

CONCOURS GÉNÉRAL DES LYCÉES

—

SESSION 2017

—

**BIOTECHNOLOGIES**

(Classes de terminale STL)

PREMIÈRE PARTIE

Durée : 5 heures

*L'usage de la calculatrice est autorisé.*

*Les différentes parties du sujet peuvent être traitées de manière indépendante.*

**Consignes aux candidats**

- Ne pas utiliser d'encre claire
- N'utiliser ni colle, ni agrafe
- Numéroter chaque page en bas à droite (numéro de page / nombre total de pages)
- Sur chaque copie, renseigner l'en-tête + l'identification du concours :

Concours / Examen : CGL

Section/Spécialité/Série : BIOTE

Epreuve : 00101

Matière : BIOT

Session : 2017







# La levure, modèle et outil inépuisable des biotechnologies

Les levures, et principalement *Saccharomyces cerevisiae*, sont utilisées par l'homme depuis que celui-ci s'est sédentarisé.

Présentes sur les fruits, les fleurs et autres sources contenant des sucres, elles permettent la transformation des fruits ou des céréales en boissons alcoolisées (vin, cidre, bière...), la levée de la pâte pour la panification et constituent un complément alimentaire de premier ordre pour les êtres humains et les animaux.

Plus récemment, grâce à la connaissance approfondie de son génome, *Saccharomyces cerevisiae* représente un des principaux modèles cellulaires eucaryotes en recherche fondamentale.

Elle est également devenue un précieux auxiliaire notamment pour la production biotechnologique de molécules d'intérêt (vaccins, enzymes, vitamines, colorants...) et le criblage de nouveaux médicaments. Le dernier outil du génie génétique, appelé CRISPR-Cas9, augmente encore le potentiel de ces cellules.

## 1. Biologie de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*)

### 1.1. Structure cellulaire de *S. cerevisiae*

Entourée d'une paroi de glucane, mannane et protéines, d'un espace périplasmique et d'une membrane plasmique en bicouche lipidique, la levure possède dans son cytoplasme tous les organites d'une cellule eucaryote non photosynthétique comme le montre le dessin d'interprétation de l'ultrastructure d'une levure sur le **document 1**.

Q1. Reporter sur la copie les numéros du document 1 et y faire correspondre la signification de chacun d'eux.

### 1.2. Cycle biologique de *S. cerevisiae*

*S. cerevisiae* présente un cycle biologique haplo-diplophasique, c'est à dire qu'elle est capable de se multiplier, par bourgeonnement, par voie asexuée aussi bien sous la forme haploïde ( $n$  chromosomes) que sous la forme diploïde ( $2n$  chromosomes).

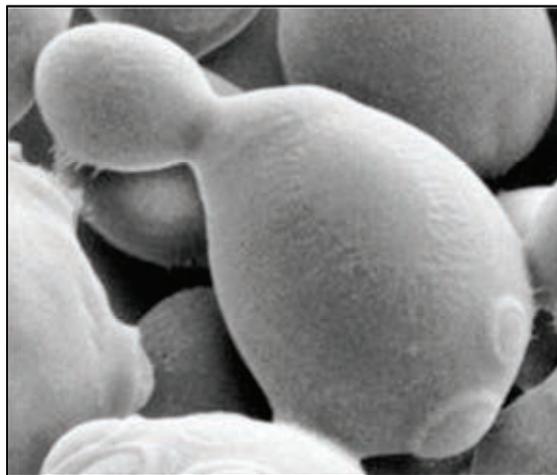
Le bourgeonnement est une mitose conduisant à la formation de deux cellules, de taille inégale mais de patrimoine génétique identique, laissant une trace cicatricielle sur la cellule mère.

Après détachement la cellule fille issue du bourgeon grossit et entre elle-même en bourgeonnement.

Le cycle de vie n'est pas indéfini, les cellules mères vieillissent puis meurent après 30 à 40 divisions.

À l'état diploïde, dans certaines conditions (généralement suite à un stress environnemental) *S. cerevisiae* entre en méiose pour former dans un ascospore quatre cellules haploïdes génétiquement différentes appelées gamètes. (Les gamètes libres, haploïdes, peuvent se multiplier par bourgeonnement comme dit ci-dessus).

On distingue deux types de gamètes de signe sexuel opposé qui, dans certaines conditions, émettent des phéromones leur permettant de se reconnaître et de fusionner donnant ainsi un zygote à l'origine du cycle diploïde. Ce phénomène appelé fécondation assure la reproduction par voie sexuée de la levure.



Photomicrographie de *S. cerevisiae* en microscopie électronique à balayage montrant une division par bourgeonnement et des cicatrices de bourgeonnement.

Un résumé schématique du cycle biologique de *S. cerevisiae* est présenté **document 2**.

Q2. Reporter les numéros (1 à 3) et les lettres (a à e) du **document 2** sur la copie et y associer les noms des cellules, les formes et les processus soulignés dans la description précédente du cycle biologique.

La méiose, contrairement à la mitose, entraîne un brassage génétique par échanges de fragments chromosomiques. Selon l'objectif biotechnologique visé, on peut donc chercher à favoriser la reproduction sexuée ou asexuée de la levure.

Q3. Justifier l'intérêt du maintien d'une population de levures en reproduction asexuée.

### 1.3. Métabolisme énergétique de *S. cerevisiae*

*S. cerevisiae* est un organisme facile à cultiver sur de nombreux substrats organiques souvent des déchets riches en glucides issus du monde industriel. Comme le montre le **document 3**, *S. cerevisiae* produit de l'ATP en dégradant le glucose aussi bien en présence de dioxygène (métabolisme aérobie) qu'en absence de dioxygène (métabolisme anaérobie dit fermentatif).

Dans un premier temps, le glucose est catabolisé en molécules d'acide pyruvique (pyruvate) par la glycolyse présentée dans le **document 4**

#### 1.3.1. Métabolisme anaérobie

En absence de dioxygène, *S. cerevisiae* tire son énergie de la fermentation principalement éthanolique selon la réaction décrite **document 5**.

Q4. Dresser le bilan moléculaire de la fermentation éthanolique d'une molécule de glucose.

#### 1.3.2. Métabolisme aérobie

En présence de dioxygène, le pyruvate est dégradé en CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O grâce aux voies métaboliques du cycle de Krebs et de la chaîne respiratoire décrites dans les **documents 7 et 8**.

Q5. Le **document 6** est un schéma de l'ultrastructure d'une mitochondrie. Sur la copie, nommer les éléments numérotés puis préciser la localisation cellulaire de la glycolyse, du cycle de Krebs et de la chaîne respiratoire.

Q6. À l'aide des **documents 5, 7 et 8** argumenter l'intérêt énergétique d'oxyder le glucose dans un environnement aérobie.

Q7. Préciser le rôle du dioxygène dans le fonctionnement de la chaîne respiratoire.

#### 1.3.3. Une application du métabolisme fermentatif : la production de la bière

La bière est une boisson gazