagctccgggtcccaacgatcaaggcgagttacatgatccccatgtgtgcaaaaaagcggT agctcctcgg
cctccgatcgtgtcagaagtaagtggccgaggttatcactcatggtatggcagcactgcataatctcttactgtcatgccatccgtaagatgctttctgtgactggtgagtactcaa
ccaagtcatctgagaatagtgatgcggcgaccgagttgctcttggccggcgaataacggcgcacataaccgcacacatagcagaacttfaaaagtgtcatcattgaaaaactcttc
ggggcgaaaaactcgaaggatctaccgctgtgagatccagttcgtgtaaccactcgtgcaccaactgatcttcagcatctttactttaccagcgtttctgggtgagcaaaaacag
gaaggcaaaatgcccaaaaagggaataaggcgacacggaaatgtgaaatactcactctcttttcaatatttgaagcattatcagggttattgtctcatgagcggatacatat
ttgaatgtattgaaaaataaacaatagggggtccgcacattccccgaaaagtccacctgacgtctaagaaccattatcatgacattaacctataaaaataggggtatcag
aggcccttctgtctcgcgcttcggtgatgacggtgaaaactctgacacatgcagctccggagacggtcacagcttctgtgtaagcggatgccgggagcagacaagcccgtcag
ggcgctcagcgggtgtgccccgtcgggctggttaactatgcggcatcagagcagattgactgagagtgaccaattggtcaccctcaggttaattaacgta

Légende :

*Nco*I surligné en jaune

*Pst*I surligné en bleu

ORF Amp^R en orange

Régions cp12_up et cp12_down en rose

ORF cp12_Core en rouge foncé

Substitution Asp – Ala surligné en vert

Substitutions Glu – Ala surlignées en rose

Annexe 14. Fréquence de codon du gène *prk* codant pour la phosphoribulokinase de 4 souches de cyanobactéries : *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Synechococcus* sp. PCC 7942, *Synechococcus* sp. PCC 7425 et *Cyanothece* sp. PCC 7425.

Codon frequencies for *prk_Scy6803*: Save...

		Second Position					
		T	C	A	G		
First Position	T	TTT → Phe (F) 0,33	TCT → Ser (S) 0,25	TAT → Tyr (Y) 0,35	TGT → Cys (C) 0,75	Third Position	T
		TTC → Phe (F) 0,67	TCC → Ser (S) 0,33	TAC → Tyr (Y) 0,65	TGC → Cys (C) 0,25		C
		TTA → Leu (L) 0,14	TCA → Ser (S) 0,00	TAA → * 1,00	TGA → * 0,00		A
		TTG → Leu (L) 0,26	TCG → Ser (S) 0,00	TAG → * 0,00	TGG → Trp (W) 1,00		G
C	CTT → Leu (L) 0,06	CCT → Pro (P) 0,13	CAT → His (H) 0,50	CGT → Arg (R) 0,28	T		
	CTC → Leu (L) 0,17	CCC → Pro (P) 0,53	CAC → His (H) 0,50	CGC → Arg (R) 0,17	C		
	CTA → Leu (L) 0,06	CCA → Pro (P) 0,13	CAA → Gln (Q) 0,45	CGA → Arg (R) 0,00	A		
	CTG → Leu (L) 0,31	CCG → Pro (P) 0,20	CAG → Gln (Q) 0,55	CGG → Arg (R) 0,39	G		
A	ATT → Ile (I) 0,69	ACT → Thr (T) 0,30	AAT → Asn (N) 0,27	AGT → Ser (S) 0,25	T		
	ATC → Ile (I) 0,31	ACC → Thr (T) 0,40	AAC → Asn (N) 0,73	AGC → Ser (S) 0,17	C		
	ATA → Ile (I) 0,00	ACA → Thr (T) 0,05	AAA → Lys (K) 0,52	AGA → Arg (R) 0,11	A		
	ATG → Met (M) 1,00	ACG → Thr (T) 0,25	AAG → Lys (K) 0,48	AGG → Arg (R) 0,06	G		
G	GTT → Val (V) 0,29	GCT → Ala (A) 0,21	GAT → Asp (D) 0,52	GGT → Gly (G) 0,48	T		
	GTC → Val (V) 0,11	GCC → Ala (A) 0,64	GAC → Asp (D) 0,48	GGC → Gly (G) 0,32	C		
	GTA → Val (V) 0,07	GCA → Ala (A) 0,00	GAA → Glu (E) 0,73	GGA → Gly (G) 0,00	A		
	GTG → Val (V) 0,54	GCG → Ala (A) 0,14	GAG → Glu (E) 0,27	GGG → Gly (G) 0,20	G		

Green = preferred codon

Format:

Codon frequencies for *prk_Sco7942*: Save...

		Second Position					
		T	C	A	G		
First Position	T	TTT → Phe (F) 0,33	TCT → Ser (S) 0,00	TAT → Tyr (Y) 0,24	TGT → Cys (C) 0,00	Third Position	T
		TTC → Phe (F) 0,67	TCC → Ser (S) 0,29	TAC → Tyr (Y) 0,76	TGC → Cys (C) 1,00		C
		TTA → Leu (L) 0,03	TCA → Ser (S) 0,14	TAA → * 0,00	TGA → * 0,00		A
		TTG → Leu (L) 0,32	TCG → Ser (S) 0,21	TAG → * 1,00	TGG → Trp (W) 1,00		G
C	CTT → Leu (L) 0,09	CCT → Pro (P) 0,12	CAT → His (H) 0,33	CGT → Arg (R) 0,23	T		
	CTC → Leu (L) 0,18	CCC → Pro (P) 0,41	CAC → His (H) 0,67	CGC → Arg (R) 0,59	C		
	CTA → Leu (L) 0,06	CCA → Pro (P) 0,06	CAA → Gln (Q) 0,33	CGA → Arg (R) 0,00	A		
	CTG → Leu (L) 0,32	CCG → Pro (P) 0,41	CAG → Gln (Q) 0,67	CGG → Arg (R) 0,18	G		
A	ATT → Ile (I) 0,14	ACT → Thr (T) 0,00	AAT → Asn (N) 0,30	AGT → Ser (S) 0,07	T		
	ATC → Ile (I) 0,86	ACC → Thr (T) 0,61	AAC → Asn (N) 0,70	AGC → Ser (S) 0,29	C		
	ATA → Ile (I) 0,00	ACA → Thr (T) 0,00	AAA → Lys (K) 0,31	AGA → Arg (R) 0,00	A		
	ATG → Met (M) 1,00	ACG → Thr (T) 0,39	AAG → Lys (K) 0,69	AGG → Arg (R) 0,00	G		
G	GTT → Val (V) 0,18	GCT → Ala (A) 0,20	GAT → Asp (D) 0,44	GGT → Gly (G) 0,46	T		
	GTC → Val (V) 0,50	GCC → Ala (A) 0,40	GAC → Asp (D) 0,56	GGC → Gly (G) 0,54	C		
	GTA → Val (V) 0,05	GCA → Ala (A) 0,20	GAA → Glu (E) 0,59	GGA → Gly (G) 0,00	A		
	GTG → Val (V) 0,27	GCG → Ala (A) 0,20	GAG → Glu (E) 0,41	GGG → Gly (G) 0,00	G		

Green = preferred codon

Format:

Codon frequencies for prk_Sco7002:

Save...

Second Position

		T	C	A	G	
First Position	T	TTT → Phe (F) 0,33	TCT → Ser (S) 0,23	TAT → Tyr (Y) 0,44	TGT → Cys (C) 0,50	T
		TTC → Phe (F) 0,67	TCC → Ser (S) 0,15	TAC → Tyr (Y) 0,56	TGC → Cys (C) 0,50	C
		TTA → Leu (L) 0,07	TCA → Ser (S) 0,08	TAA → * 0,00	TGA → * 0,00	A
		TTG → Leu (L) 0,00	TCG → Ser (S) 0,00	TAG → * 1,00	TGG → Trp (W) 1,00	G
	C	CTT → Leu (L) 0,17	CCT → Pro (P) 0,00	CAT → His (H) 0,33	CGT → Arg (R) 0,17	T
		CTC → Leu (L) 0,52	CCC → Pro (P) 0,79	CAC → His (H) 0,67	CGC → Arg (R) 0,33	C
		CTA → Leu (L) 0,10	CCA → Pro (P) 0,07	CAA → Gln (Q) 0,67	CGA → Arg (R) 0,06	A
		CTG → Leu (L) 0,14	CCG → Pro (P) 0,14	CAG → Gln (Q) 0,33	CGG → Arg (R) 0,44	G
	A	ATT → Ile (I) 0,40	ACT → Thr (T) 0,22	AAT → Asn (N) 0,46	AGT → Ser (S) 0,08	T
		ATC → Ile (I) 0,60	ACC → Thr (T) 0,56	AAC → Asn (N) 0,54	AGC → Ser (S) 0,46	C
		ATA → Ile (I) 0,00	ACA → Thr (T) 0,11	AAA → Lys (K) 0,57	AGA → Arg (R) 0,00	A
		ATG → Met (M) 1,00	ACG → Thr (T) 0,11	AAG → Lys (K) 0,43	AGG → Arg (R) 0,00	G
	G	GTT → Val (V) 0,31	GCT → Ala (A) 0,12	GAT → Asp (D) 0,62	GGT → Gly (G) 0,14	T
		GTC → Val (V) 0,19	GCC → Ala (A) 0,59	GAC → Asp (D) 0,38	GGC → Gly (G) 0,48	C
		GTA → Val (V) 0,23	GCA → Ala (A) 0,24	GAA → Glu (E) 0,79	GGA → Gly (G) 0,14	A
		GTG → Val (V) 0,27	GCG → Ala (A) 0,06	GAG → Glu (E) 0,21	GGG → Gly (G) 0,24	G

Green = preferred codon

Format:

DNA

GCA → Ala (A)

Codon frequencies for prk_Cya7425:

Save...

Second Position

		T	C	A	G	
First Position	T	TTT → Phe (F) 0,45	TCT → Ser (S) 0,25	TAT → Tyr (Y) 0,44	TGT → Cys (C) 0,25	T
		TTC → Phe (F) 0,55	TCC → Ser (S) 0,25	TAC → Tyr (Y) 0,56	TGC → Cys (C) 0,75	C
		TTA → Leu (L) 0,06	TCA → Ser (S) 0,00	TAA → * 0,00	TGA → * 0,00	A
		TTG → Leu (L) 0,13	TCG → Ser (S) 0,13	TAG → * 1,00	TGG → Trp (W) 1,00	G
	C	CTT → Leu (L) 0,06	CCT → Pro (P) 0,18	CAT → His (H) 0,38	CGT → Arg (R) 0,23	T
		CTC → Leu (L) 0,23	CCC → Pro (P) 0,53	CAC → His (H) 0,63	CGC → Arg (R) 0,36	C
		CTA → Leu (L) 0,00	CCA → Pro (P) 0,12	CAA → Gln (Q) 0,29	CGA → Arg (R) 0,05	A
		CTG → Leu (L) 0,52	CCG → Pro (P) 0,18	CAG → Gln (Q) 0,71	CGG → Arg (R) 0,36	G
	A	ATT → Ile (I) 0,41	ACT → Thr (T) 0,27	AAT → Asn (N) 0,40	AGT → Ser (S) 0,19	T
		ATC → Ile (I) 0,59	ACC → Thr (T) 0,73	AAC → Asn (N) 0,60	AGC → Ser (S) 0,19	C
		ATA → Ile (I) 0,00	ACA → Thr (T) 0,00	AAA → Lys (K) 0,71	AGA → Arg (R) 0,00	A
		ATG → Met (M) 1,00	ACG → Thr (T) 0,00	AAG → Lys (K) 0,29	AGG → Arg (R) 0,00	G
	G	GTT → Val (V) 0,18	GCT → Ala (A) 0,25	GAT → Asp (D) 0,59	GGT → Gly (G) 0,44	T
		GTC → Val (V) 0,18	GCC → Ala (A) 0,63	GAC → Asp (D) 0,41	GGC → Gly (G) 0,28	C
		GTA → Val (V) 0,04	GCA → Ala (A) 0,06	GAA → Glu (E) 0,68	GGA → Gly (G) 0,08	A
		GTG → Val (V) 0,61	GCG → Ala (A) 0,06	GAG → Glu (E) 0,32	GGG → Gly (G) 0,20	G

Green = preferred codon

Format:

DNA

GCA → Ala (A)

- Séquence en acides-aminés de la RuBisCO activase

Les entrées SYNPC7942_1427, CYAN7425_3420, slr0012 et SYNPC7002_A1796 sur le programme CLUSTAL (permettant l'alignement multiple de séquence), correspondent aux séquences protéiques de la RuBisCO activase, respectivement des souches *Synechococcus* sp. PCC 7942, *Cyanothece* sp. PCC 7425, *Synechocystis* sp. PCC 6803 et *Synechococcus* sp. PCC 7002.

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

Synpcc7942_1427      MSMKTLPKERRFETFSYLPPLSDRQIAAQIEYMI EQGFHPLIEFN EHSNPEEFYWTMWKL      60
Cyan7425_3420      --MKTLPKERRYETFSYLPPLSDAQIARQIQYTL DQGYIPAVEFNEDSNAETYYWTMWKL      58
slr0012             --MKTLPKERRYETLSYLPPLTDQQIAKQVEFL LDQGFIPGVFEFEDPQPETHFWTMWKL      58
SYNPC7002_A1796    --MKTLPKERRYETLSYLPPLSDQQIARQVQYMM DQGYIPGIEFEKDP TPELHHWTLWKL      58
                    *****:*:*:*****:*  *** *:::  ::*: *  :***:.  *  ._*:*:**

Synpcc7942_1427      PLFDCKSPQQVLDREVRECRSEYGD CYIRVAGFDNIKQCQTVSFIVHRPGRY----- 111
Cyan7425_3420      PLFNATSPQEVLN EVQQCRSEYSGSYIRV VAFDNV KQCQVMSFIVHKPNASGGYRY 114
slr0012             PFFGGATANEVLA EVRECRSENPNCYIRVIGFDNIKQCQTVSFIVHKPNQNGRY- 113
SYNPC7002_A1796    PLFNASSAQEVLN EVRECRSEYSDCYIRV VGFDNIKQCQTVSFIVYKPNQTRY--- 111
                    *:*.  :  ::**  **::*****  ..****  .***:*****:*****:*.

```

- Séquence en acides-aminés de la petite sous-unité de la RuBisCO

Les entrées slr0011, SYNPC7002_A1797, SYNPC7942_1535, et CYAN7425_3421 sur le programme CLUSTAL (permettant l'alignement multiple de séquence), correspondent aux séquences protéiques de la RuBisCO activase, respectivement des souches *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Synechococcus* sp. PCC 7002, *Synechococcus* sp. PCC 7942 et *Cyanothece* sp. PCC 7425.

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

slr0011             -----MQTKHIAQATVKVLQSYLTYQAVLR IQSELGETNPPQAIWLNQYLASHSIO      51
SYNPC7002_A1797    -----MEFKKVAKETAITLQSYLTYQAVRL ISQQLSETNPGQAIWLGFEFSKRHP IQ      51
Synpcc7942_1535    MASTQRAKPEMPRISRD TARM LVNYLTYQAV CVIR DQLAETNPAGAYRLQVFSAEFSFQ      60
Cyan7425_3421     -----MDLKQISKDTTKTLISYLYTYQAVRVV LAQLDETEPKRAYWLHQFSAREKLO      51
                    *:  :  :::  *  *  *****  :  :  *  **  *  *  *  :  :  *

slr0011             NGETFTELLDENKELVLRILAVREDIAESVLD FLPGMTNRNSLAESNIAHRRHLLERLTR      111
SYNPC7002_A1797    ESDLYLEAMMLENKELVLRILTVRENLAEGVLE FLEPMVLSQIKQSNGNHRRSLLERLTO      111
Synpcc7942_1535    DGEAYLAALLNHDR ELGLRVMTVREHLAEHIL DYLPEMTIAQIQEANINHRRALLERLTG      120
Cyan7425_3421     DGEAYLQALFQEEQR LAFRI LTVREHIAEQIAD FLELLRTGIQQANLQORTROLERMTO      111
                    :.  :  *  :  :  .  :  .  *  :  :  :  *  :  :  :  *  :  :  :  *  :  :  :  *  :  :  :  *  :  :  :  *  :  :  :  *  :  :  :  *  :  :  :  *

slr0011             TVAEDNFPSETSNGESN--NNDSPS----- 136
SYNPC7002_A1797    VDSSTDQT-EPNPGESD--TSEDSE----- 134
Synpcc7942_1535    LGAEPFLPETEVSDRPSDSATPDDASNASHAD 152
Cyan7425_3421     VDLRTTGTHPEQDANPETEA----- 131
                    *  .  .

```

Annexe 17. Revue publiée dans Life 2020, 10, 71. Veaudor, T.; Blanc-Garin, V.; Chenebault, C.; Diaz-Santos, E.; Sassi, J.-F.; Cassier-Chauvat, C.; Chauvat, F. Recent Advances in the Photoautotrophic Metabolism of Cyanobacteria: Biotechnological Implications.

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 Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), 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

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, CO₂, 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; CO₂ 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 (N₂) 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 O₂, provide food, and recycle CO₂ 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 ¹⁴C) for the production of ¹⁴C-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, CO₂, 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 CO₂ into a huge energy-dense biomass [20], and they can also tolerate high CO₂-containing (≥50%) industrial gas [19].

Furthermore, cyanobacteria also have the potential for the photoproduction of hydrogen (H₂) 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 coastal 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 H₂O molecules into O₂ 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 (CO₂) nitrogen (N₂, NO₃, NH₄) (see below), sulfur (SO₄), 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 CO₂ Fixation

Carbon fixation is arguably one of the most important metabolic processes on Earth. A large part of the biological fixation of CO₂ (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 biphosphate carboxylase/oxygenase enzyme (RubisCO) catalyzes the addition of one molecule of CO₂ to one molecule of the five-carbons sugar 1,5-ribulose biphosphate (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



Considering its pivotal role, RubisCO is surprisingly inefficient as an enzyme [32,33]. In plants, its slow catalytic rate of only ~2–10 CO₂ 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 O₂ from CO₂. 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 CO₂. 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 CO₂-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 CO₂ and O₂. 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) CO₂ 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-hydroxypropionate 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 CO₂-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 HCO₃⁻ [39,43].

4. Carboxysome A Complex Intracellular Compartment for CO₂ 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 (10⁴-fold) diffusion rates of CO₂ 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 CO₂ 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 (HCO₃⁻), over the uncharged molecules of O₂ and CO₂. The diffusion of CO₂ across the carboxysome (10⁻⁵ cm·s⁻¹) is significantly slower than CO₂ crossing the cellular membrane (10⁻² cm/s) [45]. Following this, the carbonic anhydrase (CA) catalyzes the hydration of CO₂ and dehydration of HCO₃⁻ inside the carboxysome lumen to accumulate CO₂ in the vicinity of RubisCO, which fixes CO₂ to generate 3-phosphoglycerate (3PGA) that then leaves the carboxysome and is transformed into sugars by the cytosolic Calvin-cycle enzymes [46].

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].

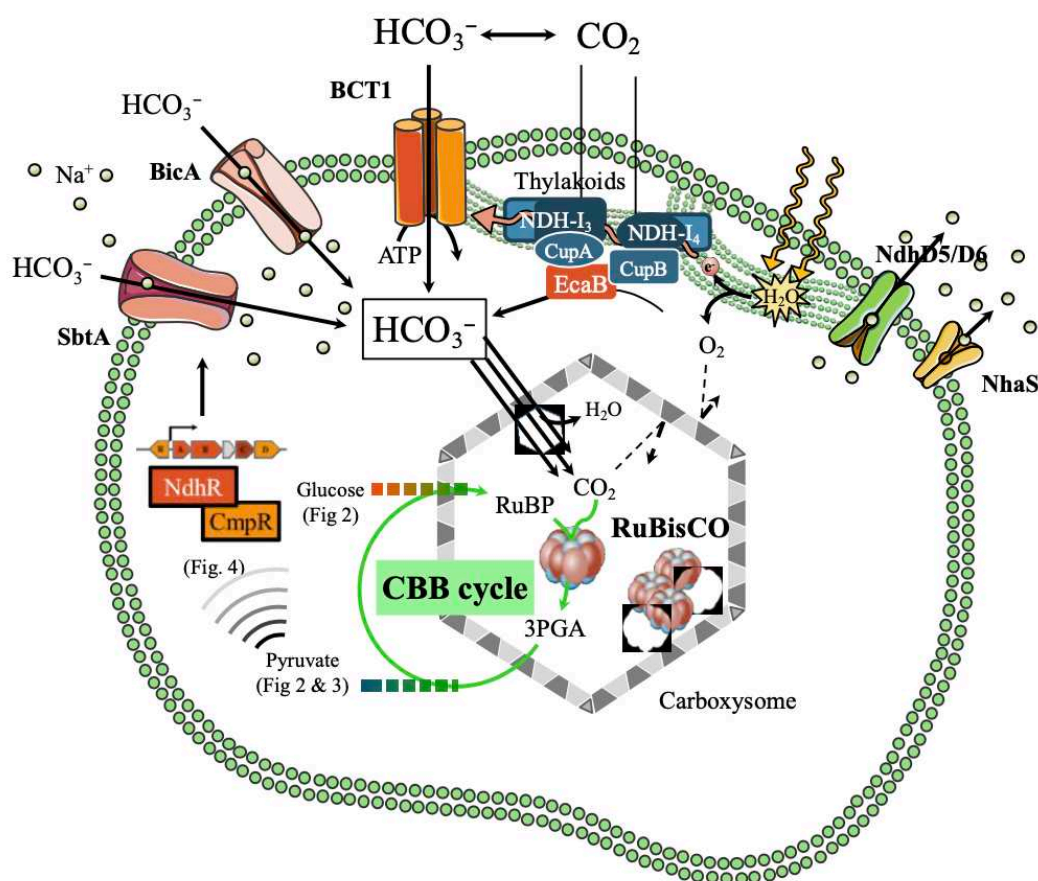


Figure 1. Schematic representation of the carbon concentrating mechanism in *Synechocystis* PCC 6803. It comprises two CO_2 uptake systems, a Na^+/H^+ gradient-restoring system, and three HCO_3^- transporters, as well as the carboxysome. Inside the carboxysome, the carbonic anhydrase (CA) enzyme dehydrates 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 C_i -inducible NDH-I₃ complex consisting of the NdhF3/NdhD3/CupA proteins and (ii), the high-flux/low-

affinity/constitutive complex NDH-I₄ 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 CO₂ into HCO₃[−] by creating a proton gradient. The HCO₃[−] 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.

The essential genes for α - and β -carboxysomes are encoded by the *cs0* 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 Stoichiometry

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 CO₂ 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 μ E m^{−2}·s^{−1}), moderate light (ML, 50 μ E m^{−2}·s^{−1}), ML + high CO₂ (3% v/v), and low light (LL, 10 μ E m^{−2}·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 C₃ plants, to increase the photosynthetic fixation of CO₂ 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 bacocystous morphologies [54].

Together, the above-mentioned conceptual frameworks provide the foundation for ‘plug-and-play’ engineering of carboxysomes as CO₂ fixation modules in a variety of biotechnological applications (production of chemicals from solar energy and CO₂).

5. Phosphoenol-Pyruvate-Carboxylase: Another Important Player in CO₂ Fixation

In addition to RubisCO, the phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) enzyme catalyzes an irreversible carboxylation of the three-carbons metabolite phosphoenolpyruvate (PEP) with bicarbonate (HCO₃⁻) 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 CO₂ 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 biphosphate (FBP) using the phosphofructokinase enzyme (PFK) that is unique to the EMP pathway. Then, fructose biphosphate 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].

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 CO₂, 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 + CO₂), mixotrophic (light + CO₂ + 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].

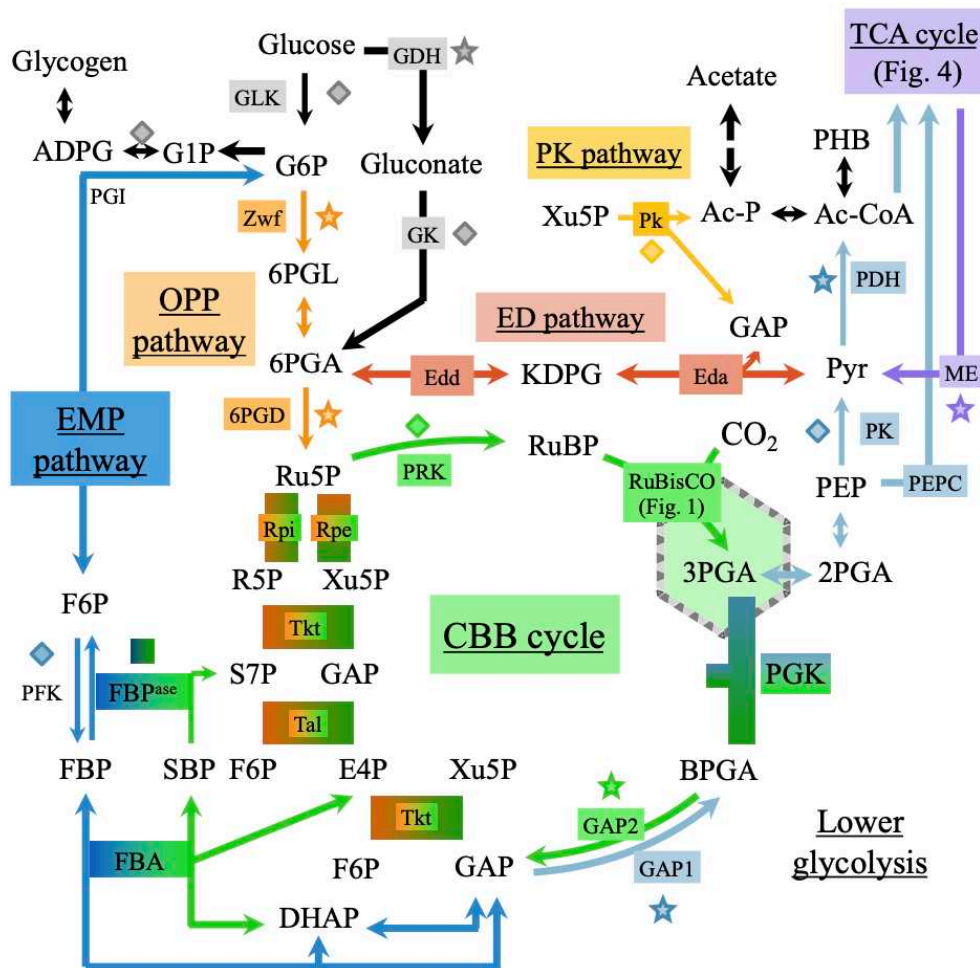


Figure 2. Schematic representation of the carbon metabolism in *Synechocystis* PCC 6803. These pathways comprise the EMP pathway (Embden–Meyerhof–Parnas, upper glycolysis and neoglucogenesis, typical reactions in dark blue), lower glycolysis (light blue), the ED pathway (Entner–Doudoroff; red), the OPP 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^{asc}: 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.

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.

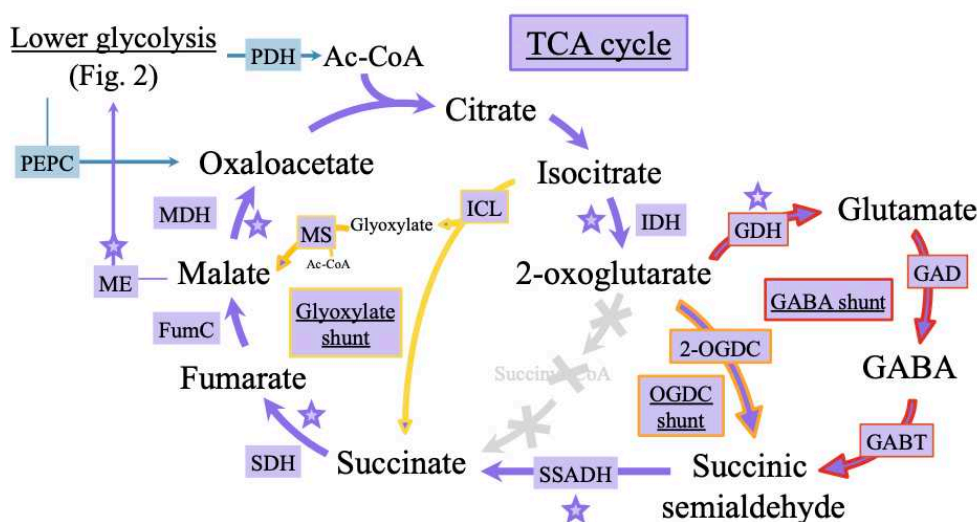


Figure 3. Schematic representation of the cyanobacterial shunts of the tricarboxylic acid (TCA) cycle. Cyanobacteria possess an atypical TCA cycle lacking the 2-oxoglutarate (2OG) dehydrogenase, which normally transforms 2-OG to succinyl-CoA that generates succinate via the succinate-CoA ligase. The 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].

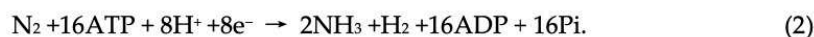
Ammonium is the preferred nitrogen source. When it is present with other suitable nitrogen sources, it is utilized first. As ammonium is scarce in most habitats, cyanobacteria possess a high-affinity ammonium uptake system, such as the Amt1 permease of *Synechocystis* PCC 6803. However, ammonium transport 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 ecosystems (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 ($\leq 1 \mu\text{M}$). This urea transport system, encoded by the five genes cluster *urtABCDE*, is regulated by the NtcA transcription factor [69]. Inside the cells, urea ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) 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]:



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 (*Crocospheera*, *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 CO₂ 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 CO₂-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 CO₂ 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].

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-13* operon), which encode the high-affinity CO₂-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 CO₂-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 CO₂ fixation by RubisCO [36].

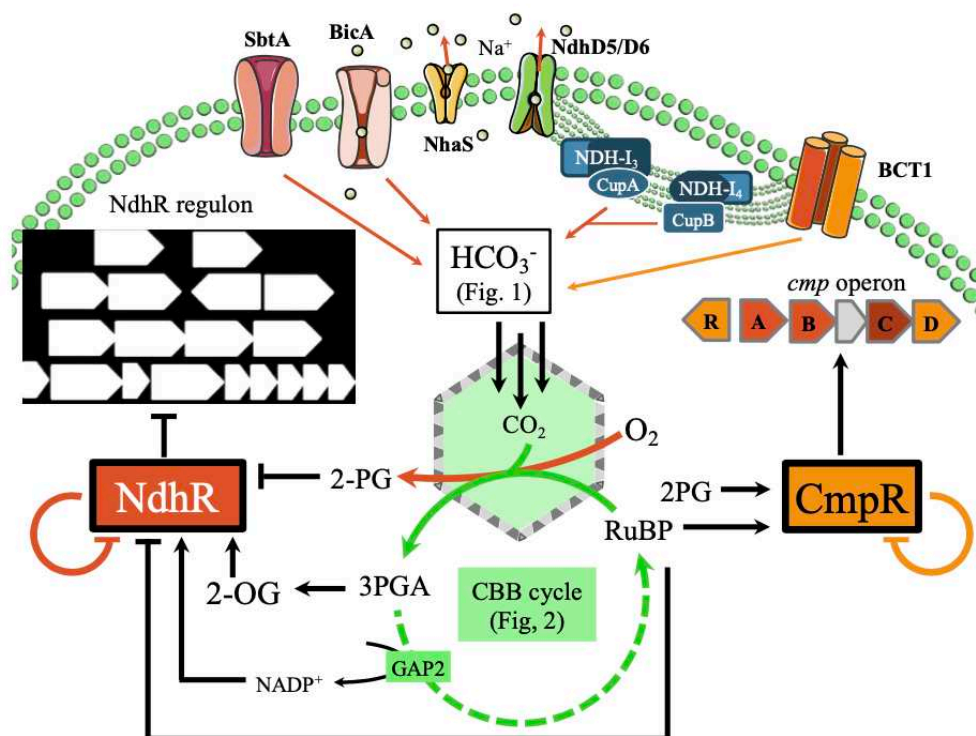


Figure 4. Regulation of the *Synechocystis* PCC 6803 carbon concentration mechanism by the CmpR and NdhR transcription factors and their modulation by the NADP⁺, 2OG (2-oxoglutarate, an indicator of high C/N ratio), 2PG (2-phosphoglycolate, an indicator of low C/N ratio), and RuBP metabolites. NADP⁺ 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 O₂/CO₂ 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.

8.1.2. 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 CO₂ 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 P_{II} 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 (K_d 26 μM) similar to that of the prion protein (K_d of about 14 μM) and nickel-binding chaperone proteins (Ni^{2+} K_d 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].

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].

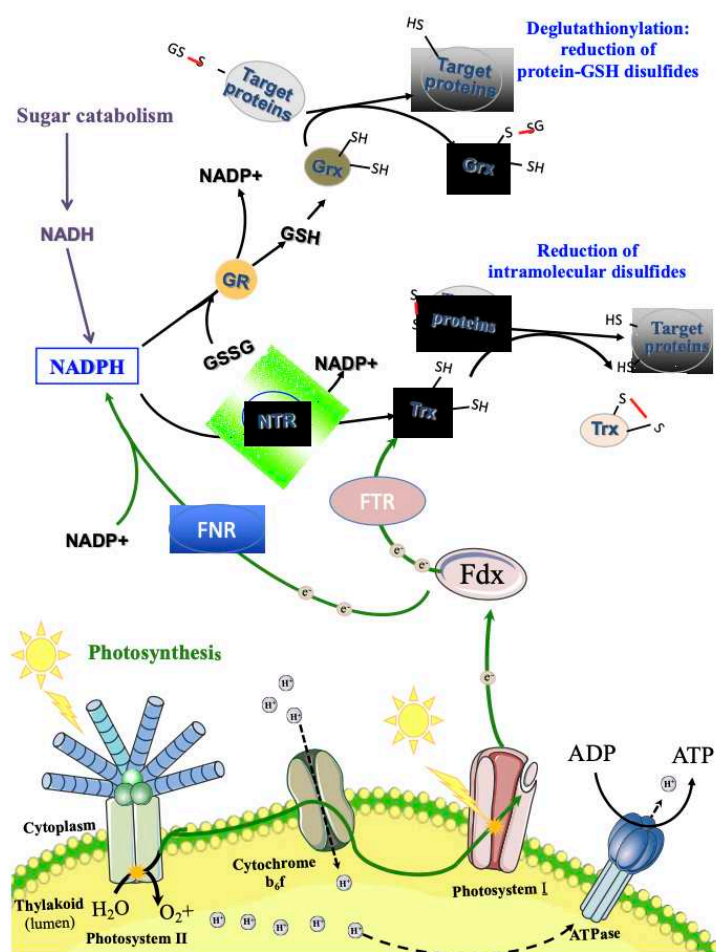


Figure 5. Schematic representation of the redox regulation mechanisms. Fed: ferredoxin; FNR: ferredoxin NADP⁺ reductase; FTR: ferredoxin thioredoxin reductase; GR: glutathione reductase; Grx: glutaredoxin; GSH: reduced glutathione (monomer form); GSSG: oxidized glutathione (glutathione

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.

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 O₂, 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 CO₂-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 CO₂-capturing photosynthetic production of PHA/PHB polymers by cyanobacteria is very interesting since these bioplastics can be completely degraded into CO₂ 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 CO₂ 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 BBIJU under the European Union's Horizon 2020 R&I program and (ii) the ANR CalvinDesign (ANR-17-CE05-0001).

Acknowledgments: We thank Pr. 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

- Schopf, J.W. The paleobiological record of photosynthesis. *Photosynth. Res.* **2011**, *107*, 87–101, doi:10.1007/s11120-010-9577-1.
- 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, doi:10.1016/j.cub.2016.11.056.
- 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, doi:10.1111/1462-2920.13118.
- 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, doi:10.1016/j.jmb.2018.08.013.
- 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*, doi:10.3389/fmicb.2016.00529.
- Cassier-Chauvat, C.; Chauvat, F. Cyanobacteria: Wonderful Microorganisms for Basic and Applied Research. *eLS* **2018**, doi:10.1002/9780470015902.a0027884.
- 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, doi:10.1093/dnares/10.4.137.
- 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.
- Cassier-Chauvat, C.; Veaudor, T.; Chauvat, F. Comparative genomics of DNA recombination and repair in cyanobacteria: Biotechnological implications. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, doi:10.3389/fmicb.2016.01809.
- 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, doi:10.1111/mmi.13296.

11. Demay, J.; Bernard, C.; Reinhardt, A.; Marie, B. Natural products from cyanobacteria: Focus on beneficial activities. *Mar. Drugs* **2019**, *17*, doi:10.3390/md17060320.
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, doi:10.1016/j.hal.2015.11.002.
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. (Olga), 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, doi:10.1017/S147355041500021X.
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.
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, doi:10.1007/s00253-017-8105-z.
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, doi:10.1074/jbc.R117.815886.
18. Lin, P.C.; Pakrasi, H.B. Engineering cyanobacteria for production of terpenoids. *Planta* **2019**, *249*, 145–154, doi:10.1007/s00425-018-3047-y.
19. Ducat, D.C.; Way, J.C.; Silver, P.A. Engineering cyanobacteria to generate high-value products. *Trends Biotechnol.* **2011**, *29*, 95–103, doi:10.1016/j.tibtech.2010.12.003.
20. Jansson, C.; Northen, T. Calcifying cyanobacteria—the potential of biomineralization for carbon capture and storage. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21*, 365–371, doi:10.1016/j.copbio.2010.03.017.
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, doi:10.3390/ijms151119938.
22. Magnuson, A. Heterocyst thylakoid bioenergetics. *Life* **2019**, *9*, doi:10.3390/life9010013.
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*, doi:10.3389/fbioe.2019.00033.
24. Veaudor, T.; Cassier-Chauvat, C.; Chauvat, F. Genomics of Urea Transport and Catabolism in Cyanobacteria: Biotechnological Implications. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, doi:10.3389/fmicb.2019.02052.
25. Lambert, D.H.; Stevens, S.E. Photoheterotrophic growth of *Agmenellum quadruplicatum* PR-6. *J. Bacteriol.* **1986**, *165*, doi:10.1128/jb.165.2.654-656.1986.
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, doi:10.1016/j.biotechadv.2008.07.006.
27. Rippka, R.; Deruelles, J.; Waterbury, J.B.; Herdman, M.; Stanier, R.Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology* **11**: 1–61. *J. Gen. Microbiol.* **1979**, *111*, 1–61, doi:10.1099/00221287-111-1-1.
28. Magdaong, N.C.M.; Blankenship, R.E. Photoprotective, excited-state quenching mechanisms in diverse photosynthetic organisms. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 5018–5025, doi:10.1074/jbc.TM117.000233.
29. Barber, J. Photosynthetic water splitting by the Mn₄Ca₂+OX catalyst of photosystem II: Its structure, robustness and mechanism. *Q. Rev. Biophys.* **2017**, *50*, doi:10.1017/S0033583517000105.
30. Gao, J.; Wang, H.; Yuan, Q.; Feng, Y. Structure and function of the photosystem supercomplexes. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, doi:10.3389/fpls.2018.00357.
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, doi:10.1128/AEM.03579-14.
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, doi:10.1146/annurev-arplant-043015-111633.
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, doi:10.1016/j.biortech.2017.05.199.

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, doi:10.1007/s11120-017-0336-4.
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, doi:10.1038/nsmb.3062.
36. Forchhammer, K.; Selim, K.A. Carbon/nitrogen homeostasis control in cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **2019**, *44*, 33–53, doi:10.1093/femsre/fuz025.
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, doi:10.1074/jbc.M117.810861.
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, doi:10.1128/mBio.01537-19.
39. Zhang, A.; Carroll, A.L.; Atsumi, S. Carbon recycling by cyanobacteria: Improving CO₂ fixation through chemical production. *FEMS Microbiol. Lett.* **2017**, *364*, doi:10.1093/femsle/fnx165.
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, doi:10.1016/j.ymben.2016.06.005.
41. Atsumi, S.; Higashide, W.; Liao, J.C. Direct photosynthetic recycling of carbon dioxide to isobutyraldehyde. *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27*, 1177–1180, doi:10.1038/nbt.1586.
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, doi:10.3389/fbioe.2014.00017.
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, doi:10.1074/jbc.C113.543132.
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, doi:10.1104/pp.18.01190.
45. Kinney, J.N.; Axen, S.D.; Kerfeld, C.A. Comparative analysis of carboxysome shell proteins. *Photosynth. Res.* **2011**, *109*, 21–32, doi:10.1007/s11120-011-9624-6.
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, doi:10.1093/jxb/erw162.
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, doi:10.3390/life5021141.
48. Turmo, A.; Gonzalez-Esquer, C.R.; Kerfeld, C.A. Carboxysomes: Metabolic modules for CO₂ fixation. *FEMS Microbiol. Lett.* **2017**, *364*, doi:10.1093/femsle/fnx176.
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*, doi:10.1038/s41586-019-0880-5.
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, doi:10.1073/pnas.1525145113.
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, doi:10.1105/tpc.18.00787.
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, doi:10.1104/pp.18.01217.
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, doi:10.1016/j.cell.2013.10.044.
54. MacCready, J.S.; Basalla, J.L.; Vecchiarelli, A.G. Origin and Evolution of Carboxysome Positioning Systems in Cyanobacteria. *Mol. Biol. Evol.* **2020**, doi:10.1093/molbev/msz308.

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*, doi:10.1038/srep41080.
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*, doi:10.1186/1754-6834-7-99.
57. Luinenburg, I.; Coleman, J.R. A requirement for phosphoenolpyruvate carboxylase in the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942. *Arch. Microbiol.* **1990**, *154*, 471–474, doi:10.1007/BF00245230.
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, doi:10.1016/j.ymben.2018.05.013.
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*, doi:10.1186/s13068-020-1653-y.
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, doi:10.1016/j.ymben.2020.03.007.
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, doi:10.1073/pnas.1521916113.
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, doi:10.1016/j.cbpa.2017.09.004.
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, doi:10.1002/bit.26287.
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*, doi:10.1016/j.plantsci.2019.110287.
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*, doi:10.1099/mic.0.000459.
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, doi:10.1074/jbc.M115.648170.
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, doi:10.1080/1040841X.2018.1446902.
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*, doi:10.3389/fmicb.2019.01428.
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, doi:10.1093/nar/gkx860.
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.
71. Herrero, A.; Stavans, J.; Flores, E. The multicellular nature of filamentous heterocyst-forming cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **2016**, *40*, 831–854, doi:10.1093/femsre/fuw029.
72. Avilan, L.; Roumezi, B.; Risoul, V.; Bernard, C.S.; Kpebe, A.; Belhadjassine, 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, doi:10.1007/s00253-018-8989-2.

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, doi:10.1111/nph.15979.
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, doi:10.1046/j.1365-2958.2000.01789.x.
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, doi:10.1016/j.tplants.2018.09.008.
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, doi:10.1073/pnas.1716062115.
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, doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04100.x.
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, doi:10.1111/tpj.13644.
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-Genes Regulatory Mechanisms* **2020**, *1863*, 194477, doi:10.1016/j.bbagr.2019.194477.
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, doi:10.1046/j.1365-2958.2001.02239.x.
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, doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04021.x.
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, doi:10.1104/pp.108.123505.
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, doi:10.1074/jbc.M311336200.
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, doi:10.1128/JB.00543-12.
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, doi:10.1093/jxb/erw068.
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, doi:10.1016/j.ijhydene.2012.11.118.
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, doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04867.x.
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, doi:10.1016/j.femsle.2005.07.024.
89. Patterson-Fortin, L.M.; Colvin, K.R.; Owtrim, G.W. A LexA-related protein regulates redox-sensitive expression of the cyanobacterial RNA helicase, crhR. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 3446–3454, doi:10.1093/nar/gkl426.
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, doi:10.1128/AEM.01009-14.

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*, doi:10.1186/s13068-017-0832-y.
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**, doi:10.1111/mmi.14512.
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*, doi:10.1371/journal.pone.0083181.
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.; Koppelaar, 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, doi:10.1074/mcp.M114.041160.
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, doi:10.1007/s11120-006-9093-5.
96. López-Calcano, P.E.; Howard, T.P.; Raines, C.A. The CP12 protein family: A thioredoxin-mediated metabolic switch? *Front. Plant Sci.* **2014**, *5*, doi:10.3389/fpls.2014.00009.
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, doi:10.1073/pnas.1806668115.
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, doi:10.1073/pnas.1906722116.
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, doi:10.1104/pp.112.210542.
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, doi:10.1042/BST20120097.
101. Kanno, M.; Carroll, A.L.; Atsumi, S. Global metabolic rewiring for improved CO₂ fixation and chemical production in cyanobacteria. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, doi:10.1038/ncomms14724.
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, doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06550.x.
103. Narainsamy, K.; Marteyn, B.; Sakr, S.; Cassier-Chauvat, C.; Chauvat, F. Genomics of the Pleiotropic Glutathione System in Cyanobacteria. In *Advances in Botanical Research*; Elsevier Academic Press: San Diego, USA, 2013; pp. 157–188; ISBN 9780123943132.
104. Carvalho, A.N.; Marques, C.; Guedes, R.C.; Castro-Caldas, M.; Rodrigues, E.; Van Horsen, 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, doi:10.1002/1873-3468.12177.
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, doi:10.1016/j.ijhydene.2013.07.124.
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, doi:10.1128/JB.00272-13.
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, doi:10.1021/pr500625a.
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, doi:10.1093/mp/ssn072.

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, doi:10.1111/j.1574-6976.2009.00183.x.
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*, doi:10.1371/journal.pone.0055564.
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, doi:10.1038/s41467-018-04588-9.
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, doi:10.1128/mBio.00650-16.
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, doi:10.1016/j.jcis.2013.05.061.
114. Rossi, F.; De Philippis, R. Role of cyanobacterial exopolysaccharides in phototrophic biofilms and in complex microbial mats. *Life* **2015**, *5*, 1218–1238, doi:10.3390/life5021218.
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*, doi:10.1016/j.biotechadv.2019.107419.
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*, doi:10.3390/biom10040582.
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, doi:10.1007/s11120-016-0286-2.
118. Balaji, S.; Gopi, K.; Muthuvelan, B. A review on production of poly β hydroxybutyrate from cyanobacteria for the production of bio plastics. *Algal Res.* **2013**, *2*, 278–285, doi:10.1016/j.algal.2013.03.002.
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*, doi:10.1186/s13568-017-0443-9.
120. Ansari, S.; Fatma, T. Cyanobacterial polyhydroxybutyrate (PHB): Screening, optimization and characterization. *PLoS ONE* **2016**, *11*, doi:10.1371/journal.pone.0158168.
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 scytonemica* TISTR 8095. *Bioresour. Technol.* **2016**, *212*, doi:10.1016/j.biortech.2016.04.035.
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, doi:10.3390/life10040047.
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, doi:10.1016/j.algal.2017.05.013.

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*, doi:10.1016/j.marpolbul.2020.111092.
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**, doi:10.1007/s00128-020-02820-1.



© 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 18. Revue publiée dans Genes 2021, 12, 500. Cassier-Chauvat, C.; Blanc-Garin, V.; Chauvat, F. Genetic, Genomics, and Responses to Stresses in Cyanobacteria: Biotechnological Implications.

Review

Genetic, Genomics, and Responses to Stresses in Cyanobacteria: Biotechnological Implications

Corinne Cassier-Chauvat , Victoire Blanc-Garin and Franck Chauvat * 

Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, 91198 Gif-sur-Yvette, France; corinne.cassier-chauvat@cea.fr (C.C.-C.); victoire.blanc-garin@cea.fr (V.B.-G.)

* Correspondence: franck.chauvat@cea.fr; Tel.: +33-1-69-08-78-11

Abstract: Cyanobacteria are widely-diverse, environmentally crucial photosynthetic prokaryotes of great interests for basic and applied science. Work to date has focused mostly on the three non-nitrogen fixing unicellular species *Synechocystis* PCC 6803, *Synechococcus* PCC 7942, and *Synechococcus* PCC 7002, which have been selected for their genetic and physiological interests summarized in this review. Extensive “omics” data sets have been generated, and genome-scale models (GSM) have been developed for the rational engineering of these cyanobacteria for biotechnological purposes. We presently discuss what should be done to improve our understanding of the genotype-phenotype relationships of these models and generate robust and predictive models of their metabolism. Furthermore, we also emphasize that because *Synechocystis* PCC 6803, *Synechococcus* PCC 7942, and *Synechococcus* PCC 7002 represent only a limited part of the wide biodiversity of cyanobacteria, other species distantly related to these three models, should be studied. Finally, we highlight the need to strengthen the communication between academic researchers, who know well cyanobacteria and can engineer them for biotechnological purposes, but have a limited access to large photobioreactors, and industrial partners who attempt to use natural or engineered cyanobacteria to produce interesting chemicals at reasonable costs, but may lack knowledge on cyanobacterial physiology and metabolism.

Keywords: *Synechocystis* PCC 6803; *Synechococcus* PCC 7942; *Synechococcus* PCC 7002; biodiversity; genotype-phenotype relationships; conjugation; transformation; RSF1010 plasmid; neutral cloning sites



Citation: Cassier-Chauvat, C.; Blanc-Garin, V.; Chauvat, F. Genetic, Genomics, and Responses to Stresses in Cyanobacteria: Biotechnological Implications. *Genes* **2021**, *12*, 500. <https://doi.org/10.3390/genes12040500>

Academic Editors: Denis Baurain and Luc Cornet

Received: 26 January 2021
Accepted: 25 March 2021
Published: 29 March 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 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 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Cyanobacteria are ancient Gram-negative prokaryotes that perform oxygenic photosynthesis and are phylogenetically close to recently discovered non-photosynthetic bacteria termed Melainabacteria and Sericytochromatia [1,2]. Cyanobacteria are regarded as the producer of the atmospheric oxygen (O₂) of Earth [3] and the ancestors of the plant chloroplast [4]. Cyanobacteria capture solar energy at high efficiencies (3–9%) [5] to power up their efficient photoautotrophic metabolism, which fixes huge amounts of inorganic carbon (CO₂, NaHCO₃, and Na₂CO₃) and nitrogen (N₂, NH₄, NO₂, NO₃, or urea) [6,7], into an enormous biomass [8] that supports a large part of the food chain.

By colonizing aquatic ecosystems (fresh, brackish, and marine waters) and soils (including deserts) of our planet, cyanobacteria are inevitably exposed to multiple stresses such as solar ultraviolet radiations and variations in light intensity and quality, inorganic-nutrients availabilities, temperatures (high and low), salinity, pH (acidic and basic), drought, and pollutants (herbicides and heavy-metals). In addition, cyanobacteria are involved in numerous interactions with competitors, predators, or symbiotic hosts [9]. Consequently, it is not surprising that cyanobacteria have evolved as a widely diverse organisms, which are of high interest for basic and applied research [10]. They display various metabolisms and morphologies [11,12], and numerous species can differentiate cells, akinetes (spores) and/or heterocysts, which are dedicated to growth or survival under adverse conditions [13,14].

Thus, cyanobacteria are good model organisms to study the impact of environmental conditions on the physiology, metabolism, and morphology of microbial cells. Furthermore, cyanobacteria synthesize a wide variety of bioactive metabolites (Figure 1), many of which being of interest for human health [15–18], and they are regarded as promising cell factories for the production of chemicals (fuels and biodegradable bioplastics) from highly abundant natural resources: solar energy, water (not necessarily potable), CO₂, and minerals, thanks to their active photosynthesis and the synthetic biology tools of model species [10,19,20].

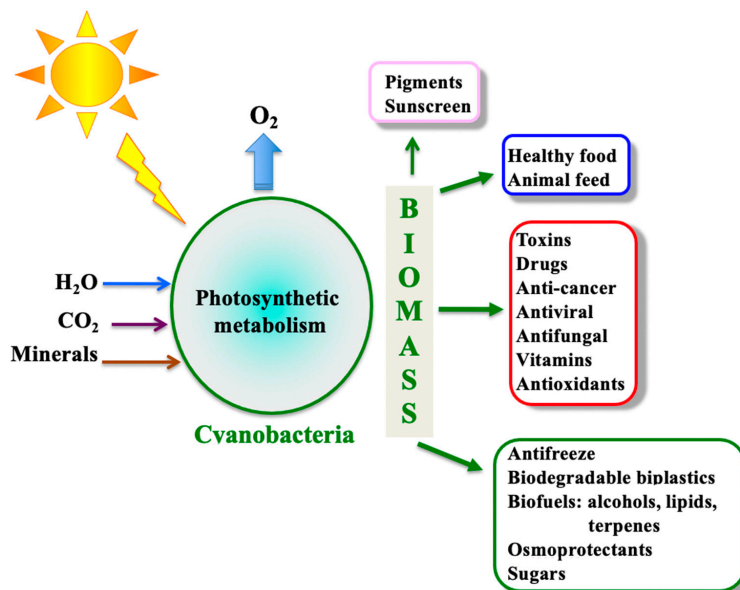


Figure 1. Cyanobacteria can synthesize a wealth of biotechnologically interesting products.

Most of our knowledge on cyanobacteria came from studying the three non-nitrogen fixing, unicellular cyanobacteria *Synechocystis* PCC 6803, *Synechococcus* PCC 7942 (formerly named “*Anacystis nidulans*”) and *Synechococcus* PCC 7002 (formerly named “*Agmenellum quadruplicatum* PR6”) that are (i) straightforward to culture under laboratory conditions, (ii) amenable to genetic manipulation, and (iii) freezable for long-term storage. In this review, we will summarize the genetic and physiological properties of these models, emphasizing on their tolerance to stresses, and the recent progress in their genetics. We will also put forward that in spite of more than three decades of intensive research the genomes of these models still contain a large number of genes and small RNAs (sRNAs) of unknown function. Furthermore, many of the genes annotated “by sequence analogy” with those genes characterized in intensively studied, non-photosynthetic, models such as *Escherichia coli* might in fact have a different function in cyanobacteria. This situation makes comparative genomics and metabolic modeling difficult. Consequently, we will discuss that to better understand and exploit the wide biodiversity of cyanobacteria, strong efforts should be put in large-scale analysis of genes and sRNAs functions in model cyanobacteria. Finally, we will emphasize that we need to identify and thoroughly study new cyanobacteria endowed with natural properties of interest for basic or applied researches, and test whether the synthetic biology tools developed for model strains can be used to facilitate the engineering of these newly identified cyanobacteria so as to turn their promises into industrial realities.

2. Cyanobacteria Being Inevitably Exposed to Photo-Oxidative Stress Have Developed the Evolutionary-Conserved Glutathione System

Having evolved the oxygenic photosynthesis [21], cyanobacteria were the first organisms to be exposed to the toxic reactive oxygen species (ROS): singlet oxygen ($^1\text{O}_2$), superoxide anion (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2), and hydroxyl radical (OH) [22] that are generated when the light-driven electron transport exceeds what is needed for nutrients assimilation [23]. Accordingly, cyanobacteria represent a major source of ROS in natural aquatic environments [24].

To cope with ROS, cyanobacteria have developed the glutathione system [3]. It comprises the glutathione tripeptide (gamma-glutamyl-cysteinyl-glycine) and numerous glutathione-dependent enzymes [25], which have been conserved during evolution [26–29]. Glutathione is abundant in all organisms (concentration ranging from 0.1 to about 10 mM) where it plays pleiotropic roles in cell life and resistance to stresses [25,30]. Supporting the notion that cyanobacteria have evolved the glutathione system, the glutathione synthesis enzyme GshB and several glutathione transferases of the model cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803 were shown to play a prominent role in the tolerance to O_2 and photo-oxidative stress [31,32].

Glutathione occurs under two redox forms: the reduced (GSH) and the oxidized, dimeric (GSSG) forms. GSH, the major form, maintains the intracellular compartment in a reduced state. It provides electrons to the GSH-dependent enzymes glutaredoxins and glutathione transferases that operate in defenses against photo-oxidative stress and heavy metal pollutants [32–34]. These toxic-only metals inactivate many enzymes, by reacting with the thiol-group of their cysteines and/or displacing their normal metal cofactors [35]. To protect cells from metals, GSH can chelate them outside the cells under the form of large complexes that cannot penetrate into the cells [36]. GSH can also form a Fe(II)GSH complex, which likely supplies Fe for the synthesis of the Fe cofactor or (Fe-S) clusters of many metalloenzymes operating in photosynthesis, respiration, or other cellular functions [30,37,38].

Oxidative stress can also generate disulfides bridges between two cysteinyl-residues of either the same or two proteins, or a protein and a molecule of glutathione, which otherwise affect protein activity [33,39]. The glutathionylation/deglutathionylation process has been studied in the best studied unicellular cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803 where about 400 proteins can be glutathionylated in vitro [40]. These proteins participate in a wide range of cellular and metabolic processes including carbon and nitrogen metabolisms, cell division, stress responses and hydrogen production [40]. The glutathionylation/deglutathionylation control of the antioxidant peroxiredoxin II, the mercuric reductase, the AbrB2 transcription factor, and the metabolic enzyme 3-phosphoglycerate dehydrogenase was confirmed by biochemical studies with the purified recombinant proteins [34,40,41]. Attesting its importance for living organisms, the redox glutathionylation/deglutathionylation process and the glutathione transferase and glutaredoxin enzymes involved in its control have been conserved during evolution from cyanobacteria to plants and human [26,29,40,42,43].

Upon cell detoxication, GSH is oxidized for the glutathione disulfide form, GSSG, which can be reduced back to GSH by various factors, such as the NADPH-using glutathione reductase enzyme (GR), which occurs in most cyanobacteria [25] and other aerobic organisms [27,44], except the model cyanobacteria *Synechocystis* PCC 6803 [45] and *Synechococcus* PCC 7002 [25].

3. Cyanobacteria Possess Widely Diverse Genomes That Contain a Wealth of Unknown Genes and Poorly Characterized Multigene Families

The first articles reporting the sequence of an entire bacterial genome (*Hemophilus influenzae*, 1,830,137 bp; *Mycoplasma genitalium*, 580,070 bp) appeared in 1995 [46,47]. Shortly thereafter, the sequence of the 3,573,470-bp chromosome of the best studied unicellular cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803 was reported [48]. Currently, about 2000 complete or draft sequences of cyanobacterial genomes are accessible in public data bases such

as the DOE joint genome institute (<https://genome.jgi.doe.gov/portal/>, accessed on 15 March 2021) and the Microbial Genome Database for Comparative Analysis (<http://mbgd.genome.ad.jp/>, accessed on 15 March 2021). This number is steadily increasing in the frame of metagenomic analyses [49–52].

The genome of cyanobacteria differs in size, ranging from 1.44 Mbp [53] to 12.07 Mbp [54], and GC content (30–60%), probably as a result from gene gains and losses [55] transferred by plasmids, insertion sequences [56], and/or cyanophages [57–59]. Cyanophages infecting marine cyanobacteria contain genes important for photosynthesis, which could facilitate their transfer among marine cyanobacteria [60]. Instances of horizontal gene transfer are inferred on the basis of observations of patchy phylogenetic distribution and/or atypical nucleotide composition of several genes [55,59].

All cyanobacteria possess a circular chromosome and, depending on the species, a linear chromosome (rarely) and/or one to several circular plasmids (frequently), excepted the marine species UCYN-A, *Prochlorococcus* and *Synechococcus*, which have a small chromosome (1.44–2.7 Mbp), but no plasmids [53,61]. Some cyanobacterial plasmids contain genes likely involved in important processes, such as cysteine biosynthesis [62], thermal tolerance [63], resistance to metal stress [64], or DNA repair [58]. The marine cyanobacterium *Acaryochloris marina* MBIC1101, which has a 6.5 Mbp circular chromosome, has 25% of its genes located on its nine large (≥ 100 kbp) single-copy plasmids [65].

An unusual genome organization was observed in two strains of the unicellular genus *Cyanothece*. The genome of *Cyanothece* ATCC51142 (5.46 Mbp) harbors two chromosomes (one circular of 4.39 Mbp; and one linear of 0.4 Mbp) and four plasmids (10–39 kbp) [66,67]. *Cyanothece* PCC 7822 has a genome of 7.84 Mbp that comprises one circular chromosome (6.09 Mbp), three linear chromosomal elements (880, 474, and 14 kbp) and three plasmids [67]. These findings are interesting because a few bacteria possess a linear chromosome, such as the (non-photosynthetic) soil bacteria of the genus *Streptomyces*, which synthesize a wide variety of bioactive secondary metabolites [68], like cyanobacteria [16,17,69]. In *Streptomyces*, the linear chromosome exhibits a remarkable genetic organization with grossly a central conserved region flanked by variable chromosomal arms [70]. Based on these observations, it would be interesting in the future to compare the plasticity of linear versus circular chromosomes of cyanobacteria.

4. Interest and Current Limitations of Comparative Genomics

The comparative analysis of cyanobacterial genomes allows to determine which genes are present in any particular genome and which ones are absent. These findings serve to determine the pan-genome, which describes the entire genes set of all cyanobacteria analyzed. It includes (i) a core-genome, which comprises the sets of genes that exist in each of the strains analyzed [71] and (ii) the dispensable-genome, which comprises the genes present in a subset of the studied strains and species-specific genes [72]. For such analyses, strains can be selected on the basis of their natural habitats [73], their physiology and/or morphology [74], and/or their phylogenetic position determined by 16S-rRNA sequence comparison [75]. Such comparative genome analyses revealed habitat-specific (or heterocyst-specific) cyanobacterial proteins [72]. It was also revealed that cyanobacteria occupy a unique position among prokaryotes as a hub between anaerobes and obligate aerobes [76] and that the earliest cyanobacteria were small and unicellular, while filamentous forms appeared shortly afterwards [77]. Comparative genome studies were also used to discuss plastid evolution [78]. When applied to two closely related cyanobacteria, comparative genomics can be used to predict the behavior of one strain relative to the other one. As a rare example of such comparison, *Synechocystis* PCC 6803 was found to be more resistant to zinc excess than *Synechocystis* PCC 6714 as it was predicted [79]. Comparative genomic information is also crucial for genome-based reconstruction of an organism's metabolism as done for *Synechocystis* PCC 6803 to predict which metabolic reaction or pathway should be engineered to increase the production of biotechnologically interesting chemicals [80–85].

4.1. Danger of Genome Annotation Based Only on Sequence Comparison

Generating robust and accurate genome-scale models (GSMs) is an iterative process dependent on the expansion and updating of draft simulation models with available experimental data obtained after measurement of fluxes and metabolic pool sizes [80,86,87]. However, GSMs are largely based on gene function predicted “by sequence analogy” with genes characterized in other model organisms, which may behave differently in the studied organism [88]. In *Synechocystis* PCC 6803, the best studied model, only ca. 1050 coding sequences (~30%) have assigned functions [80,89], which may turn out to differ from those determined in well-studied heterotrophic models. For examples, the *Synechocystis* PCC 6803 LexA protein regulates the expression of genes involved in carbon assimilation [90], not DNA repair as it occurs in *E. coli*. Furthermore, the NAD(P)H dehydrogenase transcription factor (NdhR, Sll1594), homologous to the proteobacterial regulators of the Calvin–Benson–Bassham metabolic pathway (CbbR, hereafter referred to as Calvin cycle), does not regulate the transcription of Calvin cycle genes [91]. Instead, NdhR regulates numerous genes involved in the transport and assimilation of inorganic carbon (CO₂ and bicarbonate) [6,92,93].

In addition, a single cyanobacterial protein can have more than one function. The fructose-1,6/sedoheptulose-1,7-bisphosphatase (FBP/SBPase) operates in both the Calvin cycle and gluconeogenesis [94]. The CrtLdiox protein is also dual-function enzyme with both lycopene cyclase and dioxygenase activity [95]. The IsiA protein is active in both the light-harvesting ability of PSI and the photoprotection of PSII [96]. The AgrE enzyme catalyzes two sequential reactions in arginine catabolism, in converting arginine to ornithine, and then ornithine into proline [97,98]. The ApalaDH enzyme transforms pyruvate to L-alanine, L-alanine back to pyruvate, and glyoxylate to glycine [99]. The sucrose-synthesis SPS enzyme has sucrose-phosphate synthase and sucrose-phosphate phosphatase activities [100]. The KatG enzymes have both catalase and peroxidase activities, which are also capable of oxidizing chloride, bromide, and iodide compounds [101,102].

4.2. Identification of Essential Genes at the Level of a Whole Genome for a Better Understanding of the Genotype-Phenotype Relationships

To use genomic data for reconstruction of an organism’s metabolism it is also important to identify the comprehensive set of genes that are essential to cell growth in well-defined conditions. This has been addressed using transposon mutagenesis in *Synechocystis* PCC 6803 [103,104] and *Synechococcus* PCC 7942 [105–108]. For the same purpose, the construction of a whole genome library of gene insertion plasmids has been undertaken in *Synechocystis* PCC 6803 [7]. These works will certainly contribute to decrease the high number of proteins with still unknown function. In *Synechocystis* PCC 6803, transposon mutagenesis has been useful to study (i) photosynthesis [109–111], (ii) the transport of CO₂ or bicarbonate [112,113], (iii) the production of the poly-3-hydroxybutyrate (PHB) biodegradable bioplastic [114], and (iv) the NADPH:plastoquinone oxidoreductase complex operating in plastoquinone reduction and cyclic electron transfer (CET) around photosystem I [115–121]. Transposon mutagenesis has been also useful in *Synechococcus* PCC 7942 to identify a gene in fatty acid production [122].

4.3. Importance of Deciphering the Selectivity/Redundancy of Multiple Gene Families

To generate robust and predictive model of the metabolism of cyanobacteria, it is also important to unravel the redundancy/selectivity of multigene families, such as those that code for the stress-responsive redox proteins ferredoxins, glutaredoxins, and glutathione transferase.

Ferredoxins (Fed), are small (acidic) proteins present in most organisms. They use their iron-sulfur cluster (Fe-S) to distribute electrons to various metabolic pathways involved in nutrients assimilation [123]. The best studied cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803 possess nine Feds. The Fed1–6 proteins possess a (2Fe-2S) center, while Fed7 harbors a (4Fe-4S) cluster. In contrast both Fed8 and Fed9 have two clusters: (3Fe-4S) (4Fe-4S)

and (4Fe-4S) (4Fe-4S), respectively. The highly abundant Fed1 protein, essential to photosynthesis [124,125], is encoded by a light-inducible gene [126]. The low-abundant Fed2-Fed9 proteins are encoded by stress-responsive genes (light, carbon, herbicides, or heavy metals), which have differential importance (crucial/dispensable) for the photoautotrophic growth and/or the resistance to stresses [45,123,125,127]. Fed1, Fed7, and Fed9 participate in a ferredoxin-glutaredoxin-thioredoxin crosstalk pathway that operates in the protection against oxidative and metal stresses [45]. Fed7, but not Fed9, interacts with a DnaJ-like protein, an interaction that has been strengthened in photosynthetic eukaryotes in the form of a Fed7-DnaJ fusion protein [123]. Fed7 also has a regulatory role under photooxidative stress [128]. Conversely, Fed9, but not Fed7, interacts with the Flv3 flavodiiron protein involved in the photoreduction of O₂ to H₂O [123]. Other ferredoxins partners [129,130] should be studied to better understand the selectivity/redundancy of ferredoxins in *Synechocystis* PCC 6803. Attesting their importance for the life of cyanobacteria, the *fed* genes were highly conserved in cyanobacteria. For example, the other models *Synechococcus* PCC 7002 and *Synechococcus* PCC 7942 have, respectively, nine and six *fed* genes, while the symbiotic strain *Acaryochloris marina* MBIC11017 endowed with a large genome (8.36 Mb) possesses sixteen *fed* genes [123].

Like ferredoxins, the evolutionary-conserved enzymes glutaredoxins (Grxs) are widely distributed in cyanobacteria [25,131]. Grxs use electrons provided by glutathione (GSH), or the thioredoxin reductase enzyme [45,132], to reduce the oxidative-stress-generated disulfides occurring between two cysteinyl-residues of either the same or two proteins, or a protein and a molecule of glutathione, which otherwise affect protein activity [33,39]. The dithiol Grxs, which possess a CXXC redox center (C and X stand for cysteine and any other amino acid, respectively), catalyze the reduction in protein disulfides or glutathione-protein mixed disulfides (the latter activity is named “deglutathionylation”). The monothiol Grxs, which have a CXXS redox center (S stands for serine), operates in iron sensing and trafficking the biogenesis of iron-sulfur clusters of proteins and deglutathionylation [30]. All cyanobacteria possess a monothiol Grx-encoding gene and a variable number of dithiol Grx genes [25]. *Synechocystis* PCC 6803 possesses three Grxs, which are all dispensable to the standard photoautotrophic growth [25,133]. The dithiol enzymes Grx1 and Grx2, which can interact together [45], operate in tolerance to H₂O₂ [45,133], arsenate [134,135], selenate [45], mercury, and uranium [34]. Grx1 can reactivate the oxidized (glutathionylated) form of the mercuric reductase enzyme by catalyzing its deglutathionylation [34]. The monothiol Grx3 (CGFS redox center) enzyme forms a homodimer bridged by a glutathione-ligated (2Fe-2S) cluster [26]. This feature, which has been conserved in Grx3 orthologs from cyanobacteria to plants and mammals, likely operates in Fe sensing and distribution of (2Fe-2S) cluster [26,30,136].

Another important multiple genes family encodes the evolutionary-conserved glutathione transferase (GT) enzymes, which can conjugate glutathione (GSH) on diverse toxics (oxidants, chemicals, and heavy metals) thereby generating water-soluble complexes that can then be degraded or excreted out of the cell [33,137,138]. GST also operate in the glutathionylation/deglutathionylation process [42,43]. Glutathione-S-transferases (GST) are commonly divided in three different families: (i) cytosolic GSTs (the largest family), (ii) mitochondrial GSTs, and (iii) microsomal (membranous) GSTs designated as MAPEGs (membrane-associated protein involved in eicosanoid and glutathione metabolism) [139]. Little is known about GSTs in cyanobacteria though they are regarded as having evolved the oxygen-generating photosynthesis, as well as GSH and GSH-dependent enzymes to protect themselves against the toxic ROS (reactive oxygen species) massively produced by their active photosynthesis [3]. Based on phylogenetic tree analyses, 12 GST classes were identified in cyanobacteria [140,141]. Cyanobacterial GSTs have been studied mostly in *Synechocystis* PCC 6803, which possesses six GST, namely, Sll0067, Sll1147, Sll1545, Sll1902, Slr0236, and Slr0605 [142–144]. While the role of Sll1902 and Slr0605 is still unknown, Sll1545 and Slr0236 were shown to operate in the protection against photo-oxidative stress triggered by high light or H₂O₂ [32]. Sll1147 plays a prominent role in tolerance to mem-

brane stresses triggered by heat, cold, and lipid peroxidation [29]. SII0067 operates in the protection against methylglyoxal (MG), a toxic metabolite by-product of the catabolism of sugars, lipids, and amino-acids, which causes diabetes in human. SII0067 catalyzes the conjugation of GSH with MG, the first step in MG detoxification catalyzed by the glyoxalase enzymes [145].

5. A Few Cyanobacteria Are Currently Amenable to Gene Manipulation, Leaving the Wide Biodiversity of Cyanobacteria Largely Unexplored

Historically, three non-nitrogen fixing unicellular cyanobacteria *Synechocystis* PCC 6803 (euryhaline strain), *Synechococcus* PCC 7942 (freshwater strain formerly named “*Anacystis nidulans*”) and *Synechococcus* PCC 7002 (marine strain formerly named “*Agmenellum quadruplicatum* PR6”) were chosen as model because they possess a simple morphology [146,147], a small genome (see above) and the important natural capability to be genetically transformed (see below). In addition, the freshwater strain *Anabaena* (*Nostoc*) PCC 7120 was also chosen as a genetically manipulable representative of filamentous (pluricellular) cyanobacteria [148]. This latter model is well used to analyze the differentiation of heterocysts, the cells dedicated to the fixation of atmospheric nitrogen, and their communication with vegetative cells [14], which are not the focus of the present review.

Although these four species are phylogenetically distant, they represent only a limited part of the wide biodiversity of cyanobacteria. This is evident from the comparison of the size and organization of their genomes (2.7–7.2 Mbp, absence of linear chromosome) with those of many other cyanobacteria (1.44–12M bp see above, presence of a linear chromosome in a few species).

New rapidly growing unicellular cyanobacteria have been recently described, namely, the freshwater strains *Synechococcus* UTEX 2973 [149], *Synechococcus* PCC 11801 [150], and *Synechococcus* PCC 11802 [151] and the marine strain *Synechococcus* PCC 11901 [80,152]. *Synechococcus* PCC 11901 tolerates high temperatures, up to 43 °C, which are non-optimal for *Synechococcus* UTEX 2973 [150,153], *Synechococcus* PCC 11801 [150,151], and *Synechococcus* PCC 7942 [154], and even detrimental to *Synechocystis* PCC 6803 [29,155]. *Synechococcus* PCC 11801 [150], *Synechococcus* PCC 11802 [151], and *Synechococcus* PCC 11901 [152] are naturally transformable, unlike *Synechococcus* UTEX2973 [150]. The latter strain was made transformable by cloning the *Synechococcus* PCC 7942 *pilN* gene encoding the Tfp pilus assembly protein [156].

Unfortunately, *Synechococcus* UTEX2973, *Synechococcus* PCC 11801, and *Synechococcus* PCC 11802 are very closely related to the freshwater model *Synechococcus* PCC 7942, in sharing, respectively, 99.8% and about 83% of genome identity with it [149–151,157]. Similarly, *Synechococcus* PCC 11901 shares 96.7% sequence identity with the marine model *Synechococcus* PCC 7002 [87,152]. Thus, future studies carried out with these new model strains will not significantly increase our understanding of the cyanobacterial biodiversity.

6. Properties of the Intensively Studied Unicellular Cyanobacteria *Synechocystis* PCC 6803, *Synechococcus* PCC 7942, and *Synechococcus* PCC 7002

The three non-nitrogen fixing models *Synechocystis* PCC 6803, *Synechococcus* PCC 7942, and *Synechococcus* PCC 7002 have specific physiological properties that can influence their potential to serve as cell factories for biotechnological projects. *Synechocystis* PCC 6803 in being one of the few cyanobacteria capable to grow under photoautotrophic, mixotrophic, or heterotrophic conditions [147] has become the best studied cyanobacterium. It serves as model to study the photoautotrophic metabolism [6,7,93], the crucial importance of the carbon/nitrogen metabolic balance [6,93], and the responses to stresses [35]. Such investigations are also carried out, to a lesser extent, with *Synechococcus* PCC 7002 and *Synechococcus* PCC 7942. The latter model is well used to investigate cell division [158], the carbon/nitrogen metabolic crosstalk [93], the circadian rhythm [159], and the biogenesis of the CO₂-concentrating carboxysome organelle [160].

6.1. Genome Organization in the Intensively Studied Unicellular Cyanobacteria *Synechocystis* PCC 6803, *Synechococcus* PCC 7942, and *Synechococcus* PCC 7002

Synechocystis PCC 6803, the best studied model, harbors a 3.57 Mbp circular chromosome [48], which has a copy number of about 10–22 per cell [161,162], and seven plasmids of sizes 2.3 [163,164], 2.4 [165], 5.2 [166], 44, 103, 106, and 120 kbp [167]. The ploidy of the three smaller plasmids 2.3–5.2 kbp was shown to be similar and increased from 3 to 8 copies per chromosome in cells reaching the stationary phase of growth. In contrast, the ploidy of the four larger plasmids, ranging from ~0.3 to 1.2 per chromosome depending on the studied plasmid, varied little with the growth phase [168]. The 5.2 kbp plasmid appeared to be dispensable to the standard photoautotrophic growth of *Synechocystis* PCC 6803 [169]. In contrast, large plasmids appeared to be essential (cells could not lose these plasmids), likely because they encode several toxin–antitoxin systems mediating plasmid maintenance [170,171] and they operate in beneficial functions such as potassium transport [172], copper resistance [173], and the metabolic tricarboxylic acid cycle [174].

The other model cyanobacteria *Synechococcus* PCC 7942 and *Synechococcus* PCC 7002 possess a circular chromosome of, respectively, 2.69 Mbp and 3.0 Mbp, each occurring at two to five copies per cell [175–177]. In addition, *Synechococcus* PCC 7942 has two plasmids of 7.84 [178] and 46.4 kbp [179], while *Synechococcus* PCC 7002 contains six plasmids [180] from 4.8 [181] to 186 kbp. The 7.84 kbp plasmid of *Synechococcus* PCC 7942 is not essential to its photoautotrophic growth [182,183]. In comparison, the well-studied filamentous cyanobacterium *Anabaena* (*Nostoc*) PCC 7120 has a 7.2 Mbp genome that comprises a circular chromosome of 6.41 Mbp and six plasmids of sizes 408.10, 186.614, 101.96, 55.41, 40.34, and 5.58 kbp [184].

6.2. Physiological Properties of *Synechocystis* PCC 6803, *Synechococcus* PCC 7942, and *Synechococcus* PCC 7002 and Biotechnological Implication

In agreement with them having different genome size and organization, the three model cyanobacteria also show different physiologies. *Synechococcus* PCC 7002, which has a doubling time of ~2.6 h [185], grows 2–7 times faster than *Synechococcus* PCC 7942 and *Synechocystis* PCC 6803 depending on the environmental conditions [149,183,186]. However, *Synechococcus* PCC 7002 requires vitamin B12 (cobalamin) to grow [146], unlike *Synechocystis* PCC 6803 and *Synechococcus* PCC 7942 [147]. Thus, the cost of vitamin B12 supplementation should be considered when *Synechococcus* PCC 7002 is to be used for biotechnological purposes requiring large-scale cultures. The vitamin B12 auxotrophy of *Synechococcus* PCC 7002 is due to the fact that it uses a cobalamin-dependent methionine synthase (MetH) for the synthesis of methionine, though it cannot synthesize cobalamin de novo. Recently, a cobalamin-independent methionine synthase *metE* gene from *Synechococcus* PCC 73109 was expressed in *Synechococcus* PCC 7002 to relieve its cobalamin auxotrophy [187], but this modified *Synechococcus* PCC 7002 sub-strain has been little employed yet.

All three model cyanobacteria are growing well on ammonium and nitrate, the usual nitrogen sources for cyanobacteria. In addition, both *Synechocystis* PCC 6803 and *Synechococcus* PCC 7002 can grow on urea (a frequent pollutant) as the sole nitrogen source [188–190], unlike *Synechococcus* PCC 7942 [190]. Furthermore, *Synechococcus* PCC 7002 and *Synechocystis* PCC 6803 are salt resistant (*Synechococcus* PCC 7002 is a marine strain), unlike the freshwater strain *Synechococcus* PCC 7942 [191]. Thus, *Synechococcus* PCC 7942 is not a suitable cell factory for future projects aiming at the photosynthetic production of chemicals in waters polluted by urea and/or salt to save the costs of potable waters.

As iron is an essential enzyme cofactor for oxygenic photosynthesis, cyanobacteria utilize multiple strategies to maintain iron levels within a desired range. One of them is the synthesis, export, and re-import of ferric ion chelators called siderophores. Both *Synechococcus* PCC 7942 and *Synechococcus* PCC 7002 can synthesize siderophore, unlike *Synechocystis* PCC 6803 that can only import the siderophore produced by other organisms [192]. These three model cyanobacteria have other metabolic differences. The RbcX chaperone operating in assembly of the CO₂-fixing RubisCO enzyme is essential in *Synechococcus* PCC 7002 [193], whereas it is dispensable in *Synechococcus* PCC 7942 [194] and *Synechocystis* PCC 6803 [195]. In addition, *Synechocystis* PCC 6803 has four flavodiiron proteins (Flv1–Flv4) [196], which

function as heterodimers Flv1/3 and Flv2/4. Flv1/3 catalyzes the NAD(P)H-driven reduction in oxygen to water on the acceptor side of PSI [196–198], while Flv2/4 operates both in the photoprotection of the photosystem II [199] and in an oxygen-dependent alternative electron flow [200]. Unlike *Synechocystis* PCC 6803, both *Synechococcus* PCC 7942 and *Synechococcus* PCC 7002 possess only Flv1/3, not Flv2/4 [201].

Finally, both *Synechocystis* PCC 6803 and *Synechococcus* PCC 7002 secrete extracellular polymeric substances mainly composed of exopolysaccharides, which act in the formation of biofilm and the protection against salt and metals stresses [202–205], unlike *Synechococcus* PCC 7942 that do not normally form biofilms [206].

6.3. Comparison of the Stress-Responsive Glutathione and DNA Repair Systems of the Model Cyanobacteria *Synechocystis* PCC 6803, *Synechococcus* PCC 7942, and *Synechococcus* PCC 7002

Attesting the importance of the glutathione system for the tolerance to photo-oxidative stress and cell detoxication, most cyanobacteria possess the glutathione system. Its composition varies depending on the species and the environmental challenges they face. Most cyanobacteria have a glutathione reductase (GR) enzyme as *Synechococcus* PCC 7942, unlike both *Synechocystis* PCC 6803 and *Synechococcus* PCC 7002 [25,45]. Furthermore, *Synechocystis* PCC 6803 and *Synechococcus* PCC 7002 possess three glutaredoxins (Grxs) operating in tolerance to oxidative and metal stresses [34,45,133–135], whereas *Synechococcus* PCC 7942 has only two Grxs [25,131]. Another common feature shared by *Synechocystis* PCC 6803 and *Synechococcus* PCC 7002 is the fact that they both have an orange carotenoid protein (OCP) operating in photoprotection, whereas *Synechococcus* PCC 7942 has no OCP [207]. *Synechocystis* PCC 6803 and *Synechococcus* PCC 7942 have a MAPEG-type glutathione transferase enzyme operating in the tolerance to temperature stresses [29], which could occur during culture in open ponds, unlike *Synechococcus* PCC 7002.

Concerning the also important DNA repair system, which has been poorly studied in cyanobacteria, it is worth noting that the three model species have the following common and specific features. *Synechocystis* PCC 6803 possesses the *recD* gene, which is absent in *Synechococcus* PCC 7002 and *Synechococcus* PCC 7942 [58]. Furthermore, *Synechocystis* PCC 6803 has *recB* and *recJ*, which are duplicated in *Synechococcus* PCC 7002 and *Synechococcus* PCC 7942.

Synechocystis PCC 6803 and *Synechococcus* PCC 7942 have the *umuC* and *umuD* genes (*umuC* is duplicated in *Synechocystis* PCC 6803), unlike *Synechococcus* PCC 7002 that has no *umuC* and *umuD* genes [58]. Furthermore, *Synechocystis* PCC 6803 and *Synechococcus* PCC 7942 *recQ*, which is duplicated in *Synechococcus* PCC 7002.

Synechococcus PCC 7942 has *mutT* and *mutY*, whereas *Synechococcus* PCC 7002 lacks *mutT* and *Synechocystis* PCC 6803 lacks *mutY* [58].

Synechocystis PCC 6803 and *Synechococcus* PCC 7002, which can both use exogenous carbohydrates to accelerate their growth [6], possess *lexA*, which encodes a transcription regulator involved in carbon assimilation, not DNA repair [90]. In contrast, the obligate photoautotroph *Synechococcus* PCC 7942 has no *lexA* [58].

Synechocystis PCC 6803, *Synechococcus* PCC 7002, and *Synechococcus* PCC 7942 have also different features in the simplest DNA repair system, which removes only the base-modifying agent in one single step catalyzed by the AlkB demethylase, the Ogt alkyltransferase, and the Phr photolyase. All three model cyanobacteria possess *phr*, whereas *Synechocystis* PCC 6803 has *alkB* but not *ogt*, *Synechococcus* PCC 7942 has *ogt* (duplicated) but not *alkB*, and *Synechococcus* PCC 7002 has neither *alkB* nor *ogt* [58].

6.4. Comparative Analysis of the Growth and Response to Stresses of the Three Model Cyanobacteria *Synechocystis* PCC 6803, *Synechococcus* PCC 7002, and *Synechococcus* PCC 7942

To better characterize the common and different physiological features exhibited by these three model cyanobacteria, it would be very interesting to perform simultaneous analyses and comparisons of their growth and tolerance to stresses in the same laboratories. This task is of high interest for not only basic science but also for biotechnological projects, which use of robust cell factories capable to withstand the environmental challenges

imposed by the industrial process and the possible toxicity of the intended products. So far, a very limited number of comparative studies have been carried out. *Synechocystis* PCC 6803 was shown to be more tolerant than *Synechococcus* PCC 7942 to UV (and gamma radiations) [90] and to the undecane hydrocarbon [208]. Reciprocally, *Synechococcus* PCC 7942 appeared to be more tolerant to chromate than *Synechocystis* PCC 6803, possibly because the sulfate transporters of *Synechococcus* PCC 7942 have lower affinity to chromate than those of *Synechocystis* PCC 6803 [209]. Furthermore, chromate generated more ROS (reactive oxygen species) in *Synechocystis* PCC 6803, as compared to *Synechococcus* PCC 7942, likely because *Synechocystis* PCC 6803 has intrinsic levels of superoxide dismutase, catalase and 2-Cys-peroxiredoxin than *Synechococcus* PCC 7942 [210]. Additionally, interestingly, *Synechocystis* PCC 6803 and *Synechococcus* PCC 7002 were reported to be more tolerant to ethanol than *Synechococcus* PCC 7942 [208,211].

Another important aspect to study is the genetic stability of the recombinant cyanobacteria generated for applied research. It has been reported that many engineered cyanobacteria appeared to be genetically unstable [58]. In one *Synechocystis* PCC 6803 recombinant strain, the instability was caused by the transposition of an IS5 insertion sequence leading to the inactivation of a regulatory gene [56]. Thus, it is of interest to note that the genomes of *Synechococcus* PCC 7942 and *Synechococcus* PCC 7002 are predicted to contain one and approximately 10 transposase encoding genes, whereas *Synechocystis* PCC 6803 possesses a single transposase gene.

6.5. As Observed in *Synechocystis* PCC 6803, the Sub-Strains of a Single Cyanobacterium Cultivated in Various Laboratories Can Have Different Behaviors

Another level of complexity is the un-surprising finding that a single cyanobacterium cultivated for some times in different laboratories tend to develop genetic and physiological differences from one laboratory to another. In the case of *Synechocystis* PCC 6803, originally isolated from a fresh water lake in California [146] and deposited in both the American Type Culture Collection (strain number ATCC 27184) and the Pasteur Culture Collection (strain number PCC 6803), it was reported that several sub-strains cultivated in different laboratories varied in genotypes and/or phenotypes. As compared to the original genome sequence [48], several specific mutations were identified in genes related to photosynthesis, transport, or motility [212–218]. Furthermore, variability in genome copy number was also observed [162]. Moreover, phenotypic variations were also reported including photosynthesis [217], cell size [219], motility [212,218], capability to grow on glucose as the carbon source [212,220], or resistance to temperature and salt (NaCl) stresses [221].

7. Genetic Characteristics of the Model Cyanobacteria *Synechocystis* PCC 6803, *Synechococcus* PCC 7942, and *Synechococcus* PCC 7002

Shortly after their selection based on their robustness and simple (unicellular) morphologies [146,147] *Synechocystis* PCC 6803, *Synechococcus* PCC 7942, and *Synechococcus* PCC 7002 were found to be naturally competent for genetic transformation (see below).

7.1. *Synechocystis* PCC 6803, *Synechococcus* PCC 7942, and *Synechococcus* PCC 7002 Are Naturally Competent for Genetic Transformation

Natural competence for transformation of prokaryotes refers to their capability to take up DNA from their environment and incorporate it into their own genome. Originally, antibiotic resistant mutants, generated after UV or chemical mutagenesis, were selected, and their genomic DNA was isolated and used to transform wild type cells selecting for antibiotic resistance. Three naturally transformable species have emerged from such studies, namely, *Synechococcus* PCC 7942 [222], *Synechococcus* PCC 7002 (*Agmenellum quadruplicatum* PR6) [223,224], and *Synechocystis* sp. PCC 6803 [225]. In *Synechococcus* PCC 7942, the efficiency of transformation was found to decrease at pH lower than 7.0 or temperature ≥ 40 °C, two conditions being also unfavorable for growth. Furthermore, transformation was best effective with cells reaching the transition from the first to the second exponential phases of growth, supporting the notion that transformation depends upon the physio-

logical stage of the culture [183,226]. In addition, transformation appeared to be more efficient when expression of the transferred genes was allowed for 24 h on non-selective solid medium, prior to introducing the selective antibiotic underneath the agar of the plate for its slow diffusion toward the cells for gentle selection of the transformants [183]. Additionally, interestingly, the transformation to *Synechocystis* PCC6803 was reported to be strongly stimulated after the deletion of the exonuclease *recJ* gene [227]. Recently, the natural competence for transformation was shown to involve pilus appendages [228] and to be regulated by the circadian clock [229].

In *Synechococcus* PCC 7002, it was shown that single-stranded DNA cannot transform competent cells. Furthermore, cells in the stationary phase of growth or deprived of nitrogen or light before exposure to donor DNA tend to lose their competence for transformation. In contrast, significant improvement in transformation frequency were achieved by increasing the nitrate content of the culture medium or lowering the temperature from 39 °C (the optimal temperature for growth) to 30 °C before exposure to donor DNA [230].

Later, it was established in *Synechococcus* PCC 7942 [231], *Synechococcus* PCC 7002 [232], and *Synechocystis* PCC 6803 [161,163,233] that the donor DNA is integrated in the chromosome, or an endogenous plasmid (see below) of the recipient cells, through homologous recombination (double crossing-over or gene conversion) occurring on each side of the transferred DNA sequence in the region of homology between both the donor DNA and the recipient DNA. This process, similar to what had been described earlier in *Bacillus subtilis* [234], was extensively used for deleting cyanobacterial genes (or a part of them) through their targeted replacement by an easy selectable antibiotic resistance marker. Soon after its discovery, natural transformation of cyanobacteria was used in pioneering in vivo analyses of proteins involved in photosynthesis and/or stress resistance, which were performed with *Synechocystis* PCC 6803 [235–240], *Synechococcus* PCC 7942 [241–245], and *Synechococcus* PCC 7002 [246,247].

The molecular mechanism of natural transformation has been recently described in *Synechocystis* PCC 6803 [248]. First, DNA uptake from the environment is mediated by binding to the (type IV) pili appendages, which are also involved in cell adhesion and biofilm formation as well as twitching motility. During pilus retraction, the DNA is pulled into the periplasmic space, where one DNA strand is degraded while the other is translocated further across the cytoplasmic membrane by the Com (competence) proteins. The single-stranded DNA arrived in the cytoplasm is protected from nucleases and incorporated into the genome of recipient cells via homologous recombination.

7.2. Interest and Limitation of the Polyploidy of *Synechocystis* PCC 6803, *Synechococcus* PCC 7942, and *Synechococcus* PCC 7002

In cyanobacteria, genomic modification is a time-consuming process because these organisms are polyploid. For example, *Synechococcus* PCC 7942, *Synechococcus* PCC 7002 and *Synechocystis* PCC 6803 harbor about 2–5 and 10–12 chromosome copies per cell [161,175–177]. Thus, to create a homoploid mutant, a segregation procedure must be applied to ensure that all chromosome copies in the transformants carry only the modified DNA. This requires multiple rounds of culture streaking in the presence of the selective antibiotic, which can last several weeks. However, the polyploidy of cyanobacteria is not a merely negative trait. It allows to study genes that are essential to cell life. In such cases, we obtain the corresponding heteroploid mutants, which possess both mutant and WT chromosomes copies (with and without the studied vital gene). Such mutants survive because they retain a limited but sufficient amount of the studied essential protein, and they usually have a phenotype different from the wild-type strain. This difference often serves as a guide to infer a role of the studied crucial protein.

7.3. Utilization of Neutral Genome Sites for Gene Manipulation in *Synechocystis* PCC 6803, *Synechococcus* PCC 7942, and *Synechococcus* PCC 7002

Transformation has been used extensively for the introduction of endogenous or heterologous genes into neutral chromosomal or plasmid sites, i.e., loci that can be disrupted

with no negative effect on cellular viability. Many neutral sites localized inside a dispensable gene or intergenic region have been identified in the chromosome or in an endogenous plasmid of *Synechocystis* PCC 6803 [163,249–252], *Synechococcus* PCC 7942 [253–255] and *Synechococcus* PCC 7002 [256–258]. These neutral cloning sites were frequently used for cloning and expression of endogenous, or heterologous, genes involved in cell metabolism, stress responses, or the engineering of recombinant strains for the photosynthetic production of chemicals (see Tables 1–3).

In *Synechocystis* PCC 6803, the frequently used neutral loci are (i) the gene *slr0168* or the intergenic region between *slr2030* and *slr2031*, which have no known function; (ii) the *cpcB* gene involved in the synthesis of the photosynthetic pigment phycocyanin; and (iii) the three *psbA* genes (Table 1). Although *psbA1* is not expressed [235,259], *psbA2* and *psbA3*, encoding the D1 protein subunit of the photosystem II, are expressed and dispensable, but they cannot be inactivated simultaneously [259]. The deletion of *psbA2* gene is compensated by an up-regulation of *psbA3* [260]. Neutral sites on the endogenous plasmids pCC5.2 and pCA2.4 have also been identified and evaluated for genetic integration and expression [251,261]. One neutral site on pCC5.2 was used for cloning the limonene synthase genes from *Mentha spicata* or *Citrus limon*, which directed the production of limonene [262]. Interestingly, the production of fluorescent proteins directed from neutral sites in pCC5.2 or pCA2.4 were, respectively, 14- or 100-fold higher than those observed after chromosomal integration [249,261,263,264]. These data are consistent with the finding that the endogenous small plasmids have a higher copy number than the chromosome [168]. These findings suggest that to be well-expressed genes should be cloned preferentially in a small endogenous plasmid than in the chromosome, but this assumption remain to be verified with other genes.

Table 1. Literature on the utilization of neutral chromosomal cloning sites in *Synechocystis* PCC 6803.

Neutral Site and Objective of the Gene Manipulation	References
<i>psbA1</i>: a silent gene	[235]
Photoproduction of extra bicarbonate transporters to increase biomass	[265]
Increase carbon import to improve growth	[266]
Photoproduction of isobutanol	[267]
<i>psbA2</i> (slr1311): gene encoding the D1 protein of the PSII	[259]
Photoproduction of zeaxanthin	[268]
Analysis of a thioredoxin-interacting LuxR-like regulator	[269]
Photoproduction of beta-caryophyllene	[270]
Photoproduction of D1 protein of the PSII	[271]
Photoproduction of polyhydroxybutyrate (PHB) biodegradable bioplastics	[272]
Photoproduction of isoprene	[273–277]
Photoproduction of lipids	[278]
Photoproduction of aromatic amino-acids	[279]
Photoproduction of tryptophan	[280]
Analysis of endogenous flavodiiron proteins	[281,282]
<i>cpcB</i>: phycocyanin synthesis gene	
Photoproduction of isoprene	[283,284]
Photoproduction of geranylinalool	[285]

Table 1. Cont.

Neutral Site and Objective of the Gene Manipulation	References
<i>glpK</i>, the gene encoding the glycerol kinase enzyme	
Photoproduction of ipid	[286]
Combination <i>psbA2</i> and <i>cpcB</i>	
Cloning of various genes for the photoproduction of isoprene	[287]
Photoproduction of β -phellandrene	[288–293]
<i>slr0646</i> encoding the PBP5 dispensable penicillin binding protein	[294]
Photoproduction of the p-coumaric acid	[295]
<i>ndhB</i> (slr0223): encoding subunit 2 of the NAD(P)H-dehydrogenase	
Analysis of the circadian expression of the DnaK (heat-shock protein) encoding gene	[296]
Construction of bioluminescent reporter strains for metal detection	[297]
Analysis of the light regulation of the photosystem I genes	[298,299]
<i>slr0168</i>	[220]
Analysis of tolerance to stresses	[300–302]
Analysis of endogenous and heterologous Fe- or Cu/Zn superoxide dismutase	[302]
Promoter analysis	[303]
Analysis of fatty-acids synthesis	[304]
Photoproduction of ethylene	[305,306]
Photoproduction of lactate	[307–310]
Photoproduction of 2,3-butanediol	[311]
Photoproduction of sucrose	[312]
Development of a marker-less gene replacement tool	[313]
Photoproduction of fatty alcohol	[314]
Photoproduction of isoprene	[275]
Photoproduction of ethanol	[315–317]
Photoproduction of glycerol	[318]
Photoproduction of <i>n</i> -butanol	[319]
Analysis of the regulation of Rubisco	[320]
Promoter analysis	[321]
Photoproduction of 1,2-propanediol	[322]
Analysis of alka(e)ne turnover	[323]
Photoproduction of mannitol	[324]
Photoproduction of bisabolene	[325]
<i>slr0168</i> and <i>slr1193</i>	
Photoproduction of ethanol	[326]
<i>slr0168</i> and <i>slr1556</i>	
Photoproduction of alkanes	[327]
<i>ndhB</i> and <i>slr0168</i>	
Photoproduction of ethanol	[315]
<i>psbA1</i> and <i>slr0168</i>	
Analysis of promoters	[328]
<i>psbA2</i> and <i>slr0168</i>	
Photoproduction of fatty-acids	[329]
Analysis of the cyanobacterial iron superoxide dismutase SOD	[302]
Photoproduction of ethylene	[330]
<i>phaCE</i> genes operating in the synthesis of polyhydroxybutyrate (PHB) biodegradable bioplastics	[331]
Photoproduction of acetone	[332]

Table 1. Cont.

Neutral Site and Objective of the Gene Manipulation	References
Intergenic region between <i>slr2030</i> and <i>slr2031</i>	
Analysis of glutathione synthesis	[333]
Analysis of heme oxygenase encoding genes	[334]
Photoproduction of poly-hydroxybutyrate (PHB) biodegradable bioplastics	[335]
Analysis of Flv3 flavodiiron protein	[336]
Photoproduction of pinene	[337]
Analysis of promoters and ribosome binding sites	[338]
Development of the CRISPR technologies for gene deletion or silencing	[339]
Photoproduction of ethylene	[340]
<i>slr0846</i> and <i>slr2030-slr2031</i> intergenic region	
Photoproduction of glutamate, linalool, and valencene	[341]
Intergenic regions between <i>slr0846</i> and <i>slr2030-slr2031</i>	
Photoproduction of limonene	[342]
<i>slr0168</i> and <i>slr1704-slr1575</i> intergenic region	
Photoproduction of 3-hydroxypropionic acid	[343]
<i>slr0168</i>, <i>psbA2</i>, and <i>slr2030-slr2031</i> intergenic region	
Photoproduction of the manoyl oxide terpene	[344]
Photoproduction of ethanol and butanol	[345]
Intergenic regions between <i>slr1495-slr11397</i>, <i>slr1362-slr11274</i>, <i>slr1828-slr11736</i>, and <i>slr1992-phaA2</i>	
Photoproduction of 3-hydroxybutyrate the precursor of the synthesis of PHB	[346]

The chromosomal cloning sites, written in bold cases are highlighted in grey color. The *cpcB* gene operates in the synthesis of the phycocyanin pigment. The *glpK* gene encodes the glycerol kinase. *slr0646* encodes the PBP5 dispensable penicillin binding protein [294]. The gene *ndhB* (*slr0223*) encodes a subunit of a NAD(P)H-dehydrogenase enzyme. The gene *slr0168* has no known function [220]. The *phaCE* genes operate in the synthesis of polyhydroxybutyrate (PHB) biodegradable bioplastics [331]. While *psbA1* is a silent gene [235], its homologue *psbA2* (*slr1311*) encodes the D1 protein of the photosystem II [259].

In *Synechococcus* PCC 7942 (Table 2), the most frequently employed chromosomal neutral sites are NSI (GenBank accession n° U30252), NSII (GenBank accession U44761) [253]), and NSIII (GenBank accession ABB56771.1) [254,255].

Table 2. Literature on the utilization of neutral chromosomal cloning sites in *Synechococcus* PCC 7942.

Neutral Site and Objective of the Gene Manipulation	References
NSI	
Photoproduction of 1,2-propanediol	[347]
Photoproduction of glycerol	[348]
Photoproduction of lactate	[349]
Photoproduction of succinate	[350]
Photoproduction of ethylene	[351]
Photoproduction of ethanol	[352]
NSII	
Photoproduction of free fatty acids	[353–355]
Photoproduction of B12 vitamin	[356]
NSIII	
Photoproduction of isobutyraldehyde	[357]
Photoproduction of carboxysome proteins	[358]

Table 2. Cont.

Neutral Site and Objective of the Gene Manipulation	References
NSI and NSII	
Analysis of the circadian rhythm	[359]
Photoproduction of isobutyraldehyde	[360]
Photoproduction of 1-butanol	[361,362]
Analysis of carboxysomes	[363,364]
Photoproduction of isopropanol	[364]
Photoproduction of isobutanol	[365]
Photoproduction of 3-hydroxypropionic acid	[366]
Photoproduction of 1,3-propanediol	[367]
Photoproduction of amorphadiene and squalene	[368]
Photoproduction of limonene	[369]
Photoproduction of acetone	[370]
Photoproduction of isoprene	[371]
Analysis of gene-expression control systems	[372]
Photoproduction of 2,3-butanediol	[373]
Photoproduction of farnesene	[374,375]
Photoproduction of lactate	[376]
NSI and NSIII	
Photoproduction of biomass and sucrose export	[377]
Photoproduction of a synthetic CO ₂ -fixing photorespiratory bypass	[378]
Photoproduction of 2,3 butanediol	[379]
Photoproduction of amorphadiene or squalene	[380]
NSI, NSII, and NSIII	
Overproduction of transporters to facilitate sugar export	[254]
Promoter analysis	[381]
Photoproduction of polyketides	[382]
Analysis of the influence of pilus biogenesis on the natural transformation	[229]
<i>psbA1</i>	
Photoproduction of ethylene	[383]
<i>glgC</i>	
Photoproduction of isobutanol	[366]
Intergenic region <i>Synpcc7942_0893</i> and <i>Synpcc7942_0894</i>	
Photoproduction of 2,3-butanediol	[384]

The chromosomal cloning sites, written in bold cases are highlighted in grey color.

In *Synechococcus* PCC 7002, the few neutral cloning sites employed (Table 3) are mainly the chromosomal genes *glpK*, which had been thought for some time to harbor a frameshift mutation preventing the production of a functional glycerol kinase enzyme [385], and *acsA*, which encodes an acetyl-CoA ligase, the inactivation of which conferred resistance to (3-hydroxy)propionate [386].

Table 3. Literature on the utilization of chromosomal neutral cloning sites in *Synechococcus* PCC 7002.

Neutral Cloning Sites	Objective of the Gene Manipulation and References
<i>glpK</i> (SYNPCC7002_A2842) encoding the glycerol kinase [385,386]	Removal of carboxysomes for containment of genetically modified strains [387]
<i>acsA</i> gene (SYNPCC7002_A1838) encoding an acetyl-CoA ligase and <i>glpK</i>	Analysis of an organic acid-based counter selection system [386]
<i>acsA</i> and <i>glpK</i>	Analysis of promoters and ribosome binding sites [388]
Integration between SYNPCC7002_A0935 and SYNPCC7002_A0936	Photoproduction of bisabolene and limonene [388]
<i>glpK</i> and <i>desB</i> (SYNPCC7002_A0159 encoding a ω 3 acyl-lipid desaturase [389] and integration between SYNPCC7002_A0935 and SYNPCC7002_A0936	Development of genetic tools [390]
<i>glpK</i> and integration between A0935-A0936	Engineering a strain for melamine degradation [391]
Intergenic regions between SYNPCC7002_A0932 and SYNPCC7002_A0933, SYNPCC7002_A1202 and SYNPCC7002_A1203, SYNPCC7002_A1778 and SYNPCC7002_A1779	Development of genetic tools [257]
SYNPCC7002_A1838, SYNPCC7002_A2542, and SYNPCC7002_A2842	Photoproduction of L-lysine [392]

The inactivation of the glycerol kinase *glpK* gene (SYNPCC7002_A2842), which was mistakenly annotated as having a frameshift mutation preventing the production of a functional protein [385], has no influence on the physiology of *Synechococcus* PCC 7002 [386]. Similarly, the inactivation of *desB* (SYNPCC7002_A0159, ω 3 acyl-lipid desaturase) has no detrimental influence at temperature above 22 °C [389]. The inactivation of the *acsA* gene (SYNPCC7002_A1838) encoding an acetyl-CoA ligase confers resistance to 3-hydroxypropionate and propionate [386].

7.4. Development of Transformable Shuttle Vectors Based on the Endogenous Plasmids of *Synechocystis* PCC 6803, *Synechococcus* PCC 7942, and *Synechococcus* PCC 7002

Because transformation and autonomously replicating plasmids have played a crucial role for gene manipulation in *Escherichia coli*, several groups tried to introduce an *E. coli* plasmid (pBR322 and its pUC derivatives) into cyanobacteria by transformation. All attempts were unsuccessful [163,178,231], in spite of a single report [393] that was never confirmed thereafter. These findings indicated that these *E. coli* plasmids are not able to replicate in cyanobacteria. Consequently, chimeric plasmids capable to replicate both in *E. coli* and a transformable cyanobacteria were constructed by cloning a small (cryptic) cyanobacterial plasmid (or a part of it) into an *E. coli* plasmid [394]. This approach was initiated in *Synechococcus* PCC 7942 using its smaller 7.84 kbp endogenous plasmid [182,395]. Then, the transformation efficiency was increased by plating the transformation mixture (recipient cells plus transforming DNA) on solid medium and incubating the plate in standard condition for 24 h prior to adding the selective antibiotic underneath the agar of the plate [183]. The transformation was more efficient when the recipient cyanobacterial cells were taken at the transition from the first to the second exponential growth phases [183], similarly to what has been observed for the transformation with linear chromosomal DNA [226]. The influence of the growth phase on transformation, which was not confirmed by other workers [396], was also observed in *Synechocystis* PCC 6803 [163].

Synechococcus PCC 7942 was found to be transformed more efficiently by chimeric-plasmid DNA isolated directly from this cyanobacterium rather than from *E. coli* [182]. This was explained by assuming that *Synechococcus* PCC 7942 and *E. coli* DNA are differently modified, for instance, by *dam*- or *dcm*-like DNA methylation systems [182]. Similarly, *Synechococcus* PCC 7002 was more efficiently transformed by its chimeric plasmid when it had been isolated directly from this host rather than from *E. coli* [397]. Furthermore, the elimination from this *Synechococcus* PCC 7002 biphasic plasmid of the *AvaI* restriction site (cleaved by the *AvaI*-isoschizomer *AquI* endonuclease of *Synechococcus* PCC 7002) strongly increased the efficiency of transformation to *Synechococcus* PCC 7002 [397]. The importance

of DNA modification for genetic transformation and cell fitness of cyanobacteria were firmly established in *Synechocystis* PCC 6803 [398–401].

The biphasic plasmids autonomously replicating in *E. coli* and a specific cyanobacterium were improved by several groups through the addition of restriction sites for facile gene cloning and/or several antibiotic-resistance genes for effective selection in *Synechococcus* PCC 7942 [402–404], *Synechocystis* PCC 6803 [163], and *Synechococcus* PCC 7002 [405]. These shuttle vectors were used for complementation analyses selecting for both the antibiotic resistance of the vector and the wild-type phenotype [406]. This approach allowed the identification and analysis of genes encoding the key stress-defense proteins RecA [405] and the Mn SOD [407]. One *Synechocystis* PCC 6803 shuttle vector served for analyzing the activity of several *E. coli* promoters, such as the *tac* promoter which appeared to be as effective in *Synechocystis* PCC 6803 as in *E. coli* [408]. This promoter-probe vector was also used to show that the lambda phage *Ci₈₅₇* gene (encoding a temperature sensitive repressor) and associated P_R promoter can be employed for strong and tight temperature-controlled gene expression [408]. Latter these gene expression devices were also shown to work well in other cyanobacteria [409,410].

The *Synechococcus* PCC 7002 and *Synechococcus* PCC 7942 shuttle vectors were employed for the production of heterologous larvicidal proteins in cyanobacterial cells, which turned out to be toxic when ingested by mosquito larvae [411,412]. Other studies reported the cloning of heterologous genes in *Synechococcus* PCC 7942 to increase its resistance to cadmium [413] or salt [414,415]. Similarly, the *Zymomonas mobilis* genes encoding the pyruvate decarboxylase (*pdc*) and alcohol dehydrogenase II (*adhI*) were cloned into a *Synechococcus* PCC 7942 shuttle vector to engineer an ethanol producer [416]. The same strategy of cloning heterologous genes into a shuttle vector was used to generate a *Synechococcus* PCC 7942 recombinant strain for the production of ethylene [417–419]. Chimeric shuttle vectors were also used to overexpress endogenous metabolic genes to improve CO₂-fixation and/or biomass production in *Synechococcus* PCC 7942 [420].

7.5. The Chimeric Shuttle Vectors Based on an Endogenous Cyanobacterial Plasmid Tend to Have a Narrow-Host-Range of Replication

The abovementioned biphasic shuttle plasmids based on a cyanobacterial replicon appeared to replicate in one or a few genetically manipulable cyanobacteria. For examples, the *Synechococcus* PCC 7942 chimeric plasmids could not transform *Synechocystis* PCC 6803 [163], and reciprocally, the *Synechocystis* PCC 6803 shuttle vectors could not transform *Synechococcus* PCC 7942 [163]. In contrast, a shuttle vector based on an endogenous plasmid from *Synechococcus* PCC 7942 was shown to replicate in *Anabaena* PCC 7120, but not in *Synechocystis* PCC 6803 [421].

Plasmid vectors that can be transferred to, but cannot replicate in, a host are interesting for transporting DNA that must either transpose (e.g., a transposon, useful for random mutagenesis) or by homologous recombination in order to be stably maintained.

7.6. The Development of Autonomously Replicating Vectors Derived from the Broad-Host-Range Conjugative Plasmid RSF1010 Has Boosted the Genetics of Cyanobacteria

The interest of chimeric plasmid vectors that uses two narrow-host-range replicons originating from *E. coli* and a cyanobacterium is limited by the fact that they can shuttle only from *E. coli* to mostly the corresponding cyanobacterium. Such narrow-host-range vectors are not suitable for rapid tests and comparisons of a gene function in diverse cyanobacterial hosts to select (and engineer) a cyanobacterial chassis for an effective photo-synthetic production of an industrially interesting chemical. Thus, several groups turned their attention to the naturally-occurring RSF1010 plasmid [422], a member of the incQ incompatibility group that replicates in a wide range of Gram-negative bacterial genera (cyanobacteria are also Gram-negative), including *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligene*, *Azotobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Methylophilus*, *Providencia*, *Pseudomonadales*, *Rhizobiaceae*, *Rhodopseudomonas*, and *Salmonella* SP- and *Serratia*. The value of RSF1010 as a shuttle vector is further enhanced by its ability to be transferred by conjugation from

an *E. coli* strain also carrying a self-transmissible (incP group) plasmid, such as RP4. The RSF1010-derived plasmids can be used to carry novel genetic information to those bacteria that are not capable of transformation [423–425].

RSF1010 and its derivatives were shown to be efficiently transferred by conjugation from *E. coli* to cyanobacteria where they replicate autonomously, even though they contain no cyanobacterial replicon. These cyanobacteria were, namely, *Synechocystis* PCC 6803 [426], *Synechococcus* NKBG15041C, *Pseudanabaena* NKBG040605C [427], *Synechocystis* PCC 6714, *Synechococcus* strains PCC7942 and PCC6301 [428], *Thermosynechococcus elongatus* PB1 [429], marine *Synechococcus* strains sp. WH7803, WH8102 and WH8103 [430], *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 [431,432], *Prochlorococcus* MIT9313 [433], *Nostoc* (*Anabaena*) PCC 7120, *Nostoc punctiforme* ATCC29133 (also registered as PCC 73102) [255,434,435], *Leptolyngbya* BL0902 [436] and *Cyanothece* PCC 7425 [410].

Shortly after, the *Synechocystis* PCC6803 pioneering report [426], RSF1010 was used for the development of the first conjugative plasmid vector for promoter analysis [409] and regulated protein production in cyanobacteria [437]. The promoter-probe vector used the promoter-less chloramphenicol-acetyl-transferase (*cat*) gene as the reporter. When expressed by a studied promoter, *cat* directs the production of the CAT enzyme, the activity of which can be monitored by a spectrophotometric assay and confers the resistance to chloramphenicol [409]. This vector was used for the analysis of constitutive or regulated promoters [126,438,439] and references therein. The conditional expression vector [437] harbors the lambda-phage gene *cI₈₅₇* encoding a temperature-sensitive repressor that tightly controls the activity of the otherwise strong *p_R* promoter. Together these elements allow a tight temperature-controlled expression of the studied genes (no production of the corresponding proteins at temperatures below 30 °C, moderate level at 34–36 °C, and high production at 39–40 °C). This vector and its derivative harboring the *gfp* gene encoding the green-fluorescent reporter protein have been employed for proteins involved in photosynthesis [125], response to stress [34], cell division [440–442], and biogenesis of the carboxysome [410].

Other RSF1010-derived plasmids vectors have been used to analyze ribosome binding sites and transcription terminators [264], light-emitting proteins GFP, YFP (yellow-fluorescent protein), and luciferase [255,264,432,434]. RSF1010-derived vectors were also employed to analyze the role of carbon stores glycogen and PHB (polyhydroxybutyrate) in the tolerance to stress [443] and systems for the control of gene expression (in *Synechococcus* PCC 7942) [372], as well as various proteins such as the *Synechocystis* PCC 6803 photolyase enzyme PhrA [444] and to improve carbon fixation [445].

RSF1010 derivative plasmids were also employed in many works aiming at producing biotechnologically interesting products including bisabolol and patchoulol [446], ethanol [447], ethylene [306,340,448–450], erythritol [451], hydrogen [452,453], isobutanol [454,455], lactate [308], limonene [410], n-butanol [319], and triterpenes (lupeol, marnerol, and hydroxymarnerol) [456].

Interestingly, in *Synechocystis* PCC 6803, it has been shown that RSF1010 and the pCC5.2 endogenous plasmid could be used for cloning, respectively, two pentose phosphate pathway native genes and the limonene synthase genes (*lims*) from either *Mentha spicata* or *Citrus limon*, which directed the production of limonene [262].

8. Interest and Limitation of the CRISPR/Cas Genome Editing Technology

Recently, the CRISPR/Cas system (CRISPR stands for clustered regularly interspaced short palindromic repeats and Cas for CRISPR-associated endonuclease) has facilitated the way genomes are edited in cyanobacteria, such as *Synechocystis* PCC 6803, *Synechococcus* PCC 7942, *Synechococcus* PCC 7002, *Synechococcus* UTEX 2973, and the filamentous strain *Nostoc* (*Anabaena*) PCC 7120 (for reviews see [80,83,84,339,457]). Briefly, CRISPR/Cas genome editing systems exploit the Class II family of Cas endonucleases, which have a site-specific RNA-guided DNA cleavage activity. As compared to the well-established gene deletions techniques based on homologous DNA recombination, the interest of

the CRISPR/Cas system are (i) CRISPR/Cas systems can allow the engineering of non-transformable cyanobacteria, providing they can be manipulated by conjugation; (ii) a marker-less mutation is generated at the DNA target site; and (iii) multiple DNA loci can be modified simultaneously, by co-expressing the appropriate guide RNAs and editing templates.

The limitation of the CRISPR/Cas technology are the potential toxicity of the Cas DNase and the time required to eliminate the CRISPR/Cas plasmid vector from the generated mutant. However, this curing step can be accelerated by the presence of a negative selection marker in the CRISPR/Cas vector [80].

A variant of the CRISPR/Cas system, the CRISPRi (CRISPR interference) system that make use of DNase-inactive variants of Cas, is especially relevant to repress (fully or not) the transcription of studied genes, including the essential ones that cannot be deleted. This strategy was used for the targeted repression of vital genes to arrest growth and increase carbon partitioning and biofuel titers in *Synechocystis* PCC 6803 [345]. The CRISPRi technology was also employed to generate mutants with increased yields of growth and lactate secretion [458].

9. Responses to Stresses: The Recent Progress in Omics Technics Are Limited by the Large Number of Genes of Still Unknown Function

Because of their oxygenic photosynthesis, which triggered oxygen-promoted changes in metal availability, and the fact that they colonized most aquatic biotopes of our planet, cyanobacteria have always been challenged by changes in light, metals, and nutrients availabilities [28]. The responses to these stresses have been well studied with omics techniques that measure the changes in abundance of transcripts (transcriptomics), proteins (proteomics), or metabolites (metabolomics). The available genome sequences facilitate the use of transcriptomic and proteomic approaches.

Initially, transcriptomics focused on *Synechocystis* PCC 6803, because its genome has been the first to be fully sequenced [48] and used to develop the first commercially available DNA microarrays (IntelliGene™ CyanoCHIP; Takara Bio Inc., Shiga, Japan), which only comprised probes for protein-coding genes deposited on a glass support. These CyanoCHIP were used to the transcriptional responses to high light [459], inhibitors of photosynthesis [460], depletion of the LexA regulator [90], salt [461–464], cold stress [465], acid stress [466,467], heat shock [468–470], osmotic stress [465,471,472], oxidative stresses triggered by methyl viologen [473], or H₂O₂ [474,475], Cd-, Fe-, or Zn-stresses [474].

Later, several genome-wide *Synechocystis* PCC 6803 microarrays were also developed, based on long oligonucleotide probes (60- to 70-mer) spotted on a glass support. Such oligonucleotides-based microarrays circumvented the labor-intensive and error-prone steps of probe amplification and purification. They were used to study cell responses to sulfur starvation [476] and the deletion of the AbrB2 transcription regulator [477].

As an alternative to microarray analyses, which are based on hybridization of mRNA to DNA probes, the direct sequencing of RNA (an approach designated as RNA-Seq) was adapted to cyanobacteria [478]. RNA-Seq rapidly became the standard method for cyanobacterial transcriptomics [250,479]. It revealed that the *Synechocystis* PCC 6803 transcriptome includes more than 4000 transcriptional units, half of which representing small RNAs (sRNAs), which often harbor a small protein-coding sequence of less than 100 amino acid residues, and non-coding RNAs (ncRNAs) [480]. These ncRNAs could not be detected by DNA microarrays that only comprised probes for protein-coding genes. The vast majority of ncRNAs are still uncharacterized, and most of them are antisense transcripts (asRNAs). The phylogenetic conservation of ncRNAs across genomes of relatively distant cyanobacteria and their regulated transcription in response to major stresses, such as, light, iron, carbon, or nitrogen availability, nitrogen starvation [481], and butanol or ethanol stress [482], suggest that many ncRNAs may be involved in regulation [250,479].

Proteomics was also used to study the cyanobacterial responses to stresses, again starting with *Synechocystis* PCC 6803 [483], the genome of which is predicted to contain 3672 putative open reading frames (ORFs, i.e., protein coding sequences). Of these,

3264 and 408 ORFs are located on the chromosome and the seven endogenous plasmids, respectively [484]. Traditionally, two-dimensional polyacrylamide gels (2D-PAGE) and utilization of different fluorescence dyes (difference gel electrophoresis; 2D-DIGE) were employed to estimate concentrations for each protein between stress versus unstressed conditions. Later strategies took advantage of the sensitivity of liquid chromatography (LC), coupled with tandem mass spectrometry (MS), known as LC-MS/MS, for quantitative proteomic analysis, using different tags such as the isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ)-based quantitative proteomics [485,486]. This quantitative technique became the dominant proteomics method for the identification of differentially expressed proteins of *Synechocystis* PCC 6803 [485–488].

These proteome techniques were employed to study the responses to cold [489]; copper [490]; CO₂ limitation [491]; high light [492]; high or low temperature [469,492–494]; high or low pH [495–497]; nitrogen-, phosphate, or sulfate-starvations [481,498,499]; metal stress [498,500,501]; salt stress [502–507]; and UV-B stress [508]. They also served to study the tolerance of *Synechocystis* PCC 6803 to butanol, ethanol, or hexane biofuels [488,509–512], as well as to analyze cyanobacterial strains engineered for the production of butanol [511], ethanol [510], hexane [509], or 3-hydroxypropionic acid [513].

In addition to the quantification of proteins, proteome methods can be used to identify protein modifications, such as glutathionylation [40], lysine malonylation [514], lysine methylation [515], phosphorylation [516–518], which are potentially involved in controlling protein activities.

However, our current understanding of the transcriptome and proteome responses to various challenges is limited by the fact that a large number of the responsive genes or proteins have still an unknown function.

In addition to transcriptomics and proteomics, metabolomics that focuses on low-molecular-weight metabolites provides the most straightforward characterization of metabolic responses to environmental changes. Compared to other omics studies, a few metabolomic research studies have been performed in cyanobacteria, and again *Synechocystis* PCC 6803 has been the most studied model. As many metabolites turn over quickly, fast sampling through fast culture filtration appeared to be very important in metabolomic analyses [519,520]. The combination of gas chromatography or liquid chromatography with mass spectrometry permits quantitative analysis of more than 100 metabolites in cyanobacterial cells. In addition to metabolomics, which seeks comprehensive profiling of predominantly intra-organism compounds, volatilomics assesses those compounds released by an organism: the key components of chemically mediated inter-organismal communication [521,522]. The field of volatilomics grew out as advances in collection methods of volatile organic compounds and gas chromatography coupled with mass spectrometry.

Finally, in several studies, transcriptomics, proteomics, and/or metabolomics were integrated to better analyze the responses of *Synechocystis* PCC 6803 to environmental conditions [492,497,523–529], as well as the production of [530] or the tolerance to chemicals [531]. In some cases, it appeared that omics data at different levels do not necessarily correlate a finding that can be explained by regulations occurring at the levels of gene expression [6,93,479,532–534] and/or enzyme stability and activity [40,483,527].

10. Conclusions

Cyanobacteria are a widely-diverse photosynthetic prokaryotes of wide interest for basic and applied sciences. So far, cyanobacterial research has focused primarily on a few models, such as the three unicellular non-nitrogen fixing species *Synechocystis* PCC 6803, *Synechococcus* PCC 7942, and *Synechococcus* PCC 7002, which are straightforward to culture under laboratory conditions, easily amenable to genetic modification and can be frozen for long-term storage. Extensive “omics” data sets and many genetic tools and genome-scale metabolic models (GSM) have been generated to guide the engineering of these model cyanobacteria for the photosynthetic production of biotechnologically interesting chemicals. Interestingly, it has been put forward that GSM should take into account

and describe photon absorption and light-shading thereby addressing the challenge of accurately modeling light as a metabolite [535,536]. In addition, GSM should be validated with experimental data obtained after measurement of metabolic fluxes and metabolic pool sizes [80,86,87,536]. However, omics data interpretation and GSM metabolic designs are based on our currently limited understanding of the genotype–phenotype relationships of cyanobacteria. Thus, to generate robust and predictive GSM models of the cyanobacterial metabolism, it is important to continue the analysis of *Synechocystis* PCC 6803, *Synechococcus* PCC 7942 and *Synechococcus* PCC 7002, and increase the efforts to

- (i) verify the function of numerous genes that have been annotated merely by sequence analogy with those genes characterized only in intensively studied non-photosynthetic models (*E. coli*, yeast, etc.), which may have a different function in cyanobacteria;
- (ii) and analyze the specificity/redundancy of multiple gene families;
- (iii) characterize the function of the large number of as yet unknown genes and non-coding RNAs;
- (iv) identify the comprehensive set of genes that are essential to the growth of cells incubated in well-defined conditions.

Furthermore, most of the attempts to reprogram *Synechocystis* PCC 6803, *Synechococcus* PCC 7942, or *Synechococcus* PCC 7002 for the photoproduction of chemicals have focused on increasing product synthesis by small-scale cultures growing under laboratory conditions because most academic researchers lack access to large-scale production systems that are necessary to evaluate the potential of engineered strains under realistic industrial conditions.

Moreover *Synechocystis* PCC 6803, *Synechococcus* PCC 7942, and *Synechococcus* PCC 7002 represent only a limited part of the wide biodiversity of cyanobacteria. This arguably limits fundamental discovery and applied research towards wider commercialization. Thus, new phylogenetically-distant candidate cyanobacteria should be isolated and developed from diverse environments with a robust growth and high tolerance to local conditions, so as to be used as chassis for the photosynthetic production of high-value chemicals in diverse industrial sites. We think that the genetic modifiability of such candidate strains using the conjugative transfer of RSF1010-derived broad-host-range plasmids will be key for such works.

To summarize, we recommend to strengthen the communication between academic researchers, who know well cyanobacteria and can manipulate them, but have a limited access to large photobioreactors and industrial partners, who attempt to use cyanobacteria to produce interesting chemicals at reasonable costs, but often lack knowledge on cyanobacterial genetics, physiology, and metabolism. Moreover, to minimize operation costs we need to develop robust cyanobacteria capable to grow on industrial waters and fumes, in huge photobioreactors, as well as well as efficient technologies to harvest the end products.

Author Contributions: Conceptualization, C.C.-C. and F.C.; writing—original draft preparation, F.C., C.C.-C., and V.B.-G.; writing—review and editing, F.C., C.C.-C., and V.B.-G.; supervision, F.C. and C.C.-C.; project administration, F.C. and C.C.-C.; funding acquisition, F.C. and C.C.-C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded in part by the ANR CalvinDesign (ANR-17-CE05-0001).

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. Soo, R.M.; Hemp, J.; Hugenholtz, P. Evolution of photosynthesis and aerobic respiration in the cyanobacteria. *Free Radic. Biol. Med.* **2019**, *140*, 200–205. [[CrossRef](#)]
2. Garcia-Pichel, F.; Zehr, J.P.; Bhattacharya, D.; Pakrasi, H.B. What's in a name? The case of cyanobacteria. *J. Phycol.* **2020**, *56*, 1–5. [[CrossRef](#)]
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**, *18*, 325–340. [[CrossRef](#)]
4. 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](#)]
5. Ducat, D.C.; Way, J.C.; Silver, P.A. Engineering cyanobacteria to generate high-value products. *Trends Biotechnol.* **2011**, *29*, 95–103. [[CrossRef](#)]
6. Veaudor, T.; Blanc-Garin, V.; Chenebault, C.; Diaz-Santos, E.; Sassi, J.F.; Cassier-Chauvat, C.; Chauvat, F. Recent advances in the photoautotrophic metabolism of cyanobacteria: Biotechnological implications. *Life* **2020**, *10*, 71. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Mills, L.A.; McCormick, A.J.; Lea-Smith, D.J. Current knowledge and recent advances in understanding metabolism of the model cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biosci. Rep.* **2020**, *40*. [[CrossRef](#)]
8. Garcia-Pichel, F.; Belnap, J.; Neuer, S.; Schanz, F. Estimates of global cyanobacterial biomass and its distribution. *Arch. Hydrobiol. Suppl. Algal. Stud.* **2009**, *109*, 213–227. [[CrossRef](#)]
9. Chang, A.C.G.; Chen, T.; Li, N.; Duan, J. Perspectives on endosymbiosis in coralloid roots: Association of cycads and cyanobacteria. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Cassier-Chauvat, C.; Chauvat, F. Cyanobacteria: Wonderful Microorganisms for Basic and Applied Research. *eLS* **2018**, 1–11. [[CrossRef](#)]
11. Cassier-Chauvat, C.; Chauvat, F. Cell division in cyanobacteria. In *The Cell Biology of Cyanobacteria*; Flores, E., Herrero, A., Eds.; Caister Academic Press: Poole, UK, 2014.
12. Springstein, B.L.; Nürnberg, D.J.; Weiss, G.L.; Pilhofer, M.; Stucken, K. Structural determinants and their role in cyanobacterial morphogenesis. *Life* **2020**, *10*, 355. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Chauvat, F.; Corre, B.; Herdman, M.; Joset-Espardellier, F. Energetic and metabolic requirements for the germination of akinetes of the cyanobacterium *Nostoc* PCC 7524. *Arch. Microbiol.* **1982**, *133*, 44–49. [[CrossRef](#)]
14. Herrero, A.; Stavans, J.; Flores, E. The multicellular nature of filamentous heterocyst-forming cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **2016**, *40*, 831–854. [[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](#)]
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](#)]
17. Demay, J.; Bernard, C.; Reinhardt, A.; Marie, B. Natural products from cyanobacteria: Focus on beneficial activities. *Mar. Drugs* **2019**, *17*, 320. [[CrossRef](#)]
18. Pereira, S.B.; Sousa, A.; Santos, M.; Araújo, M.; Serôdio, F.; Granja, P.; Tamagnini, P. Strategies to obtain designer polymers based on cyanobacterial extracellular polymeric substances (EPS). *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 5693. [[CrossRef](#)]
19. 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](#)]
20. Lin, P.C.; Pakrasi, H.B. Engineering cyanobacteria for production of terpenoids. *Planta* **2019**, *249*, 145–154. [[CrossRef](#)]
21. Schopf, J.W. The paleobiological record of photosynthesis. *Photosynth. Res.* **2011**, *107*, 87–101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Imlay, J.A. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: Lessons from a model bacterium. *Nat. Rev. Microbiol.* **2013**, *11*, 443–454. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Shimakawa, G.; Matsuda, Y.; Nakajima, K.; Tamoi, M.; Shigeoka, S.; Miyake, C. Diverse strategies of O₂ usage for preventing photo-oxidative damage under CO₂ limitation during algal photosynthesis. *Sci. Rep.* **2017**, *7*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Diaz, J.M.; Plummer, S. Production of extracellular reactive oxygen species by phytoplankton: Past and future directions. *J. Plankton Res.* **2018**, *40*, 655–666. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Narainsamy, K.; Marteyn, B.; Sakr, S.; Cassier-Chauvat, C.; Chauvat, F. Genomics of the Pleiotropic Glutathione System in Cyanobacteria. *Adv. Bot. Res.* **2013**, *65*, 157–188.
26. Picciocchi, A.; Saguez, C.; Boussac, A.; Cassier-Chauvat, C.; Chauvat, F. CGFS-type monothiol glutaredoxins from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 and other evolutionary distant model organisms possess a glutathione-ligated [2Fe-2S] cluster. *Biochemistry* **2007**, *46*, 15018–15026. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Fahey, R.C. Glutathione analogs in prokaryotes. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2013**, *1830*, 3182–3198. [[CrossRef](#)]
28. Cassier-Chauvat, C.; Chauvat, F. Genomics of the Resistance to Metal and Oxidative Stresses in Cyanobacteria. *Stress Environ. Regul. Gene Expr. Adapt. Bact.* **2016**, *2*, 1154–1164.
29. Kammerscheit, X.; Chauvat, F.; Cassier-Chauvat, C. From cyanobacteria to human, MAPEG-type glutathione-S-transferases operate in cell tolerance to heat, cold, and lipid peroxidation. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 2248. [[CrossRef](#)]
30. Berndt, C.; Lillig, C.H. Glutathione, Glutaredoxins, and Iron. *Antioxid. Redox Signal.* **2017**, *27*, 1235–1251. [[CrossRef](#)]

31. 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](#)]
32. Kammerscheit, X.; Chauvat, F.; Cassier-Chauvat, C. First in vivo evidence that glutathione-s-transferase operates in photo-oxidative stress in cyanobacteria. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1899. [[CrossRef](#)]
33. Noctor, G.; Mhamdi, A.; Chaouch, S.; Han, Y.; Neukermans, J.; Marquez-Garcia, B.; Queval, G.; Foyer, C.H. Glutathione in plants: An integrated overview. *Plant Cell Environ.* **2012**, *35*, 454–484. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. 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](#)]
35. Cassier-Chauvat, C.; Chauvat, F. Responses to oxidative and heavy metal stresses in cyanobacteria: Recent advances. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 871. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Thorsen, M.; Jacobson, T.; Vooijs, R.; Navarrete, C.; Blik, T.; Schat, H.; Tamás, M.J. Glutathione serves an extracellular defence function to decrease arsenite accumulation and toxicity in yeast. *Mol. Microbiol.* **2012**, *84*, 1177–1188. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Przybyla-Toscano, J.; Roland, M.; Gaymard, F.; Couturier, J.; Rouhier, N. Roles and maturation of iron–sulfur proteins in plastids. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2018**, *23*, 545–566. [[CrossRef](#)]
38. Daniel, T.; Faruq, H.M.; Laura Magdalena, J.; Manuela, G.; Christopher Horst, L. Role of GSH and Iron-Sulfur Glutaredoxins in Iron Metabolism-Review. *Molecules* **2020**, *27*, 3860. [[CrossRef](#)]
39. Mailloux, R.J. Protein S-glutathionylation reactions as a global inhibitor of cell metabolism for the desensitization of hydrogen peroxide signals. *Redox Biol.* **2020**, *32*. [[CrossRef](#)]
40. 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](#)]
41. Sakr, S.; Dutheil, J.; Saenkham, P.; Bottin, H.; Leplat, C.; Ortega-Ramos, M.; Aude, J.C.; Chapuis, V.; Guedeny, 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](#)]
42. Gallé, A.; Czékus, Z.; Bela, K.; Horváth, E.; Ördög, A.; Csiszár, J.; Poór, P. Plant glutathione transferases and light. *Front. Plant Sci.* **2019**, *9*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Sylvestre-Gonon, E.; Law, S.R.; Schwartz, M.; Robe, K.; Keech, O.; Didierjean, C.; Dubos, C.; Rouhier, N.; Hecker, A. Functional, structural and biochemical features of plant serinyl-glutathione transferases. *Front. Plant Sci.* **2019**, *10*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Couto, N.; Wood, J.; Barber, J. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radic. Biol. Med.* **2016**, *95*, 27–42. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. 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](#)] [[PubMed](#)]
46. Fleischmann, R.D.; Adams, M.D.; White, O.; Clayton, R.A.; Kirkness, E.F.; Kerlavage, A.R.; Bult, C.J.; Tomb, J.F.; Dougherty, B.A.; Merrick, J.M.; et al. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* **1995**, *269*, 496–512. [[CrossRef](#)]
47. Fraser, C.M.; Gocayne, J.D.; White, O.; Adams, M.D.; Clayton, R.A.; Fleischmann, R.D.; Bult, C.J.; Kerlavage, A.R.; Sutton, G.; Kelley, J.M.; et al. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* **1995**, *270*, 397–403. [[CrossRef](#)]
48. Kaneko, T.; Sato, S.; Kotani, H.; Tanaka, A.; Asamizu, E.; Nakamura, Y.; Miyajima, N.; Hirosawa, M.; Sugiura, M.; Sasamoto, S.; et al. 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.* **1996**, *3*, 109–136. [[CrossRef](#)]
49. Cao, H.; Shimura, Y.; Steffen, M.M.; Yang, Z.; Lu, J.; Joel, A.; Jenkins, L.; Kawachi, M.; Yin, Y.; Garcia-Pichel, F. The trait repertoire enabling cyanobacteria to bloom assessed through comparative genomic complexity and metatranscriptomics. *MBio* **2020**, *11*. [[CrossRef](#)]
50. Fernandez, L.; Peura, S.; Eiler, A.; Linz, A.M.; McMahon, K.D.; Bertilsson, S. Diazotroph Genomes and Their Seasonal Dynamics in a Stratified Humic Bog Lake. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*. [[CrossRef](#)]
51. Grettenberger, C.L.; Sumner, D.Y.; Wall, K.; Brown, C.T.; Eisen, J.A.; Mackey, T.J.; Hawes, I.; Jospin, G.; Jungblut, A.D. A phylogenetically novel cyanobacterium most closely related to *Gloeobacter*. *ISME J.* **2020**, *14*, 2142–2152. [[CrossRef](#)]
52. Salazar, V.W.; Tschoeke, D.A.; Swings, J.; Cosenza, C.A.; Mattoso, M.; Thompson, C.C.; Thompson, F.L. A new genomic taxonomy system for the *Synechococcus* collective. *Environ. Microbiol.* **2020**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Tripp, H.J.; Bench, S.R.; Turk, K.A.; Foster, R.A.; Desany, B.A.; Niazi, F.; Affourtit, J.P.; Zehr, J.P. Metabolic streamlining in an open-ocean nitrogen-fixing cyanobacterium. *Nature* **2010**, *464*, 90–94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Dagan, T.; Roettger, M.; Stucken, K.; Landan, G.; Koch, R.; Major, P.; Gould, S.B.; Goremykin, V.V.; Rippka, R.; De Marsac, N.T.; et al. Genomes of stigonematalean cyanobacteria (subsection V) and the evolution of oxygenic photosynthesis from prokaryotes to plastids. *Genome Biol. Evol.* **2013**, *5*, 31–44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Larsson, J.; Nylander, J.A.A.; Bergman, B. Genome fluctuations in cyanobacteria reflect evolutionary, developmental and adaptive traits. *BMC Evol. Biol.* **2011**, *11*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Cassier-Chauvat, C.; Poncelet, M.; Chauvat, F. Three insertion sequences from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 support the occurrence of horizontal DNA transfer among bacteria. *Gene* **1997**, *195*, 257–266. [[CrossRef](#)]

57. Zhaxybayeva, O.; Gogarten, J.P.; Charlebois, R.L.; Doolittle, W.F.; Papke, R.T. Phylogenetic analyses of cyanobacterial genomes: Quantification of horizontal gene transfer events. *Genome Res.* **2006**, *16*, 1099–10108. [[CrossRef](#)]
58. Cassier-Chauvat, C.; Veaudor, T.; Chauvat, F. Comparative genomics of DNA recombination and repair in cyanobacteria: Biotechnological implications. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Godde, J.S.; Baichoo, S.; Munglloo-Dilmohamud, Z.; Jauferally-Fakim, Y. Comparison of genomic islands in cyanobacteria: Evidence of bacteriophage-mediated horizontal gene transfer from eukaryotes. *Microbiol. Res.* **2018**, *211*, 31–46. [[CrossRef](#)]
60. Zeidner, G.; Bielawski, J.P.; Shmoish, M.; Scanlan, D.J.; Sabehi, G.; Béjà, O. Potential photosynthesis gene recombination between *Prochlorococcus* and *Synechococcus* via viral intermediates. *Environ. Microbiol.* **2005**, *7*, 1505–1513. [[CrossRef](#)]
61. Scanlan, D.J.; Ostrowski, M.; Mazard, S.; Dufresne, A.; Garczarek, L.; Hess, W.R.; Post, A.F.; Hagemann, M.; Paulsen, I.; Partensky, F. Ecological Genomics of Marine Picocyanobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2009**, *73*, 249–299. [[CrossRef](#)]
62. Nicholson, M.L.; Gaasenbeek, M.; Laudenbach, D.E. Two enzymes together capable of cysteine biosynthesis are encoded on a cyanobacterial plasmid. *MGG Mol. Gen. Genet.* **1995**, *247*, 623–632. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Kimura, A.; Hamada, T.; Morita, E.H.; Hayashi, H. A high temperature-sensitive mutant of *Synechococcus* sp. PCC 7002 with modifications in the endogenous plasmid, pAQ1. *Plant Cell Physiol.* **2002**, *43*, 217–223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Nagarajan, S.; Sherman, D.M.; Shaw, I.; Sherman, L.A. Functions of the duplicated hik31 operons in central metabolism and responses to light, dark, and carbon sources in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* **2012**, *194*, 448–459. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Swingley, W.D.; Chen, M.; Cheung, P.C.; Conrad, A.L.; Dejesa, L.C.; Hao, J.; Honchak, B.M.; Karbach, L.E.; Kurdoglu, A.; Lahiri, S.; et al. Niche adaptation and genome expansion in the chlorophyll d-producing cyanobacterium *Acaryochloris marina*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 2005–2010. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Welsh, E.A.; Liberton, M.; Stöckel, J.; Loh, T.; Elvitigala, T.; Wang, C.; Wollam, A.; Fulton, R.S.; Clifton, S.W.; Jacobs, J.M.; et al. The genome of *Cyanothece* 51142, a unicellular diazotrophic cyanobacterium important in the marine nitrogen cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 15094–15099. [[CrossRef](#)]
67. Bandyopadhyay, A.; Elvitigala, T.; Welsh, E.; Stöckel, J.; Liberton, M.; Min, H.; Sherman, L.A.; Pakrasi, H.B. Novel metabolic attributes of the genus *Cyanothece*, comprising a group of unicellular nitrogen-fixing cyanobacteria. *MBio* **2011**, *2*. [[CrossRef](#)]
68. Quinn, G.A.; Banat, A.M.; Abdelhameed, A.M.; Banat, I.M. Streptomycetes from traditional medicine: Sources of new innovations in antibiotic discovery. *J. Med. Microbiol.* **2020**, *69*, 1040–1048. [[CrossRef](#)]
69. Ahmed, M.N.; Reyna-González, E.; Schmid, B.; Wiebach, V.; Süßmuth, R.D.; Dittmann, E.; Fewer, D.P. Phylogenomic Analysis of the Microviridin Biosynthetic Pathway Coupled with Targeted Chemo-Enzymatic Synthesis Yields Potent Protease Inhibitors. *ACS Chem. Biol.* **2017**, *12*, 1538–1546. [[CrossRef](#)]
70. Hoff, G.; Bertrand, C.; Piotrowski, E.; Thibessard, A.; Leblond, P. Genome plasticity is governed by double strand break DNA repair in *Streptomyces*. *Sci. Rep.* **2018**, *8*. [[CrossRef](#)]
71. Labella, J.I.; Llop, A.; Contreras, A. The default cyanobacterial linked genome: An interactive platform based on cyanobacterial linkage networks to assist functional genomics. *FEBS Lett.* **2020**, *594*, 1661–1674. [[CrossRef](#)]
72. Simm, S.; Keller, M.; Selymes, M.; Schleiff, E. The composition of the global and feature specific cyanobacterial core-genomes. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*. [[CrossRef](#)]
73. Alvarenga, D.O.; Fiore, M.F.; Varani, A.M. A metagenomic approach to cyanobacterial genomics. *Front. Microbiol.* **2017**. [[CrossRef](#)]
74. 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](#)]
75. Shih, P.M.; Wu, D.; Latifi, A.; Axen, S.D.; Fewer, D.P.; Talla, E.; Calteau, A.; Cai, F.; Tandeau de Marsac, N.; Rippka, R.; et al. Improving the coverage of the cyanobacterial phylum using diversity-driven genome sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 1053–1058. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Harel, A.; Karkar, S.; Cheng, S.; Falkowski, P.G.; Bhattacharya, D. Deciphering primordial cyanobacterial genome functions from protein network analysis. *Curr. Biol.* **2015**, *25*, 628–634. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Sánchez-Baracaldo, P.; Cardona, T. On the origin of oxygenic photosynthesis and Cyanobacteria. *New Phytol.* **2020**, *225*, 1440–1446. [[CrossRef](#)]
78. Ponce-Toledo, R.I.; López-García, P.; Moreira, D. Horizontal and endosymbiotic gene transfer in early plastid evolution. *New Phytol.* **2019**, *224*, 618–624. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Kopf, M.; Klähn, S.; Pade, N.; Weingärtner, C.; Hagemann, M.; Voß, B.; Hess, W.R. Comparative genome analysis of the closely related *Synechocystis* strains PCC 6714 and PCC 6803. *DNA Res.* **2014**, *21*, 255–266. [[CrossRef](#)]
80. Gale, G.A.R.; Osorio, A.A.S.; Mills, L.A.; Wang, B.; Lea-Smith, D.J.; McCormick, A.J. Emerging species and genome editing tools: Future prospects in cyanobacterial synthetic biology. *Microorganisms* **2019**, *7*, 409. [[CrossRef](#)]
81. Janasch, M.; Asplund-Samuelsson, J.; Steuer, R.; Hudson, E.P. Kinetic modeling of the Calvin cycle identifies flux control and stable metabolomes in *Synechocystis* carbon fixation. *J. Exp. Bot.* **2019**, *70*, 973–983. [[CrossRef](#)]
82. Lasry Testa, R.; Delpino, C.; Estrada, V.; Diaz, S.M. In silico strategies to couple production of bioethanol with growth in cyanobacteria. *Biotechnol. Bioeng.* **2019**, *116*, 2061–2073. [[CrossRef](#)]
83. Khan, A.Z.; Bilal, M.; Mehmood, S.; Sharma, A.; Iqbal, H.M.N. State-of-the-art genetic modalities to engineer cyanobacteria for sustainable biosynthesis of biofuel and fine-chemicals to meet bio-economy challenges. *Life* **2019**, *9*, 54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

84. 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](#)]
85. Wu, C.; Jiang, H.; Kalra, I.; Wang, X.; Cano, M.; Maness, P.C.; Yu, J.; Xiong, W. A generalized computational framework to streamline thermodynamics and kinetics analysis of metabolic pathways. *Metab. Eng.* **2020**, *57*, 140–150. [[CrossRef](#)]
86. Hendry, J.I.; Bandyopadhyay, A.; Srinivasan, S.; Pakrasi, H.B.; Maranas, C.D. Metabolic model guided strain design of cyanobacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2020**, *64*, 17–23. [[CrossRef](#)]
87. Mukherjee, B.; Madhu, S.; Wangikar, P.P. The role of systems biology in developing non-model cyanobacteria as hosts for chemical production. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2020**, *64*, 62–69. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Bender, R.A. The danger of annotation by analogy: Most “thii” genes play no role in thiamine biosynthesis. *J. Bacteriol.* **2011**, *193*, 4574–4575. [[CrossRef](#)]
89. Fujisawa, T.; Narikawa, R.; Maeda, S.I.; Watanabe, S.; Kanesaki, Y.; Kobayashi, K.; Nomata, J.; Hanaoka, M.; Watanabe, M.; Ehira, S.; et al. CyanoBase: A large-scale update on its 20th anniversary. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, D551–D554. [[CrossRef](#)]
90. 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](#)]
91. 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](#)]
92. 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](#)]
93. Forchhammer, K.; Selim, K.A. Carbon/nitrogen homeostasis control in cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **2019**, *44*, 33–53. [[CrossRef](#)]
94. Cotton, C.A.R.; Kabasakal, B.V.; Miah, N.A.; Murray, J.W. Structure of the dual-function fructose-1,6/sedoheptulose-1,7-bisphosphatase from *Thermosynechococcus elongatus* bound with sedoheptulose-7-phosphate. *Acta Crystallogr. Sect. Struct. Biol. Commun.* **2015**, *71*, 1341–1345. [[CrossRef](#)]
95. Mohamed, H.E.; Vermaas, W.F.J. S110254 (CrtLdiox) is a bifunctional lycopene cyclase/dioxygenase in cyanobacteria producing myxoxanthophyll. *J. Bacteriol.* **2006**, *188*, 3337–3344. [[CrossRef](#)]
96. Yeremenko, N.; Koufil, R.; Ihalainen, J.A.; D’Haene, S.; Van Oosterwijk, N.; Andrizhiyevskaya, E.G.; Keegstra, W.; Dekker, H.L.; Hagemann, M.; Boekema, E.J.; et al. Supramolecular organization and dual function of the IsiA chlorophyll-binding protein in cyanobacteria. *Biochemistry* **2004**, *43*, 10308–10313. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Burnat, M.; Picossi, S.; Valladares, A.; Herrero, A.; Flores, E. Catabolic pathway of arginine in *Anabaena* involves a novel bifunctional enzyme that produces proline from arginine. *Mol. Microbiol.* **2019**, *111*, 883–897. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Lee, H.; Khee, S. Structural and mutational analyses of the bifunctional arginine dihydrolase and ornithine cyclodeaminase AgrE from the cyanobacterium *Anabaena*. *J. Biol. Chem.* **2020**, *295*, 5751–5760. [[CrossRef](#)]
99. Phogosee, S.; Hibino, T.; Kageyama, H.; Waditee-Sirisattha, R. Bifunctional alanine dehydrogenase from the halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica*: Characterization and molecular properties. *Arch. Microbiol.* **2018**, *200*, 719–727. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
100. Martínez-Noël, G.M.A.; Cumino, A.C.; De Los Angeles Kolman, M.; Salerno, G.L. First evidence of sucrose biosynthesis by single cyanobacterial bimodular proteins. *FEBS Lett.* **2013**, *587*, 1669–1674. [[CrossRef](#)]
101. Jakopitsch, C.; Regelsberger, G.; Furtmüller, P.G.; Rümer, F.; Peschek, G.A.; Obinger, C. Catalase-peroxidase from *Synechocystis* is capable of chlorination and bromination reactions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *287*, 682–687. [[CrossRef](#)]
102. Jakopitsch, C.; Auer, M.; Ivancich, A.; Rümer, F.; Furtmüller, P.G.; Obinger, C. Total conversion of bifunctional catalase-peroxidase (KatG) to monofunctional peroxidase by exchange of a conserved distal side tyrosine. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 20185–20191. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Zhang, S.; Laborde, S.M.; Frankel, L.K.; Bricker, T.M. Four Novel Genes Required for Optimal Photoautotrophic Growth of the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 Identified by In Vitro Transposon Mutagenesis. *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 875–879. [[CrossRef](#)]
104. Terauchi, K.; Sobue, R.; Furutani, Y.; Aoki, R.; Fujita, Y. Isolation of cyanobacterial mutants exhibiting growth defects under microoxic conditions by transposon tagging mutagenesis of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **2017**, *63*, 131–138. [[CrossRef](#)]
105. Katayama, M.; Tsinoremas, N.F.; Kondo, T.; Golden, S.S. *cpmA*, a gene involved in an output pathway of the cyanobacterial circadian system. *J. Bacteriol.* **1999**, *181*, 3516–3524. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Miyagishima, S.Y.; Wolk, P.P.; Osteryoung, K.W. Identification of cyanobacterial cell division genes by comparative and mutational analyses. *Mol. Microbiol.* **2005**, *56*, 126–143. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Watabe, K.; Mimuro, M.; Tsuchiya, T. Development of a high-frequency in vivo transposon mutagenesis system for *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Plant Cell Physiol.* **2014**, *55*, 2017–2028. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Rubin, B.E.; Wetmore, K.M.; Price, M.N.; Diamond, S.; Shultzaberger, R.K.; Lowe, L.C.; Curtin, G.; Arkin, A.P.; Deutschbauer, A.; Golden, S.S. The essential gene set of a photosynthetic organism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*. [[CrossRef](#)]

109. Ozaki, H.; Ikeuchi, M.; Ogawa, T.; Fukuzawa, H.; Sonoike, K. Large-scale analysis of chlorophyll fluorescence kinetics in *Synechocystis* sp. PCC 6803: Identification of the factors involved in the modulation of photosystem stoichiometry. *Plant Cell Physiol.* **2007**, *48*, 451–458. [[CrossRef](#)]
110. Kato, K.; Tanaka, R.; Sano, S.; Tanaka, A.; Hosaka, H. Identification of a gene essential for protoporphyrinogen IX oxidase activity in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 16649–16654. [[CrossRef](#)]
111. Zhang, S.; Frankel, L.K.; Bricker, T.M. The SlI0606 protein is required for photosystem II assembly/stability in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 32047–32054. [[CrossRef](#)]
112. Shibata, M.; Ohkawa, H.; Kaneko, T.; Fukuzawa, H.; Tabata, S.; Kaplan, A.; Ogawa, T. Distinct constitutive and low-CO₂-induced CO₂ uptake systems in cyanobacteria: Genes involved and their phylogenetic relationship with homologous genes in other organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 11789–11794. [[CrossRef](#)]
113. Shibata, M.; Katoh, H.; Sonoda, M.; Ohkawa, H.; Shimoyama, M.; Fukuzawa, H.; Kaplan, A.; Ogawa, T. Genes essential to sodium-dependent bicarbonate transport in cyanobacteria: Function and phylogenetic analysis. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 18658–18664. [[CrossRef](#)]
114. Tyo, K.E.J.; Espinoza, F.A.; Stephanopoulos, G.; Jin, Y.S. Identification of gene disruptions for increased poly-3-hydroxybutyrate accumulation in *Synechocystis* PCC 6803. *Biotechnol. Prog.* **2009**, *25*, 1236–1243. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Battchikova, N.; Wei, L.; Du, L.; Bersanini, L.; Aro, E.M.; Ma, W. Identification of novel Ssl0352 protein (NdhS), essential for efficient operation of cyclic electron transport around photosystem I, in NADPH:plastoquinone oxidoreductase (NDH-1) complexes of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 36992–37001. [[CrossRef](#)]
116. Dai, H.; Zhang, L.; Zhang, J.; Mi, H.; Ogawa, T.; Ma, W. Identification of a cyanobacterial CRR6 protein, Slr1097, required for efficient assembly of NDH-1 complexes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant J.* **2013**, *75*, 858–866. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Zhang, J.; Gao, F.; Zhao, J.; Ogawa, T.; Wang, Q.; Ma, W.W. NdhP Is an exclusive subunit of large complex of NADPH dehydrogenase essential to stabilize the complex in *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 26669–26676. [[CrossRef](#)]
118. Zhao, J.; Rong, W.; Gao, F.; Ogawa, T.; Ma, W. Subunit Q is required to stabilize the large complex of NADPH dehydrogenase in *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *Plant Physiol.* **2015**, *168*, 443–451. [[CrossRef](#)]
119. Gao, F.; Zhao, J.; Wang, X.; Qin, S.; Wei, L.; Ma, W. NdhV is a subunit of NADPH dehydrogenase essential for cyclic electron transport in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Plant Physiol.* **2016**, *170*, 752–760. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
120. He, Z.; Xu, M.; Wu, Y.; Lv, J.; Fu, P.; Mi, H. NdhM subunit is required for the stability and the function of NAD(P)H dehydrogenase complexes involved in CO₂ uptake in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Biol. Chem.* **2016**, *60*, 1374–1385. [[CrossRef](#)]
121. Wang, X.; Gao, F.; Zhang, J.; Zhao, J.; Ogawa, T.; Ma, W. A cytoplasmic protein Ssl3829 is important for NDH-1 hydrophilic arm assembly in *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *Plant Physiol.* **2016**, *171*, 864–877. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Voshol, G.P.; Meyer, V.; van den Hondel, C.A.M.J.J. GTP-binding protein Era: A novel gene target for biofuel production. *BMC Biotechnol.* **2015**, *15*. [[CrossRef](#)]
123. Cassier-Chauvat, C.; Chauvat, F. Function and Regulation of Ferredoxins in the Cyanobacterium, *Synechocystis* PCC6803: Recent Advances. *Life* **2014**, *4*, 666–680. [[CrossRef](#)]
124. Lelong, C.; Boekema, E.J.; Kruij, J.; Bottin, H.; Rögner, M.; Sétif, P. Characterization of a redox active cross-linked complex between cyanobacterial photosystem I and soluble ferredoxin. *EMBO J.* **1996**, *15*, 2160–2168. [[CrossRef](#)]
125. Poncelet, M.; Cassier-Chauvat, C.; Leschelle, X.; Bottin, H.; Chauvat, F. Targeted deletion and mutational analysis of the essential (2Fe-2S) plant-like ferredoxin in *Synechocystis* PCC6803 by plasmid shuffling. *Mol. Microbiol.* **1998**, *28*, 813–821. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. Mazouni, K.; Domain, F.; Chauvat, F.; Cassier-Chauvat, C. Expression and regulation of the crucial plant-like ferredoxin of cyanobacteria. *Mol. Microbiol.* **2003**, *49*, 1019–1029. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
127. Schorsch, M.; Kramer, M.; Goss, T.; Eisenhut, M.; Robinson, N.; Osman, D.; Wilde, A.; Sadaf, S.; Brückler, H.; Walder, L.; et al. A unique ferredoxin acts as a player in the low-iron response of photosynthetic organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, 12111–12120. [[CrossRef](#)]
128. Mustila, H.; Allahverdiyeva, Y.; Isojärvi, J.; Aro, E.M.; Eisenhut, M. The bacterial-type [4Fe-4S] ferredoxin 7 has a regulatory function under photooxidative stress conditions in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2014**, *1837*, 1293–1304. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
129. Hanke, G.T.; Satomi, Y.; Shinmura, K.; Takao, T.; Hase, T. A screen for potential ferredoxin electron transfer partners uncovers new, redox dependent interactions. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.* **2011**, *1814*, 366–374. [[CrossRef](#)]
130. Angeleri, M.; Zorina, A.; Aro, E.M.; Battchikova, N. Interplay of SpkG kinase and the Slr0151 protein in the phosphorylation of ferredoxin 5 in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *FEBS Lett.* **2018**, *592*, 411–421. [[CrossRef](#)]
131. Mondal, S.; Kumar, V.; Singh, S.P. Phylogenetic distribution and structural analyses of cyanobacterial glutaredoxins (Grxs). *Comput. Biol. Chem.* **2020**, *84*. [[CrossRef](#)]
132. Zaffagnini, M.; Bedhomme, M.; Marchand, C.H.; Morisse, S.; Trost, P.; Lemaire, S.D. Redox regulation in photosynthetic organisms: Focus on glutathionylation. *Antioxid. Redox Signal.* **2012**, *16*, 567–586. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
133. Sánchez-Riego, A.M.; López-Maury, L.; Florencio, F.J. Glutaredoxins are essential for stress adaptation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Front. Plant Sci.* **2013**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

134. López-Maury, L.; Sánchez-Riego, A.M.; Reyes, J.C.; Florencio, F.J. The glutathione/glutaredoxin system is essential for arsenate reduction in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* **2009**, *191*, 3534–3543. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
135. Kim, S.G.; Chung, J.S.; Sutton, R.B.; Lee, J.S.; López-Maury, L.; Lee, S.Y.; Florencio, F.J.; Lin, T.; Zabet-Moghaddam, M.; Wood, M.J.; et al. Redox, mutagenic and structural studies of the glutaredoxin/arsenate reductase couple from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.* **2012**, *1824*, 392–403. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
136. Iwema, T.; Picciocchi, A.; Traore, D.A.K.; Ferrer, J.L.; Chauvat, F.; Jacquamet, L. Structural basis for delivery of the intact [Fe2S2] cluster by monothiol glutaredoxin. *Biochemistry* **2009**, *48*, 6041–6043. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
137. Deponte, M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2013**, *1830*, 3217–3266. [[CrossRef](#)]
138. Nianiou-Obeidat, I.; Madesis, P.; Kissoudis, C.; Voulgari, G.; Chronopoulou, E.; Tsaftaris, A.; Labrou, N.E. Plant glutathione transferase-mediated stress tolerance: Functions and biotechnological applications. *Plant Cell Rep.* **2017**, *36*, 791–805. [[CrossRef](#)]
139. Oakley, A. Glutathione transferases: A structural perspective. *Drug Metab. Rev.* **2011**, *43*, 138–151. [[CrossRef](#)]
140. Wiktelius, E.; Stenberg, G. Novel class of glutathione transferases from cyanobacteria exhibit high catalytic activities towards naturally occurring isothiocyanates. *Biochem. J.* **2007**, *406*, 115–123. [[CrossRef](#)]
141. Naciyar, M.S.; Karthick, L.; Prakasam, P.A.; Deviram, G.; Uma, L.; Prabakaran, D.; Saha, S.K. Diversity of glutathione S-transferases (GSTs) in cyanobacteria with reference to their structures, substrate recognition and catalytic functions. *Microorganisms* **2020**, *8*, 712. [[CrossRef](#)]
142. Pandey, T.; Chhetri, G.; Chinta, R.; Kumar, B.; Singh, D.B.; Tripathi, T.; Singh, A.K. Functional classification and biochemical characterization of a novel rho class glutathione S-transferase in *Synechocystis* PCC 6803. *FEBS Open Bio* **2015**, *5*, 1–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
143. Pandey, T.; Singh, S.K.; Chhetri, G.; Tripathi, T.; Singh, A.K. Characterization of a highly pH stable Chi-class glutathione S-transferase from *Synechocystis* PCC 6803. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0126811. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
144. Pandey, T.; Shukla, R.; Shukla, H.; Sonkar, A.; Tripathi, T.; Singh, A.K. A combined biochemical and computational studies of the rho-class glutathione s-transferase sll1545 of *Synechocystis* PCC 6803. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *94*, 378–385. [[CrossRef](#)]
145. Kammerscheit, X.; Hecker, A.; Rouhier, N.; Chauvat, F.; Cassier-Chauvat, C. Methylglyoxal Detoxification Revisited: Role of Glutathione Transferase in Model Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *MBio* **2020**, *11*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
146. Stanier, R.Y.; Kunisawa, R.; Mandel, M.; Cohen-Bazire, G. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriol. Rev.* **1971**, *35*, 171–205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
147. 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](#)]
148. Niu, T.C.; Lin, G.M.; Xie, L.R.; Wang, Z.Q.; Xing, W.Y.; Zhang, J.Y.; Zhang, C.C. Expanding the Potential of CRISPR-Cpf1-Based Genome Editing Technology in the Cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. *ACS Synth. Biol.* **2019**, *8*, 170–180. [[CrossRef](#)]
149. Yu, J.; Liberton, M.; Clifton, P.F.; Head, R.D.; Jacobs, J.M.; Smith, R.D.; Koppenaal, D.W.; Brand, J.J.; Pakrasi, H.B. *Synechococcus elongatus* UTEX 2973, a fast growing cyanobacterial chassis for biosynthesis using light and CO₂. *Sci. Rep.* **2015**, *5*. [[CrossRef](#)]
150. Jaiswal, D.; Sengupta, A.; Sohoni, S.; Sengupta, S.; Phadnavis, A.G.; Pakrasi, H.B.; Wangikar, P.P. Genome Features and Biochemical Characteristics of a Robust, Fast Growing and Naturally Transformable Cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 11801 Isolated from India. *Sci. Rep.* **2018**, *8*. [[CrossRef](#)]
151. Jaiswal, D.; Sengupta, A.; Sengupta, S.; Madhu, S.; Pakrasi, H.B.; Wangikar, P.P. A Novel Cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 11802 has Distinct Genomic and Metabolomic Characteristics Compared to its Neighbor PCC 11801. *Sci. Rep.* **2020**, *10*. [[CrossRef](#)]
152. Włodarczyk, A.; Selão, T.T.; Norling, B.; Nixon, P.J. Newly discovered *Synechococcus* sp. PCC 11901 is a robust cyanobacterial strain for high biomass production. *Commun. Biol.* **2020**, *3*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
153. Tan, X.; Hou, S.; Song, K.; Georg, J.; Klähn, S.; Lu, X.; Hess, W.R. The primary transcriptome of the fast-growing cyanobacterium *Synechococcus elongatus* UTEX 2973. *Biotechnol. Biofuels* **2018**, *11*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
154. Lou, W.; Tan, X.; Song, K.; Zhang, S.; Luan, G.; Li, C.; Lu, X. A specific single nucleotide polymorphism in the ATP synthase gene significantly improves environmental stress tolerance of *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Appl. Environ. Microbiol.* **2018**, *84*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
155. Bachin, D.; Nazarenko, L.V.; Mironov, K.S.; Pisareva, T.; Allakhverdiev, S.I.; Los, D.A. Mechanosensitive ion channel Mscl controls ionic fluxes during cold and heat stress in *Synechocystis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **2015**, *362*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
156. Li, S.; Sun, T.; Xu, C.; Chen, L.; Zhang, W. Development and optimization of genetic toolboxes for a fast-growing cyanobacterium *Synechococcus elongatus* UTEX 2973. *Metab. Eng.* **2018**, *48*, 163–174. [[CrossRef](#)]
157. Ungerer, J.; Wendt, K.E.; Hendry, J.L.; Maranas, C.D.; Pakrasi, H.B. Comparative genomics reveals the molecular determinants of rapid growth of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* UTEX 2973. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
158. Zhang, M.; Qiao, C.; Luan, G.; Luo, Q.; Lu, X. Systematic Identification of Target Genes for Cellular Morphology Engineering in *Synechococcus elongatus* PCC7942. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*. [[CrossRef](#)]
159. Golden, S.S. Principles of rhythmicity emerging from cyanobacteria. *Eur. J. Neurosci.* **2020**, *51*, 13–18. [[CrossRef](#)]
160. MacCready, J.S.; Basalla, J.L.; Vecchiarelli, A.G. Origin and Evolution of Carboxysome Positioning Systems in Cyanobacteria. *Mol. Biol. Evol.* **2020**. [[CrossRef](#)]

161. Labarre, J.; Chauvat, F.; Thuriaux, P. Insertional mutagenesis by random cloning of antibiotic resistance genes into the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* **1989**, *171*, 3449–3457. [[CrossRef](#)]
162. Zerulla, K.; Ludt, K.; Soppa, J. The ploidy level of *Synechocystis* sp. PCC 6803 is highly variable and is influenced by growth phase and by chemical and physical external parameters. *Microbiology (UK)* **2016**, *162*, 730–739. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
163. Chauvat, F.; De Vries, L.; Van der Ende, A.; Van Arkel, G.A. A host-vector system for gene cloning in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *MGG Mol. Gen. Genet.* **1986**, *204*, 185–191. [[CrossRef](#)]
164. Yang, X.; McFadden, B.A. 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.* **1993**, *175*, 3981–3991. [[CrossRef](#)]
165. Yang, X.; McFadden, B.A. The complete DNA sequence and replication analysis of the plasmid pCB2.4 from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Plasmid* **1994**, *31*, 131–137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
166. Xu, W.; McFadden, B.A. Sequence analysis of plasmid pCC5.2 from cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803 that replicates by a rolling circle mechanism. *Plasmid* **1997**, *37*, 95–104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
167. Kaneko, T.; Nakamura, Y.; Sasamoto, S.; Watanabe, A.; Kohara, M.; Matsumoto, M.; Shimpo, S.; Yamada, M.; Tabata, S. Structural analysis of four large plasmids harboring in a unicellular cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803. *DNA Res.* **2003**, *10*, 221–228. [[CrossRef](#)]
168. Berla, B.M.; Pakrasi, H.B. Upregulation of plasmid genes during stationary phase in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803, a cyanobacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *18*. [[CrossRef](#)]
169. Castets, A.M.; Houmard, J.; Tandeau de Marsac, N. Is cell motility a plasmid-encoded function in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803? *FEMS Microbiol. Lett.* **1986**, *37*, 277–281. [[CrossRef](#)]
170. Kopfmann, S.; Hess, W.R. Toxin-antitoxin systems on the large defense plasmid pSYSA of *Synechocystis* sp. pCC 6803. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 7399–7409. [[CrossRef](#)]
171. Kopfmann, S.; Roesch, S.K.; Hess, W.R. Type II toxin-antitoxin systems in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Toxins* **2016**, *8*, 228. [[CrossRef](#)]
172. Paynter, J.J.; Andres-Enguix, I.; Fowler, P.W.; Tottey, S.; Cheng, W.; Enkvetchakul, D.; Bavro, V.N.; Kusakabe, Y.; Sansom, M.S.P.; Robinson, N.J.; et al. Functional complementation and genetic deletion studies of KirBac channels: Activatory mutations highlight gating-sensitive domains. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 40754–40761. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
173. Giner-Lamia, J.; López-Maury, L.; Reyes, J.C.; Florencio, F.J. The CopRS two-component system is responsible for resistance to copper in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiol.* **2012**, *159*, 1806–1818. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
174. De Alvarenga, L.V.; Hess, W.R.; Hagemann, M. AcnSP—A Novel Small Protein Regulator of Aconitase Activity in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
175. Bird, A.J.; Turner-Cavet, J.S.; Lakey, J.H.; Robinson, N.J. A carboxyl-terminal Cys2/His2-type zinc-finger motif in DNA primase influences DNA content in *Synechococcus* PCC 7942. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 21246–21252. [[CrossRef](#)]
176. Griese, M.; Lange, C.; Soppa, J. Ploidy in cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **2011**, *323*, 124–131. [[CrossRef](#)]
177. Watanabe, S.; Ohbayashi, R.; Kanesaki, Y.; Saito, N.; Chibazakura, T.; Soga, T.; Yoshikawa, H. Intensive DNA replication and metabolism during the lag phase in Cyanobacteria. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0136800. [[CrossRef](#)]
178. Van Den Hondel, C.A.M.J.J.; Verbeek, S.; van Der Ende, A.; Weisbeek, P.J.; Borrias, W.E.; van Arkel, G.A. Introduction of transposon Tn901 into a plasmid of *Anacystis nidulans*: Preparation for cloning in cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, *77*, 1570–1574. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
179. Chen, Y.; Kay Holtman, C.; Magnuson, R.D.; Youderian, P.A.; Golden, S.S. The complete sequence and functional analysis of pANL, the large plasmid of the unicellular freshwater cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Plasmid* **2008**, *59*, 176–192. [[CrossRef](#)]
180. Roberts, T.M.; Koths, K.E. The blue-green alga *Agmenellum quadruplicatum* contains covalently closed DNA circles. *Cell* **1976**, *9*, 551–557. [[CrossRef](#)]
181. Akiyama, H.; Kanai, S.; Hirano, M.; Miyasaka, H. Nucleotide sequence of plasmid pAQ1 of marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7002. *DNA Res.* **1998**, *5*, 127–129. [[CrossRef](#)]
182. Kuhlemeier, C.J.; Borrias, W.E.; van den Hondel, C.A.M.J.J.; van Arkel, G.A. Vectors for cloning in cyanobacteria: Construction and characterization of two recombinant plasmids capable of transformation to *Escherichia coli* K12 and *Anacystis nidulans* R2. *MGG Mol. Gen. Genet.* **1981**, *184*, 249–254. [[CrossRef](#)]
183. Chauvat, F.; Astier, C.; Vedel, F.; Joset-Espardellier, F. Transformation in the cyanobacterium *Synechococcus* R2: Improvement of efficiency; Role of the pUH24 plasmid. *MGG Mol. Gen. Genet.* **1983**, *191*, 39–45. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
184. Kaneko, T.; Nakamura, Y.; Wolk, C.P.; Kuritz, T.; Sasamoto, S.; Watanabe, A.; Iriguchi, M.; Ishikawa, A.; Kawashima, K.; Kimura, T.; et al. Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *DNA Res.* **2001**, *8*, 205–213. [[CrossRef](#)]
185. Ludwig, M.; Bryant, D.A. Acclimation of the global transcriptome of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002 to nutrient limitations and different nitrogen sources. *Front. Microbiol.* **2012**, *11*. [[CrossRef](#)]
186. Labarre, J.; Thuriaux, P.; Chauvat, F. Genetic analysis of amino acid transport in the facultatively heterotrophic cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain 6803. *J. Bacteriol.* **1987**, *169*, 4668–4673. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
187. Pérez, A.A.; Liu, Z.; Rodionov, D.A.; Li, Z.; Bryant, D.A. Complementation of cobalamin auxotrophy in *Synechococcus* sp. strain PCC 7002 and validation of a putative cobalamin riboswitch in vivo. *J. Bacteriol.* **2016**, *198*, 2743–2752. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

188. Sakamoto, T.; Delgaizo, V.B.; Bryant, D.A. Growth on urea can trigger death and peroxidation of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64*, 2361–2366. [[CrossRef](#)]
189. Valladares, A.; Montesinos, M.L.; Herrero, A.; Flores, E. An ABC-type, high-affinity urea permease identified in cyanobacteria. *Mol. Microbiol.* **2002**, *43*, 703–715. [[CrossRef](#)]
190. Veaudor, T.; Cassier-Chauvat, C.; Chauvat, F. Genomics of Urea Transport and Catabolism in Cyanobacteria: Biotechnological Implications. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*. [[CrossRef](#)]
191. Kirsch, F.; Klähn, S.; Hagemann, M. Salt-Regulated Accumulation of the Compatible Solutes Sucrose and Glucosylglycerol in Cyanobacteria and Its Biotechnological Potential. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*. [[CrossRef](#)]
192. Årstøl, E.; Hohmann-Marriott, M.F. Cyanobacterial siderophores—physiology, structure, biosynthesis, and applications. *Mar. Drugs* **2019**, *17*, 281. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
193. Onizuka, T.; Endo, S.; Akiyama, H.; Kanai, S.; Hirano, M.; Yokota, A.; Tanaka, S.; Miyasaka, H. The *rbcX* gene product promotes the production and assembly of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase of *Synechococcus* sp. PCC7002 in *Escherichia coli*. *Plant Cell Physiol.* **2004**, *45*, 1390–1395. [[CrossRef](#)]
194. Emlyn-Jones, D.; Woodger, F.J.; Price, G.D.; Whitney, S.M. RbcX can function as a Rubisco chaperonin, but is non-essential in *Synechococcus* PCC7942. *Plant Cell Physiol.* **2006**, *47*, 1630–1640. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
195. 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](#)]
196. Helman, Y.; Tchernov, D.; Reinhold, L.; Shibata, M.; Ogawa, T.; Schwarz, R.; Ohad, I.; Kaplan, A. Genes encoding A-type flavoproteins are essential for photoreduction of O₂ in cyanobacteria. *Curr. Biol.* **2003**, *13*, 230–235. [[CrossRef](#)]
197. Vicente, J.B.; Gomes, C.M.; Wasserfallen, A.; Teixeira, M. Module fusion in an A-type flavoprotein from the cyanobacterium *Synechocystis* condenses a multiple-component pathway in a single polypeptide chain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *294*, 82–87. [[CrossRef](#)]
198. Allahverdiyeva, Y.; Mustila, H.; Ermakova, M.; Bersanini, L.; Richaud, P.; Ajlani, G.; Battchikova, N.; Cournac, L.; Aro, E.M. Flavodiiron proteins Flv1 and Flv3 enable cyanobacterial growth and photosynthesis under fluctuating light. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 4111–4116. [[CrossRef](#)]
199. Zhang, P.; Allahverdiyeva, Y.; Eisenhut, M.; Aro, E.M. Flavodiiron proteins in oxygenic photosynthetic organisms: Photoprotection of photosystem II by Flv2 and Flv4 in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e5331. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
200. Shimakawa, G.; Shaku, K.; Nishi, A.; Hayashi, R.; Yamamoto, H.; Sakamoto, K.; Makino, A.; Miyake, C. FLAVODIIRON2 and FLAVODIIRON4 proteins mediate an oxygen-dependent alternative electron flow in *Synechocystis* sp. pcc 6803 under CO₂-limited conditions. *Plant Physiol.* **2015**, *167*, 472–480. [[CrossRef](#)]
201. Fujisawa, T.; Okamoto, S.; Katayama, T.; Nakao, M.; Yoshimura, H.; Kajiya-Kanegae, H.; Yamamoto, S.; Yano, C.; Yanaka, Y.; Maita, H.; et al. CyanoBase and RhizoBase: Databases of manually curated annotations for cyanobacterial and rhizobial genomes. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*. [[CrossRef](#)]
202. 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*, e55564. [[CrossRef](#)]
203. 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](#)] [[PubMed](#)]
204. Naveed, S.; Yu, Q.; Zhang, C.; Ge, Y. Extracellular polymeric substances alter cell surface properties, toxicity, and accumulation of arsenic in *Synechocystis* PCC6803. *Environ. Pollut.* **2020**, *261*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
205. Yu, R.; Chai, H.; Yu, Z.; Wu, X.; Liu, Y.; Shen, L.; Li, J.; Ye, J.; Liu, D.; Ma, T.; et al. Behavior and mechanism of cesium biosorption from aqueous solution by living *Synechococcus* PCC7002. *Microorganisms* **2020**, *8*, 491. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
206. Schatz, D.; Nagar, E.; Sendersky, E.; Parnasa, R.; Zilberman, S.; Carmeli, S.; Mastai, Y.; Shimoni, E.; Klein, E.; Yeger, O.; et al. Self-suppression of biofilm formation in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. *Environ. Microbiol.* **2013**, *15*, 1786–1794. [[CrossRef](#)]
207. Muzzopappa, F.; Kirilovsky, D. Changing Color for Photoprotection: The Orange Carotenoid Protein. *Trends Plant Sci.* **2020**, *25*, 92–104. [[CrossRef](#)]
208. Kämäräinen, J.; Knoop, H.; Stanford, N.J.; Guerrero, F.; Akhtar, M.K.; Aro, E.M.; Steuer, R.; Jones, P.R. Physiological tolerance and stoichiometric potential of cyanobacteria for hydrocarbon fuel production. *J. Biotechnol.* **2012**, *162*, 67–74. [[CrossRef](#)]
209. Gupta, A.; Bhagwat, S.G.; Sainis, J.K. *Synechococcus elongatus* PCC 7942 is more tolerant to chromate as compared to *Synechocystis* sp. PCC 6803. *BioMetals* **2013**, *26*, 309–319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
210. Gupta, A.; Ballal, A. Unraveling the mechanism responsible for the contrasting tolerance of *Synechocystis* and *Synechococcus* to Cr(VI): Enzymatic and non-enzymatic antioxidants. *Aquat. Toxicol.* **2015**, *164*, 118–125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
211. Kämäräinen, J.; Nylund, M.; Aro, E.M.; Kallio, P. Comparison of ethanol tolerance between potential cyanobacterial production hosts. *J. Biotechnol.* **2018**, *283*, 140–145. [[CrossRef](#)]
212. Ikeuchi, M.; Tabata, S. *Synechocystis* sp. PCC 6803—A useful tool in the study of the genetics of cyanobacteria. *Photosynth. Res.* **2001**, *70*, 73–83. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

213. Tajima, N.; Sato, S.; Maruyama, F.; Kaneko, T.; Sasaki, N.V.; Kurokawa, K.; Ohta, H.; Kanesaki, Y.; Yoshikawa, H.; Tabata, S.; et al. Genomic structure of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 strain GT-S. *DNA Res.* **2011**, *18*, 393–399. [[CrossRef](#)]
214. Morris, J.N.; Crawford, T.S.; Jeffs, A.; Stockwell, P.A.; Eaton-Rye, J.J.; Summerfield, T.C. Whole genome re-sequencing of two “wild-type” strains of the model cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *N. Z. J. Bot.* **2014**, *52*, 36–47. [[CrossRef](#)]
215. Trautmann, D.; Voß, B.; Wilde, A.; Al-Babili, S.; Hess, W.R. Microevolution in cyanobacteria: Re-sequencing a motile substrain of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *DNA Res.* **2012**, *19*, 435–448. [[CrossRef](#)]
216. Kanesaki, Y.; Shiwa, Y.; Tajima, N.; Suzuki, M.; Watanabe, S.; Sato, N.; Ikeuchi, M.; Yoshikawa, H. Identification of substrain-specific mutations by massively parallel whole-genome resequencing of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *DNA Res.* **2012**, *19*, 67–79. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
217. Tichý, M.; Bečková, M.; Kopečná, J.; Noda, J.; Sobotka, R.; Komenda, J. Strain of *Synechocystis* PCC 6803 with aberrant assembly of photosystem II contains tandem duplication of a large chromosomal region. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*. [[CrossRef](#)]
218. Ding, Q.; Chen, G.; Wang, Y.; Wei, D. Identification of specific variations in a non-motile strain of cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 originated from ATCC 27184 by whole genome resequencing. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 24081–24093. [[CrossRef](#)]
219. Morris, J.N.; Eaton-Rye, J.J.; Summerfield, T.C. Phenotypic variation in wild-type substrains of the model cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *N. Z. J. Bot.* **2017**, *12*, 25–35. [[CrossRef](#)]
220. Williams, J.G.K. Construction of Specific Mutations in Photosystem II Photosynthetic Reaction Center by Genetic Engineering Methods in *Synechocystis* 6803. *Methods Enzymol.* **1988**, *167*, 766–778. [[CrossRef](#)]
221. Zavřel, T.; Očenášová, P.; Červený, J. Phenotypic characterization of *Synechocystis* sp. PCC 6803 substrains reveals differences in sensitivity to abiotic stress. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0189130. [[CrossRef](#)]
222. Shestakov, S.V.; Khyen, N.T. Evidence for genetic transformation in blue-green alga *Anacystis nidulans*. *MGG Mol. Gen. Genet.* **1970**, *107*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
223. Stevens, S.E.; Porter, R.D. Transformation in *Agmenellum quadruplicatum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, *77*, 6052–6056. [[CrossRef](#)]
224. Lambert, D.H.; Stevens, S.E. Photoheterotrophic growth of *Agmenellum quadruplicatum* PR-6. *J. Bacteriol.* **1986**, *165*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
225. Grigorjeva, G.; Shestakov, S. Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. 6803. *FEMS Microbiol. Lett.* **1982**, *13*, 367–370. [[CrossRef](#)]
226. Orkwiszewski, K.G.; Kaney, A.R. Genetic transformation of the blue-green bacterium, *Anacystis nidulans*. *Arch. Microbiol.* **1974**, *98*, 31–37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
227. Kufryk, G.I.; Sachet, M.; Schmetterer, G.; Vermaas, W.F.J. Transformation of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 as a tool for genetic mapping: Optimization of efficiency. *FEMS Microbiol. Lett.* **2002**, *206*, 215–219. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
228. Wendt, K.E.; Pakrasi, H.B. Genomics approaches to deciphering natural transformation in cyanobacteria. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
229. Taton, A.; Erikson, C.; Yang, Y.; Rubin, B.E.; Rifkin, S.A.; Golden, J.W.; Golden, S.S. The circadian clock and darkness control natural competence in cyanobacteria. *Nat. Commun.* **2020**, *11*. [[CrossRef](#)]
230. Essich, E.; Stevens, E.; Porter, R.D. Chromosomal transformation in the cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum*. *J. Bacteriol.* **1990**, *172*, 1916–1922. [[CrossRef](#)]
231. Williams, J.G.K.; Szalay, A.A. Stable integration of foreign DNA into the chromosome of the cyanobacterium *Synechococcus* R2. *Gene* **1983**, *24*, 37–51. [[CrossRef](#)]
232. Buzby, J.S.; Porter, R.D.; Stevens, S.E. Expression of the *Escherichia coli* lacZ gene on a plasmid vector in a cyanobacterium. *Science* **1985**, *230*, 805–807. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
233. Debus, R.J.; Barry, B.A.; Babcock, G.T.; McIntosh, L. Site-directed mutagenesis identifies a tyrosine radical involved in the photosynthetic oxygen-evolving system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*. [[CrossRef](#)]
234. De Vos, W.M.; Venema, G.; Canosi, U.; Trautner, T.A. Plasmid transformation in *Bacillus subtilis*: Fate of plasmid DNA. *MGG Mol. Gen. Genet.* **1981**, *181*, 424–433. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
235. Jansson, C.; Debus, R.J.; Osiewacz, H.D.; Gurevitz, M.; McIntosh, L. Construction of an Obligate Photoheterotrophic Mutant of the Cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Plant Physiol.* **1987**, *85*, 1021–1025. [[CrossRef](#)]
236. Pakrasi, H.B.; Williams, J.G.; Arntzen, C.J. 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.* **1988**, *7*, 325–332. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
237. Vermaas, W.F.J.; Ikeuchi, M.; Inoue, Y. Protein composition of the photosystem II core complex in genetically engineered mutants of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photosynth. Res.* **1988**, *17*, 97–113. [[CrossRef](#)]
238. Chitnis, P.R.; Reilly, P.A.; Miedel, M.C.; Nelson, N. Structure and targeted mutagenesis of the gene encoding 8-kDa subunit of photosystem I from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 18374–18380. [[CrossRef](#)]
239. Chauvat, F.; Rouet, P.; Bottin, H.; Boussac, A. Mutagenesis by random cloning of an *Escherichia coli* kanamycin resistance gene into the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803: Selection of mutants defective in photosynthesis. *MGG Mol. Gen. Genet.* **1989**, *216*, 51–59. [[CrossRef](#)]
240. Muller, E.G.; Buchanan, B.B. Thioredoxin is essential for photosynthetic growth. The thioredoxin m gene of *Anacystis nidulans*. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 4008–4014. [[CrossRef](#)]
241. Golden, S.S.; Brusslan, J.; Haselkorn, R. Expression of a family of psbA genes encoding a photosystem II polypeptide in the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. *EMBO J.* **1986**, *5*, 2789–2798. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

242. Golden, S.S.; Cho, D.S.; Nalty, M.S. Two functional psbD genes in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J. Bacteriol.* **1989**, *171*, 4707–4713. [[CrossRef](#)]
243. Omata, T.; Carlson, T.J.; Ogawa, T.; Pierce, J. Sequencing and modification of the gene encoding the 42-kilodalton protein in the cytoplasmic membrane of *Synechococcus* PCC 7942. *Plant Physiol.* **1990**, *93*, 305–312. [[CrossRef](#)]
244. Laudenbach, D.E.; Herbert, S.K.; McDowell, C.; Fork, D.C.; Grossman, A.R.; Straus, N.A. Cytochrome c-553 is not required for photosynthetic activity in the cyanobacterium *Synechococcus*. *Plant Cell* **1990**, *2*, 913–924. [[CrossRef](#)]
245. Bustos, S.A.; Golden, S.S. Light-regulated expression of the psbD gene family in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942: Evidence for the role of duplicated psbD genes in cyanobacteria. *MGG Mol. Gen. Genet.* **1992**. [[CrossRef](#)]
246. Swanson, R.V.; Zhou, J.; Leary, J.A.; Williams, T.; De Lorimier, R.; Bryant, D.A.; Glazer, A.N. Characterization of phycocyanin produced by cpcE and cpcF mutants and identification of an intergenic suppressor of the defect in bilin attachment. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 16146–16154. [[CrossRef](#)]
247. Zhou, J.; Gasparich, G.E.; Stirewalt, V.L.; De Lorimier, R.; Bryant, D.A. The cpcE and cpcF genes of *Synechococcus* sp. PCC 7002. Construction and phenotypic characterization of interposon mutants. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 16138–16145. [[CrossRef](#)]
248. Schirmacher, A.M.; Hanamghar, S.S. Function and Benefits of Natural Competence in Cyanobacteria: From Ecology to Targeted Manipulation. *Life* **2020**, *10*, 249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
249. Armshaw, P.; Carey, D.; Sheahan, C.; Pembroke, J.T. Utilising the native plasmid, pCA2.4, from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803 as a cloning site for enhanced product production. *Biotechnol. Biofuels* **2015**, *8*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
250. Kopf, M.; Hess, W.R. Regulatory RNAs in photosynthetic cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **2015**, *39*, 301–315. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
251. Ng, A.H.; Berla, B.M.; Pakrasi, H.B. Fine-tuning of photoautotrophic protein production by combining promoters and neutral sites in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, *81*, 6857–6863. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
252. Pinto, F.; Pacheco, C.C.; Oliveira, P.; Montagud, A.; Landels, A.; Couto, N.; Wright, P.C.; Urchueguía, J.F.; Tamagnini, P. Improving a *Synechocystis*-based photoautotrophic chassis through systematic genome mapping and validation of neutral sites. *DNA Res.* **2015**, *22*, 425–437. [[CrossRef](#)]
253. Andersson, C.R.; Tsinoremas, N.F.; Shelton, J.; Lebedeva, N.V.; Yarrow, J.; Min, H.; Golden, S.S. Application of bioluminescence to the study of circadian rhythms in cyanobacteria. *Methods Enzymol.* **2000**, *305*. [[CrossRef](#)]
254. Niederholtmeyer, H.; Wolfstädter, B.T.; Savage, D.F.; Silver, P.A.; Way, J.C. Engineering cyanobacteria to synthesize and export hydrophilic products. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 3462–3466. [[CrossRef](#)]
255. Taton, A.; Unglaub, F.; Wright, N.E.; Zeng, W.Y.; Paz-Yepes, J.; Brahmasha, B.; Palenik, B.; Peterson, T.C.; Haerizadeh, F.; Golden, S.S.; et al. Broad-host-range vector system for synthetic biology and biotechnology in cyanobacteria. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*. [[CrossRef](#)]
256. Xu, Y.; Alvey, R.M.; Byrne, P.O.; Graham, J.E.; Shen, G.; Bryant, D.A. Expression of genes in cyanobacteria: Adaptation of endogenous plasmids as platforms for high-level gene expression in *Synechococcus* sp. PCC 7002. *Methods Mol. Biol.* **2011**. [[CrossRef](#)]
257. Ruffing, A.M.; Jensen, T.J.; Strickland, L.M. Genetic tools for advancement of *Synechococcus* sp. PCC 7002 as a cyanobacterial chassis. *Microb. Cell Fact.* **2016**, *15*. [[CrossRef](#)]
258. Nozzi, N.E.; Case, A.E.; Carroll, A.L.; Atsumi, S. Systematic Approaches to Efficiently Produce 2,3-Butanediol in a Marine Cyanobacterium. *ACS Synth. Biol.* **2017**, *6*, 2136–2144. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
259. Mohamed, A.; Jansson, C. Influence of light on accumulation of photosynthesis-specific transcripts in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Plant Mol. Biol.* **1989**, *13*, 693–700. [[CrossRef](#)]
260. Mohamed, A.; Eriksson, J.; Osiewacz, H.D.; Jansson, C. Differential expression of the psbA genes in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *MGG Mol. Gen. Genet.* **1993**, *238*, 161–168. [[CrossRef](#)]
261. Albers, S.C.; Gallegos, V.A.; Peebles, C.A.M. Engineering of genetic control tools in *Synechocystis* sp. PCC 6803 using rational design techniques. *J. Biotechnol.* **2015**, *216*, 36–46. [[CrossRef](#)]
262. Lin, P.-C.; Saha, R.; Zhang, F.; Pakrasi, H.B. Metabolic engineering of the pentose phosphate pathway for enhanced limonene production in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Sci. Rep.* **2017**, *7*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
263. Jin, H.; Wang, Y.; Idoine, A.; Bhaya, D. Construction of a shuttle vector using an endogenous plasmid from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
264. Liu, D.; Pakrasi, H.B. Exploring native genetic elements as plug-in tools for synthetic biology in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Microb. Cell Fact.* **2018**, *17*. [[CrossRef](#)]
265. Kamennaya, N.A.; Post, A.F. Characterization of cyanate metabolism in marine *Synechococcus* and *Prochlorococcus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *29*, 76–85. [[CrossRef](#)]
266. Kamennaya, N.A.; Ahn, S.E.; Park, H.; Bartal, R.; Sasaki, K.A.; Holman, H.Y.; Jansson, C. Installing extra bicarbonate transporters in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 enhances biomass production. *Metab. Eng.* **2015**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
267. Varman, A.M.; Xiao, Y.; Pakrasi, H.B.; Tang, Y.J. Metabolic engineering of *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 for isobutanol production. *Appl. Environ. Microbiol.* **2013**, *79*, 908–914. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
268. Lagarde, D.; Beuf, L.; Vermaas, W. Increased production of zeaxanthin and other pigments by application of genetic engineering techniques to *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 64–72. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

269. Horiuchi, M.; Nakamura, K.; Kojima, K.; Nishiyama, Y.; Hatakeyama, W.; Hisabori, T.; Hihara, Y. The PedR transcriptional regulator interacts with thioredoxin to connect photosynthesis with gene expression in cyanobacteria. *Biochem. J.* **2010**, *431*, 135–140. [CrossRef]
270. Reinsvold, R.E.; Jinkerson, R.E.; Radakovits, R.; Posewitz, M.C.; Basu, C. The production of the sesquiterpene β -caryophyllene in a transgenic strain of the cyanobacterium *Synechocystis*. *J. Plant Physiol.* **2011**, *168*, 848–852. [CrossRef]
271. Nagarajan, A.; Winter, R.; Eaton-Rye, J.; Burnap, R. 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 Biol.* **2011**, *104*, 212–219. [CrossRef]
272. Khetkorn, W.; Incharoensakdi, A.; Lindblad, P.; Jantaro, S. Enhancement of poly-3-hydroxybutyrate production in *Synechocystis* sp. PCC 6803 by overexpression of its native biosynthetic genes. *Bioresour. Technol.* **2016**, *214*, 761–768. [CrossRef]
273. Lindberg, P.; Park, S.; Melis, A. Engineering a platform for photosynthetic isoprene production in cyanobacteria, using *Synechocystis* as the model organism. *Metab. Eng.* **2010**, *12*, 70–79. [CrossRef] [PubMed]
274. Bentley, F.K.; Melis, A. Diffusion-based process for carbon dioxide uptake and isoprene emission in gaseous/aqueous two-phase photobioreactors by photosynthetic microorganisms. *Biotechnol. Bioeng.* **2012**, *109*. [CrossRef]
275. Bentley, F.K.; Zurbriggen, A.; Melis, A. Heterologous expression of the mevalonic acid pathway in cyanobacteria enhances endogenous carbon partitioning to isoprene. *Mol. Plant* **2014**, *7*, 71–86. [CrossRef]
276. Kudoh, K.; Hotta, S.; Sekine, M.; Fujii, R.; Uchida, A.; Kubota, G.; Kawano, Y.; Ihara, M. Overexpression of endogenous 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS) in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 accelerates protein aggregation. *J. Biosci. Bioeng.* **2017**, *123*, 590–596. [CrossRef]
277. Englund, E.; Shabestary, K.; Hudson, E.P.; Lindberg, P. Systematic overexpression study to find target enzymes enhancing production of terpenes in *Synechocystis* PCC 6803, using isoprene as a model compound. *Metab. Eng.* **2018**, *49*, 164–177. [CrossRef] [PubMed]
278. Eungasamee, K.; Miao, R.; Incharoensakdi, A.; Lindblad, P.; Jantaro, S. Improved lipid production via fatty acid biosynthesis and free fatty acid recycling in engineered *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biotechnol. Biofuels* **2019**, *12*. [CrossRef] [PubMed]
279. Brey, L.F.; Włodarczyk, A.J.; Bang Thøfner, J.F.; Burow, M.; Crocoll, C.; Nielsen, I.; Zygadlo Nielsen, A.J.; Jensen, P.E. Metabolic engineering of *Synechocystis* sp. PCC 6803 for the production of aromatic amino acids and derived phenylpropanoids. *Metab. Eng.* **2020**, *57*, 129–139. [CrossRef] [PubMed]
280. Deshpande, A.; Vue, J.; Morgan, J. Combining random mutagenesis and metabolic engineering for enhanced tryptophan production in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Appl. Environ. Microbiol.* **2020**, *86*. [CrossRef]
281. Bersanini, L.; Battchikova, N.; Jokel, M.; Rehman, A.; Vass, I.; Allahverdiyeva, Y.; Aro, E.M. Flavodiiron protein Flv2/Flv4-related photoprotective mechanism dissipates excitation pressure of PSII in cooperation with phycobilisomes in cyanobacteria. *Plant Physiol.* **2014**, *164*, 805–818. [CrossRef]
282. Mustila, H.; Paananen, P.; Battchikova, N.; Santana-Sánchez, A.; Muth-Pawlak, D.; Hagemann, M.; Aro, E.M.; Allahverdiyeva, Y. The flavodiiron protein Flv3 functions as a homo-oligomer during stress acclimation and is distinct from the Flv1/Flv3 hetero-oligomer specific to the O₂ photoreduction pathway. *Plant Cell Physiol.* **2016**, *57*, 1468–1483. [CrossRef] [PubMed]
283. Chaves, J.E.; Romero, P.R.; Kirst, H.; Melis, A. Role of isopentenyl-diphosphate isomerase in heterologous cyanobacterial (*Synechocystis*) isoprene production. *Photosynth. Res.* **2016**, *130*, 517–527. [CrossRef] [PubMed]
284. Chaves, J.E.; Rueda-Romero, P.; Kirst, H.; Melis, A. Engineering Isoprene Synthase Expression and Activity in Cyanobacteria. *ACS Synth. Biol.* **2017**, *6*, 2281–2292. [CrossRef]
285. Formighieri, C.; Melis, A. Heterologous synthesis of geranylinalool, a diterpenol plant product, in the cyanobacterium *Synechocystis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *101*, 2791–2800. [CrossRef] [PubMed]
286. Sivaramakrishnan, R.; Incharoensakdi, A. Enhancement of lipid production in *Synechocystis* sp. PCC 6803 overexpressing glycerol kinase under oxidative stress with glycerol supplementation. *Bioresour. Technol.* **2018**, *267*, 532–540. [CrossRef] [PubMed]
287. Chaves, J.E.; Melis, A. Biotechnology of cyanobacterial isoprene production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *102*, 6452–6458. [CrossRef] [PubMed]
288. Formighieri, C.; Melis, A. Regulation of β -phellandrene synthase gene expression, recombinant protein accumulation, and monoterpene hydrocarbons production in *Synechocystis* transformants. *Planta* **2014**, *240*, 309–324. [CrossRef]
289. Formighieri, C.; Melis, A. A phycocyanin-phellandrene synthase fusion enhances recombinant protein expression and β -phellandrene (monoterpene) hydrocarbons production in *Synechocystis* (cyanobacteria). *Metab. Eng.* **2015**, *32*, 116–124. [CrossRef] [PubMed]
290. Formighieri, C.; Melis, A. Sustainable heterologous production of terpene hydrocarbons in cyanobacteria. *Photosynth. Res.* **2016**, *130*, 123–135. [CrossRef]
291. Betterle, N.; Melis, A. Heterologous Leader Sequences in Fusion Constructs Enhance Expression of Geranyl Diphosphate Synthase and Yield of β -Phellandrene Production in Cyanobacteria (*Synechocystis*). *ACS Synth. Biol.* **2018**, *7*, 912–921. [CrossRef]
292. Betterle, N.; Melis, A. Photosynthetic generation of heterologous terpenoids in cyanobacteria. *Biotechnol. Bioeng.* **2019**, *116*, 2041–2051. [CrossRef]
293. Valsami, E.A.; Psychogyiou, M.E.; Pateraki, A.; Chrysoulaki, E.; Melis, A.; Ghanotakis, D.F. Fusion constructs enhance heterologous β -phellandrene production in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Appl. Phycol.* **2020**. [CrossRef]

294. Marbouty, M.; Mazouni, K.; Saguez, C.; Cassier-Chauvat, C.; Chauvat, F. Characterization of the *Synechocystis* strain PCC 6803 penicillin-binding proteins and cytokinetic proteins FtsQ and FtsW and their network of interactions with ZipN. *J. Bacteriol.* **2009**, *191*, 5123–5133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
295. Xue, Y.; Zhang, Y.; Cheng, D.; Daddy, S.; He, Q. Genetically engineering *Synechocystis* sp. Pasteur Culture Collection 6803 for the sustainable production of the plant secondary metabolite p-coumaric acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 9449–9454. [[CrossRef](#)]
296. Aoki, S.; Kondo, T.; Ishiura, M. Circadian expression of the dnaK gene in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* **1995**, *177*, 5606–5611. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
297. Peca, L.; Kós, P.B.; Máté, Z.; Farsang, A.; Vass, I. Construction of bioluminescent cyanobacterial reporter strains for detection of nickel, cobalt and zinc. *FEMS Microbiol. Lett.* **2008**, *1837*, 1293–1304. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
298. Muramatsu, M.; Hihara, Y. Transcriptional regulation of genes encoding subunits of photosystem I during acclimation to high-light conditions in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Planta* **2003**, *216*, 446–453. [[CrossRef](#)]
299. Takahashi, T.; Nakai, N.; Muramatsu, M.; Hihara, Y. Role of multiple HLR1 sequences in the regulation of the dual promoters of the psaAB genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Bacteriol.* **2010**, *192*, 4031–4036. [[CrossRef](#)]
300. Rutherford, J.C.; Cavet, J.S.; Robinson, N.J. Cobalt-dependent transcriptional switching by a dual-effector MerR-like protein regulates a cobalt-exporting variant CPx-type ATPase. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 25827–25832. [[CrossRef](#)]
301. Calderon, R.H.; García-Cerdán, J.G.; Malnoë, A.; Cook, R.; Russell, J.J.; Gaw, C.; Dent, R.M.; De Vitry, C.; Niyogi, K.K. A conserved rubredoxin is necessary for photosystem II accumulation in diverse oxygenic photoautotrophs. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 26688–26696. [[CrossRef](#)]
302. Ke, W.T.; Dai, G.Z.; Jiang, H.B.; Zhang, R.; Qiu, B.S. Essential roles of iron superoxide dismutase in photoautotrophic growth of *Synechocystis* sp. PCC 6803 and heterogeneous expression of marine *Synechococcus* sp. CC9311 copper/zinc superoxide dismutase within its sodB knockdown mutant. *Microbiology (UK)* **2014**, *160*, 228–241. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
303. Kunert, A.; Hagemann, M.; Erdmann, N. Construction of promoter probe vectors for *Synechocystis* sp. PCC 6803 using the light-emitting reporter systems Gfp and LuxAB. *J. Microbiol. Methods* **2000**, *41*, 185–194. [[CrossRef](#)]
304. Tan, X.; Yao, L.; Gao, Q.; Wang, W.; Qi, F.; Lu, X. Photosynthesis driven conversion of carbon dioxide to fatty alcohols and hydrocarbons in cyanobacteria. *Metab. Eng.* **2011**, *13*, 169–176. [[CrossRef](#)]
305. Ungerer, J.; Tao, L.; Davis, M.; Ghirardi, M.; Maness, P.C.; Yu, J. Sustained photosynthetic conversion of CO₂ to ethylene in recombinant cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Energy Environ. Sci.* **2012**, *5*, 8998–9006. [[CrossRef](#)]
306. Veetil, V.P.; Angermayr, S.A.; Hellingwerf, K.J. Ethylene production with engineered *Synechocystis* sp PCC 6803 strains. *Microb. Cell Fact.* **2017**, *16*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
307. Angermayr, S.A.; Paszota, M.; Hellingwerf, K.J. Engineering a cyanobacterial cell factory for production of lactic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 7098–7106. [[CrossRef](#)]
308. 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](#)]
309. Van der Woude, A.D.; Angermayr, S.A.; Puthan Veetil, V.; Osnato, A.; Hellingwerf, K.J. Carbon sink removal: Increased photosynthetic production of lactic acid by *Synechocystis* sp. PCC6803 in a glycogen storage mutant. *J. Biotechnol.* **2014**, *184*, 100–102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
310. Hidese, R.; Matsuda, M.; Osanai, T.; Hasunuma, T.; Kondo, A. Malic Enzyme Facilitates d -Lactate Production through Increased Pyruvate Supply during Anoxic Dark Fermentation in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *ACS Synth. Biol.* **2020**, *9*, 260–268. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
311. Savakis, P.E.; Angermayr, S.A.; Hellingwerf, K.J. Synthesis of 2,3-butanediol by *Synechocystis* sp. PCC6803 via heterologous expression of a catabolic pathway from lactic acid- and enterobacteria. *Metab. Eng.* **2013**, *20*, 121–130. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
312. Du, W.; Liang, F.; Duan, Y.; Tan, X.; Lu, X. Exploring the photosynthetic production capacity of sucrose by cyanobacteria. *Metab. Eng.* **2013**, *19*, 17–25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
313. Viola, S.; Rühle, T.; Leister, D. A single vector-based strategy for marker-less gene replacement in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Microb. Cell Fact.* **2014**, *13*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
314. Yao, L.; Qi, F.; Tan, X.; Lu, X. Improved production of fatty alcohols in cyanobacteria by metabolic engineering. *Biotechnol. Biofuels* **2014**, *7*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
315. Yoshikawa, K.; Hirasawa, T.; Shimizu, H. Effect of malic enzyme on ethanol production by *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biosci. Bioeng.* **2015**, *119*, 82–84. [[CrossRef](#)]
316. Namakoshi, K.; Nakajima, T.; Yoshikawa, K.; Toya, Y.; Shimizu, H. Combinatorial deletions of glgC and phaCE enhance ethanol production in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biotechnol.* **2016**, *239*, 13–19. [[CrossRef](#)]
317. Bartasun, P.; Prandi, N.; Storch, M.; Aknin, Y.; Bennett, M.; Palma, A.; Baldwin, G.; Sakuragi, Y.; Jones, P.R.; Rowland, J. The effect of modulating the quantity of enzymes in a model ethanol pathway on metabolic flux in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *PeerJ* **2019**, *7*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
318. Savakis, P.; Tan, X.; Du, W.; Branco Dos Santos, F.; Lu, X.; Hellingwerf, K.J. Photosynthetic production of glycerol by a recombinant cyanobacterium. *J. Biotechnol.* **2015**, *195*, 46–51. [[CrossRef](#)]

319. Anfelt, J.; Kaczmarzyk, D.; Shabestary, K.; Renberg, B.; Rockberg, J.; Nielsen, J.; Uhlén, M.; Hudson, E.P. Genetic and nutrient modulation of acetyl-CoA levels in *Synechocystis* for n-butanol production. *Microb. Cell Fact.* **2015**, *14*. [[CrossRef](#)]
320. Hu, J.; Li, T.; Xu, W.; Zhan, J.; Chen, H.; He, C.; Wang, Q. Small antisense RNA RbIR positively regulates RuBisCo in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Front. Microbiol.* **2017**. [[CrossRef](#)]
321. Wang, B.; Eckert, C.; Maness, P.C.; Yu, J. A Genetic Toolbox for Modulating the Expression of Heterologous Genes in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *ACS Synth. Biol.* **2018**, *7*, 276–286. [[CrossRef](#)]
322. David, C.; Schmid, A.; Adrian, L.; Wilde, A.; Bühler, K. Production of 1,2-propanediol in photoautotrophic *Synechocystis* is linked to glycogen turn-over. *Biotechnol. Bioeng.* **2018**, *115*, 300–311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
323. Qiao, Y.; Wang, W.; Lu, X. High Light Induced Alka(e)ne Biodegradation for Lipid and Redox Homeostasis in Cyanobacteria. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
324. Wu, W.; Du, W.; Gallego, R.P.; Hellingwerf, K.J.; Van Der Woude, A.D.; Dos Santos, F.B. Using osmotic stress to stabilize mannitol production in *Synechocystis* sp. PCC6803. *Biotechnol. Biofuels* **2020**, *13*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
325. Sebesta, J.; Peebles, C.A. Improving heterologous protein expression in *Synechocystis* sp. PCC 6803 for alpha-bisabolene production. *Metab. Eng. Commun.* **2020**, *10*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
326. Gao, Z.; Zhao, H.; Li, Z.; Tan, X.; Lu, X. Photosynthetic production of ethanol from carbon dioxide in genetically engineered cyanobacteria. *Energy Environ. Sci.* **2012**, *5*, 9857–9865. [[CrossRef](#)]
327. Wang, W.; Liu, X.; Lu, X. Engineering cyanobacteria to improve photosynthetic production of alka(e)nes. *Biotechnol. Biofuels* **2013**, *6*. [[CrossRef](#)]
328. Immethun, C.M.; DeLorenzo, D.M.; Focht, C.M.; Gupta, D.; Johnson, C.B.; Moon, T.S. Physical, chemical, and metabolic state sensors expand the synthetic biology toolbox for *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biotechnol. Bioeng.* **2017**, *114*, 1561–1569. [[CrossRef](#)]
329. Gao, Q.; Wang, W.; Zhao, H.; Lu, X. Effects of fatty acid activation on photosynthetic production of fatty acid-based biofuels in *Synechocystis* sp. PCC6803. *Biotechnol. Biofuels* **2012**, *5*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
330. Lee, T.C.; Xiong, W.; Paddock, T.; Carrieri, D.; Chang, I.F.; Chiu, H.F.; Ungerer, J.; Hank Joo, S.H.; Maness, P.C.; Yu, J. Engineered xylose utilization enhances bio-products productivity in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Metab. Eng.* **2015**, *30*, 179–189. [[CrossRef](#)]
331. Hein, S.; Tran, H.; Steinbüchel, A. *Synechocystis* sp. PCC6803 possesses a two-component polyhydroxyalkanoic acid synthase similar to that of anoxygenic purple sulfur bacteria. *Arch. Microbiol.* **1998**, *170*, 162–170. [[CrossRef](#)]
332. Zhou, J.; Zhang, H.; Zhang, Y.; Li, Y.; Ma, Y. Designing and creating a modularized synthetic pathway in cyanobacterium *Synechocystis* enables production of acetone from carbon dioxide. *Metab. Eng.* **2012**, *14*, 394–400. [[CrossRef](#)]
333. Cameron, J.C.; Pakrasi, H.B. Essential role of glutathione in acclimation to environmental and redox perturbations in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiol.* **2010**, *154*, 1672–1685. [[CrossRef](#)]
334. Aoki, R.; Goto, T.; Fujita, Y. A heme oxygenase isoform is essential for aerobic growth in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: Modes of differential operation of two isoforms/enzymes to adapt to low oxygen environments in cyanobacteria. *Plant Cell Physiol.* **2011**, *52*, 1744–1756. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
335. Osanai, T.; Oikawa, A.; Numata, K.; Kuwahara, A.; Iijima, H.; Doi, Y.; Saito, K.; Hirai, M.Y. Pathway-level acceleration of glycogen catabolism by a response regulator in the cyanobacterium *Synechocystis* species PCC 6803. *Plant Physiol.* **2014**, *164*, 1831–1841. [[CrossRef](#)]
336. Hasunuma, T.; Matsuda, M.; Senga, Y.; Aikawa, S.; Toyoshima, M.; Shimakawa, G.; Miyake, C.; Kondo, A. Overexpression of flv3 improves photosynthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 by enhancement of alternative electron flow. *Biotechnol. Biofuels* **2014**, *7*. [[CrossRef](#)]
337. Tashiro, M.; Kiyota, H.; Kawai-Noma, S.; Saito, K.; Ikeuchi, M.; Iijima, Y.; Umeno, D. Bacterial Production of Pinene by a Laboratory-Evolved Pinene-Synthase. *ACS Synth. Biol.* **2016**, *5*. [[CrossRef](#)]
338. Englund, E.; Liang, F.; Lindberg, P. Evaluation of promoters and ribosome binding sites for biotechnological applications in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Sci. Rep.* **2016**, *6*. [[CrossRef](#)]
339. Behler, J.; Vijay, D.; Hess, W.R.; Akhtar, M.K. CRISPR-Based Technologies for Metabolic Engineering in Cyanobacteria. *Trends Biotechnol.* **2018**, *36*, 996–1010. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
340. 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](#)] [[PubMed](#)]
341. Matsudaira, A.; Hoshino, Y.; Uesaka, K.; Takatani, N.; Omata, T.; Usuda, Y. Production of glutamate and stereospecific flavors, (S)-linalool and (+)-valencene, by *Synechocystis* sp. PCC6803. *J. Biosci. Bioeng.* **2020**, *130*, 464–470. [[CrossRef](#)]
342. Kiyota, H.; Okuda, Y.; Ito, M.; Hirai, M.Y.; Ikeuchi, M. Engineering of cyanobacteria for the photosynthetic production of limonene from CO₂. *J. Biotechnol.* **2014**, *185*, 1–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
343. Wang, Y.; Sun, T.; Gao, X.; Shi, M.; Wu, L.; Chen, L.; Zhang, W. Biosynthesis of platform chemical 3-hydroxypropionic acid (3-HP) directly from CO₂ in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Metab. Eng.* **2016**, *34*, 60–70. [[CrossRef](#)]
344. Englund, E.; Andersen-Ranberg, J.; Miao, R.; Hamberger, B.; Lindberg, P. Metabolic Engineering of *Synechocystis* sp. PCC 6803 for Production of the Plant Diterpenoid Manoyl Oxide. *ACS Synth. Biol.* **2015**, *4*, 1270–1278. [[CrossRef](#)]
345. Shabestary, K.; Anfelt, J.; Ljungqvist, E.; Jahn, M.; Yao, L.; Hudson, E.P. Targeted Repression of Essential Genes to Arrest Growth and Increase Carbon Partitioning and Biofuel Titers in Cyanobacteria. *ACS Synth. Biol.* **2018**, *7*, 1669–1675. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

346. Wang, B.; Pugh, S.; Nielsen, D.R.; Zhang, W.; Meldrum, D.R. Engineering cyanobacteria for photosynthetic production of 3-hydroxybutyrate directly from CO₂. *Metab. Eng.* **2013**, *16*, 68–77. [[CrossRef](#)]
347. Li, H.; Liao, J.C. Engineering a cyanobacterium as the catalyst for the photosynthetic conversion of CO₂ to 1,2-propanediol. *Microb. Cell Fact.* **2013**, *12*. [[CrossRef](#)]
348. Wang, Y.; Tao, F.; Ni, J.; Li, C.; Xu, P. Production of C₃ platform chemicals from CO₂ by genetically engineered cyanobacteria. *Green Chem.* **2015**, *17*. [[CrossRef](#)]
349. Li, C.; Tao, F.; Ni, J.; Wang, Y.; Yao, F.; Xu, P. Enhancing the light-driven production of d-lactate by engineering cyanobacterium using a combinational strategy. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 9777. [[CrossRef](#)]
350. Lan, E.I.; Wei, C.T. Metabolic engineering of cyanobacteria for the photosynthetic production of succinate. *Metab. Eng.* **2016**, *38*, 483–493. [[CrossRef](#)]
351. Carbonell, V.; Vuorio, E.; Aro, E.M.; Kallio, P. Enhanced stable production of ethylene in photosynthetic cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *35*, 77. [[CrossRef](#)]
352. Velmurugan, R.; Incharoensakdi, A. Heterologous Expression of Ethanol Synthesis Pathway in Glycogen Deficient *Synechococcus elongatus* PCC 7942 Resulted in Enhanced Production of Ethanol and Exopolysaccharides. *Front Plant Sci* **2020**, *11*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
353. Ruffing, A.M.; Jones, H.D.T. Physiological effects of free fatty acid production in genetically engineered *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Biotechnol. Bioeng.* **2012**, *109*, 2190–2199. [[CrossRef](#)]
354. Ruffing, A.M. Borrowing genes from *Chlamydomonas reinhardtii* for free fatty acid production in engineered cyanobacteria. *J. Appl. Phycol.* **2013**, *25*, 1495–1507. [[CrossRef](#)]
355. 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](#)] [[PubMed](#)]
356. Kachel, B.; Mack, M. Engineering of *Synechococcus* sp. strain PCC 7002 for the photoautotrophic production of light-sensitive riboflavin (vitamin B2). *Metab. Eng.* **2020**, *62*, 275–286. [[CrossRef](#)]
357. Jazmin, L.J.; Xu, Y.; Cheah, Y.E.; Adebisi, A.O.; Johnson, C.H.; Young, J.D. Isotopically nonstationary 13C flux analysis of cyanobacterial isobutyraldehyde production. *Metab. Eng.* **2017**, *42*, 9–18. [[CrossRef](#)]
358. 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](#)]
359. Clerico, E.M.; Cassone, V.M.; Golden, S.S. Stability and lability of circadian period of gene expression in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. *Microbiology* **2009**, *155*, 635–641. [[CrossRef](#)]
360. Atsumi, S.; Higashide, W.; Liao, J.C. Direct photosynthetic recycling of carbon dioxide to isobutyraldehyde. *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27*, 1177–1180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
361. Lan, E.I.; Liao, J.C. Metabolic engineering of cyanobacteria for 1-butanol production from carbon dioxide. *Metab. Eng.* **2011**, *13*, 353–363. [[CrossRef](#)]
362. Lan, E.I.; Liao, J.C. ATP drives direct photosynthetic production of 1-butanol in cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 6018–6023. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
363. 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](#)]
364. Chen, A.H.; Robinson-Mosher, A.; Savage, D.F.; Silver, P.A.; Polka, J.K. The Bacterial Carbon-Fixing Organelle Is Formed by Shell Envelopment of Preassembled Cargo. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e76127. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
365. Kusakabe, T.; Tatsuke, T.; Tsuruno, K.; Hirokawa, Y.; Atsumi, S.; Liao, J.C.; Hanai, T. Engineering a synthetic pathway in cyanobacteria for isopropanol production directly from carbon dioxide and light. *Metab. Eng.* **2013**, *20*, 101–108. [[CrossRef](#)]
366. Li, X.; Shen, C.R.; Liao, J.C. Isobutanol production as an alternative metabolic sink to rescue the growth deficiency of the glycogen mutant of *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Photosynth. Res.* **2014**, *120*, 301–310. [[CrossRef](#)]
367. Lan, E.I.; Chuang, D.S.; Shen, C.R.; Lee, A.M.; Ro, S.Y.; Liao, J.C. Metabolic engineering of cyanobacteria for photosynthetic 3-hydroxypropionic acid production from CO₂ using *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Metab. Eng.* **2015**, *31*, 163–170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
368. Hirokawa, Y.; Maki, Y.; Tatsuke, T.; Hanai, T. Cyanobacterial production of 1,3-propanediol directly from carbon dioxide using a synthetic metabolic pathway. *Metab. Eng.* **2016**, *34*, 97–103. [[CrossRef](#)]
369. Wang, X.; Liu, W.; Xin, C.; Zheng, Y.; Cheng, Y.; Sun, S.; Li, R.; Zhu, X.-G.; Dai, S.Y.; Rentzepis, P.M.; et al. Enhanced limonene production in cyanobacteria reveals photosynthesis limitations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 14225–14230. [[CrossRef](#)]
370. Chwa, J.W.; Kim, W.J.; Sim, S.J.; Um, Y.; Woo, H.M. Engineering of a modular and synthetic phosphoketolase pathway for photosynthetic production of acetone from CO₂ in *Synechococcus elongatus* PCC 7942 under light and aerobic condition. *Plant Biotechnol. J.* **2016**, *14*, 1768–1776. [[CrossRef](#)]
371. Gao, X.; Gao, F.; Liu, D.; Zhang, H.; Nie, X.; Yang, C. Engineering the methylerythritol phosphate pathway in cyanobacteria for photosynthetic isoprene production from CO₂. *Energy Environ. Sci.* **2016**, *7*, 71–86. [[CrossRef](#)]
372. Taton, A.; Ma, A.T.; Ota, M.; Golden, S.S.; Golden, J.W. NOT Gate Genetic Circuits to Control Gene Expression in Cyanobacteria. *ACS Synth. Biol.* **2017**, *6*, 2175. [[CrossRef](#)]

373. Kanno, M.; Atsumi, S. Engineering an Obligate photoautotrophic cyanobacterium to utilize glycerol for growth and chemical production. *ACS Synth. Biol.* **2017**, *6*, 69–75. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
374. Lee, H.J.; Lee, J.; Lee, S.-M.; Um, Y.; Kim, Y.; Sim, S.J.; Choi, J.-I.; Woo, H.M. Direct Conversion of CO₂ to α -Farnesene Using Metabolically Engineered *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *60*, 10424–10428. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
375. Pattharaprachayakul, N.; Lee, H.J.; Incharoensakdi, A.; Woo, H.M. Evolutionary Engineering of Cyanobacteria to Enhance the Production of α -Farnesene from CO₂. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 13658–13664. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
376. Hirokawa, Y.; Goto, R.; Umetani, Y.; Hanai, T. Construction of a novel D-lactate producing pathway from dihydroxyacetone phosphate of the Calvin cycle in cyanobacterium, *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *J. Biosci. Bioeng.* **2017**, *124*, 54–61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
377. Ducat, D.C.; Avelar-Rivas, J.A.; Way, J.C.; Silvera, P.A. Rerouting carbon flux to enhance photosynthetic productivity. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 2660–2668. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
378. 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](#)]
379. Oliver, J.W.K.; Atsumi, S. A carbon sink pathway increases carbon productivity in cyanobacteria. *Metab. Eng.* **2015**, *29*, 106–112. [[CrossRef](#)]
380. Choi, S.Y.; Sim, S.J.; Choi, J.I.; Woo, H.M. Identification of small droplets of photosynthetic squalene in engineered *Synechococcus elongatus* PCC 7942 using TEM and selective fluorescent Nile red analysis. *Lett. Appl. Microbiol.* **2018**, *66*, 523–529. [[CrossRef](#)]
381. Kim, W.J.; Lee, S.M.; Um, Y.; Sim, S.J.; Woo, H.M. Development of synebric vectors as a synthetic biology platform for gene expression in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*. [[CrossRef](#)]
382. Roulet, J.; Taton, A.; Golden, J.W.; Arabolaza, A.; Burkart, M.D.; Gramajo, H. Development of a cyanobacterial heterologous polyketide production platform. *Metab. Eng.* **2018**, *49*, 94–104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
383. Takahama, K.; Matsuoka, M.; Nagahama, K.; Ogawa, T. Construction and analysis of a recombinant cyanobacterium expressing a chromosomally inserted gene for an ethylene-forming enzyme at the *psbAI* locus. *J. Biosci. Bioeng.* **2003**, *15*, 302–305. [[CrossRef](#)]
384. Oliver, J.W.K.; Machado, I.M.P.; Yoneda, H.; Atsumi, S. Cyanobacterial conversion of carbon dioxide to 2,3-butanediol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 1249–1254. [[CrossRef](#)]
385. Peterson, E.S.; McCue, L.A.; Schrimpe-Rutledge, A.C.; Jensen, J.L.; Walker, H.; Kobold, M.A.; Webb, S.R.; Payne, S.H.; Ansong, C.; Adkins, J.N.; et al. VESPA: Software to facilitate genomic annotation of prokaryotic organisms through integration of proteomic and transcriptomic data. *BMC Genom.* **2012**, *13*. [[CrossRef](#)]
386. Begemann, M.B.; Zess, E.K.; Walters, E.M.; Schmitt, E.F.; Markley, A.L.; Pflieger, B.F. An Organic Acid Based Counter Selection System for Cyanobacteria. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e76594. [[CrossRef](#)]
387. Clark, R.L.; Gordon, G.C.; Bennett, N.R.; Lyu, H.; Root, T.W.; Pflieger, B.F. High-CO₂ Requirement as a Mechanism for the Containment of Genetically Modified Cyanobacteria. *ACS Synth. Biol.* **2018**, *7*, 384–391. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
388. Markley, A.L.; Begemann, M.B.; Clarke, R.E.; Gordon, G.C.; Pflieger, B.F. Synthetic Biology Toolbox for Controlling Gene Expression in the Cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. *ACS Synth. Biol.* **2015**, *4*, 595–603. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
389. Sakamoto, T.; Shen, G.; Higashi, S.; Murata, N.; Bryant, D.A. Alteration of low-temperature susceptibility of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002 by genetic manipulation of membrane lipid unsaturation. *Arch. Microbiol.* **1997**, *169*, 20–28. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
390. Vogel, A.I.M.; Lale, R.; Hohmann-Marriott, M.F. Streamlining recombination-mediated genetic engineering by validating three neutral integration sites in *Synechococcus* sp. PCC 7002. *J. Biol. Eng.* **2017**, *11*. [[CrossRef](#)]
391. Selão, T.T.; Włodarczyk, A.; Nixon, P.J.; Norling, B. Growth and selection of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002 using alternative nitrogen and phosphorus sources. *Metab. Eng.* **2019**, *54*, 2. [[CrossRef](#)]
392. Korosh, T.C.; Markley, A.L.; Clark, R.L.; McGinley, L.L.; McMahon, K.D.; Pflieger, B.F. Engineering photosynthetic production of L-lysine. *Metab. Eng.* **2017**, *44*, 273–283. [[CrossRef](#)]
393. Daniell, H.; Sarojini, G.; McFadden, B.A. Transformation of the cyanobacterium *Anacystis nidulans* 6301 with the *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 2546–2550. [[CrossRef](#)]
394. Koksharova, O.; Wolk, C. Genetic tools for cyanobacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *58*, 123–137. [[CrossRef](#)]
395. Sherman, L.A.; Van de Putte, P. Construction of a hybrid plasmid capable of replication in the bacterium *Escherichia coli* and the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *J. Bacteriol.* **1982**, *150*, 410–413. [[CrossRef](#)]
396. Golden, S.S.; Sherman, L.A. Optimal conditions for genetic transformation of the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. *J. Bacteriol.* **1984**, *158*, 36–42. [[CrossRef](#)]
397. Buzby, J.S.; Porter, R.D.; Stevens, S.E. Plasmid transformation in *Agmenellum quadruplicatum* PR-6: Construction of biphasic plasmids and characterization of their transformation properties. *J. Bacteriol.* **1983**, *154*, 1446–1450. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
398. Scharnagl, M.; Richter, S.; Hagemann, M. The cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 expresses a DNA methyltransferase specific for the recognition sequence of the restriction endonuclease PvuII. *J. Bacteriol.* **1998**, *180*, 4116–4122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
399. Wang, B.; Yu, J.; Zhang, W.; Meldrum, D.R. Premethylation of Foreign DNA Improves Integrative Transformation. *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, *81*, 8500–8506. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

400. Hagemann, M.; Gartner, K.; Scharnagl, M.; Bolay, P.; Lott, S.C.; Fuss, J.; Huettel, B.; Reinhardt, R.; Klahn, S.; Hess, W.R. Identification of the DNA methyltransferases establishing the methylome of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *DNA Res.* **2018**, *25*, 343–352. [[CrossRef](#)]
401. Wu, D.; Wang, Y.; Xu, X. Effects of a Type I RM System on Gene Expression and Glycogen Catabolism in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 1258. [[CrossRef](#)]
402. Kuhlemeier, C.J.; Thomas, A.A.M.; van der Ende, A.; van Leen, R.W.; Borrias, W.E.; van den Hondel, C.A.M.J.J.; van Arkel, G.A. A host-vector system for gene cloning in the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. *Plasmid* **1983**, *10*, 156–163. [[CrossRef](#)]
403. Golden, S.S.; Sherman, L.A. A hybrid plasmid is a stable cloning vector for the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. *J. Bacteriol.* **1983**, *155*, 966–972. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
404. Gendel, S.; Straus, N.; Pulleyblank, D.; Williams, J. Shuttle cloning vectors for the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *J. Bacteriol.* **1983**, *156*, 148–154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
405. Murphy, R.C.; Bryant, D.A.; Porter, R.D.; Tandeau De Marsac, N. Molecular cloning and characterization of the *recA* gene from the Cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. *J. Bacteriol.* **1987**, *172*, 967–976. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
406. Kuhlemeier, C.J.; Logtenberg, T.; Stoorvogel, W.; van Heugten, H.A.; Borrias, W.E.; van Arkel, G.A. Cloning of nitrate reductase genes from the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *J. Bacteriol.* **1984**, *159*, 36–41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
407. Gruber, M.Y.; Glick, B.R.; Thompson, J.E. Cloned manganese superoxide dismutase reduces oxidative stress in *Escherichia coli* and *Anacystis nidulans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 2608–2612. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
408. Ferino, F.; Chauvat, F. A promoter-probe vector-host system for the cyanobacterium, *Synechocystis* PCC6803. *Gene* **1989**, *84*, 257–266. [[CrossRef](#)]
409. Marraccini, P.; Bulteau, S.; Cassier-Chauvat, C.; Mermet-Bouvier, P.; Chauvat, F. A conjugative plasmid vector for promoter analysis in several cyanobacteria of the genera *Synechococcus* and *Synechocystis*. *Plant Mol. Biol.* **1993**, *23*, 905–909. [[CrossRef](#)]
410. Chenebault, C.; Diaz-Santos, E.; Kammerscheit, X.; Gørgen, S.; Ilioaia, C.; Streckaite, S.; Gall, A.; Robert, B.; Marcon, E.; Buisson, D.-A.; et al. A Genetic Toolbox for the New Model Cyanobacterium Cyanotheca PCC 7425: A Case Study for the Photosynthetic Production of Limonene. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 586–601. [[CrossRef](#)]
411. Murphy, R.C.; Stevens, S.E. Cloning and expression of the cryIVD gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in the cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* PR-6 and its resulting larvicidal activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **1992**, *58*, 1650–1655. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
412. Soltes-Rak, E.; Kushner, D.J.; Williams, D.D.; Coleman, J.R. Effect of promoter modification on mosquitocidal cryIVB gene expression in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *Appl. Environ. Microbiol.* **1993**, *59*, 2404–2410. [[CrossRef](#)]
413. Erbe, J.L.; Taylor, K.B.; Hall, L.M. Expression of mouse metallothionein in the cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942. *J. Ind. Microbiol.* **1996**, *17*, 41–46. [[CrossRef](#)]
414. Nomura, M.; Ishitani, M.; Takabe, T.; Rai, A.K.; Takabe, T. *Synechococcus* sp. PCC7942 transformed with *Escherichia coli* bet genes produces glycine betaine from choline and acquires resistance to salt stress. *Plant Physiol.* **1995**, *107*, 703–708. [[CrossRef](#)]
415. Kaku, N.; Hibino, T.; Tanaka, Y.; Ishikawa, H.; Araki, E.; Takabe, T.; Takabe, T. Effects of overexpression of *Escherichia coli* katE and bet genes on the tolerance for salt stress in a freshwater cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Plant Sci.* **2000**, *159*, 281–288. [[CrossRef](#)]
416. De Deng, M.; Coleman, J.R. Ethanol synthesis by genetic engineering in cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 523–528. [[CrossRef](#)]
417. Fukuda, H.; Sakai, M.; Nagahama, K.; Fujii, T.; Matsuoka, M.; Inoue, Y.; Ogawa, T. Heterologous expression of the gene for the ethylene-forming enzyme from *Pseudomonas syringae* in the cyanobacterium *Synechococcus*. *Biotechnol. Lett.* **1994**, *16*, 1–6. [[CrossRef](#)]
418. Sakai, M.; Ogawa, T.; Matsuoka, M.; Fukuda, H. Photosynthetic conversion of carbon dioxide to ethylene by the recombinant cyanobacterium, *Synechococcus* sp. PCC 7942, which harbors a gene for the ethylene-forming enzyme of *Pseudomonas syringae*. *J. Ferment. Bioeng.* **1997**, *4*, 434–443. [[CrossRef](#)]
419. Jindou, S.; Ito, Y.; Mito, N.; Uematsu, K.; Hosoda, A.; Tamura, H. Engineered platform for bioethylene production by a cyanobacterium expressing a chimeric complex of plant enzymes. *ACS Synth. Biol.* **2014**, *3*, 487–496. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
420. Iwaki, T.; Haranoh, K.; Inoue, N.; Kojima, K.; Satoh, R.; Nishino, T.; Wada, S.; Ihara, H.; Tsuyama, S.; Kobayashi, H.; et al. Expression of foreign type I ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/ oxygenase (EC 4.1.1.39) stimulates photosynthesis in cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942 cells. *Photosynth. Res.* **2006**, *88*, 287–297. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
421. Chen, Y.; Taton, A.; Go, M.; London, R.E.; Pieper, L.M.; Golden, S.S.; Golden, J.W. Self-replicating shuttle vectors based on pANS, a small endogenous plasmid of the unicellular cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Microbiology (UK)* **2016**, *162*, 2029–2041. [[CrossRef](#)]
422. Scholz, P.; Haring, V.; Wittmann-Liebold, B.; Ashman, K.; Bagdasarian, M.; Scherzinger, E. Complete nucleotide sequence and gene organization of the broad-host-range plasmid RSF1010. *Gene* **1989**, *75*, 271–288. [[CrossRef](#)]
423. Bagdasarian, M.; Lurz, R.; Rückert, B.; Franklin, F.C.H.; Bagdasarian, M.M.; Frey, J.; Timmis, K.N. Specific-purpose plasmid cloning vectors II. Broad host range, high copy number, RSF 1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Gene* **1981**, *16*, 237–247. [[CrossRef](#)]
424. Kues, U.; Stahl, U. Replication of plasmids in gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* **1989**, *53*, 491–516. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

425. Meyer, R. Replication and conjugative mobilization of broad host-range IncQ plasmids. *Plasmid* **2009**, *62*, 57–70. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
426. Kreps, S.; Ferino, F.; Mosrin, C.; Gerits, J.; Mergeay, M.; Thuriaux, P. Conjugative transfer and autonomous replication of a promiscuous IncQ plasmid in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *MGG Mol. Gen. Genet.* **1990**, *221*, 129–133. [[CrossRef](#)]
427. Sode, K.; Tataru, M.; Takeyama, H.; Burgess, J.G.; Matsunaga, T. Conjugative gene transfer in marine cyanobacteria: *Synechococcus* sp., *Synechocystis* sp. and *Pseudanabaena* sp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1992**, *37*, 369–373. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
428. Mermet-Bouvier, P.; Cassier-Chauvat, C.; Marraccini, P.; Chauvat, F. Transfer and replication of RSF1010-derived plasmids in several cyanobacteria of the genera *Synechocystis* and *Synechococcus*. *Curr. Microbiol.* **1993**, *27*, 323–327. [[CrossRef](#)]
429. Mühlenhoff, U.; Chauvat, F. Gene transfer and manipulation in the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. *Mol. Gen. Genet.* **1996**, *252*, 93–100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
430. Brahamsha, B. A genetic manipulation system for oceanic cyanobacteria of the genus *Synechococcus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, *62*, 1745–1751. [[CrossRef](#)]
431. Guo, H.; Xu, X. Broad host range plasmid-based gene transfer system in the cyanobacterium *Gloeobacter violaceus* which lacks thylakoids. *Prog. Nat. Sci.* **2004**, *14*, 31–35. [[CrossRef](#)]
432. Araki, M.; Shimada, Y.; Mimuro, M.; Tsuchiya, T. Establishment of the reporter system for a thylakoid-lacking cyanobacterium, *Gloeobacter violaceus* PCC 7421. *FEBS Open Bio* **2013**, *3*, 11–15. [[CrossRef](#)]
433. Tolonen, A.C.; Liszt, G.B.; Hess, W.R. Genetic manipulation of *Prochlorococcus* strain MIT9313: Green fluorescent protein expression from an RSF1010 plasmid and Tn5 transposition. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 7607–7613. [[CrossRef](#)]
434. Huang, H.H.; Camsund, D.; Lindblad, P.; Heidorn, T. Design and characterization of molecular tools for a synthetic biology approach towards developing cyanobacterial biotechnology. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 2577–2593. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
435. Bishé, B.; Taton, A.; Golden, J.W. Modification of RSF1010-Based Broad-Host-Range Plasmids for Improved Conjugation and Cyanobacterial Bioprospecting. *iScience* **2019**, *20*, 216–228. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
436. Taton, A.; Lis, E.; Adin, D.M.; Dong, G.; Cookson, S.; Kay, S.A.; Golden, S.S.; Golden, J.W. Gene transfer in *Leptolyngbya* sp. strain BL0902, a cyanobacterium suitable for production of biomass and bioproducts. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e30901. [[CrossRef](#)]
437. Mermet-Bouvier, P.; Chauvat, F. A conditional expression vector for the cyanobacteria *Synechocystis* sp. strains PCC6803 and PCC6714 or *Synechococcus* sp. strains PCC7942 and PCC6301. *Curr. Microbiol.* **1994**, *28*, 145–148. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
438. Mazouni, K.; Bulteau, S.; Cassier-Chauvat, C.; Chauvat, F. Promoter element spacing controls basal expression and light inducibility of the cyanobacterial *secA* gene. *Mol. Microbiol.* **1998**, *30*, 1113–1122. [[CrossRef](#)]
439. Duthheil, J.; Saenkham, P.; Sakr, S.; Leplat, C.; Ortega-Ramos, M.; Bottin, H.; Courmac, 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](#)]
440. Mazouni, K.; Domain, F.; Cassier-Chauvat, C.; Chauvat, F. Molecular analysis of the key cytokinetic components of cyanobacteria: FtsZ, ZipN and MinCDE. *Mol. Microbiol.* **2004**, *52*, 1145–1158. [[CrossRef](#)]
441. Marbouty, M.; Saguez, C.; Cassier-Chauvat, C.; Chauvat, F. Characterization of the FtsZ-interacting septal proteins SepF and Ftn6 in the spherical-celled cyanobacterium *Synechocystis* strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* **2009**, *191*, 6178–6185. [[CrossRef](#)]
442. Marbouty, M.; Saguez, C.; Cassier-Chauvat, C.; Chauvat, F. ZipN, an FtsA-like orchestrator of divisome assembly in the model cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. *Mol. Microbiol.* **2009**, *74*, 409–420. [[CrossRef](#)]
443. Damrow, R.; Maldener, I.; Zilliges, Y. The multiple functions of common microbial carbon polymers, glycogen and PHB, during stress responses in the non-diazotrophic cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*. [[CrossRef](#)]
444. Ng, W.O.; Zentella, R.; Wang, Y.; Taylor, J.S.A.; Pakrasi, H.B. *phrA*, the major photoreactivating factor in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 codes for a cyclobutane-pyrimidine-dimer- specific DNA photolyase. *Arch. Microbiol.* **2000**, *173*, 412–416. [[CrossRef](#)]
445. De Porcellinis, A.J.; Nørgaard, H.; Brey, L.M.F.; Erstad, S.M.; Jones, P.R.; Heazlewood, J.L.; Sakuragi, Y. 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.* **2018**, *47*, 170–183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
446. Dienst, D.; Wichmann, J.; Mantovani, O.; Rodrigues, J.S.; Lindberg, P. High density cultivation for efficient sesquiterpenoid biosynthesis in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 5932. [[CrossRef](#)]
447. Liang, F.; Englund, E.; Lindberg, P.; Lindblad, P. Engineered cyanobacteria with enhanced growth show increased ethanol production and higher biofuel to biomass ratio. *Metab. Eng.* **2018**, *46*, 51–59. [[CrossRef](#)]
448. Guerrero, F.; Carbonell, V.; Cossu, M.; Correddu, D.; Jones, P.R. Ethylene Synthesis and Regulated Expression of Recombinant Protein in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e50470. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
449. Kuchmina, E.; Klähn, S.; Jakob, A.; Bigott, W.; Enke, H.; Dühring, U.; Wilde, A. Ethylene production in *Synechocystis* sp. PCC 6803 promotes phototactic movement. *Microbiology (UK)* **2017**, *16*, 1937–1947. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
450. Thiel, K.; Mulaku, E.; Dandapani, H.; Nagy, C.; Aro, E.M.; Kallio, P. Translation efficiency of heterologous proteins is significantly affected by the genetic context of RBS sequences in engineered cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Microb. Cell Fact.* **2018**, *17*, 34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
451. Van der Woude, A.D.; Perez Gallego, R.; Vreugdenhil, A.; Puthan Veetil, V.; Chroumpi, T.; Hellingwerf, K.J. Genetic engineering of *Synechocystis* PCC6803 for the photoautotrophic production of the sweetener erythritol. *Microb. Cell Fact.* **2016**, *15*. [[CrossRef](#)]

452. Ortega-Ramos, M.; Jittawuttipoka, T.; Saenkham, P.; Czarnicka-Kwasiborski, A.; Bottin, H.; Cassier-Chauvat, C.; Chauvat, F. Engineering *Synechocystis* PCC6803 for hydrogen production: Influence on the tolerance to oxidative and sugar stresses. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e89372. [[CrossRef](#)]
453. 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](#)]
454. Miao, R.; Liu, X.; Englund, E.; Lindberg, P.; Lindblad, P. Isobutanol production in *Synechocystis* PCC 6803 using heterologous and endogenous alcohol dehydrogenases. *Metab. Eng. Commun.* **2017**, *5*, 45–53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
455. Miao, R.; Xie, H.; Ho, F.M.; Lindblad, P. Protein engineering of α -ketoisovalerate decarboxylase for improved isobutanol production in *Synechocystis* PCC 6803. *Metab. Eng.* **2018**, *47*, 42–48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
456. Loeschcke, A.; Dienst, D.; Wewer, V.; Hage-Hülsmann, J.; Dietsch, M.; Kranz-Finger, S.; Hüren, V.; Metzger, S.; Urlacher, V.B.; Gigolashvili, T.; et al. The photosynthetic bacteria *Rhodobacter capsulatus* and *Synechocystis* sp. PCC 6803 as new hosts for cyclic plant triterpene biosynthesis. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e189816. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
457. Carroll, A.L.; Case, A.E.; Zhang, A.; Atsumi, S. Metabolic engineering tools in model cyanobacteria. *Metab. Eng.* **2018**, *50*, 47–56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
458. Yao, L.; Shabestary, K.; Björk, S.M.; Asplund-Samuelsson, J.; Joensson, H.N.; Jahn, M.; Hudson, E.P. Pooled CRISPRi screening of the cyanobacterium *Synechocystis* sp PCC 6803 for enhanced industrial phenotypes. *Nat. Commun.* **2020**, *11*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
459. Hihara, Y.; Kamei, A.; Kanehisa, M.; Kaplan, A.; Ikeuchi, M. DNA microarray analysis of cyanobacterial gene expression during acclimation to high light. *Plant Cell* **2001**, *13*, 793–806. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
460. Hihara, Y.; Sonoike, K.; Kanehisa, M.; Ikeuchi, M. DNA microarray analysis of redox-responsive genes in the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* **2003**, *185*, 1719–1725. [[CrossRef](#)]
461. Kanesaki, Y.; Suzuki, I.; Allakhverdiev, S.I.; Mikami, K.; Murata, N. Salt stress and hyperosmotic stress regulate the expression of different sets of genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *290*, 339–348. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
462. Marin, K.; Suzuki, I.; Yamaguchi, K.; Ribbeck, K.; Yamamoto, H.; Kanesaki, Y.; Hagemann, M.; Murata, N. Identification of histidine kinases that act as sensors in the perception of salt stress in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 9061–9066. [[CrossRef](#)]
463. Marin, K.; Kanesaki, Y.; Los, D.A.; Murata, N.; Suzuki, I.; Hagemann, M. Gene expression profiling reflects physiological processes in salt acclimation of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Plant Physiol.* **2004**, *13*, 3290–3300. [[CrossRef](#)]
464. Shoumskaya, M.A.; Paithoonrangarid, K.; Kanesaki, Y.; Los, D.A.; Zinchenko, V.V.; Tanticharoen, M.; Suzuki, I.; Murata, N. Identical Hik-Rre systems are involved in perception and transduction of salt signals and hyperosmotic signals but regulate the expression of individual genes to different extents in *Synechocystis*. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 21531–21538. [[CrossRef](#)]
465. Mikami, K.; Kanesaki, Y.; Suzuki, I.; Murata, N. The histidine kinase Hik33 perceives osmotic stress and cold stress in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol. Microbiol.* **2002**, *46*, 905–915. [[CrossRef](#)]
466. Ohta, H.; Shibata, Y.; Haseyama, Y.; Yoshino, Y.; Suzuki, T.; Kagasawa, T.; Kamei, A.; Ikeuchi, M.; Enami, I. Identification of genes expressed in response to acid stress in *Synechocystis* sp. PCC 6803 using DNA microarrays. *Photosynth. Res.* **2005**, *84*, 225–230. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
467. Uchiyama, J.; Asakura, R.; Kimura, M.; Moriyama, A.; Tahara, H.; Kobayashi, Y.; Kubo, Y.; Yoshihara, T.; Ohta, H. Slr0967 and Slr0939 induced by the SphR response regulator in *Synechocystis* sp. PCC 6803 are essential for growth under acid stress conditions. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2012**, *1817*, 1270–1276. [[CrossRef](#)]
468. Suzuki, I.; Kanesaki, Y.; Hayashi, H.; Hall, J.J.; Simon, W.J.; Slabas, A.R.; Murata, N. The histidine kinase Hik34 is involved in thermotolerance by regulating the expression of heat shock genes in *Synechocystis*. *Plant Physiol.* **2005**, *138*, 1409–1421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
469. Suzuki, I.; Simon, W.J.; Slabas, A.R. The heat shock response of *Synechocystis* sp. PCC 6803 analysed by transcriptomics and proteomics. *J. Exp. Bot.* **2006**, *57*, 1573–1578. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
470. Rowland, J.G.; Pang, X.; Suzuki, I.; Murata, N.; Simon, W.J.; Slabas, A.R. Identification of components associated with thermal acclimation of photosystem II in *Synechocystis* sp. PCC6803. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e10511. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
471. Paithoonrangarid, K.; Shoumskaya, M.A.; Kanesaki, Y.; Satoh, S.; Tabata, S.; Los, D.A.; Zinchenko, V.V.; Hayashi, H.; Tanticharoen, M.; Suzuki, I.; et al. Five histidine kinases perceive osmotic stress and regulate distinct sets of genes in *Synechocystis*. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 53078–53086. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
472. Shapiguzov, A.; Lyukevich, A.A.; Allakhverdiev, S.I.; Sergeyenkov, T.V.; Suzuki, I.; Murata, N.; Los, D.A. Osmotic shrinkage of cells of *Synechocystis* sp. PCC 6803 by water efflux via aquaporins regulates osmotic stress-inducible gene expression. *Microbiology* **2005**, *151*, 447–455. [[CrossRef](#)]
473. Kobayashi, M.; Ishizuka, T.; Katayama, M.; Kanehisa, M.; Bhattacharyya-Pakrasi, M.; Pakrasi, H.B.; Ikeuchi, M. Response to oxidative stress involves a novel peroxiredoxin gene in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol.* **2004**, *45*, 290–299. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
474. Houot, L.; Floutier, M.; Marteyn, B.; Michaut, M.; Picciocchi, A.; Legrain, P.; Aude, J.C.; Cassier-Chauvat, C.; Chauvat, F. Cadmium triggers an integrated reprogramming of the metabolism of *Synechocystis* PCC6803, under the control of the Slr1738 regulator. *BMC Genom.* **2007**, *8*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

475. Kanesaki, Y.; Yamamoto, H.; Paithoonrangsarid, K.; Shoumskaya, M.; Suzuki, I.; Hayashi, H.; Murata, N. Histidine kinases play important roles in the perception and signal transduction of hydrogen peroxide in the cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant J.* **2007**, *49*, 313–324. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
476. Zhang, Z.; Pendse, N.D.; Phillips, K.N.; Cotner, J.B.; Khodursky, A. Gene expression patterns of sulfur starvation in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *BMC Genom.* **2008**, *9*. [[CrossRef](#)]
477. 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](#)]
478. Mitschke, J.; Georg, J.; Scholz, I.; Sharma, C.M.; Dienst, D.; Bantscheff, J.; Voß, B.; Steglich, C.; Wilde, A.; Vogel, J.; et al. An experimentally anchored map of transcriptional start sites in the model cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 2124–2129. [[CrossRef](#)]
479. Muro-Pastor, A.M.; Hess, W.R. Regulatory RNA at the crossroads of carbon and nitrogen metabolism in photosynthetic cyanobacteria. *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* **2020**, *1863*, 194477. [[CrossRef](#)]
480. Baumgartner, D.; Kopf, M.; Klähn, S.; Steglich, C.; Hess, W.R. Small proteins in cyanobacteria provide a paradigm for the functional analysis of the bacterial micro-proteome. *BMC Microbiol.* **2016**, *16*. [[CrossRef](#)]
481. Huang, S.; Chen, L.; Te, R.; Qiao, J.; Wang, J.; Zhang, W. Complementary iTRAQ proteomics and RNA-seq transcriptomics reveal multiple levels of regulation in response to nitrogen starvation in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol. Biosyst.* **2013**, *9*, 2565–2574. [[CrossRef](#)]
482. Pei, G.; Sun, T.; Chen, S.; Chen, L.; Zhang, W. Systematic and functional identification of small non-coding RNAs associated with exogenous biofuel stress in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biotechnol. Biofuels* **2017**, *10*. [[CrossRef](#)]
483. Hernández-Prieto, M.A.; Semeniuk, T.A.; Futschik, M.E. Toward a systems-level understanding of gene regulatory, protein interaction, and metabolic networks in cyanobacteria. *Front. Genet.* **2014**, *5*. [[CrossRef](#)]
484. Nakao, M.; Okamoto, S.; Kohara, M.; Fujishiro, T.; Fujisawa, T.; Sato, S.; Tabata, S.; Kaneko, T.; Nakamura, Y. CyanoBase: The cyanobacteria genome database update 2010. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *38*, D379–D381. [[CrossRef](#)]
485. Zhang, Y.; Fonslow, B.R.; Shan, B.; Baek, M.C.; Yates, J.R. Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 2343–2394. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
486. Gao, L.; Wang, J.; Ge, H.; Fang, L.; Zhang, Y.; Huang, X.; Wang, Y. Toward the complete proteome of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photosynth. Res.* **2015**, *126*, 203–219. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
487. Gao, L.; Shen, C.; Liao, L.; Huang, X.; Liu, K.; Wang, W.; Guo, L.; Jin, W.; Huang, F.; Xu, W.; et al. Functional proteomic discovery of Slr0110 as a central regulator of carbohydrate metabolism in *Synechocystis* species PCC6803. *Mol. Cell. Proteom.* **2014**, *13*, 204–219. [[CrossRef](#)]
488. Song, Z.; Chen, L.; Wang, J.; Lu, Y.; Jiang, W.; Zhang, W. A transcriptional regulator SlI0794 regulates tolerance to biofuel ethanol in photosynthetic *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol. Cell. Proteom.* **2014**, *13*, 3519–3532. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
489. Chen, W.; Fang, L.; Huang, X.; Ge, H.; Wang, J.; Wang, X.; Zhang, Y.; Sui, N.; Xu, W.; Wang, Y. Systematic identification of light-regulated cold-responsive proteome in a model cyanobacterium. *J. Proteom.* **2018**, *179*, 100–109. [[CrossRef](#)]
490. Angeleri, M.; Muth-Pawlak, D.; Wilde, A.; Aro, E.M.; Battchikova, N. Global proteome response of *Synechocystis* 6803 to extreme copper environments applied to control the activity of the inducible *petJ* promoter. *J. Appl. Microbiol.* **2019**, *126*, 826–841. [[CrossRef](#)]
491. Battchikova, N.; Vainonen, J.P.; Vorontsova, N.; Keränen, M.; Carmel, D.; Aro, E.M. Dynamic changes in the proteome of *Synechocystis* 6803 in response to CO₂ limitation revealed by quantitative proteomics. *J. Proteome Res.* **2010**, *9*, 5896–5912. [[CrossRef](#)]
492. Miranda, H.; Cheregi, O.; Netotea, S.; Hvidsten, T.R.; Moritz, T.; Funk, C. Co-expression analysis, proteomic and metabolomic study on the impact of a Deg/HtrA protease triple mutant in *Synechocystis* sp. PCC 6803 exposed to temperature and high light stress. *J. Proteom.* **2013**, *78*, 294–311. [[CrossRef](#)]
493. Slabas, A.R.; Suzuki, I.; Murata, N.; Simon, W.J.; Hall, J.J. Proteomic analysis of the heat shock response in *Synechocystis* PCC6803 and a thermally tolerant knockout strain lacking the histidine kinase 34 gene. *Proteomics* **2006**, *6*, 845–864. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
494. Rowland, J.G.; Simon, W.J.; Prakash, J.S.S.; Slabas, A.R. Proteomics reveals a role for the RNA helicase *crhR* in the modulation of multiple metabolic pathways during cold acclimation of *Synechocystis* sp. PCC6803. *J. Proteome Res.* **2011**, *10*, 3674–3689. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
495. Zhang, L.F.; Yang, H.M.; Cui, S.X.; Hu, J.; Wang, J.; Kuang, T.Y.; Norling, B.; Huang, F. Proteomic analysis of plasma membranes of cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 in response to high pH stress. *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 2892–2902. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
496. Kurian, D.; Phadwal, K.; Mäenpää, P. Proteomic characterization of acid stress response in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Proteomics* **2006**, *6*, 3614–3624. [[CrossRef](#)]
497. Ren, Q.; Shi, M.; Chen, L.; Wang, J.; Zhang, W. Integrated proteomic and metabolomic characterization of a novel two-component response regulator Slr1909 involved in acid tolerance in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Proteom.* **2014**, *109*, 76–89. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

498. Wegener, K.M.; Singh, A.K.; Jacobs, J.M.; Elvitigala, T.; Welsh, E.A.; Keren, N.; Gritsenko, M.A.; Ghosh, B.K.; Camp, D.G.; Smith, R.D.; et al. Global proteomics reveal an atypical strategy for carbon/nitrogen assimilation by a cyanobacterium under diverse environmental perturbations. *Mol. Cell. Proteom.* **2010**, *12*, 2678–2689. [[CrossRef](#)]
499. Fuszard, M.A.; Ow, S.Y.; Gan, C.S.; Noirel, J.; Ternan, N.G.; McMullan, G.; Biggs, C.A.; Reardon, K.F.; Wright, P.C. The quantitative proteomic response of *Synechocystis* sp. PCC6803 to phosphate acclimation. *Aquat. Biosyst.* **2013**, *9*. [[CrossRef](#)]
500. Chen, L.; Zhu, Y.; Song, Z.; Wang, J.; Zhang, W. An orphan response regulator Sll0649 involved in cadmium tolerance and metal homeostasis in photosynthetic *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Proteom.* **2014**, *103*, 87–102. [[CrossRef](#)]
501. Mehta, A.; López-Maury, L.; Florencio, F.J. Proteomic pattern alterations of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 in response to cadmium, nickel and cobalt. *J. Proteom.* **2014**, *102*, 98–112. [[CrossRef](#)]
502. Fulda, S.; Huang, F.; Nilsson, F.; Hagemann, M.; Norling, B. Proteomics of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: Identification of periplasmic proteins in cells grown at low and high salt concentrations. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 5900–5907. [[CrossRef](#)]
503. Fulda, S.; Mikkat, S.; Huang, F.; Huckauf, J.; Marin, K.; Norling, B.; Hagemann, M. Proteome analysis of salt stress response in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Proteomics* **2006**, *6*, 2733–2745. [[CrossRef](#)]
504. Huang, F.; Fulda, S.; Hagemann, M.; Norling, B. Proteomic screening of salt-stress-induced changes in plasma membranes of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Proteomics* **2006**, *6*, 910–920. [[CrossRef](#)]
505. Pandhal, J.; Ow, S.Y.; Wright, P.C.; Biggs, C.A. Comparative proteomics study of salt tolerance between a nonsequenced extremely halotolerant cyanobacterium and its mildly halotolerant relative using in vivo metabolic labeling and in vitro isobaric labeling. *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 818–828. [[CrossRef](#)]
506. Li, T.; Yang, H.M.; Cui, S.X.; Suzuki, I.; Zhang, L.F.; Li, L.; Bo, T.T.; Wang, J.; Murata, N.; Huang, F. Proteomic study of the impact of Hik33 mutation in *Synechocystis* sp. PCC 6803 under normal and salt stress conditions. *J. Proteome Res.* **2012**, *11*, 502–514. [[CrossRef](#)]
507. Qiao, J.; Huang, S.; Te, R.; Wang, J.; Chen, L.; Zhang, W. Integrated proteomic and transcriptomic analysis reveals novel genes and regulatory mechanisms involved in salt stress responses in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 8253–8264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
508. Gao, Y.; Xiong, W.; Li, X.B.; Gao, C.F.; Zhang, Y.L.; Li, H.; Wu, Q.Y. Identification of the proteomic changes in *Synechocystis* sp. PCC 6803 following prolonged UV-B irradiation. *J. Exp. Bot.* **2009**, *60*, 1141–1154. [[CrossRef](#)]
509. Liu, J.; Chen, L.; Wang, J.; Qiao, J.; Zhang, W. Proteomic analysis reveals resistance mechanism against biofuel hexane in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biotechnol. Biofuels* **2012**, *5*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
510. Qiao, J.; Wang, J.; Chen, L.; Tian, X.; Huang, S.; Ren, X.; Zhang, W. Quantitative iTRAQ LC-MS/MS proteomics reveals metabolic responses to biofuel ethanol in cyanobacterial *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Proteome Res.* **2012**, *11*, 5286–5300. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
511. Tian, X.; Chen, L.; Wang, J.; Qiao, J.; Zhang, W. Quantitative proteomics reveals dynamic responses of *Synechocystis* sp. PCC 6803 to next-generation biofuel butanol. *J. Proteom.* **2013**, *78*, 326–345. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
512. Chen, L.; Wu, L.; Wang, J.; Zhang, W. Butanol tolerance regulated by a two-component response regulator Slr1037 in photosynthetic *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biotechnol. Biofuels* **2014**, *7*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
513. Wang, Y.; Chen, L.; Zhang, W. Proteomic and metabolomic analyses reveal metabolic responses to 3-hydroxypropionic acid synthesized internally in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biotechnol. Biofuels* **2016**, *9*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
514. Ma, Y.; Yang, M.; Lin, X.; Liu, X.; Huang, H.; Ge, F. Malonylome Analysis Reveals the Involvement of Lysine Malonylation in Metabolism and Photosynthesis in Cyanobacteria. *J. Proteome Res.* **2017**, *15*, 2030–2043. [[CrossRef](#)]
515. Lin, X.; Yang, M.; Liu, X.; Cheng, Z.; Ge, F. Characterization of Lysine Monomethylome and Methyltransferase in Model Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Genom. Proteom. Bioinform.* **2020**, *18*, 289–304. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
516. Mikkat, S.; Fulda, S.; Hagemann, M. A 2D gel electrophoresis-based snapshot of the phosphoproteome in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Microbiology (UK)* **2014**, *160*, 296–306. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
517. Spät, P.; Macek, B.; Forchhammer, K. Phosphoproteome of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 and its dynamics during nitrogen starvation. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
518. Toyoshima, M.; Tokumaru, Y.; Matsuda, F.; Shimizu, H. Assessment of protein content and phosphorylation level in *Synechocystis* sp. PCC 6803 under various growth conditions using quantitative phosphoproteomic analysis. *Molecules* **2020**, *20*, 3582. [[CrossRef](#)]
519. Krall, L.; Huege, J.; Catchpole, G.; Steinhäuser, D.; Willmitzer, L. Assessment of sampling strategies for gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) based metabolomics of cyanobacteria. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2009**, *877*, 2952–2960. [[CrossRef](#)]
520. Narainsamy, K.; Cassier-Chauvat, C.; Junot, C.; Chauvat, F. High performance analysis of the cyanobacterial metabolism via liquid chromatography coupled to a LTQ-Orbitrap mass spectrometer: Evidence that glucose reprograms the whole carbon metabolism and triggers oxidative stress. *Metabolomics* **2013**, *9*, 21–32. [[CrossRef](#)]
521. Achyuthan, K.E.; Harper, J.C.; Manginell, R.P.; Moorman, M.W. Volatile metabolites emission by in vivo microalgae—An overlooked opportunity? *Metabolites* **2017**, *7*, 39. [[CrossRef](#)]
522. Majchrzak, T.; Wojnowski, W.; Rutkowska, M.; Wasik, A. Real-Time Volatilomics: A Novel Approach for Analyzing Biological Samples. *Trends Plant Sci.* **2020**, *25*, 302–312. [[CrossRef](#)]

523. Yoshikawa, K.; Hirasawa, T.; Ogawa, K.; Hidaka, Y.; Nakajima, T.; Furusawa, C.; Shimizu, H. Integrated transcriptomic and metabolomic analysis of the central metabolism of *Synechocystis* sp. PCC 6803 under different trophic conditions. *Biotechnol. J.* **2013**, *8*, 571–580. [[CrossRef](#)]
524. Nakajima, T.; Kajihata, S.; Yoshikawa, K.; Matsuda, F.; Furusawa, C.; Hirasawa, T.; Shimizu, H. Integrated metabolic flux and omics analysis of *Synechocystis* sp. PCC 6803 under mixotrophic and photoheterotrophic conditions. *Plant Cell Physiol.* **2014**, *55*, 1605–1612. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
525. Cheregi, O.; Miranda, H.; Gröbner, G.; Funk, C. Inactivation of the Deg protease family in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 has impact on the outer cell layers. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2015**, *152*, 383–394. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
526. Klähn, S.; Orf, I.; Schwarz, D.; Matthiessen, J.K.F.; Kopka, J.; Hess, W.R.; Hagemann, M. Integrated transcriptomic and metabolomic characterization of the low-carbon response using an *ndhR* mutant of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiol.* **2015**, *169*, 1540–1556. [[CrossRef](#)]
527. Jablonsky, J.; Papacek, S.; Hagemann, M. Different strategies of metabolic regulation in cyanobacteria: From transcriptional to biochemical control. *Sci. Rep.* **2016**, *6*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
528. Saha, R.; Liu, D.; Hoynes-O'Connor, A.; Liberton, M.; Yu, J.; Bhattacharyya-Pakrasi, M.; Balassy, A.; Zhang, F.; Moon, T.S.; Maranas, C.D.; et al. Diurnal regulation of cellular processes in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: Insights from transcriptomic, fluxomic, and physiological analyses. *MBio* **2016**, *7*, e00464-16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
529. Tibiletti, T.; Hernández-Prieto, M.A.; Matthijs, H.C.P.; Niyogi, K.K.; Funk, C. Deletion of the gene family of small chlorophyll-binding proteins (ScpABCDE) offsets C/N homeostasis in *Synechocystis* PCC 6803. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2016**, *1857*, 396–407. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
530. Hasunuma, T.; Matsuda, M.; Kondo, A. Improved sugar-free succinate production by *Synechocystis* sp. PCC 6803 following identification of the limiting steps in glycogen catabolism. *Metab. Eng. Commun.* **2016**, *3*, 130–141. [[CrossRef](#)]
531. Zhu, H.; Ren, X.; Wang, J.; Song, Z.; Shi, M.; Qiao, J.; Tian, X.; Liu, J.; Chen, L.; Zhang, W. Integrated OMICS guided engineering of biofuel butanol-tolerance in photosynthetic *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biotechnol. Biofuels* **2013**, *6*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
532. Liu, Z.X.; Li, H.C.; Wei, Y.P.; Chu, W.Y.; Chong, Y.L.; Long, X.H.; Liu, Z.P.; Qin, S.; Shao, H.B. Signal transduction pathways in *Synechocystis* sp. PCC 6803 and biotechnological implications under abiotic stress. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2015**, *35*, 269–280. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
533. Gärtner, K.; Klähn, S.; Watanabe, S.; Mikkat, S.; Scholz, I.; Hess, W.R.; Hagemann, M. Cytosine N4-methylation via M.Ssp6803II is involved in the regulation of transcription, fine-tuning of DNA replication and DNA repair in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*. [[CrossRef](#)]
534. Xu, W.; Wang, Y. Post-translational Modifications of Serine/Threonine and Histidine Kinases and Their Roles in Signal Transductions in *Synechocystis* Sp. PCC 6803. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2020**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
535. Broddrick, J.T.; Rubin, B.E.; Welkie, D.G.; Du, N.; Mih, N.; Diamond, S.; Lee, J.J.; Golden, S.S.; Palsson, B.O. Unique attributes of cyanobacterial metabolism revealed by improved genome-scale metabolic modeling and essential gene analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, E8344–E8353. [[CrossRef](#)]
536. Broddrick, J.T.; Welkie, D.G.; Jallet, D.; Golden, S.S.; Peers, G.; Palsson, B.O. Predicting the metabolic capabilities of *Synechococcus elongatus* PCC 7942 adapted to different light regimes. *Metab. Eng.* **2019**, *52*, 42–56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

BIBLIOGRAPHIE

- Aharoni, Asaph, Ashok P. Giri, Stephan Deuerlein, Frans Griepink, Willem-Jan de Kogel, Francel W. A. Verstappen, Harrie A. Verhoeven, Maarten A. Jongsma, Wilfried Schwab, et Harro J. Bouwmeester. « Terpenoid Metabolism in Wild-Type and Transgenic Arabidopsis Plants ». *The Plant Cell* 15, n° 12 (décembre 2003): 2866-84. <https://doi.org/10.1105/tpc.016253>.
- Ahmad, Ahmad, Ruchi Pathania, et Shireesh Srivastava. « Biochemical Characteristics and a Genome-Scale Metabolic Model of an Indian Euryhaline Cyanobacterium with High Polyglucan Content ». *Metabolites* 10, n° 5 (mai 2020): 177. <https://doi.org/10.3390/metabo10050177>.
- Aizawa, Katsunori, Tokuro Shimizu, Tetsuo Hiyama, Kimiyuki Satoh, et Yohko Nakamura. « Changes in Composition of Membrane Proteins Accompanying the Regulation of PS I/PS II Stoichiometry Observed with *Synechocystis* PCC 6803 ». *Photosynthesis Research* 32, n° 2 (1 mai 1992): 131-38. <https://doi.org/10.1007/BF00035947>.
- Ajikumar, Parayil Kumaran, Keith Tyo, Simon Carlsen, Oliver Mucha, Too Heng Phon, et Gregory Stephanopoulos. « Terpenoids: Opportunities for Biosynthesis of Natural Product Drugs Using Engineered Microorganisms ». *Molecular Pharmaceutics* 5, n° 2 (avril 2008): 167-90. <https://doi.org/10.1021/mp700151b>.
- Ajikumar, Parayil Kumaran, Wen-Hai Xiao, Keith E. J. Tyo, Yong Wang, Fritz Simeon, Effendi Leonard, Oliver Mucha, Too Heng Phon, Blaine Pfeifer, et Gregory Stephanopoulos. « Isoprenoid Pathway Optimization for Taxol Precursor Overproduction in *Escherichia coli* ». *Science (New York, N.Y.)* 330, n° 6000 (1 octobre 2010): 70-74. <https://doi.org/10.1126/science.1191652>.
- Alagesan, Swathi, Sandeep B. Gaudana, Avinash Sinha, et Pramod P. Wangikar. « Metabolic Flux Analysis of *Cyanospora* Sp. ATCC 51142 under Mixotrophic Conditions ». *Photosynthesis Research* 118, n° 1 (1 novembre 2013): 191-98. <https://doi.org/10.1007/s11220-013-9911-5>.
- Albertsen, Line, Yun Chen, Lars S. Bach, Stig Rattleff, Jerome Maury, Susanne Brix, Jens Nielsen, et Uffe H. Mortensen. « Diversion of Flux toward Sesquiterpene Production in *Saccharomyces cerevisiae* by Fusion of Host and Heterologous Enzymes ». *Applied and Environmental Microbiology* 77, n° 3 (février 2011): 1033-40. <https://doi.org/10.1128/AEM.01361-10>.
- Andrews, T J, et G H Lorimer. « Catalytic Properties of a Hybrid between Cyanobacterial Large Subunits and Higher Plant Small Subunits of Ribulose Biphosphate Carboxylase-Oxygenase. » *Journal of Biological Chemistry* 260, n° 8 (25 avril 1985): 4632-36. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)89117-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)89117-7).
- Anfelt, Josefine, Danuta Kaczmarzyk, Kiyon Shabestary, Björn Renberg, Johan Rockberg, Jens Nielsen, Mathias Uhlén, et Elton P. Hudson. « Genetic and nutrient modulation of acetyl-CoA levels in *Synechocystis* for n-butanol production ». *Microbial Cell Factories* 14, n° 1 (16 octobre 2015): 167. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0355-9>.
- Angermayr, S. Andreas, Aniek D. van der Woude, Danilo Correddu, Angie Vreugdenhil, Valeria Verrone, et Klaas J. Hellingwerf. « Exploring Metabolic Engineering Design Principles for the Photosynthetic Production of Lactic Acid by *Synechocystis* Sp. PCC6803 ». *Biotechnology for Biofuels* 7 (2014): 99. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-99>.
- Armshaw, Patricia, Dawn Carey, Lorraine Quinn, Con Sheahan, et Joseph Pembroke. « Optimisation of ethanol production in *Synechocystis* PCC 6803, the DEMA approach. », 2015.
- Asada, Yasuo, Masato Miyake, Jun Miyake, Ryuichiro Kurane, et Yutaka Tokiwa. « Photosynthetic Accumulation of Poly-(Hydroxybutyrate) by Cyanobacteria—the Metabolism and Potential for CO₂ Recycling ». *International Journal of Biological Macromolecules* 25, n° 1 (1 juin 1999): 37-42. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(99\)00013-6](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(99)00013-6).
- Atsumi, Shota, Wendy Higashide, et James C. Liao. « Direct Photosynthetic Recycling of Carbon Dioxide to Isobutyraldehyde ». *Nature Biotechnology* 27, n° 12 (décembre 2009): 1177-80. <https://doi.org/10.1038/nbt.1586>.
- Avilan, Luisana, Sandrine Lebreton, et Brigitte Gontero. « Thioredoxin Activation of Phosphoribulokinase in a Bi-Enzyme Complex from *Chlamydomonas Reinhardtii* Chloroplasts ». *Journal of Biological Chemistry* 275, n° 13 (mars 2000): 9447-51. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.13.9447>.
- Avilan, Luisana, Carine Puppo, Jenny Erales, Mireille Woudstra, Régine Lebrun, et Brigitte Gontero. « CP12 Residues Involved in the Formation and Regulation of the Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase–CP12–Phosphoribulokinase Complex in *Chlamydomonas Reinhardtii* ». *Molecular BioSystems* 8, n° 11 (2 octobre 2012): 2994-3002. <https://doi.org/10.1039/C2MB25244A>.
- Baalen, Chase Van. « Studies on Marine Blue-Green Algae » 4, n° 1-2 (1 janvier 1962): 129-39. <https://doi.org/10.1515/botm.1962.4.1-2.129>.
- Bachhar, Anushree, et Jiri Jablonsky. « A new insight into role of phosphoketolase pathway in *Synechocystis* sp. PCC 6803 ». *Scientific Reports* 10 (16 décembre 2020): 22018. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78475-z>.
- Badger, Badger M., et Lorimer G. Lorimer. « Interaction of Sugar Phosphates with the Catalytic Site of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase. » *Biochemistry* 20, n° 8 (1981): 2219-25.
- Badger, Murray R., David Hanson, et G. Dean Price. « Evolution and Diversity of CO₂ Concentrating Mechanisms in Cyanobacteria ». *Functional Plant Biology* 29, n° 3 (2002): 161-73. <https://doi.org/10.1071/pp01213>.
- Badger, Murray R., et G. Dean Price. « CO₂ concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution ». *Journal of Experimental Botany* 54, n° 383 (1 février 2003): 609-22. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg076>.
- Bagdasarian, M., R. Lurz, B. Rückert, F. C. H. Franklin, M. M. Bagdasarian, J. Frey, et K. N. Timmis. « Specific-Purpose

- Plasmid Cloning Vectors II. Broad Host Range, High Copy Number, RSF 1010-Derived Vectors, and a Host-Vector System for Gene Cloning in *Pseudomonas* ». *Gene* 16, n° 1 (1 décembre 1981): 237-47. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(81\)90080-9](https://doi.org/10.1016/0378-1119(81)90080-9).
- Baloglu, null, et null Kingston. « The Taxane Diterpenoids ». *Journal of Natural Products* 62, n° 10 (octobre 1999): 1448-72. <https://doi.org/10.1021/np990176i>.
- 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>
- Bateman, Alex. « The Structure of a Domain Common to Archaeobacteria and the Homocystinuria Disease Protein ». *Trends in Biochemical Sciences* 22, n° 1 (1 janvier 1997): 12-13. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(96\)30046-7](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(96)30046-7).
- Batterton, John C., et C. Van Baalen. « Growth Responses of Blue-Green Algae to Sodium Chloride Concentration ». *Archiv Für Mikrobiologie* 76, n° 2 (1 juin 1971): 151-65. <https://doi.org/10.1007/BF00411789>.
- Behnke, Katja, Barbara Ehling, Markus Teuber, Martina Bauerfeind, Sandrine Louis, Robert Hänsch, Andrea Polle, Jörg Bohlmann, et Jörg-Peter Schnitzler. « Transgenic, Non-Isoprene Emitting Poplars Don't like It Hot ». *The Plant Journal* 51, n° 3 (2007): 485-99. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03157.x>.
- Behr, Arno, et Leif Johnen. « Myrcene as a Natural Base Chemical in Sustainable Chemistry: A Critical Review ». *ChemSusChem* 2, n° 12 (2009): 1072-95. <https://doi.org/10.1002/cssc.200900186>.
- Benhar, Moran, Michael Forrester, et Jonathan Stamler. « Protein denitrosylation: Enzymatic mechanisms and cellular functions ». *Nature reviews. Molecular cell biology* 10 (1 octobre 2009): 721-32. <https://doi.org/10.1038/nrm2764>.
- Bentley, Fiona K., Jose Gines García-Cerdán, Hsu-Ching Chen, et Anastasios Melis. « Paradigm of Monoterpene (β -Phellandrene) Hydrocarbons Production via Photosynthesis in Cyanobacteria ». *BioEnergy Research* 6, n° 3 (1 septembre 2013): 917-29. <https://doi.org/10.1007/s12155-013-9325-4>.
- Bentley, Fiona K., Andreas Zurbriggen, et Anastasios Melis. « Heterologous Expression of the Mevalonic Acid Pathway in Cyanobacteria Enhances Endogenous Carbon Partitioning to Isoprene ». *Molecular Plant* 7, n° 1 (1 janvier 2014): 71-86. <https://doi.org/10.1093/mp/sst134>.
- Benzerara, K., Skouri-Panet, F., Li, J., Féraud, 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, Bertram M., et Himadri B. Pakrasi. « Upregulation of Plasmid Genes during Stationary Phase in *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803, a Cyanobacterium ». *Applied and Environmental Microbiology* 78, n° 15 (1 août 2012): 5448-51. <https://doi.org/10.1128/AEM.01174-12>.
- Berner, R. A. « Modeling Atmospheric O₂ over Phanerozoic Time ». *Geochimica et Cosmochimica Acta* 65, n° 5 (1 mars 2001): 685-94. [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(00\)00572-X](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(00)00572-X).
- Berner, Robert A. « The Long-Term Carbon Cycle, Fossil Fuels and Atmospheric Composition ». *Nature* 426, n° 6964 (novembre 2003): 323-26. <https://doi.org/10.1038/nature02131>.
- Berner, Robert A., et Zavareth Kothavala. « Geocarb III: A Revised Model of Atmospheric CO₂ over Phanerozoic Time ». *American Journal of Science* 301, n° 2 (1 février 2001): 182-204. <https://doi.org/10.2475/ajs.301.2.182>.
- Beudeker, R. F., G. C. Cannon, J. G. Kuenen, et J. M. Shively. « Relations between D-Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase, Carboxysomes and CO₂ Fixing Capacity in the Obligate Chemolithotroph *Thiobacillus Neapolitanus* Grown under Different Limitations in the Chemostat ». *Archives of Microbiology* 124, n° 2 (1 février 1980): 185-89. <https://doi.org/10.1007/BF00427725>.
- Bhadury, Punyasloke, et Phillip C. Wright. « Exploitation of Marine Algae: Biogenic Compounds for Potential Antifouling Applications ». *Planta* 219, n° 4 (1 août 2004): 561-78. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1307-5>.
- Blondeau, M., Sachse, M., Boulogne, C., Gillet, C., Guigner, J.-M., Skouri-Panet, F., Poinso, 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>
- Bohlmann, Jörg, et Christopher I. Keeling. « Terpenoid Biomaterials ». *The Plant Journal* 54, n° 4 (2008): 656-69. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03449.x>.
- Bourgou, S., M.E. Kchouk, A. Bellila, et B. Marzouk. « EFFECT OF SALINITY ON PHENOLIC COMPOSITION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF NIGELLA SATIVA ». *Acta Horticulturae*, n° 853 (février 2010): 57-60. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.853.5>.
- Bracher, Andreas, Spencer M. Whitney, F. Ulrich Hartl, et Manajit Hayer-Hartl. « Biogenesis and Metabolic Maintenance of RuBisCO ». *Annual Review of Plant Biology* 68, n° 1 (2017): 29-60. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-111633>.
- Brandes, H. K., F. C. Hartman, T. Y. Lu, et F. W. Larimer. « Efficient Expression of the Gene for Spinach Phosphoribulokinase in *Pichia Pastoris* and Utilization of the Recombinant Enzyme to Explore the Role of Regulatory Cysteiny Residues by Site-Directed Mutagenesis ». *The Journal of Biological Chemistry* 271, n° 11 (15 mars 1996): 6490-96. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.11.6490>.
- Brandes, Hillel K., Frank W. Larimer, et Fred C. Hartman. « The Molecular Pathway for the Regulation of Phosphoribulokinase by Thioredoxin f(*) ». *Journal of Biological Chemistry* 271, n° 7 (16 février 1996): 3333-35. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.7.3333>.
- Breitmaier, Eberhard. *Terpenes: Flavors, Fragrances, Pharmaca, Pheromones*. John Wiley & Sons, 2006.
- Burnap, Robert, Martin Hagemann, et Aaron Kaplan. « Regulation of CO₂ Concentrating Mechanism in Cyanobacteria ». *Life* 5 (1 mars 2015): 348-71. <https://doi.org/10.3390/life5010348>.

- Burnap, Robert L., Rehka Nambudiri, et Steven Holland. « Regulation of the Carbon-Concentrating Mechanism in the Cyanobacterium *Synechocystis* Sp. PCC6803 in Response to Changing Light Intensity and Inorganic Carbon Availability ». *Photosynthesis Research* 118, n° 1-2 (novembre 2013): 115-24. <https://doi.org/10.1007/s11120-013-9912-4>.
- Cai, Zhen, Guoxia Liu, Junli Zhang, et Yin Li. « Development of an Activity-Directed Selection System Enabled Significant Improvement of the Carboxylation Efficiency of RuBisCO ». *Protein & Cell* 5, n° 7 (juillet 2014): 552-62. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0072-x>.
- Cano, Melissa, Steven C. Holland, Juliana Artier, Rob L. Burnap, Maria Ghirardi, John A. Morgan, et Jianping Yu. « Glycogen Synthesis and Metabolite Overflow Contribute to Energy Balancing in Cyanobacteria ». *Cell Reports* 23, n° 3 (avril 2018): 667-72. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.083>.
- Cao, Yi-Qi, Qian Li, Peng-Fei Xia, Liu-Jing Wei, Ning Guo, Jian-Wei Li, et Shu-Guang Wang. « AraBAD Based Toolkit for Gene Expression and Metabolic Robustness Improvement in *Synechococcus Elongatus* ». *Scientific Reports* 7, n° 1 (22 décembre 2017): 18059. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17035-4>.
- Caputi, Lorenzo, et Eugenio Aprea. « Use of Terpenoids as Natural Flavouring Compounds in Food Industry ». *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture* 3, n° 1 (janvier 2011): 9-16. <https://doi.org/10.2174/2212798411103010009>.
- Carmo-Silva, A. Elizabete, et Michael E. Salvucci. « The Activity of RuBisCO's Molecular Chaperone, RuBisCO Activase, in Leaf Extracts ». *Photosynthesis Research* 108, n° 2 (1 septembre 2011): 143-55. <https://doi.org/10.1007/s11120-011-9667-8>.
- Carson, C. F., K. A. Hammer, et T. V. Riley. « Melaleuca alternifolia (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties ». *Clinical Microbiology Reviews* 19, n° 1 (janvier 2006): 50-62. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.1.50-62.2006>.
- Cassier-Chauvat, Corinne, Victoire Blanc-Garin, et Franck Chauvat. « Genetic, Genomics, and Responses to Stresses in Cyanobacteria: Biotechnological Implications ». *Genes* 12, n° 4 (avril 2021): 500. <https://doi.org/10.3390/genes12040500>.
- Cassier-Chauvat, Corinne, Théo Veaudor, et Franck Chauvat. « Comparative Genomics of DNA Recombination and Repair in Cyanobacteria: Biotechnological Implications ». *Frontiers in Microbiology* 7 (2016): 1809. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01809>.
- Cavanaugh. « Examining the Differential Effects of Natural and Synthetic Aromas of Lavender and Peppermint on Cognition, Mood, and Subjective Workload », 2013.
- Chardonnet, Solenne, Samer Sakr, Corinne Cassier-Chauvat, Pierre Le Maréchal, Franck Chauvat, Stéphane D. Lemaire, et Paulette Decottignies. « First Proteomic Study of S-Glutathionylation in Cyanobacteria ». *Journal of Proteome Research* 14, n° 1 (2 janvier 2015): 59-71. <https://doi.org/10.1021/pr500625a>.
- Chatow, Lior, Adi Nudel, Iris Neshet, David Hayo Hemo, Perri Rozenberg, Hanna Voropaev, Ilan Winkler, et al. « In Vitro Evaluation of the Activity of Terpenes and Cannabidiol against Human Coronavirus E229 ». *Life* 11, n° 4 (avril 2021): 290. <https://doi.org/10.3390/life11040290>.
- Chauvat, F., L. De Vries, A. Van der Ende, et G. A. Van Arkel. « A Host-Vector System for Gene Cloning in the Cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803 ». *Molecular and General Genetics MGG* 204, n° 1 (1 juillet 1986): 185-91. <https://doi.org/10.1007/BF00330208>.
- Chaves, Julie E., et Anastasios Melis. « Biotechnology of Cyanobacterial Isoprene Production ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 102, n° 15 (1 août 2018): 6451-58. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9093-3>.
- Cheah, Yi Ern, Yao Xu, Sarah A. Sacco, Piyoosh K. Babele, Amy O. Zheng, Carl Hirschie Johnson, et Jamey D. Young. « Systematic Identification and Elimination of Flux Bottlenecks in the Aldehyde Production Pathway of *Synechococcus Elongatus* PCC 7942 ». *Metabolic Engineering* 60 (1 juillet 2020): 56-65. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2020.03.007>.
- Chen, Anna H., Avi Robinson-Mosher, David F. Savage, Pamela A. Silver, et Jessica K. Polka. « The Bacterial Carbon-Fixing Organelle Is Formed by Shell Envelopment of Preassembled Cargo ». *PLoS One* 8, n° 9 (2013): e76127. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076127>.
- Chen, Pei-Hong, Hsien-Lin Liu, Yin-Ju Chen, Yi-Hsiang Cheng, Wei-Ling Lin, Chien-Hung Yeh, et Chuan-Hsiung Chang. « Enhancing CO₂ Bio-Mitigation by Genetic Engineering of Cyanobacteria ». *Energy & Environmental Science* 5, n° 8 (18 juillet 2012): 8318-27. <https://doi.org/10.1039/C2EE21124F>.
- Chenebault, Célia, Encarnación Diaz-Santos, Xavier Kammerscheit, Sigrid Görgen, Cristian Illoaia, Simona Streckaite, Andrew Gall, et al. « A Genetic Toolbox for the New Model Cyanobacterium *Cyanothece* PCC 7425: A Case Study for the Photosynthetic Production of Limonene ». *Frontiers in Microbiology* 11 (2020): 2335. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.586601>.
- Chin, Taejun, Yukiko Okuda, et Masahiko Ikeuchi. « Sorbitol Production and Optimization of Photosynthetic Supply in the Cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803 ». *Journal of Biotechnology* 276-277 (20 juin 2018): 25-33. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.04.004>.
- Choi, Sun Young, Hyun Jeong Lee, Jaeyeon Choi, Jiye Kim, Sang Jun Sim, Youngsoon Um, Yunje Kim, Taek Soon Lee, Jay D. Keasling, et Han Min Woo. « Photosynthetic conversion of CO₂ to farnesyl diphosphate-derived phytochemicals (amorpha-4,11-diene and squalene) by engineered cyanobacteria ». *Biotechnology for Biofuels* 9, n° 1 (22 septembre 2016): 202. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0617-8>.
- Chuck, C., et Joseph Donnelly. « The Compatibility of Potential Bioderived Fuels with Jet A-1 Aviation Kerosene ». *Applied Energy* 118 (1 avril 2014): 83-91. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.12.019>.
- Chwa, Jun-Won, Wook Jin Kim, Sang Jun Sim, Youngsoon Um, et Han Min Woo. « Engineering of a Modular and Synthetic Phosphoketolase Pathway for Photosynthetic Production of Acetone from CO₂ in *Synechococcus Elongatus* PCC 7942 under Light and Aerobic Condition ». *Plant Biotechnology Journal* 14, n° 8 (2016): 1768-76. <https://doi.org/10.1111/pbi.12536>.

- Ciddi, Veeresham, Venkatesh Srinivasan, et M. L. Shuler. « Elicitation of *Taxus* Sp. Cell Cultures for Production of Taxol ». *Biotechnology Letters* 17, n° 12 (1 décembre 1995): 1343-46. <https://doi.org/10.1007/BF00189223>.
- Cipak, Lubos, Lubica Grausova, Eva Miadokova, Ladislav Novotny, et Peter Rauko. « Dual activity of triterpenoids: Apoptotic versus antidifferentiation effects ». *Archives of toxicology* 80 (1 août 2006): 429-35. <https://doi.org/10.1007/s00204-006-0072-6>.
- Clasper, Steven, John S. Easterby, et Roy Powls. « Properties to Two High-Molecular-Mass Forms of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase from Spinach Leaf, One of Which Also Possesses Latent Phosphoribulokinase Activity ». *European Journal of Biochemistry* 202, n° 3 (1991): 1239-46. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1991.tb16496.x>.
- Colby, S. M., W. R. Alonso, E. J. Katahira, D. J. McGarvey, et R. Croteau. « 4S-Limonene Synthase from the Oil Glands of Spearmint (*Mentha Spicata*). CDNA Isolation, Characterization, and Bacterial Expression of the Catalytically Active Monoterpene Cyclase ». *The Journal of Biological Chemistry* 268, n° 31 (5 novembre 1993): 23016-24.
- Copeland. « Complete sequence of chromosome 1 of *Synechococcus elongatus* PCC 7942 », 2005.
- Cör, Darija, Željko Knez, et Maša Knez Hrnčič. « Antitumour, Antimicrobial, Antioxidant and Antiacetylcholinesterase Effect of *Ganoderma Lucidum* Terpenoids and Polysaccharides: A Review ». *Molecules (Basel, Switzerland)* 23, n° 3 (13 mars 2018): E649. <https://doi.org/10.3390/molecules23030649>.
- Cotton, Charles A. R., Burak V. Kabasakal, Nishat A. Miah, et James W. Murray. « Structure of the dual-function fructose-1,6/sedoheptulose-1,7-bisphosphatase from *Thermosynechococcus elongatus* bound with sedoheptulose-7-phosphate ». *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology Communications* 71, n° Pt 10 (23 septembre 2015): 1341-45. <https://doi.org/10.1107/S2053230X15016829>.
- Craig, M. H., R. W. Snow, et D. le Sueur. « A Climate-Based Distribution Model of Malaria Transmission in Sub-Saharan Africa ». *Parasitology Today (Personal Ed.)* 15, n° 3 (mars 1999): 105-11. [https://doi.org/10.1016/s0169-4758\(99\)01396-4](https://doi.org/10.1016/s0169-4758(99)01396-4).
- Cronan, John E., et Grover L. Waldrop. « Multi-Subunit Acetyl-CoA Carboxylases ». *Progress in Lipid Research* 41, n° 5 (1 septembre 2002): 407-35. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(02\)00007-3](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(02)00007-3).
- Cummins, Peter L., Babu Kannappan, et Jill E. Gready. « Directions for Optimization of Photosynthetic Carbon Fixation: RuBisCO's Efficiency May Not Be So Constrained After All ». *Frontiers in Plant Science* 9 (2018): 183. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00183>.
- Dadgostar, Porooshat. « Antimicrobial Resistance: Implications and Costs ». *Infection and Drug Resistance* 12 (2019): 3903-10. <https://doi.org/10.2147/IDR.S234610>.
- Dai, Wei, Muyuan Chen, Christopher Myers, Steven J. Ludtke, B. Montgomery Pettitt, Jonathan A. King, Michael F. Schmid, et Wah Chiu. « Visualizing Individual RuBisCO and its Assembly into Carboxysomes in Marine Cyanobacteria by Cryo-Electron Tomography ». *Journal of molecular biology* 430, n° 21 (19 octobre 2018): 4156-67. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.08.013>.
- Danishefsky, Samuel J., et Mark T. Bilodeau. « Glycals in Organic Synthesis: The Evolution of Comprehensive Strategies for the Assembly of Oligosaccharides and Glycoconjugates of Biological Consequence ». *Angewandte Chemie International Edition in English* 35, n° 13-14 (1996): 1380-1419. <https://doi.org/10.1002/anie.199613801>.
- Davies, Fiona K., Victoria H. Work, Alexander S. Beliaev, et Matthew C. Posewitz. « Engineering Limonene and Bisabolene Production in Wild Type and a Glycogen-Deficient Mutant of *Synechococcus* sp. PCC 7002 ». *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 2 (19 juin 2014): 21. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2014.00021>.
- De Porcellinis, Alice Jara, Hanne Nørgaard, Laura Maria Furelos Brey, Simon Matthé Erstad, Patrik R. Jones, Joshua L. Heazlewood, et Yumiko Sakuragi. « 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 ». *Metabolic Engineering* 47 (mai 2018): 170-83. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.03.001>.
- DeJong, Jason T., Michael B. Fritzsche, et Klaus Nüsslein. « Microbially Induced Cementation to Control Sand Response to Undrained Shear ». *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering* 132, n° 11 (novembre 2006): 1381-92. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)1090-0241\(2006\)132:11\(1381\)](https://doi.org/10.1061/(ASCE)1090-0241(2006)132:11(1381)).
- Dejtisakdi, W., et Stephen M. Miller. « Overexpression of Calvin cycle enzyme fructose 1,6-bisphosphatase in *Chlamydomonas reinhardtii* has a detrimental effect on growth », 2016. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2016.01.003>.
- Delobel, Arnaud, Emmanuelle Graciet, Simona Andreescu, Brigitte Gontero, Frédéric Halgand, et Olivier Laprévotte. « Mass Spectrometric Analysis of the Interactions between CP12, a Chloroplast Protein, and Metal Ions: A Possible Regulatory Role within a PRK/GAPDH/CP12 Complex ». *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 19, n° 22 (30 novembre 2005): 3379-88. <https://doi.org/10.1002/rcm.2192>.
- Dempo, Yudai, Erika Ohta, Yasumune Nakayama, Takeshi Bamba, et Eiichiro Fukusaki. « Molar-Based Targeted Metabolic Profiling of Cyanobacterial Strains with Potential for Biological Production ». *Metabolites* 4, n° 2 (juin 2014): 499-516. <https://doi.org/10.3390/metabo4020499>.
- Diaz-Chavez, Maria L., Jessie Moniodis, Lufiani L. Madilao, Sharon Jancsik, Christopher I. Keeling, Elizabeth L. Barbour, Emilio L. Ghisalberti, Julie A. Plummer, Christopher G. Jones, et Jörg Bohlmann. « Biosynthesis of Sandalwood Oil: *Santalum Album* CYP76F Cytochromes P450 Produce Santalols and Bergamotol ». *PLOS ONE* 8, n° 9 (18 septembre 2013): e75053. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075053>.
- Dienst, Dennis, Julian Wichmann, Oliver Mantovani, João S. Rodrigues, et Pia Lindberg. « High Density Cultivation for Efficient Sesquiterpenoid Biosynthesis in *Synechocystis* Sp. PCC 6803 ». *Scientific Reports* 10, n° 1 (3 avril 2020): 5932. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62681-w>.
- Ding, Fei, Meiling Wang, Shuoxin Zhang, et Xizhen Ai. « Changes in SBPase activity influence photosynthetic capacity, growth, and tolerance to chilling stress in transgenic tomato plants ». *Scientific Reports* 6 (2 septembre 2016): 32741. <https://doi.org/10.1038/srep32741>.

- Dismukes, G Charles, Damian Carrieri, Nicholas Bennette, Gennady M Ananyev, et Matthew C Posewitz. « Aquatic Phototrophs: Efficient Alternatives to Land-Based Crops for Biofuels ». *Current Opinion in Biotechnology* 19, n° 3 (juin 2008): 235-40. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.05.007>.
- Domain, Francis, Laetitia Houot, Franck Chauvat, et Corinne Cassier-Chauvat. « Function and Regulation of the Cyanobacterial Genes LexA, RecA and RuvB: LexA Is Critical to the Survival of Cells Facing Inorganic Carbon Starvation ». *Molecular Microbiology* 53, n° 1 (juillet 2004): 65-80. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04100.x>.
- Dunlop, Mary J., Zain Y. Dossani, Heather L. Szmids, Hou Cheng Chu, Taek Soon Lee, Jay D. Keasling, Masood Z. Hadi, et Aindrila Mukhopadhyay. « Engineering Microbial Biofuel Tolerance and Export Using Efflux Pumps ». *Molecular Systems Biology* 7, n° 1 (1 janvier 2011): 487. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.21>.
- Durall, Claudia, Pia Lindberg, Jianping Yu, et Peter Lindblad. « Increased ethylene production by overexpressing phosphoenolpyruvate carboxylase in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803 ». *Biotechnology for Biofuels* 13, n° 1 (28 janvier 2020): 16. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-1653-y>.
- Durall, Claudia, et Peter Lindblad. « Mechanisms of Carbon Fixation and Engineering for Increased Carbon Fixation in Cyanobacteria ». *Algal Research* 11 (1 septembre 2015): 263-70. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.07.002>.
- Durão, Paulo, Harald Aigner, Péter Nagy, Oliver Mueller-Cajar, F. Ulrich Hartl, et Manajit Hayer-Hartl. « Opposing Effects of Folding and Assembly Chaperones on Evolvability of RuBisCO ». *Nature Chemical Biology* 11, n° 2 (février 2015): 148-55. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1715>.
- Ehira, S. « Genome-Wide Expression Analysis of the Responses to Nitrogen Deprivation in the Heterocyst-Forming Cyanobacterium *Anabaena* Sp. Strain PCC 7120 ». *DNA Research* 10, n° 3 (1 janvier 2003): 97-113. <https://doi.org/10.1093/dnares/10.3.97>.
- Eisenhut, Marion, Wolfgang Ruth, Maya Haimovich, Hermann Bauwe, Aaron Kaplan, et Martin Hagemann. « The photorespiratory glycolate metabolism is essential for cyanobacteria and might have been conveyed endosymbiotically to plants ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, n° 44 (4 novembre 2008): 17199-204. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807043105>.
- El Tamer, Mazen K. *Molecular Regulation of Plant Monoterpene Biosynthesis in Relation to Fragrance*, 2002.
- Emlyn-Jones, Daniel, Fiona J. Woodger, G. Dean Price, et Spencer M. Whitney. « RbcX Can Function as a RuBisCO Chaperonin, But is Non-Essential in *Synechococcus* PCC7942 ». *Plant and Cell Physiology* 47, n° 12 (1 décembre 2006): 1630-40. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcp028>.
- Engels, Benedikt, Pia Dahm, et Stefan Jennewein. « Metabolic Engineering of Taxadiene Biosynthesis in Yeast as a First Step towards Taxol (Paclitaxel) Production ». *Metabolic Engineering* 10, n° 3 (1 mai 2008): 201-6. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2008.03.001>.
- Englund, Elias, Johan Andersen-Ranberg, Rui Miao, Björn Hamberger, et Pia Lindberg. « Metabolic Engineering of *Synechocystis* Sp. PCC 6803 for Production of the Plant Diterpenoid Manoyl Oxide ». *ACS Synthetic Biology* 4, n° 12 (18 décembre 2015): 1270-78. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.5b00070>.
- Englund, Elias, Kiyon Shabestary, Elton P. Hudson, et Pia Lindberg. « Systematic Overexpression Study to Find Target Enzymes Enhancing Production of Terpenes in *Synechocystis* PCC 6803, Using Isoprene as a Model Compound ». *Metabolic Engineering* 49 (1 septembre 2018): 164-77. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.07.004>.
- Erales, Jenny, Sabrina Lignon, et Brigitte Gontero. « CP12 from *Chlamydomonas reinhardtii*, a Permanent Specific “Chaperone-like” Protein of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase ». *Journal of Biological Chemistry* 284, n° 19 (mai 2009): 12735-44. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808254200>.
- Erales, Jenny, Malika Mekhalfi, Mireille Woudstra, et Brigitte Gontero. « Molecular Mechanism of NADPH-Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Regulation through the C-Terminus of CP12 in *Chlamydomonas reinhardtii* ». *Biochemistry* 50, n° 14 (12 avril 2011): 2881-88. <https://doi.org/10.1021/bi1020259>.
- Ershov, Yuri V., R. Raymond Gantt, Francis X. Cunningham, Jr., et Elisabeth Gantt. « Isoprenoid Biosynthesis in *Synechocystis* sp. Strain PCC6803 Is Stimulated by Compounds of the Pentose Phosphate Cycle but Not by Pyruvate or Deoxyxylulose-5-Phosphate ». *Journal of Bacteriology* 184, n° 18 (septembre 2002): 5045-51. <https://doi.org/10.1128/JB.184.18.5045-5051.2002>.
- Feller, U, I Anders, et K Demirevska. « DEGRADATION OF RUBISCO AND OTHER CHLOROPLAST PROTEINS UNDER ABIOTIC STRESS », s. d., 14.
- Feller, Urs, Iwona Anders, et Tadahiko Mae. « RuBisCOlytics: fate of RuBisCO after its enzymatic function in a cell is terminated ». *Journal of Experimental Botany* 59, n° 7 (1 mai 2008): 1615-24. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm242>.
- Feng, Lingling, Yao Sun, Hui Deng, Ding Li, Jian Wan, Xiaofeng Wang, Weiwei Wang, Xun Liao, Yanliang Ren, et Xiaopeng Hu. « Structural and Biochemical Characterization of Fructose-1,6/Sedoheptulose-1,7-Bisphosphatase from the Cyanobacterium *Synechocystis* Strain 6803 ». *The FEBS Journal* 281, n° 3 (2014): 916-26. <https://doi.org/10.1111/febs.12657>.
- Feng, Lingling, Kun Wang, Yang Li, Yanping Tan, Jin Kong, Hui Li, Yangsheng Li, et Yingguo Zhu. « Overexpression of SBPase Enhances Photosynthesis against High Temperature Stress in Transgenic Rice Plants ». *Plant Cell Reports* 26, n° 9 (septembre 2007): 1635-46. <https://doi.org/10.1007/s00299-006-0299-y>.
- Ferino, F., et F. Chauvat. « A promoter-probe vector-host system for the cyanobacterium, *Synechocystis* PCC6803. » *Gene*, 1989. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(89\)90499-X](https://doi.org/10.1016/0378-1119(89)90499-X).
- Field, null, null Behrenfeld, null Randerson, et null Falkowski. « Primary Production of the Biosphere: Integrating Terrestrial and Oceanic Components ». *Science (New York, N.Y.)* 281, n° 5374 (10 juillet 1998): 237-40. <https://doi.org/10.1126/science.281.5374.237>.
- Figge, R. M., C. Cassier-Chauvat, F. Chauvat, et R. Cerff. « Characterization and Analysis of an NAD(P)H Dehydrogenase Transcriptional Regulator Critical for the Survival of Cyanobacteria Facing Inorganic Carbon Starvation and Osmotic Stress ». *Molecular Microbiology* 39, n° 2 (janvier 2001): 455-69. <https://doi.org/10.1046/j.1365->

2958.2001.02239.x.

- Firdaus, Maulidan, Lucas Montero de Espinosa, et Michael A. R. Meier. « Terpene-Based Renewable Monomers and Polymers via Thiol–Ene Additions ». *Macromolecules* 44, n° 18 (27 septembre 2011): 7253-62. <https://doi.org/10.1021/ma201544e>.
- Forchhammer, Karl, et Khaled A Selim. « Carbon/nitrogen homeostasis control in cyanobacteria ». *FEMS Microbiology Reviews* 44, n° 1 (1 janvier 2020): 33-53. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz025>.
- Formighieri, Cinzia, et Melis, Anastasios. « A Phycocyanin-phellandrene Synthase Fusion Enhances Recombinant Protein Expression and β -Phellandrene (Monoterpene) Hydrocarbons Production in *Synechocystis* (Cyanobacteria) ». *Metabolic Engineering* 32 (novembre 2015): 116-24. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2015.09.010>.
- Formighieri, Cinzia, et Melis, Anastasios. « Cyanobacterial Production of Plant Essential Oils ». *Planta* 248, n° 4 (1 octobre 2018): 933-46. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2948-0>.
- Formighieri, Cinzia, et Melis, Anastasios « Regulation of β -Phellandrene Synthase Gene Expression, Recombinant Protein Accumulation, and Monoterpene Hydrocarbons Production in *Synechocystis* Transformants ». *Planta* 240, n° 2 (août 2014): 309-24. <https://doi.org/10.1007/s00425-014-2080-8>.
- Formighieri, Cinzia, et Melis, Anastasios. « Sustainable Heterologous Production of Terpene Hydrocarbons in Cyanobacteria ». *Photosynthesis Research* 130, n° 1-3 (décembre 2016): 123-35. <https://doi.org/10.1007/s1120-016-0233-2>.
- Galmozzi, Carla V., M. Jesús Fernández-Avila, José C. Reyes, Francisco J. Florencio, et M. Isabel Muro-Pastor. « The Ammonium-Inactivated Cyanobacterial Glutamine Synthetase I Is Reactivated *in Vivo* by a Mechanism Involving Proteolytic Removal of Its Inactivating Factors ». *Molecular Microbiology* 65, n° 1 (juillet 2007): 166-79. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05773.x>.
- Gandini, Alessandro. « The Irruption of Polymers from Renewable Resources on the Scene of Macromolecular Science and Technology ». *Green Chemistry* 13, n° 5 (4 mai 2011): 1061-83. <https://doi.org/10.1039/C0GC00789G>.
- Gao, Xiang, Fang Gao, Deng Liu, Hao Zhang, Xiaoqun Nie, et Chen Yang. « Engineering the Methylerythritol Phosphate Pathway in Cyanobacteria for Photosynthetic Isoprene Production from CO₂ ». *Energy & Environmental Science* 9, n° 4 (13 avril 2016): 1400-1411. <https://doi.org/10.1039/C5EE03102H>.
- Gao, Zhengxu, Hui Zhao, Zhimin Li, Xiaoming Tan, et Xuefeng Lu. « Photosynthetic Production of Ethanol from Carbon Dioxide in Genetically Engineered Cyanobacteria ». *Energy & Environmental Science* 5, n° 12 (14 novembre 2012): 9857-65. <https://doi.org/10.1039/C2EE22675H>.
- Genkov, Todor, Moritz Meyer, Howard Griffiths, et Robert J. Spreitzer. « Functional Hybrid RuBisCO Enzymes with Plant Small Subunits and Algal Large Subunits: Engineered RbcS cDNA for Expression in *Chlamydomonas* ». *The Journal of Biological Chemistry* 285, n° 26 (25 juin 2010): 19833-41. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.124230>.
- George, Kevin W, Mitchell G Thompson, Joonhoon Kim, Edward E K Baidoo, George Wang, Veronica Teixeira Benites, Christopher J Petzold, et al. « Integrated Analysis of Isopentenyl Pyrophosphate (IPP) Toxicity in Isoprenoid-Producing *Escherichia Coli* ». *Metabolic Engineering* 47 (1 mai 2018): 60-72. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.03.004>.
- Gershenzon, Jonathan, et Natalia Dudareva. « The Function of Terpene Natural Products in the Natural World ». *Nature Chemical Biology* 3, n° 7 (juillet 2007): 408-14. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2007.5>.
- Gibson, J. L., et F. R. Tabita. « Localization and Mapping of CO₂ Fixation Genes within Two Gene Clusters in *Rhodobacter Sphaeroides* ». *Journal of Bacteriology* 170, n° 5 (mai 1988): 2153-58. <https://doi.org/10.1128/jb.170.5.2153-2158.1988>.
- Giordano, Mario, John Beardall, et John A. Raven. « CONCENTRATING MECHANISMS IN ALGAE: Mechanisms, Environmental Modulation, and Evolution ». *Annual Review of Plant Biology* 56, n° 1 (juin 2005): 99-131. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144052>.
- Goeltenboth, Friedhelm, Gerhard Langenberger, et Peter Widmann. « Special Forest Ecosystems », 385-99, 2006. <https://doi.org/10.1016/B978-044452739-4/50018-8>.
- Goldstein, Joseph L., et Michael S. Brown. « Regulation of the Mevalonate Pathway ». *Nature* 343, n° 6257 (février 1990): 425-30. <https://doi.org/10.1038/343425a0>.
- Gontero, Brigitte, et Stephen C. Maberly. « An intrinsically disordered protein, CP12: jack of all trades and master of the Calvin cycle ». *Biochemical Society Transactions* 40, n° 5 (19 septembre 2012): 995-99. <https://doi.org/10.1042/BST20120097>.
- Gorelova, O. A., O. I. Baulina, U. Rasmussen, et O. A. Koksharova. « The Pleiotropic Effects of Ftn2 and Ftn6 Mutations in *Cyanobacterium Synechococcus* Sp. PCC 7942: An Ultrastructural Study ». *Protoplasma* 250, n° 4 (août 2013): 931-42. <https://doi.org/10.1007/s00709-012-0479-2>.
- Graciet, Emmanuelle, Pierre Gans, Norbert Wedel, Sandrine Lebreton, Jean-Michel Camadro, et Brigitte Gontero. « The Small Protein CP12: A Protein Linker for Supramolecular Complex Assembly ». *Biochemistry* 42, n° 27 (1 juillet 2003): 8163-70. <https://doi.org/10.1021/bi034474x>.
- Graciet, Emmanuelle, Sandrine Lebreton, Jean-Michel Camadro, et Brigitte Gontero. « Characterization of Native and Recombinant A4 Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase. Kinetic Evidence for Conformation Changes upon Association with the Small Protein CP12 ». *European Journal of Biochemistry* 270, n° 1 (janvier 2003): 129-36. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03372.x>.
- Greene, Dina N., Spencer M. Whitney, et Ichiro Matsumura. « Artificially evolved *Synechococcus* PCC6301 RuBisCO variants exhibit improvements in folding and catalytic efficiency ». *The Biochemical Journal* 404, n° Pt 3 (15 juin 2007): 517-24. <https://doi.org/10.1042/BJ20070071>.
- Greenspan, P, E P Mayer, et S D Fowler. « Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. » *Journal of Cell Biology* 100, n° 3 (1 mars 1985): 965-73. <https://doi.org/10.1083/jcb.100.3.965>.
- Griffin, Shane G., S. Grant Wyllie, Julie L. Markham, et David N. Leach. « The Role of Structure and Molecular Properties of

- Terpenoids in Determining Their Antimicrobial Activity ». *Flavour and Fragrance Journal* 14, n° 5 (1999): 322-32. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1026\(199909/10\)14:5<322::AID-FFJ837>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1026(199909/10)14:5<322::AID-FFJ837>3.0.CO;2-4).
- Groben, René, Dimitrios Kaloudas, Christine A. Raines, Bernard Offmann, Stephen C. Maberly, et Brigitte Gontero. « Comparative Sequence Analysis of CP12, a Small Protein Involved in the Formation of a Calvin Cycle Complex in Photosynthetic Organisms ». *Photosynthesis Research* 103, n° 3 (1 mars 2010): 183-94. <https://doi.org/10.1007/s11120-010-9542-z>.
- Guadalupe-Medina, Víctor, H. Wouter Wisselink, Marijke Ah Luttik, Erik de Hulster, Jean-Marc Daran, Jack T. Pronk, et Antonius Ja van Maris. « Carbon Dioxide Fixation by Calvin-Cycle Enzymes Improves Ethanol Yield in Yeast ». *Biotechnology for Biofuels* 6, n° 1 (29 août 2013): 125. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-125>.
- Gurrieri, Libero, Alessandra Del Giudice, Nicola Demitri, Giuseppe Falini, Nicolae Viorel Pavel, Mirko Zaffagnini, Maurizio Polentarutti, et al. « Arabidopsis and Chlamydomonas Phosphoribulokinase Crystal Structures Complete the Redox Structural Proteome of the Calvin–Benson Cycle ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116, n° 16 (16 avril 2019): 8048-53. <https://doi.org/10.1073/pnas.1820639116>.
- Hackenberg, Claudia, Johanna Hakanpää, Fei Cai, Svetlana Antonyuk, Caroline Eigner, Sven Meissner, Mikko Laitaoja, et al. « Structural and Functional Insights into the Unique CBS–CP12 Fusion Protein Family in Cyanobacteria ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115, n° 27 (3 juillet 2018): 7141-46. <https://doi.org/10.1073/pnas.1806668115>.
- Hagino, Kyoko, Ryo Onuma, Masanobu Kawachi, et Takeo Horiguchi. « Discovery of an Endosymbiotic Nitrogen-Fixing Cyanobacterium UCYN-A in Braarudosphaera Bigelowii (Prymnesiophyceae) ». *PLOS ONE* 8, n° 12 (4 décembre 2013): e81749. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081749>.
- Halfmann, Charles, Liping Gu, William Gibbons, et Ruanbao Zhou. « Genetically Engineering Cyanobacteria to Convert CO₂, Water, and Light into the Long-Chain Hydrocarbon Farnesene ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 98, n° 23 (1 décembre 2014): 9869-77. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6118-4>.
- Halfmann, Charles, Liping Gu, et Ruanbao Zhou. « Engineering Cyanobacteria for the Production of a Cyclic Hydrocarbon Fuel from CO₂ and H₂O ». *Green Chemistry* 16, n° 6 (27 mai 2014): 3175-85. <https://doi.org/10.1039/C3GC42591F>.
- Hallenbeck, P. L., et S. Kaplan. « Cloning of the Gene for Phosphoribulokinase Activity from Rhodospirillum rubrum and Its Expression in Escherichia Coli ». *Journal of Bacteriology* 169, n° 8 (août 1987): 3669-78. <https://doi.org/10.1128/jb.169.8.3669-3678.1987>.
- Han, Zuozhen, Dan Li, Hui Zhao, Huaxiao Yan, et Peiyuan Li. « Biomineralization of Carbonate Minerals Induced by the Halophilic Chromohalobacter israelensis under High Salt Concentrations: Implications for Natural Environments », 26 avril 2017. <https://doi.org/10.20944/preprints201703.0043.v2>.
- Hanahan, Douglas, Joel Jessee, et Fredric R. Bloom. « [4] Plasmid Transformation of Escherichia Coli and Other Bacteria ». In *Methods in Enzymology*, 204:63-113. Bacterial Genetic Systems. Academic Press, 1991. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(91\)04006-A](https://doi.org/10.1016/0076-6879(91)04006-A).
- Routledge & CRC Press. « Handbook of Photosynthesis ». Consulté le 24 août 2021. <https://www.routledge.com/Handbook-of-Photosynthesis/Pessarakli/p/book/9781482230734>.
- Hartman, Fred C., et Mark R. Harpel. « Structure, Function, Regulation, and Assembly of D-Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase ». *Annual Review of Biochemistry* 63, n° 1 (1994): 197-232. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.63.070194.001213>.
- Harvey, Benjamin G. High density/high cetane renewable fuel blends. United States US10113130B1, filed 29 février 2016, et issued 30 octobre 2018. <https://patents.google.com/patent/US10113130B1/en>.
- Hasunuma, Tomohisa, Mami Matsuda, Yuichi Kato, Christopher John Vavricka, et Akihiko Kondo. « Temperature Enhanced Succinate Production Concurrent with Increased Central Metabolism Turnover in the Cyanobacterium Synechocystis Sp. PCC 6803 ». *Metabolic Engineering* 48 (1 juillet 2018): 109-20. <https://doi.org/10.1016/j.mben.2018.05.013>.
- Hatano-Iwasaki, Aya, et Ken'ichi Ogawa. « Biomass Production Is Promoted by Increasing an Aldolase Undergoing Glutathionylation in Arabidopsis Thaliana », s. d., 8.
- Hauf, Waldemar, Björn Watzler, Nora Roos, Alexander Klotz, et Karl Forchhammer. « Photoautotrophic Polyhydroxybutyrate Granule Formation Is Regulated by Cyanobacterial Phasin PhaP in Synechocystis sp. Strain PCC 6803 ». *Applied and Environmental Microbiology* 81, n° 13 (juillet 2015): 4411-22. <https://doi.org/10.1128/AEM.00604-15>.
- Hauser, Thomas, Leonhard Popilka, F. Ulrich Hartl, et Manajit Hayer-Hartl. « Role of Auxiliary Proteins in RuBisCO Biogenesis and Function ». *Nature Plants* 1 (2 juin 2015): 15065. <https://doi.org/10.1038/nplants.2015.65>.
- Hayer-Hartl, Manajit, Andreas Bracher, et F. Ulrich Hartl. « The GroEL–GroES Chaperonin Machine: A Nano-Cage for Protein Folding ». *Trends in Biochemical Sciences*, Special Issue: 40 Years of TiBS, 41, n° 1 (1 janvier 2016): 62-76. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.07.009>.
- Hayes, John M., Harald Strauss, et Alan J. Kaufman. « The Abundance of ¹³C in Marine Organic Matter and Isotopic Fractionation in the Global Biogeochemical Cycle of Carbon during the Past 800 Ma ». *Chemical Geology* 161, n° 1 (30 septembre 1999): 103-25. [https://doi.org/10.1016/S0009-2541\(99\)00083-2](https://doi.org/10.1016/S0009-2541(99)00083-2).
- Hein, Silke, H. Tran, et A. Steinbüchel. « Synechocystis Sp. PCC6803 Possesses a Two-Component Polyhydroxyalkanoic Acid Synthase Similar to That of Anoxygenic Purple Sulfur Bacteria ». *Archives of Microbiology* 170, n° 3 (1 août 1998): 162-70. <https://doi.org/10.1007/s002030050629>.
- Hellier, Paul, Nicos Ladommatos, Robert Allan, Sorin Filip, et John Rogerson. « The Importance of Double Bond Position and Cis–Trans Isomerisation in Diesel Combustion and Emissions ». *Fuel* 105 (1 mars 2013): 477-89. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2012.08.007>.
- Hezari, M., N. G. Lewis, et R. Croteau. « Purification and Characterization of Taxa-4(5),11(12)-Diene Synthase from Pacific Yew (Taxus brevifolia) That Catalyzes the First Committed Step of Taxol Biosynthesis ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 322, n° 2 (1 octobre 1995): 437-44. <https://doi.org/10.1006/abbi.1995.1486>.
- « Highly efficient production of FAMES and β-farnesene from a two-stage biotransformation of waste cooking oils -

- Hihara, Yukako, Kintake Sonoike, et Masahiko Ikeuchi. « A Novel Gene, pmgA, Specifically Regulates Photosystem Stoichiometry in the Cyanobacterium *Synechocystis* Species PCC 6803 in Response to High Light 1 ». *Plant Physiology* 117, n° 4 (1 août 1998): 1205-16. <https://doi.org/10.1104/pp.117.4.1205>.
- Holton, Robert A., Carmen Somoza, Hyeong Baik Kim, Feng Liang, Ronald J. Biediger, P. Douglas Boatman, Mitsuru Shindo, Chase C. Smith, et Soekchan Kim. « First total synthesis of taxol. 1. Functionalization of the B ring ». *Journal of the American Chemical Society* 116, n° 4 (1 février 1994): 1597-98. <https://doi.org/10.1021/ja00083a066>.
- 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 Cyanothecce 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>
- Howard, Thomas P., Michael J. Fryer, Prashant Singh, Metodi Metodiev, Anna Lytovchenko, Toshihiro Obata, Alisdair R. Fernie, et al. « Antisense Suppression of the Small Chloroplast Protein CP12 in Tobacco Alters Carbon Partitioning and Severely Restricts Growth ». *Plant Physiology* 157, n° 2 (1 octobre 2011): 620-31. <https://doi.org/10.1104/pp.111.183806>.
- Howard, Thomas P., Metodi Metodiev, Julie C. Lloyd, et Christine A. Raines. « Thioredoxin-mediated reversible dissociation of a stromal multiprotein complex in response to changes in light availability ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, n° 10 (11 mars 2008): 4056-61. <https://doi.org/10.1073/pnas.0710518105>.
- Huang, Fang, Wen-Wen Kong, Yaqi Sun, Taiyu Chen, Gregory F. Dykes, Yong-Liang Jiang, et Lu-Ning Liu. « RuBisCO Accumulation Factor 1 (Raf1) Plays Essential Roles in Mediating RuBisCO Assembly and Carboxysome Biogenesis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117, n° 29 (21 juillet 2020): 17418-28. <https://doi.org/10.1073/pnas.2007990117>.
- Hudson, G. S., J. R. Evans, S. von Caemmerer, Y. B. Arvidsson, et T. J. Andrews. « Reduction of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase Content by Antisense RNA Reduces Photosynthesis in Transgenic Tobacco Plants ». *Plant Physiology* 98, n° 1 (janvier 1992): 294-302. <https://doi.org/10.1104/pp.98.1.294>.
- Huege, Jan, Jan Goetze, Doreen Schwarz, Hermann Bauwe, Martin Hagemann, et Joachim Kopka. « Modulation of the Major Paths of Carbon in Photorespiratory Mutants of *Synechocystis* ». *PLoS One* 6, n° 1 (21 janvier 2011): e16278. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016278>.
- Hui, Shao., Wenmin Huang, Luisana Avilan, Véronique Receveur-Bréchet, Carine Puppo, Rémy Puppo, Régine Lebrun, Brigitte Gontero, et Hélène Launay. « A new type of flexible CP12 protein in the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* ». *Cell Communication and Signaling* 19, no 1 (24 mars 2021): 38. <https://doi.org/10.1186/s12964-021-00718-x>.
- Husic, Diane W., H. David Husic, N. Edward Tolbert, et Clanton C. Black. « The oxidative photosynthetic carbon cycle or C2 cycle ». *Critical Reviews in Plant Sciences* 5, n° 1 (1 janvier 1987): 45-100. <https://doi.org/10.1080/07352688709382234>.
- Hyatt, David C., Buhyun Youn, Yuxin Zhao, Bindu Santhamma, Robert M. Coates, Rodney B. Croteau, et ChulHee Kang. « Structure of Limonene Synthase, a Simple Model for Terpenoid Cyclase Catalysis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, n° 13 (27 mars 2007): 5360-65. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700915104>.
- Immethun, Cheryl M., Allison G. Hoynes-O'Connor, Andrea Balassy, et Tae Seok Moon. « Microbial Production of Isoprenoids Enabled by Synthetic Biology ». *Frontiers in Microbiology* 4 (2013): 75. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00075>.
- Ishikawa, Satoru, Nobuo Suzui, Sayuri Ito-Tanabata, Satomi Ishii, Masato Igura, Tadashi Abe, Masato Kuramata, Naoki Kawachi, et Shu Fujimaki. « Real-Time Imaging and Analysis of Differences in Cadmium Dynamics in Rice Cultivars (*Oryza Sativa*) Using Positron-Emitting ¹⁰⁷Cd Tracer ». *BMC Plant Biology* 11, n° 1 (29 novembre 2011): 172. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-172>.
- Iwaki, T., K. Haranoh, N. Inoue, K. Kojima, R. Satoh, T. Nishino, S. Wada, et al. « Expression of Foreign Type I Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/ Oxygenase (EC 4.1.1.39) Stimulates Photosynthesis in Cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942 Cells ». *Photosynthesis Research* 88, n° 3 (juin 2006): 287-97. <https://doi.org/10.1007/s11120-006-9048-x>.
- Jacobsen, Jacob H., et Niels-Ulrik Frigaard. « Engineering of Photosynthetic Mannitol Biosynthesis from CO₂ in a Cyanobacterium ». *Metabolic Engineering* 21 (1 janvier 2014): 60-70. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2013.11.004>.
- Jansén, Tove, Dominic Kurian, Wuttinun Raksajit, Steve York, Michael Summers, et Pirkko Mäenpää. « Characterization of trophic changes and a functional oxidative pentose phosphate pathway in *Synechocystis* sp. PCC 6803 ». *Acta Physiol. Plant* 32 (1 mai 2009): 511-18. <https://doi.org/10.1007/s11738-009-0428-7>.
- Jeong, Byung-Cheon, Si Hoon Park, Kyoung Shin Yoo, Jeong Sheop Shin, et Hyun Kyu Song. « Change in Single Cystathionine β-Synthase Domain-Containing Protein from a Bent to Flat Conformation upon Adenosine Monophosphate Binding ». *Journal of Structural Biology* 183, no 1 (juillet 2013): 40-46. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2013.04.013>.
- Ji, Xing, Jolanda M. H. Verspagen, Dedmer B. Van de Waal, Björn Rost, et Jef Huisman. « Phenotypic plasticity of carbon fixation stimulates cyanobacterial blooms at elevated CO₂ ». *Science Advances* 6, n° 8 (19 février 2020): eaax2926. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax2926>.
- Jin, Haojie, Yan Wang, Adam Idoine, et Devaki Bhaya. « Construction of a Shuttle Vector Using an Endogenous Plasmid From the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 ». *Frontiers in Microbiology* 9 (24 juillet 2018): 1662. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01662>.
- John Andrews, T., et Spencer M. Whitney. « Manipulating Ribulose Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase in the Chloroplasts of Higher Plants ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 414, n° 2 (15 juin 2003): 159-69.

- [https://doi.org/10.1016/s0003-9861\(03\)00100-0](https://doi.org/10.1016/s0003-9861(03)00100-0).
- Johnson, Xenie, et Jean Alric. « Central Carbon Metabolism and Electron Transport in *Chlamydomonas Reinhardtii*: Metabolic Constraints for Carbon Partitioning between Oil and Starch ». *Eukaryotic Cell* 12, n° 6 (juin 2013): 776-93. <https://doi.org/10.1128/EC.00318-12>.
- Jones, Christopher G., Julie A. Plummer, et Elizabeth L. Barbour. « Non-Destructive Sampling of Indian Sandalwood (*Santalum album* L.) for Oil Content and Composition ». *Journal of Essential Oil Research* 19, n° 2 (1 mars 2007): 157-64. <https://doi.org/10.1080/10412905.2007.9699250>.
- Jongedijk, Esmer, Katarina Cankar, Markus Buchhaupt, Jens Schrader, Harro Bouwmeester, et Jules Beekwilder. « Biotechnological Production of Limonene in Microorganisms ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 100, n° 7 (avril 2016): 2927-38. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7337-7>.
- Juergens, Lisa Joy, Heinrich Worth, et Uwe R. Juergens. « New Perspectives for Mucolytic, Anti-Inflammatory and Adjunctive Therapy with 1,8-Cineole in COPD and Asthma: Review on the New Therapeutic Approach ». *Advances in Therapy* 37, n° 5 (1 mai 2020): 1737-53. <https://doi.org/10.1007/s12325-020-01279-0>.
- Jugreet, Sharmeen, Fawzi Mahomoodally, Gokhan Zengin, et Filippo Maggi. « Essential Oils as Natural Sources of Fragrance Compounds for Cosmetics and Cosmeceuticals ». *Molecules* 26 (27 janvier 2021). <https://doi.org/10.3390/molecules26030666>.
- Jung, Che-Hun, Fred C. Hartman, Tse-Yuan S. Lu, et Frank W. Larimer. « -Ribose-5-Phosphate Isomerase from Spinach: Heterologous Overexpression, Purification, Characterization, and Site-Directed Mutagenesis of the Recombinant Enzyme ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 373, n° 2 (janvier 2000): 409-17. <https://doi.org/10.1006/abbi.1999.1554>.
- Kaiser, Werner M. « Reversible Inhibition of the Calvin Cycle and Activation of Oxidative Pentose Phosphate Cycle in Isolated Intact Chloroplasts by Hydrogen Peroxide ». *Planta* 145, n° 4 (1979): 377-82.
- Kamennaya, Nina A., SeEun Ahn, Hanwool Park, Roy Bartal, Kenji A. Sasaki, Hoi-Ying Holman, et Christer Jansson. « Installing Extra Bicarbonate Transporters in the Cyanobacterium *Synechocystis* Sp. PCC6803 Enhances Biomass Production ». *Metabolic Engineering* 29 (mai 2015): 76-85. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2015.03.002>.
- Kammerscheit, Xavier, Franck Chauvat, et Corinne Cassier-Chauvat. « First in vivo Evidence That Glutathione-S-Transferase Operates in Photo-Oxidative Stress in Cyanobacteria ». *Frontiers in Microbiology* 10 (13 août 2019). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01899>.
- Kammerscheit, Xavier, Franck Chauvat, et Corinne Cassier-Chauvat. « From Cyanobacteria to Human, MAPEG-Type Glutathione-S-Transferases Operate in Cell Tolerance to Heat, Cold, and Lipid Peroxidation ». *Frontiers in Microbiology* 10 (2019): 2248. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02248>.
- Kane, H., J. Viil, B. Entsch, K. Paul, M. Morell, et T. Andrews. « An Improved Method for Measuring the CO₂/O₂ Specificity of Ribulosebiphosphate Carboxylase-Oxygenase », 1994. <https://doi.org/10.1071/PP9940449>.
- Kaneko, T., S. Sato, H. Kotani, A. Tanaka, E. Asamizu, Y. Nakamura, N. Miyajima, et al. « 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 Research* 3, n° 3 (1 janvier 1996): 109-36. <https://doi.org/10.1093/dnares/3.3.109>.
- Kaneko, Takakazu, Yasukazu Nakamura, Shigemi Sasamoto, Akiko Watanabe, Mitsuyo Kohara, Midori Matsumoto, Sayaka Shimpo, Manabu Yamada, et Satoshi Tabata. « Structural Analysis of Four Large Plasmids Harboring in a Unicellular Cyanobacterium, *Synechocystis* Sp. PCC 6803 ». *DNA Research: An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes* 10, n° 5 (31 octobre 2003): 221-28. <https://doi.org/10.1093/dnares/10.5.221>.
- Kanno, Masahiro, Austin L. Carroll, et Shota Atsumi. « Global Metabolic Rewiring for Improved CO₂ Fixation and Chemical Production in Cyanobacteria ». *Nature Communications* 8, n° 1 (13 mars 2017): 14724. <https://doi.org/10.1038/ncomms14724>.
- Kaplan, Aaron, et Leonora Reinhold. « CO₂ Concentrating Mechanisms in Photosynthetic Microorganisms ». *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50, n° 1 (1999): 539-70. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.539>.
- Kaplan, Aaron, Drora Zenvirth, Yehouda Marcus, Tatsuo Omata, et Teruo Ogawa. « Energization and Activation of Inorganic Carbon Uptake by Light in Cyanobacteria ». *Plant Physiology* 84, n° 2 (1 juin 1987): 210-13. <https://doi.org/10.1104/pp.84.2.210>.
- Karmali, A, A F Drake, et N Spencer. « Purification, properties and assay of D-ribulose 5-phosphate 3-epimerase from human erythrocytes. » *Biochemical Journal* 211, n° 3 (1 juin 1983): 617-23.
- Kaufman, Alan J., et Shuhai Xiao. « High CO₂ Levels in the Proterozoic Atmosphere Estimated from Analyses of Individual Microfossils ». *Nature* 425, n° 6955 (septembre 2003): 279-82. <https://doi.org/10.1038/nature01902>.
- Kauny, Jocelyn, et Pierre Sétif. « NADPH Fluorescence in the Cyanobacterium *Synechocystis* Sp. PCC 6803: A Versatile Probe for in Vivo Measurements of Rates, Yields and Pools ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1837, n° 6 (juin 2014): 792-801. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2014.01.009>.
- Kayser, Oliver, Albrecht Kiderlen, et SL Croft. « Natural Products as potential antiparasitic drugs. », 2002.
- Kellogg, Elizabeth A., et Nickolas D. Juliano. « The Structure and Function of RuBisCo and Their Implications for Systematic Studies ». *American Journal of Botany* 84, n° 3 (1997): 413-28. <https://doi.org/10.2307/2446015>.
- Kerfeld, Cheryl A, et Matthew R Melnicki. « Assembly, Function and Evolution of Cyanobacterial Carboxysomes ». *Current Opinion in Plant Biology* 31 (juin 2016): 66-75. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.03.009>.
- Kesselmeier, J., et M. Staudt. « Biogenic Volatile Organic Compounds (VOC): An Overview on Emission, Physiology and Ecology ». *Journal of Atmospheric Chemistry* 33, n° 1 (1 mai 1999): 23-88. <https://doi.org/10.1023/A:1006127516791>.
- Kessler, Andre, et Ian Baldwin. « Defensive Function of Herbivore-Induced Plant Volatile Emissions in Nature ». *Science* 291 (1 avril 2001): 2141-44. <https://doi.org/10.1126/science.291.5511.2141>.

- Khetkorn, Wanthanee, Aran Incharoensakdi, Peter Lindblad, et Saowarath Jantaro. « Enhancement of Poly-3-Hydroxybutyrate Production in *Synechocystis* Sp. PCC 6803 by Overexpression of Its Native Biosynthetic Genes ». *Bioresource Technology* 214 (1 août 2016): 761-68. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.014>.
- Khozai, Mahdi, Stuart Fisk, Tracy Lawson, Yves Gibon, Ronan Sulpice, Mark Stitt, Stephane C. Lefebvre, et Christine A. Raines. « Overexpression of Plastid Transketolase in Tobacco Results in a Thiamine Auxotrophic Phenotype ». *The Plant Cell* 27, n° 2 (1 février 2015): 432-47. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.131011>.
- Kim, Wook Jin, Sun-Mi Lee, Youngsoon Um, Sang Jun Sim, et Han Min Woo. « Development of SyneBrick Vectors As a Synthetic Biology Platform for Gene Expression in *Synechococcus Elongatus* PCC 7942 ». *Frontiers in Plant Science* 8 (2017): 293. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00293>.
- Kiyota, Hiroshi, Yukiko Okuda, Michiyo Ito, Masami Yokota Hirai, et Masahiko Ikeuchi. « Engineering of Cyanobacteria for the Photosynthetic Production of Limonene from CO₂ ». *Journal of Biotechnology* 185 (20 septembre 2014): 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.05.025>.
- Klanchui, Amornpan, Supapon Cheevadhanarak, Peerada Prommeenate, et Asawin Meechai. « Exploring Components of the CO₂-Concentrating Mechanism in Alkaliphilic Cyanobacteria Through Genome-Based Analysis ». *Computational and Structural Biotechnology Journal* 15 (2017): 340-50. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2017.05.001>.
- 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>
- Klughammer, Barbara, Dieter Sültemeyer, Murray R. Badger, et G. Dean Price. « The Involvement of NAD(P)H Dehydrogenase Subunits, NdhD3 and NdhF3, in High-Affinity CO₂ Uptake in *Synechococcus* Sp. PCC7002 Gives Evidence for Multiple NDH-1 Complexes with Specific Roles in Cyanobacteria ». *Molecular Microbiology* 32, n° 6 (1999): 1305-15. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01457.x>.
- Kobayashi, Daisuke, Masahiro Tamoi, Toshio Iwaki, Shigeru Shigeoka, et Akira Wadano. « Molecular Characterization and Redox Regulation of Phosphoribulokinase from the Cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942 ». *Plant and Cell Physiology* 44, n° 3 (15 mars 2003): 269-76. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcg048>.
- Koch, Moritz, Kenneth W. Berendzen, et Karl Forchhammer. « On the Role and Production of Polyhydroxybutyrate (PHB) in the Cyanobacterium *Synechocystis* Sp. PCC 6803 ». *Life* 10, n° 4 (avril 2020): 47. <https://doi.org/10.3390/life10040047>.
- Kochetov, G A. « Functional Flexibility of the Transketolase Molecule » 66, n° 10 (2001): 9.
- Köhler, Iris H., Ursula M. Ruiz-Vera, Andy VanLooche, Michell L. Thomey, Tom Clemente, Stephen P. Long, Donald R. Ort, et Carl J. Bernacchi. « Expression of cyanobacterial FBP/SBPase in soybean prevents yield depression under future climate conditions ». *Journal of Experimental Botany* 68, n° 3 (1 janvier 2017): 715-26. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw435>.
- Köksal, Mustafa, Ina Zimmer, Jörg-Peter Schnitzler, et David W. Christianson. « Structure of Isoprene Synthase Illuminates the Chemical Mechanism of Teragram Atmospheric Carbon Emission ». *Journal of Molecular Biology* 402, n° 2 (17 septembre 2010): 363-73. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.07.009>.
- Koksharova, O. « Genetic tools for cyanobacteria. Koksharova OA, Wolk CP. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2002 Feb;58(2):123-37. », 1 février 2002.
- Kolesinski, Piotr, Malgorzata Rydzy, et Andrzej Szczepaniak. « Is RAF1 Protein from *Synechocystis* Sp. PCC 6803 Really Needed in the Cyanobacterial RuBisCO Assembly Process? » *Photosynthesis Research* 132, n° 2 (1 mai 2017): 135-48. <https://doi.org/10.1007/s11120-017-0336-4>.
- Korte, Christoph, H. Kozur, Michael Joachimski, et Jan Veizer. « Strontium, oxygen and carbon isotope records of Permian seawater », Vol. 5, 2003.
- Kosobokova, E. N., K. A. Skrypnik, et V. S. Kosorukov. « Overview of Fusion Tags for Recombinant Proteins ». *Biochemistry. Biokhimiia* 81, n° 3 (mars 2016): 187-200. <https://doi.org/10.1134/S0006297916030019>.
- Kothe, Michael, Cristina Purcarea, Hedeel I. Guy, David R. Evans, et Susan G. Powers-Lee. « Direct demonstration of carbamoyl phosphate formation on the C-terminal domain of carbamoyl phosphate synthetase ». *Protein Science : A Publication of the Protein Society* 14, n° 1 (janvier 2005): 37-44. <https://doi.org/10.1110/ps.041041305>.
- Koushan, Keyvan, Raluca Rusovici, Wenhua Li, Lee R. Ferguson, et Kakarla V. Chalam. « The Role of Lutein in Eye-Related Disease ». *Nutrients* 5, n° 5 (22 mai 2013): 1823-39. <https://doi.org/10.3390/nu5051823>.
- Kreps, Sabine, Fabrice Ferino, Christine Mosrin, Jozef Gerits, Max Mergeay, et Pierre Thuriaux. « Conjugative Transfer and Autonomous Replication of a Promiscuous IncQ Plasmid in the Cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803 ». *Molecular and General Genetics MGG* 221, n° 1 (1 mars 1990): 129-33. <https://doi.org/10.1007/BF00280378>.
- Kris-Etherton, Penny M., William S. Harris, Lawrence J. Appel, et American Heart Association. Nutrition Committee. « Fish Consumption, Fish Oil, Omega-3 Fatty Acids, and Cardiovascular Disease ». *Circulation* 106, n° 21 (19 novembre 2002): 2747-57. <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000038493.65177.94>.
- Krüseemann, Jan L., Steffen N. Lindner, Marian Dempfle, Julian Widmer, Stephanie Arrivault, Marine Debacker, Hai He, et al. « Artificial Pathway Emergence in Central Metabolism from Three Recursive Phosphoketolase Reactions ». *The FEBS Journal* 285, n° 23 (2018): 4367-77. <https://doi.org/10.1111/febs.14682>.
- Kües, U, et U Stahl. « Replication of plasmids in gram-negative bacteria. » *Microbiological Reviews* 53, n° 4 (décembre 1989): 491-516.
- Kunert, Grit, Susanne Otto, Ursula S. R. Röse, Jonathan Gershenzon, et Wolfgang W. Weisser. « Alarm Pheromone Mediates Production of Winged Dispersal Morphs in Aphids: Alarm Pheromone Mediates Wing Induction ». *Ecology Letters* 8, n° 6 (28 avril 2005): 596-603. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2005.00754.x>.
- Kung, Yi, Bo-Chuan Hsieh, Tzong-Jih Cheng, Chen-Kang Huang, et Richie L. C. Chen. « Impedimetric Sensing of the Biodiesel Contents in Diesel Fuels with a Carbon Paste Electrode Pair ». *Fuel, Special Section: ACS Clean Coal*, 102 (1 décembre 2012): 724-28. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2012.06.023>.

- Kupriyanova, Elena, Arsenio Villarejo, Alexandra Markelova, Lyudmila Gerasimenko, Georgy Zavarzin, Göran Samuelsson, Dmitry Los, et Natalia Pronina. « Extracellular carbonic anhydrases of the stromatolite-forming cyanobacterium *Microcoleus chthonoplastes* ». *Microbiology (Reading, England)* 153 (1 mai 2007): 1149-56. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/003905-0>.
- Kurita, N, M Miyaji, R Kurane, Y Takahara, et K Ichimura. « TABLE 1. ANTIFUNGAL ACTIVITY OF ALDEHYDE COMPOUNDS FROM OILS OF HIGHER PLANTS », s. d., 7.
- Kushwaha, Hemant R., Anil K. Singh, Sudhir K. Sopory, Sneha L. Singla-Pareek, et Ashwani Pareek. « Genome wide expression analysis of CBS domain containing proteins in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh and *Oryza sativa* L. reveals their developmental and stress regulation ». *BMC Genomics* 10, n° 1 (28 avril 2009): 200. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-200>.
- Labarre, J, F Chauvat, et P Thuriaux. « Insertional mutagenesis by random cloning of antibiotic resistance genes into the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* strain PCC 6803. » *Journal of Bacteriology* 171, n° 6 (juin 1989): 3449-57.
- Lambert, D H, et S E Stevens. « Photoheterotrophic growth of *Agmenellum quadruplicatum* PR-6. » *Journal of Bacteriology* 165, n° 2 (février 1986): 654-56.
- Lan, Ethan I., et James C. Liao. « Metabolic Engineering of Cyanobacteria for 1-Butanol Production from Carbon Dioxide ». *Metabolic Engineering* 13, n° 4 (juillet 2011): 353-63. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2011.04.004>.
- Lange, B. Markus, Tamas Rujan, William Martin, et Rodney Croteau. « Isoprenoid Biosynthesis: The Evolution of Two Ancient and Distinct Pathways across Genomes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, n° 24 (21 novembre 2000): 13172-77. <https://doi.org/10.1073/pnas.240454797>.
- Langenheim, J. H. « Higher Plant Terpenoids: A Phytocentric Overview of Their Ecological Roles ». *Journal of Chemical Ecology* 20, n° 6 (juin 1994): 1223-80. <https://doi.org/10.1007/BF02059809>.
- Leavell, Michael D, Derek J McPhee, et Chris J Paddon. « Developing Fermentative Terpenoid Production for Commercial Usage ». *Current Opinion in Biotechnology, Food biotechnology • Plant biotechnology*, 37 (1 février 2016): 114-19. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.10.007>.
- Lee, Eun-Ju, Yoon-Jung Moon, Hyun Oh, Su-Jin Kim, Young-Ho Chung, Hee-Seok Kweon, et Youn-Joong Kim. « Observations of the Cyanobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 using Cryo-Methods and Cryo-SEM ». *Applied Microscopy* 39 (1 janvier 2009).
- Lee, G. J., K. A. McDonald, et B. A. McFadden. « Leucine 332 Influences the CO₂/O₂ Specificity Factor of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase from *Anacystis Nidulans* ». *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 2, n° 7 (juillet 1993): 1147-54. <https://doi.org/10.1002/pro.5560020709>.
- Lee, Hyun Jeong, Jiwon Lee, Sun-Mi Lee, Youngsoon Um, Yunje Kim, Sang Jun Sim, Jong-il Choi, et Han Min Woo. « Direct Conversion of CO₂ to α -Farnesene Using Metabolically Engineered *Synechococcus elongatus* PCC 7942 ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65, n° 48 (6 décembre 2017): 10424-28. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b03625>.
- Lefebvre, Stephane, Tracy Lawson, Oksana V. Zakhleniuk, Julie C. Lloyd, Christine A. Raines, et Mike Fryer. « Increased Sedoheptulose-1,7-Bisphosphatase Activity in Transgenic Tobacco Plants Stimulates Photosynthesis and Growth from an Early Stage in Development ». *Plant Physiology* 138, n° 1 (mai 2005): 451-60. <https://doi.org/10.1104/pp.104.055046>.
- Li, J., Margaret Oliver, I., Cam, N., Boudier, T., Blondeau, M., Leroy, E., Cosmidis, J., Skouri-Panet, F., Guigner, J.-M., Féraud, 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>
- Liang, Feiyan, Elias Englund, Pia Lindberg, et Peter Lindblad. « Engineered Cyanobacteria with Enhanced Growth Show Increased Ethanol Production and Higher Biofuel to Biomass Ratio ». *Metabolic Engineering* 46 (mars 2018): 51-59. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.02.006>.
- Liang, Feiyan, et P. Lindblad. « *Synechocystis* PCC 6803 overexpressing RuBisCO grow faster with increased photosynthesis ». *Metabolic engineering communications*, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.meteno.2017.02.002>.
- Liang, Feiyan, et Peter Lindblad. « Effects of Overexpressing Photosynthetic Carbon Flux Control Enzymes in the Cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803 ». *Metabolic Engineering* 38 (novembre 2016): 56-64. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2016.06.005>.
- Lichtenthaler, Hartmut K. « The 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis in Plants ». *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50, n° 1 (1999): 47-65. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.47>.
- Lin, Po-Cheng, Rajib Saha, Fuzhong Zhang, et Himadri B. Pakrasi. « Metabolic Engineering of the Pentose Phosphate Pathway for Enhanced Limonene Production in the Cyanobacterium *Synechocystis* Sp. PCC 6803 ». *Scientific Reports* 7, n° 1 (13 décembre 2017): 17503. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17831-y>.
- Lin, Po-Cheng, Fuzhong Zhang, et Himadri B. Pakrasi. « Enhanced Limonene Production in a Fast-Growing Cyanobacterium through Combinatorial Metabolic Engineering ». *Metabolic Engineering Communications* 12 (juin 2021): e00164. <https://doi.org/10.1016/j.mec.2021.e00164>.
- Lindberg, Pia, Sungsoo Park, et Anastasios Melis. « Engineering a Platform for Photosynthetic Isoprene Production in Cyanobacteria, Using *Synechocystis* as the Model Organism ». *Metabolic Engineering* 12, n° 1 (1 janvier 2010): 70-79. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2009.10.001>.
- Liran, Oded, Eli Shemesh, et Dan Tchernov. « Investigation into the CO₂ Concentrating Step Rates within the Carbon Concentrating Mechanism of *Synechocystis* Sp. PCC6803 at Various PH and Light Intensities Reveal Novel Mechanistic Properties ». *Algal Research* 33 (1 juillet 2018): 419-29. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.06.020>.
- Liu, Chong, Brendan C. Colón, Marika Ziesack, Pamela A. Silver, et Daniel G. Nocera. « Water Splitting–Biosynthetic System

- with CO₂ Reduction Efficiencies Exceeding Photosynthesis ». *Science* 352, n° 6290 (3 juin 2016): 1210-13. <https://doi.org/10.1126/science.aaf5039>.
- Liu, Cuimin, Anna L. Young, Amanda Starling-Windhof, Andreas Bracher, Sandra Saschenbrecker, Bharathi Vasudeva Rao, Karnam Vasudeva Rao, et al. « Coupled Chaperone Action in Folding and Assembly of Hexadecameric RuBisCO ». *Nature* 463, n° 7278 (14 janvier 2010): 197-202. <https://doi.org/10.1038/nature08651>.
- Liu, Lu-Ning. « Distribution and Dynamics of Electron Transport Complexes in Cyanobacterial Thylakoid Membranes ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, Organization and dynamics of bioenergetic systems in bacteria, 1857, n° 3 (1 mars 2016): 256-65. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.11.010>.
- Liu, Xiaoli, Mingsheng Dong, Xiaohong Chen, Mei Jiang, Xin Lv, et Jianzhong Zhou. « Antimicrobial Activity of an Endophytic Xylaria Sp.YX-28 and Identification of Its Antimicrobial Compound 7-Amino-4-Methylcoumarin ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 78, n° 2 (février 2008): 241-47. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1305-1>.
- Long, Byron H, Joan M Carboni, Arthur J Wasserman, Laurie A Cornell, Anna Maria Casazza, Paul R Jensen, Thomas Lindel, William Fenica, et Craig R Fairchild. « Eleutherobin, a Novel Cytotoxic Agent That Induces Tubulin Polymerization, Is Similar to Paclitaxel (Taxol®) », 1998, 6.
- López-Calcagno, Patricia E., Thomas P. Howard, et Christine A. Raines. « The CP12 Protein Family: A Thioredoxin-Mediated Metabolic Switch? » *Frontiers in Plant Science* 5 (2014): 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00009>.
- López-Calcagno, Patricia, Amani Omar Abuzaid, Tracy Lawson, et Christine Anne Raines. « Arabidopsis CP12 mutants have reduced levels of phosphoribulokinase and impaired function of the Calvin–Benson cycle ». *Journal of Experimental Botany* 68, n° 9 (1 avril 2017): 2285-98. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx084>.
- Lücker, Joost, Mazen K. El Tamer, Wilfried Schwab, Francel W. A. Verstappen, Linus H. W. van der Plas, Harro J. Bouwmeester, et Harrie A. Verhoeven. « Monoterpene Biosynthesis in Lemon (Citrus Limon). cDNA Isolation and Functional Analysis of Four Monoterpene Synthases ». *European Journal of Biochemistry* 269, n° 13 (juillet 2002): 3160-71. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.02985.x>.
- Ludwig, Marcus, et Donald A. Bryant. « Synechococcus sp. Strain PCC 7002 Transcriptome: Acclimation to Temperature, Salinity, Oxidative Stress, and Mixotrophic Growth Conditions ». *Frontiers in Microbiology* 3 (11 octobre 2012): 354. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00354>.
- Luimstra, Veerle M., J. Merijn Schuurmans, Antonie M. Verschoor, Klaas J. Hellingwerf, Jef Huisman, et Hans C. P. Matthijs. « Blue Light Reduces Photosynthetic Efficiency of Cyanobacteria through an Imbalance between Photosystems I and II ». *Photosynthesis Research* 138, n° 2 (1 novembre 2018): 177-89. <https://doi.org/10.1007/s1120-018-0561-5>.
- Luinenburg, I., et J. R. Coleman. « A requirement for phosphoenolpyruvate carboxylase in the cyanobacterium Synechococcus PCC 7942 ». *Archives of Microbiology*, 1990. <https://doi.org/10.1007/BF00245230>.
- Lv, Jiajia, Yuefei Wang, Chengyu Zhang, Shengping You, Wei Qi, Rongxin Su, et Zhimin He. « Highly Efficient Production of FAMES and β -Farnesene from a Two-Stage Biotransformation of Waste Cooking Oils ». *Energy Conversion and Management* 199 (1 novembre 2019): 112001. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2019.112001>.
- Ma, Weimin, Dingji Shi, Quanxi Wang, Lanzhen Wei, et Haibao Chen. « Exogenous Expression of the Wheat Chloroplastic Fructose-1,6-Bisphosphatase Gene Enhances Photosynthesis in the Transgenic Cyanobacterium, Anabaena PCC7120 ». *Journal of Applied Phycology* 17, n° 3 (1 mai 2005): 273-80. <https://doi.org/10.1007/s10811-005-4850-y>.
- Ma, Weimin, Lanzhen Wei, Quanxi Wang, Dingji Shi, et Haibao Chen. « Increased Activity of the Non-Regulated Enzymes Fructose-1,6-Bisphosphate Aldolase and Triosephosphate Isomerase in Anabaena Sp. Strain PCC 7120 Increases Photosynthetic Yield ». *Journal of Applied Phycology* 19, n° 3 (29 novembre 2006): 207. <https://doi.org/10.1007/s10811-006-9125-8>.
- MacCready, Joshua S., Lisa Tran, Joseph L. Basalla, Pusparanee Hakim, et Anthony G. Vecchiarelli. « The McdAB System Positions α -Carboxysomes in Proteobacteria », 11 août 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.08.11.246918>.
- Maeda, Shin-ichi, Murray R. Badger, et G. Dean Price. « Novel Gene Products Associated with NdhD3/D4-Containing NDH-1 Complexes Are Involved in Photosynthetic CO₂ Hydration in the Cyanobacterium, Synechococcus Sp. PCC7942 ». *Molecular Microbiology* 43, n° 2 (2002): 425-35. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02753.x>.
- Mahizan, Nik Amirah, Shun-Kai Yang, Chew-Li Moo, Adelene Ai-Lian Song, Chou-Min Chong, Chun-Wie Chong, Aisha Abushelaibi, Swee-Hua Erin Lim, et Kok-Song Lai. « Terpene Derivatives as a Potential Agent against Antimicrobial Resistance (AMR) Pathogens ». *Molecules (Basel, Switzerland)* 24, n° 14 (19 juillet 2019): E2631. <https://doi.org/10.3390/molecules24142631>.
- Makowka, Alexander, Lars Nichelmann, Dennis Schulze, Katharina Spengler, Christoph Wittmann, Karl Forchhammer, et Kirstin Gutekunst. « Glycolytic Shunts Replenish the Calvin–Benson–Bassham Cycle as Anaplerotic Reactions in Cyanobacteria ». *Molecular Plant, Photobiology*, 13, n° 3 (2 mars 2020): 471-82. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.02.002>.
- Mangan, Niall M., Avi Flamholz, Rachel D. Hood, Ron Milo, et David F. Savage. « PH Determines the Energetic Efficiency of the Cyanobacterial CO₂ Concentrating Mechanism ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113, n° 36 (6 septembre 2016): E5354-62. <https://doi.org/10.1073/pnas.1525145113>.
- Mangan, Stephanie, Rod W. Wilson, Helen S. Findlay, et Ceri N. Lewis. « Seawater Carbonate Chemistry and Acid-Base Physiology over Tidal Periods in the Mussel *Mytilus Edulis* ». PANGAEA, 2 septembre 2019. <https://doi.org/10.1594/PANGAEA.922198>.
- Marcus, Yehouda, Hagit Altman-Gueta, Yael Wolff, et Michael Gurevitz. « RuBisCO mutagenesis provides new insight into limitations on photosynthesis and growth in Synechocystis PCC6803 ». *Journal of Experimental Botany* 62, n° 12 (1 août 2011): 4173-82. <https://doi.org/10.1093/jxb/err116>.
- Marraccini, Pierre, Stéphane Bulteau, Corinne Cassier-Chauvat, Pierre Mermet-Bouvier, et Franck Chauvat. « A conjugative

- plasmid vector for promoter analysis in several cyanobacteria of the genera *Synechococcus* and *Synechocystis* ». *Plant molecular biology* 23 (1 décembre 1993): 905-9. <https://doi.org/10.1007/BF00021546>.
- Marri, Lucia, Paolo Trost, Paolo Pupillo, et Francesca Sparla. « Reconstitution and Properties of the Recombinant Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase/CP12/Phosphoribulokinase Supramolecular Complex of *Arabidopsis* ». *Plant Physiology* 139, n° 3 (novembre 2005): 1433-43. <https://doi.org/10.1104/pp.105.068445>.
- Marri, Lucia, Paolo Trost, Xavier Trivelli, Leonardo Gonnelli, Paolo Pupillo, et Francesca Sparla. « Spontaneous Assembly of Photosynthetic Supramolecular Complexes as Mediated by the Intrinsically Unstructured Protein CP12 ». *Journal of Biological Chemistry* 283, n° 4 (janvier 2008): 1831-38. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705650200>.
- Marri, Lucia, Mirko Zaffagnini, Valérie Collin, Emmanuelle Issakidis-Bourguet, Stéphane D. Lemaire, Paolo Pupillo, Francesca Sparla, Myroslawa Miginiac-Maslow, et Paolo Trost. « Prompt and Easy Activation by Specific Thioredoxins of Calvin Cycle Enzymes of *Arabidopsis Thaliana* Associated in the GAPDH/CP12/PRK Supramolecular Complex ». *Molecular Plant* 2, n° 2 (1 mars 2009): 259-69. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp061>.
- Marsden, W. J. N., et G. A. YR 1984 Codd. « Purification and Molecular and Catalytic Properties of Phosphoribulokinase from the Cyanobacterium *Chlorogloeopsis fritschii* ». *Microbiology* 130, n° 4 (s. d.): 999-1006. <https://doi.org/10.1099/00221287-130-4-999>.
- Martin, Vincent J J, Douglas J Pitera, Sydnor T Withers, Jack D Newman, et Jay D Keasling. « Engineering a Mevalonate Pathway in *Escherichia Coli* for Production of Terpenoids ». *Nature Biotechnology* 21, n° 7 (juillet 2003): 796-802. <https://doi.org/10.1038/nbt833>.
- Masson Delmotte et al., « IPCC, 2021: Summary for Policymakers. In: Climate Change 2021: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change ». Cambridge University Press. In Press., s. d.
- Matsudaira, Akiko, Yasushi Hoshino, Kazuma Uesaka, Nobuyuki Takatani, Tatsuo Omata, et Yoshihiro Usuda. « Production of Glutamate and Stereospecific Flavors, (S)-Linalool and (+)-Valencene, by *Synechocystis* Sp. PCC6803 ». *Journal of Bioscience and Bioengineering* 130, n° 5 (1 novembre 2020): 464-70. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2020.06.013>.
- Matsumura, Hiroyoshi, Akihiro Kai, Takayuki Maeda, Masahiro Tamoi, Atsuko Satoh, Haruka Tamura, Mika Hirose, et al. « Structure Basis for the Regulation of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Activity via the Intrinsically Disordered Protein CP12 ». *Structure* 19, n° 12 (7 décembre 2011): 1846-54. <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.08.016>.
- Matsumura, Hiroyoshi, Keita Shiomi, Akito Yamamoto, Yuri Taketani, Noriyuki Kobayashi, Takuya Yoshizawa, Shun-ichi Tanaka, Hiroki Yoshikawa, Masaki Endo, et Hiroshi Fukayama. « Hybrid RuBisCO with Complete Replacement of Rice RuBisCO Small Subunits by Sorghum Counterparts Confers C4 Plant-like High Catalytic Activity ». *Molecular Plant* 13, n° 11 (2 novembre 2020): 1570-81. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.08.012>.
- Maurady, Amal, Alexander Zdanov, Danielle de Moissac, Danielle Beaudry, et Jurgen Sygusch. « A Conserved Glutamate Residue Exhibits Multifunctional Catalytic Roles in D-Fructose-1,6-bisphosphate Aldolases ». *The Journal of biological chemistry* 277 (1 mars 2002): 9474-83. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107600200>.
- McEwen, Jordan T., Iara M. P. Machado, Michael R. Connor, et Shota Atsumi. « Engineering *Synechococcus elongatus* PCC 7942 for Continuous Growth under Diurnal Conditions ». *Applied and Environmental Microbiology* 79, n° 5 (mars 2013): 1668-75. <https://doi.org/10.1128/AEM.03326-12>.
- McFarlane, Ciaran R., Nita R. Shah, Burak V. Kabasakal, Blanca Echeverria, Charles A. R. Cotton, Doryen Bubeck, et James W. Murray. « Structural Basis of Light-Induced Redox Regulation in the Calvin-Benson Cycle in Cyanobacteria ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116, n° 42 (15 octobre 2019): 20984-90. <https://doi.org/10.1073/pnas.1906722116>.
- McGeady, Paul, Daniel L. Wansley, et David A. Logan. « Carvone and Perillaldehyde Interfere with the Serum-Induced Formation of Filamentous Structures in *Candida Albicans* at Substantially Lower Concentrations than Those Causing Significant Inhibition of Growth ». *Journal of Natural Products* 65, n° 7 (juillet 2002): 953-55. <https://doi.org/10.1021/np010621l>.
- McKay, R. Michael L., Sarah P. Gibbs, et George S. Espie. « Effect of Dissolved Inorganic Carbon on the Expression of Carboxysomes, Localization of RuBisCO and the Mode of Inorganic Carbon Transport in Cells of the Cyanobacterium *Synechococcus* UTEX 625 ». *Archives of Microbiology* 159, n° 1 (1 janvier 1993): 21-29. <https://doi.org/10.1007/BF00244259>.
- Melis, Anastasios. « Carbon Partitioning in Photosynthesis ». *Current Opinion in Chemical Biology, Next generation therapeutics • Energy*, 17, n° 3 (1 juin 2013): 453-56. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.03.010>.
- Mermet-Bouvier, Pierre, Corinne Cassier-Chauvat, Pierre Marraccini, et Franck Chauvat. « Transfer and Replication of RSF1010-Derived Plasmids in Several Cyanobacteria of the Genera *Synechocystis* and *Synechococcus* ». *Current Microbiology* 27, n° 6 (1 décembre 1993): 323-27. <https://doi.org/10.1007/BF01568955>.
- Mermet-Bouvier, Pierre, et Franck Chauvat. « A Conditional Expression Vector for the Cyanobacteria *Synechocystis* Sp. Strains PCC6803 and PCC6714 or *Synechococcus* Sp. Strains PCC7942 and PCC6301 ». *Current Microbiology* 28, n° 3 (1 mars 1994): 145-48. <https://doi.org/10.1007/BF01571055>.
- Mewalal, Ritesh, Durgesh K. Rai, David Kainer, Feng Chen, Carsten Kùllheim, Gary F. Peter, et Gerald A. Tuskan. « Plant-Derived Terpenes: A Feedstock for Specialty Biofuels ». *Trends in Biotechnology* 35, n° 3 (mars 2017): 227-40. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.08.003>.
- Meylemans, Heather A., Lawrence C. Baldwin, et Benjamin G. Harvey. « Low-Temperature Properties of Renewable High-Density Fuel Blends ». *Energy & Fuels* 27, n° 2 (21 février 2013): 883-88. <https://doi.org/10.1021/ef301608z>.
- Meylemans, Heather A., Roxanne L. Quintana, et Benjamin G. Harvey. « Efficient Conversion of Pure and Mixed Terpene Feedstocks to High Density Fuels ». *Fuel* 97 (1 juillet 2012): 560-68. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2012.01.062>.
- Michelet, Laure, Mirko Zaffagnini, Vincent Massot, Eliane Keryer, Hélène Vanacker, Myroslawa Miginiac-Maslow, Emmanuelle Issakidis-Bourguet, et Stéphane D. Lemaire. « Thioredoxins, Glutaredoxins, and Glutathionylation:

- New Crosstalks to Explore ». *Photosynthesis Research* 89, n° 2 (1 septembre 2006): 225-45. <https://doi.org/10.1007/s11120-006-9096-2>.
- Michelet, Laure, Mirko Zaffagnini, Samuel Morisse, Francesca Sparla, María Esther Pérez-Pérez, Francesco Francia, Antoine Danon, et al. « Redox regulation of the Calvin-Benson cycle: something old, something new ». *Frontiers in Plant Science* 4 (2013): 470. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00470>.
- Milanez, S., R. J. Mural, et F. C. Hartman. « Roles of Cysteine Residues of Phosphoribulokinase as Examined by Site-Directed Mutagenesis ». *Journal of Biological Chemistry* 266, n° 16 (5 juin 1991): 10694-99. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)99279-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)99279-3).
- Millo, Federico, Luciano Rolando, Rocco Fuso, et Fabio Mallamo. « Real CO₂ Emissions Benefits and End User's Operating Costs of a Plug-in Hybrid Electric Vehicle ». *Applied Energy* 114 (1 février 2014): 563-71. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.09.014>.
- Miyagawa, Y., M. Tamoi, et S. Shigeoka. « Overexpression of a Cyanobacterial Fructose-1,6-/Sedoheptulose-1,7-Bisphosphatase in Tobacco Enhances Photosynthesis and Growth ». *Nature Biotechnology* 19, n° 10 (octobre 2001): 965-69. <https://doi.org/10.1038/nbt1001-965>.
- Moparthi, Satish Babu, Gabriel Thieulin-Pardo, Pascal Mansuelle, Hervé Rigneault, Brigitte Gontero, et Jérôme Wenger. « Conformational Modulation and Hydrodynamic Radii of CP12 Protein and Its Complexes Probed by Fluorescence Correlation Spectroscopy ». *FEBS Journal* 281, n° 14 (juillet 2014): 3206-17. <https://doi.org/10.1111/febs.12854>.
- Moparthi, Satish Babu, Gabriel Thieulin-Pardo, Juan de Torres, Petru Ghenuche, Brigitte Gontero, et Jérôme Wenger. « FRET Analysis of CP12 Structural Interplay by GAPDH and PRK ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 458, n° 3 (13 mars 2015): 488-93. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.01.135>.
- Morcia, C., M. Malnati, et V. Terzi. « In Vitro Antifungal Activity of Terpinen-4-Ol, Eugenol, Carvone, 1,8-Cineole (Eucalyptol) and Thymol against Mycotoxigenic Plant Pathogens ». *Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment* 29, n° 3 (2012): 415-22. <https://doi.org/10.1080/19440049.2011.643458>.
- Morrissey, J. P., et A. E. Osbourn. « Fungal Resistance to Plant Antibiotics as a Mechanism of Pathogenesis ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews*: *MMBR* 63, n° 3 (septembre 1999): 708-24. <https://doi.org/10.1128/MMBR.63.3.708-724.1999>.
- Mueller-Cajar, Oliver, Mathias Stotz, et Andreas Bracher. « Maintaining photosynthetic CO₂ fixation via protein remodelling: the RuBisCO activases ». *Photosynthesis research* 119 (31 mars 2013). <https://doi.org/10.1007/s11120-013-9819-0>.
- Mullineaux, Conrad W., Mark J. Tobin, et Gareth R. Jones. « Mobility of Photosynthetic Complexes in Thylakoid Membranes ». *Nature* 390, n° 6658 (novembre 1997): 421-24. <https://doi.org/10.1038/37157>.
- Nagy, Csaba, Kati Thiel, Edita Mulaku, Henna Mustila, Paula Tamagnini, Eva-Mari Aro, Catarina C. Pacheco, et Pauli Kallio. « Comparison of alternative integration sites in the chromosome and the native plasmids of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 in respect to expression efficiency and copy number ». *Microbial Cell Factories* 20 (10 juillet 2021): 130. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01622-2>.
- Nakahara, Ken, Hiroshi Yamamoto, Chikahiro Miyake, et Akiho Yokota. « Purification and Characterization of Class-I and Class-II Fructose-1,6-bisphosphate Aldolases from the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 ». *Plant and Cell Physiology* 44, n° 3 (15 mars 2003): 326-33. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcg044>.
- Namakoshi, Katsunori, Tubasa Nakajima, Katsunori Yoshikawa, Yoshihiro Toya, et Hiroshi Shimizu. « Combinatorial Deletions of GlcC and PhaCE Enhance Ethanol Production in *Synechocystis* Sp. PCC 6803 ». *Journal of Biotechnology* 239 (10 décembre 2016): 13-19. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.09.016>.
- Narainsamy, Kinsley, C. Cassier-Chauvat, C. Junot, et F. Chauvat. « High performance analysis of the cyanobacterial metabolism via liquid chromatography coupled to a LTQ-Orbitrap mass spectrometer: evidence that glucose reprograms the whole carbon metabolism and triggers oxidative stress ». *Metabolomics*, 2011. <https://doi.org/10.1007/s11306-011-0382-4>.
- Newman, David J., et Gordon M. Cragg. « Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years ». *Journal of Natural Products* 70, n° 3 (1 mars 2007): 461-77. <https://doi.org/10.1021/np068054v>.
- Ng, Andrew H., Bertram M. Berla, et Himadri B. Pakrasi. « Fine-Tuning of Photoautotrophic Protein Production by Combining Promoters and Neutral Sites in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 ». *Applied and Environmental Microbiology* 81, n° 19 (octobre 2015): 6857-63. <https://doi.org/10.1128/AEM.01349-15>.
- Nisbet, E. G., N. V. Grassineau, C. J. Howe, P. I. Abell, M. Regelous, et R. E. R. Nisbet. « The Age of RuBisCO: The Evolution of Oxygenic Photosynthesis ». *Geobiology* 5, n° 4 (2007): 311-35. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2007.00127.x>.
- Nomura, Christopher, Toshio Sakamoto, et Donald Bryant. « Roles for heme-copper oxidases in extreme high-light and oxidative stress response in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002 ». *Archives of microbiology* 185 (1 juillet 2006): 471-79. <https://doi.org/10.1007/s00203-006-0107-7>.
- Nowitzki, Ulrich, Ralf Wyrich, Peter Westhoff, Katrin Henze, Claus Schnarrenberger, et William Martin. « chloroplasts: functional and evolutionary aspects », 1995.
- Occhialini, Alessandro, Myat T. Lin, P. John Andralojc, Maureen R. Hanson, et Martin A. J. Parry. « Transgenic tobacco plants with improved cyanobacterial RuBisCO expression but no extra assembly factors grow at near wild-type rates if provided with elevated CO₂ ». *The Plant journal : for cell and molecular biology* 85, n° 1 (janvier 2016): 148-60. <https://doi.org/10.1111/tpj.13098>.
- Oesterheldt, Christine, Elmar Schmälzlin, Jürgen M. Schmitt, et Heiko Lokstein. « Regulation of Photosynthesis in the Unicellular Acidophilic Red Alga *Galdieria Sulphuraria*† ». *The Plant Journal* 51, n° 3 (2007): 500-511. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2007.03159.x>.
- Ogawa, Takahisa, Masahiro Tamoi, Ayako Kimura, Ayaka Mine, Harumi Sakuyama, Eriko Yoshida, Takanori Maruta, Kengo Suzuki, Takahiro Ishikawa, et Shigeru Shigeoka. « Enhancement of photosynthetic capacity in *Euglena gracilis* by

- expression of cyanobacterial fructose-1,6-/sedoheptulose-1,7-bisphosphatase leads to increases in biomass and wax ester production ». *Biotechnology for Biofuels* 8 (30 mai 2015): 80. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0264-5>.
- Olkowski, W. « Natural and Synthetic Pyrethrum Insecticides: Finding Your Way through the Maze ». *Common Sense Pest Control Quarterly (USA)*, 1989. https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Natural+and+synthetic+pyrethrum+insecticides%3A+finding+your+way+through+the+maze&author=Olkowski%2C+W.&publication_year=1989.
- Olujimi, O. O., O. S. Fatoki, J. P. Odendaal, et J. O. Okonkwo. « Review: Endocrine Disrupting Chemicals (Phenol and Phthalates) in the South African Environment: A Need for More Monitoring ». *Water SA* 36, n° 5 (2010). <https://doi.org/10.4314/wsa.v36i5.62001>.
- Omata, Tatsuo, Satoshi Gohta, Yukari Takahashi, Yoshimi Harano, et Shin-ichi Maeda. « Involvement of a CbbR Homolog in Low CO₂-Induced Activation of the Bicarbonate Transporter Operon in Cyanobacteria ». *Journal of Bacteriology* 183, n° 6 (15 mars 2001): 1891-98. <https://doi.org/10.1128/JB.183.6.1891-1898.2001>.
- Omata, Tatsuo, G. Dean Price, Murray R. Badger, Masato Okamura, Satoshi Gohta, et Teruo Ogawa. « Identification of an ATP-Binding Cassette Transporter Involved in Bicarbonate Uptake in the Cyanobacterium *Synechococcus* Sp. Strain PCC 7942 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, n° 23 (9 novembre 1999): 13571-76. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.23.13571>.
- Onizuka, Takuo, Sumiyo Endo, Hideo Akiyama, Shozo Kanai, Masahiko Hirano, Akiho Yokota, Satoshi Tanaka, et Hitoshi Miyasaka. « The rbcX Gene Product Promotes the Production and Assembly of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase of *Synechococcus* sp. PCC7002 in *Escherichia coli* ». *Plant and Cell Physiology* 45, n° 10 (15 octobre 2004): 1390-95. <https://doi.org/10.1093/pcp/pch160>.
- Orf, Isabel, Doreen Schwarz, Aaron Kaplan, Joachim Kopka, Wolfgang R. Hess, Martin Hagemann, et Stephan Klähn. « CyAbrB2 Contributes to the Transcriptional Regulation of Low CO₂ Acclimation in *Synechocystis* sp. PCC 6803 ». *Plant and Cell Physiology* 57, n° 10 (1 octobre 2016): 2232-43. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcw146>.
- Otori, Kumi, Masahiro Tamoi, Noriaki Tanabe, et Shigeru Shigeoka. « Enhancements in sucrose biosynthesis capacity affect shoot branching in *Arabidopsis* ». *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 81, n° 8 (3 août 2017): 1470-77. <https://doi.org/10.1080/09168451.2017.1321954>.
- Otuki, Michel F., Juliano Ferreira, Fabiana V. Lima, Cristiane Meyre-Silva, Angela Malheiros, Luciane A. Muller, Graziela S. Cani, Adair R. S. Santos, Rosendo A. Yunes, et João B. Calixto. « Antinociceptive Properties of Mixture of Alpha-Amyrin and Beta-Amyrin Triterpenes: Evidence for Participation of Protein Kinase C and Protein Kinase A Pathways ». *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 313, n° 1 (avril 2005): 310-18. <https://doi.org/10.1124/jpet.104.071779>.
- Paddon, C. J., P. J. Westfall, D. J. Pitera, K. Benjamin, K. Fisher, D. McPhee, M. D. Leavell, et al. « High-Level Semi-Synthetic Production of the Potent Antimalarial Artemisinin ». *Nature* 496, n° 7446 (avril 2013): 528-32. <https://doi.org/10.1038/nature12051>.
- Paddon, Chris J., et Jay D. Keasling. « Semi-Synthetic Artemisinin: A Model for the Use of Synthetic Biology in Pharmaceutical Development ». *Nature Reviews. Microbiology* 12, n° 5 (mai 2014): 355-67. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3240>.
- Pade, Nadin, Sabrina Erdmann, Heike Enke, Frederik Dethloff, Ulf Dühring, Jens Georg, Juliane Wambutt, et al. « Insights into isoprene production using the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 ». *Biotechnology for Biofuels* 9, n° 1 (18 avril 2016): 89. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0503-4>.
- Paduch, Roman, Martyna Kandefers-Szerszeń, Mariusz Trytek, et Jan Fiedurek. « Terpenes: Substances Useful in Human Healthcare ». *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 55, n° 5 (octobre 2007): 315. <https://doi.org/10.1007/s00005-007-0039-1>.
- Parry, Martin A. J., P. John Andralojc, Joanna C. Scales, Michael E. Salvucci, A. Elizabete Carmo-Silva, Hernan Alonso, et Spencer M. Whitney. « RuBisCO Activity and Regulation as Targets for Crop Improvement ». *Journal of Experimental Botany* 64, n° 3 (janvier 2013): 717-30. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers336>.
- Parry, Martin A. J., Alfred J. Keys, Pippa J. Madgwick, Ana E. Carmo-Silva, et P. John Andralojc. « RuBisCO regulation: a role for inhibitors ». *Journal of Experimental Botany* 59, n° 7 (1 mai 2008): 1569-80. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern084>.
- Pattanaik, Bagmi, Elias Englund, Nicholas Nolte, et Pia Lindberg. « Introduction of a Green Algal Squalene Synthase Enhances Squalene Accumulation in a Strain of *Synechocystis* Sp. PCC 6803 ». *Metabolic Engineering Communications* 10 (1 juin 2020): e00125. <https://doi.org/10.1016/j.mec.2020.e00125>.
- Peralta-Yahya, Pamela P., Mario Ouellet, Rossana Chan, Aindrila Mukhopadhyay, Jay D. Keasling, et Taek Soon Lee. « Identification and Microbial Production of a Terpene-Based Advanced Biofuel ». *Nature Communications* 2, n° 1 (27 septembre 2011): 483. <https://doi.org/10.1038/ncomms1494>.
- « Plant-Biochemistry-2011-tc.pdf ». Consulté le 24 août 2021. <http://www.iranfilestore.com/wp-content/uploads/2016/01/Plant-Biochemistry-2011-tc.pdf>.
- Pohlmeyer, Kai, Brigitte K. Paap, Jürgen Soll, et Norbert Wedel. « CP12: A Small Nuclear-Encoded Chloroplast Protein Provides Novel Insights into Higher-Plant GAPDH Evolution ». *Plant Molecular Biology* 32, n° 5 (décembre 1996): 969-78. <https://doi.org/10.1007/BF00020493>.
- Poliquin, Kelly, Yuri V. Ershov, Francis X. Cunningham, Tinsay T. Woreta, R. Raymond Gantt, et Elisabeth Gantt. « Inactivation of sll1556 in *Synechocystis* Strain PCC 6803 Impairs Isoprenoid Biosynthesis from Pentose Phosphate Cycle Substrates In Vitro ». *Journal of Bacteriology* 186, n° 14 (juillet 2004): 4685-93. <https://doi.org/10.1128/JB.186.14.4685-4693.2004>.
- Porta, D., Rippka, R., Hernández-Mariné, M., 2000. Unusual ultrastructural features in three strains of Cyanothecae (cyanobacteria). *Arch. Microbiol.* 173, 154–163.
- Powell, Bridget, Max Mergeay, et Nicholas Christofi. « Transfer of broad host-range plasmids to sulphate-reducing bacteria ».

- FEMS Microbiology Letters* 59, n° 3 (1 juin 1989): 269-73. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1989.tb03123.x>.
- Preiss, J. « Bacterial Glycogen Synthesis and Its Regulation ». *Annual Review of Microbiology* 38, n° 1 (1984): 419-58. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.38.100184.002223>.
- Price, G. D., J. R. Coleman, et M. R. Badger. « Association of Carbonic Anhydrase Activity with Carboxysomes Isolated from the Cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942 ». *Plant Physiology* 100, n° 2 (octobre 1992): 784-93. <https://doi.org/10.1104/pp.100.2.784>.
- Price, G. Dean, Murray R. Badger, et Susanne von Caemmerer. « The Prospect of Using Cyanobacterial Bicarbonate Transporters to Improve Leaf Photosynthesis in C3 Crop Plants ». *Plant Physiology* 155, n° 1 (janvier 2011): 20-26. <https://doi.org/10.1104/pp.110.164681>.
- Price, G. Dean, Murray R. Badger, Fiona J. Woodger, et Ben M. Long. « Advances in Understanding the Cyanobacterial CO₂-Concentrating-Mechanism (CCM): Functional Components, Ci Transporters, Diversity, Genetic Regulation and Prospects for Engineering into Plants ». *Journal of Experimental Botany* 59, n° 7 (2008): 1441-61. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm112>.
- Price, G. Dean, Fiona J. Woodger, Murray R. Badger, Susan M. Howitt, et Loraine Tucker. « Identification of a SulP-Type Bicarbonate Transporter in Marine Cyanobacteria ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, n° 52 (28 décembre 2004): 18228-33. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405211101>.
- Puskas, J. E., E. Gautriaud, A. Deffieux, et J. P. Kennedy. « Natural Rubber Biosynthesis—A Living Carbocationic Polymerization? » *Progress in Polymer Science* 31, n° 6 (1 juin 2006): 533-48. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.05.002>.
- Qi, Shu-Hua, et Xuan Ma. « Antifouling Compounds from Marine Invertebrates ». *Marine Drugs* 15, n° 9 (septembre 2017): 263. <https://doi.org/10.3390/md15090263>.
- Quick, W.P., U. Schurr, K. Fichtner, E.-D. Schulze, S.R. Rodermel, L. Bogorad, et M. Stitt. « The Impact of Decreased RuBisCO on Photosynthesis, Growth, Allocation and Storage in Tobacco Plants Which Have Been Transformed with Antisense RbcS ». *The Plant Journal* 1, n° 1 (juillet 1991): 51-58. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.1991.00051.x>.
- Raines, Christine A. « The Calvin Cycle Revisited ». *Photosynthesis Research* 75, n° 1 (1 janvier 2003): 1-10. <https://doi.org/10.1023/A:1022421515027>.
- Rault, Magali, Marie-Thérèse Giudici-Ortoni, Brigitte Gontero, et Jacques Ricard. « Structural and Functional Properties of a Multi-Enzyme Complex from Spinach Chloroplasts ». *European Journal of Biochemistry* 217, n° 3 (1993): 1065-73. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb18338.x>.
- Raven, John A., Mario Giordano, John Beardall, et Stephen C. Maberly. « Algal evolution in relation to atmospheric CO₂: carboxylases, carbon-concentrating mechanisms and carbon oxidation cycles ». *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 367, n° 1588 (19 février 2012): 493-507. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0212>.
- Read, B. A., et F. R. Tabita. « High Substrate Specificity Factor Ribulose Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase from Eukaryotic Marine Algae and Properties of Recombinant Cyanobacterial RubiSCO Containing “Algal” Residue Modifications ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 312, n° 1 (juillet 1994): 210-18. <https://doi.org/10.1006/abbi.1994.1301>.
- Recio, María del Carmen, Rosa María Giner, Salvador Máñez, et José Luis Ríos. « Structural Requirements for the Anti-Inflammatory Activity of Natural Triterpenoids ». *Planta Medica* 61, n° 02 (avril 1995): 182-85. <https://doi.org/10.1055/s-2006-958045>.
- Reinsvold, Robert E., Robert E. Jinkerson, Randor Radakovits, Matthew C. Posewitz, et Chhandak Basu. « The Production of the Sesquiterpene β -Caryophyllene in a Transgenic Strain of the Cyanobacterium *Synechocystis* ». *Journal of Plant Physiology* 168, n° 8 (15 mai 2011): 848-52. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.11.006>.
- Richardson, D.L., R.H. Reed, et W.D.P. Stewart. « *Synechocystis* PCC6803: a euryhaline cyanobacterium ». *FEMS Microbiology Letters* 18, n° 1-2 (1 avril 1983): 99-102. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1983.tb00457.x>.
- Rippka, Rosmarie, Josette Deruelles, John B. Waterbury, Michael Herdman, et Roger Y.Y.R. Stanier. « Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria ». *Microbiology* 111, n° 1 (s. d.): 1-61. <https://doi.org/10.1099/00221287-111-1-1>.
- Rohmer, M, M Knani, P Simonin, B Sutter, et H Sahm. « Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. » *Biochemical Journal* 295, n° Pt 2 (15 octobre 1993): 517-24.
- Rosenthal, David M., Anna M. Locke, Mahdi Khozaei, Christine A. Raines, Stephen P. Long, et Donald R. Ort. « Over-expressing the C3 photosynthesis cycle enzyme Sedoheptulose-1-7 Bisphosphatase improves photosynthetic carbon gain and yield under fully open air CO₂fumigation (FACE) ». *BMC Plant Biology* 11, n° 1 (31 août 2011): 123. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-123>.
- Roussou, Stamatina, Alessia Albergati, Feiyan Liang, et Peter Lindblad. « Engineered Cyanobacteria with Additional Overexpression of Selected Calvin-Benson-Bassham Enzymes Show Further Increased Ethanol Production ». *Metabolic Engineering Communications* 12 (1 juin 2021): e00161. <https://doi.org/10.1016/j.mec.2021.e00161>.
- Ruffing, Anne M. « Borrowing Genes from *Chlamydomonas Reinhardtii* for Free Fatty Acid Production in Engineered Cyanobacteria ». *Journal of Applied Phycology* 25, n° 5 (1 octobre 2013): 1495-1507. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-9993-7>.
- Ruffing, Anne M « Improved Free Fatty Acid Production in Cyanobacteria with *Synechococcus* sp. PCC 7002 as Host ». *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 2 (2014): 17. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2014.00017>.
- Ruzicka, L. « The Isoprene Rule and the Biogenesis of Terpenic Compounds ». *Experientia* 9, n° 10 (1 octobre 1953): 357-67. <https://doi.org/10.1007/BF02167631>.
- Sandoval, Celeste M., Marites Ayson, Nathan Moss, Bonny Lieu, Peter Jackson, Sara P. Gaucher, Tizita Horning, et al. « Use of Pantothenate as a Metabolic Switch Increases the Genetic Stability of Farnesene Producing *Saccharomyces*

- Cerevisiae ». *Metabolic Engineering* 25 (1 septembre 2014): 215-26. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2014.07.006>.
- Santos-Merino, María, Amit K. Singh, et Daniel C. Ducat. « New Applications of Synthetic Biology Tools for Cyanobacterial Metabolic Engineering ». *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 7 (2019): 33. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00033>.
- Sarria, Stephen, Betty Wong, Hector García Martín, Jay D. Keasling, et Pamela Peralta-Yahya. « Microbial Synthesis of Pinene ». *ACS Synthetic Biology* 3, n° 7 (18 juillet 2014): 466-75. <https://doi.org/10.1021/sb4001382>.
- Saschenbrecker, Sandra, Andreas Bracher, Karnam Vasudeva Rao, Bharathi Vasudeva Rao, F. Ulrich Hartl, et Manajit Hayer-Hartl. « Structure and Function of RbcX, an Assembly Chaperone for Hexadecameric RuBisCO ». *Cell* 129, n° 6 (15 juin 2007): 1189-1200. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.04.025>.
- Satagopan, Sriram, Katherine A. Huening, et F. Robert Tabita. « Selection of Cyanobacterial (*Synechococcus* sp. Strain PCC 6301) RubisCO Variants with Improved Functional Properties That Confer Enhanced CO₂-Dependent Growth of *Rhodospirillum rubrum*, a Photosynthetic Bacterium ». *mBio* 10, n° 4 (s. d.): e01537-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.01537-19>.
- Sato, Masumi, Kaori Nimura-Matsune, Satoru Watanabe, Taku Chibazakura, et Hirofumi Yoshikawa. « Expression Analysis of Multiple DnaK Genes in the Cyanobacterium *Synechococcus Elongatus* PCC 7942 ». *Journal of Bacteriology* 189, n° 10 (mai 2007): 3751-58. <https://doi.org/10.1128/JB.01722-06>.
- Sato, Shinichiro, Masahiko Ikeuchi, et Hitoshi Nakamoto. « Expression and Function of a GroEL Paralog in the Thermophilic Cyanobacterium *Thermosynechococcus Elongatus* under Heat and Cold Stress ». *FEBS Letters* 582, n° 23-24 (15 octobre 2008): 3389-95. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.08.034>.
- Savir, Yonatan, Elad Noor, Ron Milo, et Tsvi Tlusty. « Cross-Species Analysis Traces Adaptation of RuBisCO toward Optimality in a Low-Dimensional Landscape ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, n° 8 (23 février 2010): 3475-80. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911663107>.
- Sawamura, M. « Citrus Essential Oils: Flavor and Fragrance. » *Citrus Essential Oils: Flavor and Fragrance.*, 2010. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20113051321>.
- Scanlan, D J, S Sundaram, J Newman, N H Mann, et N G Carr. « Characterization of a zwf mutant of *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. » *Journal of Bacteriology* 177, n° 9 (mai 1995): 2550-53.
- Scheibe, Renate, Norbert Wedel, Susanne Vetter, Vera Emmerlich, et Sonja-Manuela Saueremann. « Co-Existence of Two Regulatory NADP-Glyceraldehyde 3-P Dehydrogenase Complexes in Higher Plant Chloroplasts ». *European Journal of Biochemistry* 269, n° 22 (novembre 2002): 5617-24. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03269.x>.
- Schempp, Florence M., Laura Drummond, Markus Buchhaupt, et Jens Schrader. « Microbial Cell Factories for the Production of Terpenoid Flavor and Fragrance Compounds ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66, n° 10 (14 mars 2018): 2247-58. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00473>.
- Schopf, J. William. « The Fossil Record: Tracing the Roots of the Cyanobacterial Lineage ». In *The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space*, édité par Brian A. Whitton et Malcolm Potts, 13-35. Dordrecht: Springer Netherlands, 2002. https://doi.org/10.1007/0-306-46855-7_2.
- Schwarz, Doreen, Isabel Orf, Joachim Kopka, et Martin Hagemann. « Recent Applications of Metabolomics toward Cyanobacteria ». *Metabolites* 3, n° 1 (4 février 2013): 72-100. <https://doi.org/10.3390/metabo3010072>.
- Schwarz, Rakefet, et Karl Forchhammer. « Acclimation of Unicellular Cyanobacteria to Macronutrient Deficiency: Emergence of a Complex Network of Cellular Responses ». *Microbiology (Reading, England)* 151, n° Pt 8 (août 2005): 2503-14. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27883-0>.
- Schwarz, Rakefet, Karl Forchhammer, Rakefet Schwarz, et Karl Forchhammer. « Correspondence », s. d.
- Sebesta, Jacob, et Christie Am Peebles. « Improving Heterologous Protein Expression in *Synechocystis* Sp. PCC 6803 for Alpha-Bisabolene Production ». *Metabolic Engineering Communications* 10 (juin 2020): e00117. <https://doi.org/10.1016/j.mec.2019.e00117>.
- Sebesta, Jacob, Allison Werner, et Christie Ann Marie Peebles. « Genetic Engineering of Cyanobacteria: Design, Implementation, and Characterization of Recombinant *Synechocystis* Sp. PCC 6803 ». In *Microbial Metabolic Engineering: Methods and Protocols*, édité par Christine Nicole S. Santos et Parayil Kumaran Ajikumar, 139-54. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer, 2019. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9142-6_10.
- Sengupta, Rajib, et Arne Holmgren. « Thioredoxin and Thioredoxin Reductase in Relation to Reversible S-Nitrosylation ». *Antioxidants & redox signaling* 18 (15 juin 2012). <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4716>.
- Sharkey, Thomas D., Amy E. Wiberley, et Autumn R. Donohue. « Isoprene Emission from Plants: Why and How ». *Annals of Botany* 101, n° 1 (1 janvier 2008): 5-18. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm240>.
- Sherman, D. M., T. A. Troyan, et L. A. Sherman. « Localization of Membrane Proteins in the Cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942 (Radial Asymmetry in the Photosynthetic Complexes). » *Plant Physiology* 106, n° 1 (septembre 1994): 251-62.
- Shestakov, S. V., et N. T. Khyen. « Evidence for Genetic Transformation in Blue-Green Alga *Anacystis Nidulans* ». *Molecular & General Genetics: MGG* 107, n° 4 (1970): 372-75. <https://doi.org/10.1007/BF00441199>.
- Shevela, Dmitriy, Roman Y. Pishchalnikov, Lutz A. Eichacker, et Govindjee. « Oxygenic Photosynthesis in Cyanobacteria », 3-40. CRC Press, 2013. <http://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:umu:diva-73300>.
- Shibata, Mari, Hirokazu Katoh, Masatoshi Sonoda, Hiroshi Ohkawa, Masaya Shimoyama, Hideya Fukuzawa, Aaron Kaplan, et Teruo Ogawa. « Genes Essential to Sodium-Dependent Bicarbonate Transport in Cyanobacteria: FUNCTION AND PHYLOGENETIC ANALYSIS * ». *Journal of Biological Chemistry* 277, n° 21 (24 mai 2002): 18658-64. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112468200>.
- Shibata, Mari, Hiroshi Ohkawa, Takakazu Kaneko, Hideya Fukuzawa, Satoshi Tabata, Aaron Kaplan, et Teruo Ogawa. « Distinct Constitutive and Low-CO₂-Induced CO₂ Uptake Systems in Cyanobacteria: Genes Involved and Their Phylogenetic Relationship with Homologous Genes in Other Organisms ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, n° 20 (25 septembre 2001): 11789-94. <https://doi.org/10.1073/pnas.191258298>.

- Shih, Patrick M., Jan Zarzycki, Krishna K. Niyogi, et Cheryl A. Kerfeld. « Introduction of a Synthetic CO₂-Fixing Photorespiratory Bypass into a Cyanobacterium ». *Journal of Biological Chemistry* 289, n° 14 (4 avril 2014): 9493-9500. <https://doi.org/10.1074/jbc.C113.543132>.
- Simkin, Andrew J., Patricia E. Lopez-Calcagno, Philip A. Davey, Lauren R. Headland, Tracy Lawson, Stefan Timm, Hermann Bauwe, et Christine A. Raines. « Simultaneous Stimulation of Sedoheptulose 1,7-Bisphosphatase, Fructose 1,6-Bisphosphate Aldolase and the Photorespiratory Glycine Decarboxylase-H Protein Increases CO₂ Assimilation, Vegetative Biomass and Seed Yield in Arabidopsis ». *Plant Biotechnology Journal* 15, n° 7 (juillet 2017): 805-16. <https://doi.org/10.1111/pbi.12676>.
- Simkin, Andrew J., Lorna McAusland, Lauren R. Headland, Tracy Lawson, et Christine A. Raines. « Multigene manipulation of photosynthetic carbon assimilation increases CO₂ fixation and biomass yield in tobacco ». *Journal of Experimental Botany* 66, n° 13 (juillet 2015): 4075-90. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv204>.
- Singh, Prashant, Dimitrios Kaloudas, et Christine A. Raines. « Expression analysis of the Arabidopsis CP12 gene family suggests novel roles for these proteins in roots and floral tissues ». *Journal of Experimental Botany* 59, n° 14 (1 octobre 2008): 3975-85. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern236>.
- Singh, Shailendra Kumar, Shanthi Sundaram, Sukrat Sinha, Md. Akhlaqur Rahman, et Suman Kapur. « Recent advances in CO₂ uptake and fixation mechanism of cyanobacteria and microalgae ». *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 46, n° 16 (17 août 2016): 1297-1323. <https://doi.org/10.1080/10643389.2016.1217911>.
- Sivy, Tami L., Ray Fall, et Todd N. Rosenstiel. « Evidence of Isoprenoid Precursor Toxicity in *Bacillus Subtilis* ». *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 75, n° 12 (23 décembre 2011): 2376-83. <https://doi.org/10.1271/bbb.110572>.
- Sjöholm, Johannes, Paulo Oliveira, et Peter Lindblad. « Transcription and Regulation of the Bidirectional Hydrogenase in the Cyanobacterium *Nostoc* sp. Strain PCC 7120 ». *Applied and Environmental Microbiology* 73, n° 17 (septembre 2007): 5435-46. <https://doi.org/10.1128/AEM.00756-07>.
- So, A. K., et G. S. Espie. « Cloning, Characterization and Expression of Carbonic Anhydrase from the Cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 ». *Plant Molecular Biology* 37, n° 2 (mai 1998): 205-15. <https://doi.org/10.1023/a:1005959200390>.
- Spreitzer, R J. « Genetic Dissection of RuBisCO Structure and Function ». *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 44, n° 1 (1993): 411-34. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.44.060193.002211>.
- Stalon, V, A Piérard, N Glansdorff, et R Cunin. « Biosynthesis and Metabolism of Arginine in Bacteria ». *MICROBIOL. REV.* 50 (1986): 39.
- Stanier, R Y, R Kunisawa, M Mandel, et G Cohen-Bazire. « Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales) ». *Bacteriological Reviews* 35, n° 2 (juin 1971): 171-205.
- Stanley, Desirée N., Christine A. Raines, et Cheryl A. Kerfeld. « Comparative Analysis of 126 Cyanobacterial Genomes Reveals Evidence of Functional Diversity Among Homologs of the Redox-Regulated CP12 Protein1[C][W] ». *Plant Physiology* 161, n° 2 (février 2013): 824-35. <https://doi.org/10.1104/pp.112.210542>.
- Steele, Christopher L., Sadanobu Katoh, Jörg Bohlmann, et Rodney Croteau. « Regulation of Oleoresinosis in Grand Fir (*Abies grandis*) ». *Plant Physiology* 116, n° 4 (avril 1998): 1497-1504.
- Stephanopoulos, Gregory. « Challenges in Engineering Microbes for Biofuels Production ». *Science (New York, N.Y.)* 315, n° 5813 (9 février 2007): 801-4. <https://doi.org/10.1126/science.1139612>.
- Stevens, S. E., C. O. Pat Patterson, et Jack Myers. « The Production of Hydrogen Peroxide by Blue-Green Algae: A Survey1 ». *Journal of Phycology* 9, n° 4 (1973): 427-30. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1973.tb04116.x>.
- Stevens, S. E., et R. D. Porter. « Transformation in *Agmenellum Quadruplicatum* ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77, n° 10 (octobre 1980): 6052-56. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.10.6052>.
- Stierle, A., G. Strobel, et D. Stierle. « Taxol and Taxane Production by *Taxomyces Andreanae*, an Endophytic Fungus of Pacific Yew ». *Science* 260, n° 5105 (9 avril 1993): 214-16. <https://doi.org/10.1126/science.8097061>.
- Subasinghe, Upul, Manuri Gamage, et D. Hettiarachchi. « Essential oil content and composition of Indian sandalwood (*Santalum album*) in Sri Lanka ». *Journal of Forestry Research* 24 (16 août 2014): 4. <https://doi.org/10.1007/s11676-013-0331-3>.
- Sugita, Chieko, Koretsugu Ogata, Masamitsu Shikata, Hiroyuki Jikuya, Jun Takano, Miho Furumichi, Minoru Kanehisa, Tatsuo Omata, Masahiro Sugiura, et Mamoru Sugita. « Complete Nucleotide Sequence of the Freshwater Unicellular Cyanobacterium *Synechococcus Elongatus* PCC 6301 Chromosome: Gene Content and Organization ». *Photosynthesis Research* 93, n° 1-3 (septembre 2007): 55-67. <https://doi.org/10.1007/s11120-006-9122-4>.
- Suhrbier, Andreas, Brad Jones, Glen M. Boyle, Thuy T. Le, Steven M. Ogbourne, Andreas Suhrbier, Brad Jones, Et Al, Mitochondrial Disruption, et Necrotic Cell Death. « See Profile », s. d.
- Sültemeyer, Dieter, G. Dean Price, Jian-Wei Yu, et Murray R. Badger. « Characterisation of Carbon Dioxide and Bicarbonate Transport during Steady-State Photosynthesis in the Marine Cyanobacterium *Synechococcus* Strain PCC7002 ». *Planta* 197, n° 4 (1 novembre 1995): 597-607. <https://doi.org/10.1007/BF00191566>.
- Sun, Yaqi, Adam J. M. Wollman, Fang Huang, Mark C. Leake, et Lu-Ning Liu. « Single-Organelle Quantification Reveals Stoichiometric and Structural Variability of Carboxysomes Dependent on the Environment ». *The Plant Cell* 31, n° 7 (1 juillet 2019): 1648-64. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00787>.
- Suzuki, Yuji, Eri Kondo, et Amane Makino. « Effects of Co-Overexpression of the Genes of RuBisCO and Transketolase on Photosynthesis in Rice ». *Photosynthesis Research* 131, n° 3 (mars 2017): 281-89. <https://doi.org/10.1007/s11120-016-0320-4>.
- Suzuki, Yuji, Maki Ohkubo, Hanako Hatakeyama, Keiko Ohashi, Ryuichi Yoshizawa, Soichi Kojima, Toshihiko Hayakawa, Tomoyuki Yamaya, Tadahiko Mae, et Amane Makino. « Increased RuBisCO Content in Transgenic Rice Transformed with the 'Sense' rbcS Gene ». *Plant and Cell Physiology* 48, n° 4 (1 avril 2007): 626-37. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcm035>.
- Tabita, F. Robert, Sriram Satagopan, Thomas E. Hanson, Nathan E. Kreeel, et Stephanie S. Scott. « Distinct form I, II, III, and

- IV RuBisCO proteins from the three kingdoms of life provide clues about RuBisCO evolution and structure/function relationships ». *Journal of Experimental Botany* 59, n° 7 (1 mai 2008): 1515-24. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm361>.
- Takeya, Masahiro, Masami Yokota Hirai, et Takashi Osanai. « Allosteric Inhibition of Phosphoenolpyruvate Carboxylases Is Determined by a Single Amino Acid Residue in Cyanobacteria ». *Scientific Reports* 7 (24 janvier 2017): 41080. <https://doi.org/10.1038/srep41080>.
- Tamoi, M., T. Ishikawa, T. Takeda, et S. Shigeoka. « Molecular Characterization and Resistance to Hydrogen Peroxide of Two Fructose-1,6-Bisphosphatases from *Synechococcus* PCC 7942 ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 334, n° 1 (1 octobre 1996): 27-36. <https://doi.org/10.1006/abbi.1996.0425>.
- Tamoi, Masahiro, Takashi Miyazaki, Tamo Fukamizo, et Shigeru Shigeoka. « The Calvin Cycle in Cyanobacteria Is Regulated by CP12 via the NAD(H)/NADP(H) Ratio under Light/Dark Conditions ». *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 42, n° 4 (mai 2005): 504-13. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02391.x>.
- Tamoi, Masahiro, Miki Nagaoka, Yoshiko Miyagawa, et Shigeru Shigeoka. « Contribution of Fructose-1,6-Bisphosphatase and Sedoheptulose-1,7-Bisphosphatase to the Photosynthetic Rate and Carbon Flow in the Calvin Cycle in Transgenic Plants ». *Plant & Cell Physiology* 47, n° 3 (mars 2006): 380-90. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcj004>.
- Tamoi, Masahiro, Toru Takeda, et Shigeru Shigeoka. « Functional Analysis of Fructose-1,6-Bisphosphatase Isozymes (fbp-I and fbp-II Gene Products) in Cyanobacteria ». *Plant and Cell Physiology* 40, n° 2 (1 janvier 1999): 257-61. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029536>.
- Taroncher-Oldenburg, G., K. Nishina, et G. Stephanopoulos. « Identification and Analysis of the Polyhydroxyalkanoate-Specific Beta-Ketothiolase and Acetoacetyl Coenzyme A Reductase Genes in the Cyanobacterium *Synechocystis* Sp. Strain PCC6803 ». *Applied and Environmental Microbiology* 66, n° 10 (octobre 2000): 4440-48. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4440-4448.2000>.
- Tashiro, Miki, Hiroshi Kiyota, Shigeko Kawai-Noma, Kyoichi Saito, Masahiko Ikeuchi, Yoko Iijima, et Daisuke Umeno. « Bacterial Production of Pinene by a Laboratory-Evolved Pinene-Synthase ». *ACS Synthetic Biology* 5, n° 9 (16 septembre 2016): 1011-20. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00140>.
- Taton, Arnaud, Federico Unglaub, Nicole E. Wright, Wei Yue Zeng, Javier Paz-Yepes, Bianca Brahamsha, Brian Palenik, et al. « Broad-host-range vector system for synthetic biology and biotechnology in cyanobacteria ». *Nucleic Acids Research* 42, n° 17 (29 septembre 2014): e136-e136. <https://doi.org/10.1093/nar/gku673>.
- Tcherkez, Guillaume G. B., Graham D. Farquhar, et T. John Andrews. « Despite Slow Catalysis and Confused Substrate Specificity, All Ribulose Bisphosphate Carboxylases May Be Nearly Perfectly Optimized ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, n° 19 (9 mai 2006): 7246-51. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600605103>.
- Thieulin-Pardo, Gabriel, Luisana Avilan, Mila Kojadinovic, et Brigitte Gontero. « Fairy “tails”: flexibility and function of intrinsically disordered extensions in the photosynthetic world ». *Frontiers in Molecular Biosciences* 2 (2015): 23. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2015.00023>.
- Thompson, Luke R., Qinglu Zeng, Libusha Kelly, Katherine H. Huang, Alexander U. Singer, JoAnne Stubbe, et Sallie W. Chisholm. « Phage Auxiliary Metabolic Genes and the Redirection of Cyanobacterial Host Carbon Metabolism ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, n° 39 (27 septembre 2011): E757-64. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102164108>.
- Thulasiram, Hirekodathakallu V., Hans K. Erickson, et C. Dale Poulter. « Chimeras of Two Isoprenoid Synthases Catalyze All Four Coupling Reactions in Isoprenoid Biosynthesis ». *Science (New York, N.Y.)* 316, n° 5821 (6 avril 2007): 73-76. <https://doi.org/10.1126/science.1137786>.
- Tippmann, Stefan, Yun Chen, Verena Siewers, et Jens Nielsen. « From Flavors and Pharmaceuticals to Advanced Biofuels: Production of Isoprenoids in *Saccharomyces Cerevisiae* ». *Biotechnology Journal* 8, n° 12 (décembre 2013): 1435-44. <https://doi.org/10.1002/biot.201300028>.
- Tjandra, Angie Davina, et Jun Huang. « Photocatalytic Carbon Dioxide Reduction by Photocatalyst Innovation ». *Chinese Chemical Letters* 29, n° 6 (1 juin 2018): 734-46. <https://doi.org/10.1016/j.ccl.2018.03.017>.
- Tracy, Noah I., Daichuan Chen, Daniel W. Crunkleton, et Geoffrey L. Price. « Hydrogenated Monoterpenes as Diesel Fuel Additives ». *Fuel* 88, n° 11 (1 novembre 2009): 2238-40. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2009.02.002>.
- Troschl, Clemens, Katharina Meixner, et Bernhard Drosig. « Cyanobacterial PHA Production—Review of Recent Advances and a Summary of Three Years’ Working Experience Running a Pilot Plant ». *Bioengineering* 4, n° 2 (juin 2017): 26. <https://doi.org/10.3390/bioengineering4020026>.
- Trost, P., S. Fermani, L. Marri, M. Zaffagnini, G. Falini, S. Scagliarini, P. Pupillo, et F. Sparla. « Thioredoxin-Dependent Regulation of Photosynthetic Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase: Autonomous vs. CP12-Dependent Mechanisms ». *Photosynthesis Research* 89, n° 2 (1 septembre 2006): 263-75. <https://doi.org/10.1007/s11120-006-9099-z>.
- Tsukamoto, Yu, Yuriko Fukushima, Satoshi Hara, et Toru Hisabori. « Redox Control of the Activity of Phosphoglycerate Kinase in *Synechocystis* sp. PCC6803 ». *Plant and Cell Physiology* 54, n° 4 (1 avril 2013): 484-91. <https://doi.org/10.1093/pcp/pct002>.
- Tymoczko, John L., Jeremy M. Berg, et Lubert Stryer. *Biochemistry: A Short Course, 2nd Edition*. Second edition. New York: W. H. Freeman, 2011.
- Uematsu, Kimio, Nobuaki Suzuki, Tomoko Iwamae, Masayuki Inui, et Hideaki Yukawa. « Increased Fructose 1,6-Bisphosphate Aldolase in Plastids Enhances Growth and Photosynthesis of Tobacco Plants ». *Journal of Experimental Botany* 63, n° 8 (mai 2012): 3001-9. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers004>.
- Uemura, K., null Anwaruzzaman, S. Miyachi, et A. Yokota. « Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase from Thermophilic Red Algae with a Strong Specificity for CO₂ Fixation ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 233, n° 2 (17 avril 1997): 568-71. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.6497>.
- Ungerer, Justin, Kristen E. Wendt, John I. Hendry, Costas D. Maranas, et Himadri B. Pakrasi. « Comparative Genomics

- Reveals the Molecular Determinants of Rapid Growth of the Cyanobacterium *Synechococcus Elongatus* UTEX 2973 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115, n° 50 (11 décembre 2018): E11761-70. <https://doi.org/10.1073/pnas.1814912115>.
- Vasudevan, Ravendran, Grant A.R. Gale, Alejandra A. Schiavon, Anton Puzorjov, John Malin, Michael D. Gillespie, Konstantinos Vavitsas, et al. « CyanoGate: A Modular Cloning Suite for Engineering Cyanobacteria Based on the Plant MoClo Syntax ». *Plant Physiology* 180, n° 1 (1 mai 2019): 39-55. <https://doi.org/10.1104/pp.18.01401>.
- Veaudor, Théo, Victoire Blanc-Garin, Célia Chenebault, Encarnación Diaz-Santos, Jean-François Sassi, Corinne Cassier-Chauvat, et Franck Chauvat. « Recent Advances in the Photoautotrophic Metabolism of Cyanobacteria: Biotechnological Implications ». *Life* 10, n° 5 (mai 2020): 71. <https://doi.org/10.3390/life10050071>.
- Vespermann, Kele A. C., Bruno N. Paulino, Mayara C. S. Barcelos, Marina G. Pessôa, Glaucia M. Pastore, et Gustavo Molina. « Biotransformation of α - and β -Pinene into Flavor Compounds ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 101, n° 5 (mars 2017): 1805-17. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-8066-7>.
- Vitlin Gruber, Anna, et Leila Feiz. « RuBisCO Assembly in the Chloroplast ». *Frontiers in Molecular Biosciences* 5 (2018): 24. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2018.00024>.
- Vogel, Anne Ilse Maria, Rahmi Lale, et Martin Frank Hohmann-Marriott. « Streamlining Recombination-Mediated Genetic Engineering by Validating Three Neutral Integration Sites in *Synechococcus* Sp. PCC 7002 ». *Journal of Biological Engineering* 11 (2017): 19. <https://doi.org/10.1186/s13036-017-0061-8>.
- Wagner, Karl-Heinz, et Ibrahim Elmadfa. « Biological Relevance of Terpenoids. Overview Focusing on Mono-, Di- and Tetraterpenes ». *Annals of Nutrition & Metabolism* 47, n° 3-4 (2003): 95-106. <https://doi.org/10.1159/000070030>.
- Walden, H., G. S. Bell, R. J. Russell, B. Siebers, R. Hensel, et G. L. Taylor. « Tiny TIM: A Small, Tetrameric, Hyperthermostable Triosephosphate Isomerase ». *Journal of Molecular Biology* 306, n° 4 (2 mars 2001): 745-57. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4433>.
- Walls, Dermot, et Sinéad T. Loughran. « Tagging Recombinant Proteins to Enhance Solubility and Aid Purification ». In *Protein Chromatography: Methods and Protocols*, édité par Dermot Walls et Sinéad T. Loughran, 151-75. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press, 2011. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-913-0_9.
- Walls, Laura Ellen, et Leonardo Rios-Solis. « Sustainable Production of Microbial Isoprenoid Derived Advanced Biojet Fuels Using Different Generation Feedstocks: A Review ». *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 8 (30 octobre 2020): 599560. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.599560>.
- Wan, Ni, Drew M. DeLorenzo, Lian He, Le You, Cheryl M. Immethun, George Wang, Edward E. K. Baidoo, et al. « Cyanobacterial Carbon Metabolism: Fluxome Plasticity and Oxygen Dependence ». *Biotechnology and Bioengineering* 114, n° 7 (2017): 1593-1602. <https://doi.org/10.1002/bit.26287>.
- Wang, Hong-Liang, Bradley L. Postier, et Robert L. Burnap. « 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 ». *The Journal of Biological Chemistry* 279, n° 7 (13 février 2004): 5739-51. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311336200>.
- Wang, Xin, Wei Liu, Changpeng Xin, Yi Zheng, Yanbing Cheng, Su Sun, Runze Li, et al. « Enhanced limonene production in cyanobacteria reveals photosynthesis limitations ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113, n° 50 (13 décembre 2016): 14225-30. <https://doi.org/10.1073/pnas.1613340113>.
- Waugh, David S. « Making the Most of Affinity Tags ». *Trends in Biotechnology* 23, n° 6 (juin 2005): 316-20. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2005.03.012>.
- Webb, Hamish, Robert Lanfear, John Hamill, William Foley, et Carsten Külheim. « The Yield of Essential Oils in *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae) Is Regulated through Transcript Abundance of Genes in the MEP Pathway ». *PLoS one* 8 (27 mars 2013): e60631. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060631>.
- Wedel, Norbert, et Jürgen Soll. « Evolutionary Conserved Light Regulation of Calvin Cycle Activity by NADPH-Mediated Reversible Phosphoribulokinase/CP12/ Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Complex Dissociation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, n° 16 (4 août 1998): 9699-9704. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.16.9699>.
- Wedel, Norbert, Jürgen Soll, et Brigitte K. Paap. « CP12 provides a new mode of light regulation of Calvin cycle activity in higher plants ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, n° 19 (16 septembre 1997): 10479-84.
- Wen, Chih-Chun, Yueh-Hsiung Kuo, Jia-Tsrong Jan, Po-Huang Liang, Sheng-Yang Wang, Hong-Gi Liu, Ching-Kuo Lee, et al. « Specific Plant Terpenoids and Lignoids Possess Potent Antiviral Activities against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus ». *Journal of Medicinal Chemistry* 50, n° 17 (23 août 2007): 4087-95. <https://doi.org/10.1021/jm070295s>.
- Wheatley, Nicole M., Christopher D. Sundberg, Soheil D. Gidaniyan, Duilio Cascio, et Todd O. Yeates. « Structure and Identification of a Pterin Dehydratase-like Protein as a Ribulose-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase (RuBisCO) Assembly Factor in the α -Carboxysome ». *The Journal of Biological Chemistry* 289, n° 11 (14 mars 2014): 7973-81. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.531236>.
- Whitney, S. M., et T. J. Andrews. « The Gene for the Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase (RuBisCO) Small Subunit Relocated to the Plastid Genome of Tobacco Directs the Synthesis of Small Subunits That Assemble into RuBisCO ». *The Plant Cell* 13, n° 1 (janvier 2001): 193-205. <https://doi.org/10.1105/tpc.13.1.193>.
- WHO (World Health Organization). « New report calls for urgent action to avert antimicrobial resistance crisis ». Consulté le 24 août 2021. <https://www.who.int/news/item/29-04-2019-new-report-calls-for-urgent-action-to-avert-antimicrobial-resistance-crisis>.
- Wichmann, Julian, Thomas Baier, Eduard Wentnagel, Kyle J. Lauenstein, et Olaf Kruse. « Tailored Carbon Partitioning for Phototrophic Production of (E)- α -Bisabolene from the Green Microalga *Chlamydomonas Reinhardtii* ». *Metabolic Engineering* 45 (janvier 2018): 211-22. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2017.12.010>.

- Wilbon, Perry A., Fuxiang Chu, et Chuanbing Tang. « Progress in Renewable Polymers from Natural Terpenes, Terpenoids, and Rosin ». *Macromolecular Rapid Communications* 34, n° 1 (2013): 8-37. <https://doi.org/10.1002/marc.201200513>.
- Willige, Björn C., Michael Kutzer, Felix Tebartz, et Dorothea Bartels. « Subcellular Localization and Enzymatic Properties of Differentially Expressed Transketolase Genes Isolated from the Desiccation Tolerant Resurrection Plant *Craterostigma Plantagineum* ». *Planta* 229, n° 3 (février 2009): 659-66. <https://doi.org/10.1007/s00425-008-0863-5>.
- Wilson, Robert H., Elena Martin-Avila, Carly Conlan, et Spencer M. Whitney. « An Improved Escherichia Coli Screen for RuBisCO Identifies a Protein-Protein Interface That Can Enhance CO₂-Fixation Kinetics ». *Journal of Biological Chemistry* 293, n° 1 (5 janvier 2018): 18-27. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.810861>.
- Wise, Eric, Julie Akana, John Gerlt, et Ivan Rayment. « Structure of D-ribulose 5-phosphate 3-epimerase from *Synechocystis* to 1.6 Å resolution ». *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 60 (1 octobre 2004): 1687-90. <https://doi.org/10.1107/S0907444904015896>.
- Woodger, Fiona J., Murray R. Badger, et G. Dean Price. « Sensing of Inorganic Carbon Limitation in *Synechococcus* PCC7942 Is Correlated with the Size of the Internal Inorganic Carbon Pool and Involves Oxygen ». *Plant Physiology* 139, n° 4 (décembre 2005): 1959-69. <https://doi.org/10.1104/pp.105.069146>.
- Woodger, Fiona J., Donald A. Bryant, et G. Dean Price. « Transcriptional Regulation of the CO₂-Concentrating Mechanism in a Euryhaline, Coastal Marine Cyanobacterium, *Synechococcus* sp. Strain PCC 7002: Role of NdhR/CemR ». *Journal of Bacteriology* 189, n° 9 (mai 2007): 3335-47. <https://doi.org/10.1128/JB.01745-06>.
- Woude, Aniek D. van der, S. Andreas Angermayr, Vinod Puthan Veetil, Anna Osnato, et Klaas J. Hellingwerf. « Carbon Sink Removal: Increased Photosynthetic Production of Lactic Acid by *Synechocystis* Sp. PCC6803 in a Glycogen Storage Mutant ». *Journal of Biotechnology* 184 (20 août 2014): 100-102. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.04.029>.
- Wu, Shubin., Lv, Gao-jin., Lou, Rui. « Applications of Chromatography Hyphenated Techniques in the Field of Lignin Pyrolysis | IntechOpen ». Consulté le 24 août 2021. <https://www.intechopen.com/chapters/31212>.
- Xiong, Wei, Tai-Chi Lee, Sarah Rommelfanger, Erica Gjersing, Melissa Cano, Pin-Ching Maness, Maria Ghirardi, et Jianping Yu. « Phosphoketolase Pathway Contributes to Carbon Metabolism in Cyanobacteria ». *Nature Plants* 2, n° 1 (7 décembre 2015): 1-8. <https://doi.org/10.1038/nplants.2015.187>.
- Xu, Weidong, et Bruce A. McFadden. « Sequence Analysis of Plasmid PCC5.2 from *Cyanobacterium* *Synechocystis* PCC 6803 That Replicates by a Rolling Circle Mechanism ». *Plasmid* 37, n° 2 (1 mars 1997): 95-104. <https://doi.org/10.1006/plas.1997.1281>.
- Xu, Yu., Alvey, Richard M., Byrne, Patrick O., Graham., Joel E., Bryant, Donald A. « Expression of Genes in Cyanobacteria: Adaptation of Endogenous Plasmids as Platforms for High-Level Gene Expression in *Synechococcus* sp. PCC 7002 | SpringerLink ». Consulté le 24 août 2021. https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-60761-925-3_21.
- Yang, Bo, Jin Liu, Xiaonian Ma, Bingbing Guo, Bin Liu, Tao Wu, Yue Jiang, et Feng Chen. « Genetic Engineering of the Calvin Cycle toward Enhanced Photosynthetic CO₂ Fixation in Microalgae ». *Biotechnology for Biofuels* 10 (2017): 229. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0916-8>.
- Yang, Chen, Qiang Hua, et Kazuyuki Shimizu. « Metabolic Flux Analysis in *Synechocystis* Using Isotope Distribution from ¹³C-Labeled Glucose ». *Metabolic Engineering* 4, n° 3 (juillet 2002): 202-16. <https://doi.org/10.1006/mben.2002.0226>.
- Yang, Chen, Wei Zhang, Minglei Ren, Lirong Song, Tao Li, et Jindong Zhao. « Whole-Genome Sequence of *Microcystis aeruginosa* TAIHU98, a Nontoxic Bloom-Forming Strain Isolated from Taihu Lake, China ». *Genome Announcements* 1, n° 3 (27 juin 2013): e00333-13. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00333-13>.
- Yang, W. M., H. An, S. K. Chou, S. Vedharaji, R. Vallinagam, M. Balaji, F. E. A. Mohammad, et K. J. E. Chua. « Emulsion Fuel with Novel Nano-Organic Additives for Diesel Engine Application ». *Fuel*, 10th Japan/China Symposium on Coal and C1 Chemistry, 104 (1 février 2013): 726-31. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2012.04.051>.
- Yang, X., et B. A. McFadden. « A Small Plasmid, PCA2.4, from the *Cyanobacterium* *Synechocystis* Sp. Strain PCC 6803 Encodes a Rep Protein and Replicates by a Rolling Circle Mechanism ». *Journal of Bacteriology* 175, n° 13 (juillet 1993): 3981-91. <https://doi.org/10.1128/jb.175.13.3981-3991.1993>.
- Yang, X., et B. A. McFadden. « The Complete DNA Sequence and Replication Analysis of the Plasmid PCB2.4 from the *Cyanobacterium* *Synechocystis* PCC 6803 ». *Plasmid* 31, n° 2 (mars 1994): 131-37. <https://doi.org/10.1006/plas.1994.1014>.
- Yoo, Kyoung Shin, Sung Han Ok, Byung-Cheon Jeong, Kwang Wook Jung, Mei Hua Cui, Sujin Hyoung, Myeong-Ryeol Lee, Hyun Kyu Song, et Jeong Sheop Shin. « Single Cystathionine β-Synthase Domain-Containing Proteins Modulate Development by Regulating the Thioredoxin System in *Arabidopsis* ». *The Plant Cell* 23, n° 10 (octobre 2011): 3577-94. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.089847>.
- Yoshida, Keisuke, Eriko Uchikoshi, Satoshi Hara, et Toru Hisabori. « Thioredoxin-Like2/2-Cys Peroxiredoxin Redox Cascade Acts as Oxidative Activator of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase in Chloroplasts ». *The Biochemical Journal* 476, n° 12 (26 juin 2019): 1781-90. <https://doi.org/10.1042/BCJ20190336>.
- Yoshikuni, Yasuo, Jeffrey A. Dietrich, Farnaz F. Nowroozi, Patricia C. Babbitt, et Jay D. Keasling. « Redesigning Enzymes Based on Adaptive Evolution for Optimal Function in Synthetic Metabolic Pathways ». *Chemistry & Biology* 15, n° 6 (23 juin 2008): 607-18. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2008.05.006>.
- Yoshizawa, Yoichi, Koichi Toyoda, Hiroyuki Arai, Masaharu Ishii, et Yasuo Igarashi. « CO₂-Responsive Expression and Gene Organization of Three Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase Enzymes and Carboxysomes in *Hydrogenovibrio Marinus* Strain MH-110 ». *Journal of Bacteriology* 186, n° 17 (septembre 2004): 5685-91. <https://doi.org/10.1128/JB.186.17.5685-5691.2004>.
- You, Le, Lian He, et Yinjie J. Tang. « Photoheterotrophic Fluxome in *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 and Its Implications for Cyanobacterial Bioenergetics ». *Journal of Bacteriology* 197, n° 5 (mars 2015): 943-50. <https://doi.org/10.1128/JB.02149-14>.

- Zaffagnini, Mirko, Mariette Bedhomme, Christophe H. Marchand, Samuel Morisse, Paolo Trost, et Stéphane D. Lemaire. « Redox Regulation in Photosynthetic Organisms: Focus on Glutathionylation ». *Antioxidants & Redox Signaling* 16, n° 6 (15 mars 2012): 567-86. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4255>.
- Zaffagnini, Mirko, Simona Fermani, Alex Costa, Stéphane Lemaire, et Paolo Trost. « Plant cytoplasmic GAPDH: redox post-translational modifications and moonlighting properties ». *Frontiers in Plant Science* 4 (2013): 450. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00450>.
- Zha, Wen-long, et Jia-chen Zi. « Advances in Biotechnological Production of Santalenes and Santalols ». *Chinese Herbal Medicines* 13, n° 1 (1 janvier 2021): 90-97. <https://doi.org/10.1016/j.chmed.2020.11.002>.
- Zhang, Angela, Austin L. Carroll, et Shota Atsumi. « Carbon recycling by cyanobacteria: improving CO₂ fixation through chemical production ». *FEMS Microbiology Letters* 364, n° 16 (1 septembre 2017). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx165>.
- Zhao, Lishan, Wei-chen Chang, Youli Xiao, Hung-wen Liu, et Pinghua Liu. « Methylerythritol Phosphate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis ». *Annual review of biochemistry* 82 (2013): 497-530. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-052010-100934>.
- Zhao, Tao., Krokene, Paal., Hu, Jiang., Christiansen, Erik., Björklund, Niklas., Långström, Bo., Solheim, Halvor., Borg-Karlson, Anna-Karin. « Induced Terpene Accumulation in Norway Spruce Inhibits Bark Beetle Colonization in a Dose-Dependent Manner ». Consulté le 24 août 2021. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0026649>.
- Zhao, Tao, Paal Krokene, Jiang Hu, Erik Christiansen, Niklas Björklund, Bo Långström, Halvor Solheim, et Anna-Karin Borg-Karlson. « Induced Terpene Accumulation in Norway Spruce Inhibits Bark Beetle Colonization in a Dose-Dependent Manner ». *PLOS ONE* 6, n° 10 (19 octobre 2011): e26649. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026649>.
- Zhou, Jie, Taicheng Zhu, Zhen Cai, et Yin Li. « From cyanochemicals to cyanofactories: a review and perspective ». *Microbial Cell Factories* 15, n° 1 (8 janvier 2016): 2. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0405-3>.

Titre : Ingénierie du métabolisme de capture du CO₂ chez les cyanobactéries pour la photoproduction de molécules à haute valeur ajoutée (terpènes)

Mots clés : Cyanobactérie, Biologie synthétique, Photoproduction, Biocarburants, molécules à haute valeur ajoutée, Terpènes

Résumé : Les cyanobactéries sont des micro-organismes photosynthétiques considérés comme des usines cellulaires prometteuses pour la production biotechnologique commercialement viable, durable et soutenable de molécules carbonées d'intérêts à partir de l'énergie solaire, du CO₂, et d'eau (même salée et/ou polluée). Le laboratoire s'intéresse à la production terpènes, des molécules au myriade d'applications pour la cosmétique (parfums), la santé (antimicrobiens) et l'environnement (biocarburants).

Pour permettre aux cyanobactéries de devenir des usines cellulaires efficaces, un des défis majeurs est de mieux comprendre et d'améliorer leur métabolisme d'assimilation du carbone, où les principales pertes d'énergie au cours de la photosynthèse peuvent être attribuées à des goulets d'étranglement dans le cycle de Calvin-Benson (CCB), qui fixe le CO₂.

En vue de l'optimisation du métabolisme de capture du CO₂, je me suis concentrée sur l'influence de la modification (au niveau de leur séquence) et de leur quantité (surproduction) de deux enzymes clés du CCB : la RuBisCO et la Phosphoribulokinase au sein de 3 châssis cyanobactériens modèles : *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Synechococcus* sp. PCC 7942 et *Synechococcus* sp. PCC 7002, présentant des particularités physiologiques intéressantes pour la biotechnologie.

En vue de l'optimisation de la photoproduction de terpènes (limonène, bisabolène, farnésène et santalène), j'ai combiné au sein de ces 3 cyanobactéries, l'ingénierie métabolique du CCB à la production de terpènes, pour tirer parti de la redirection du flux de carbone du CCB vers la maximisation des rendements de ces molécules carbonées.

Ainsi, pour plusieurs de ces stratégies, l'accumulation de biomasse, les vitesses de croissance et les rendements de production en terpènes ont été accrus.

D'autre part, par une approche génétique chez la souche *Synechocystis* sp. PCC 6803, j'ai participé à l'analyse des relations structure-fonction de la protéine rédox et intrinsèquement désordonnée CP12, un régulateur majeur du CCB. Dans cette étude, CP12 et ses cystéines en C-terminales ont montré *in vivo*, jouer un rôle majeur au niveau de processus lumière-dépendants, et de régimes de photohétérotrophie ou mixotrophie. Pour ces derniers, la protéine et ses résidus cystéines en C-terminal ont montré être essentiels pour métaboliser le carbone organique sous différentes formes, et ceci notamment dans le but d'économiser le pouvoir réducteur et maintenir une balance Carbone/Azote au sein de la cellule.

L'influence de CP12 sur la production de divers terpènes a également été analysée, et a permis, pour chacun, une augmentation des rendements.

Title : Engineering cyanobacteria's CO₂ capture metabolism for the photoproduction of high value added molecules (terpenes)

Keywords : Cyanobacteria, Synthetic biology, Photoproduction, Biofuels, High-value-added molecules, Terpenes

Abstract : Cyanobacteria are photosynthetic micro-organisms considered as promising cellular factories for the commercially viable, sustainable and durable biotechnological production of carbonaceous molecules of interest from solar energy, CO₂, and water (even salty and/or polluted). The laboratory is interested in the production of terpenes, molecules with myriad applications for cosmetics (perfumes), health (antimicrobials) and the environment (biofuels).

To enable cyanobacteria becoming efficient cellular factories, one major challenge is to better understand and improve their carbon assimilation metabolism, where the main energy losses during photosynthesis can be attributed to bottlenecks in the Calvin-Benson cycle (CCB), which fixes CO₂.

In order to optimize the CO₂ capture metabolism, I focused on the influence of the modification (protein sequence) and quantity (overproduction) of two key CCB enzymes: RuBisCO and Phosphoribulokinase in 3 model cyanobacterial species: *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Synechococcus* sp. PCC 7942 and *Synechococcus* sp. PCC 7002, presenting physiological peculiarities of interest for biotechnology.

For the optimization of terpene (limonene, bisabolene, farnesene and sandalwood) photoproduction, I combined within these 3 cyanobacteria, metabolic engineering of CCB with terpene production, to take advantage of the redirection of carbon flux from CCB, to maximize yields of these molecules.

Thus, for several of these strategies, biomass accumulation, growth rates and terpene production yields were increased.

On the other hand, using a genetic approach in *Synechocystis* sp. PCC 6803 strain, I participated in the analysis of the structure-function relationships of the redox and intrinsically disordered CP12 protein, a major regulator of CCB. In this study, CP12 and its C-terminal cysteines were shown *in vivo* to play a major role in light-dependent processes, and in photoheterotrophy or mixotrophy regimes. For the latter, the protein and its C-terminal cysteine residues have demonstrated to be essential for metabolizing organic carbon in different forms, in order to save reducing power and maintain a Carbon/Nitrogen balance within the cell. The influence of CP12 on the production of various terpenes was also analyzed, and resulted in increased yields for each.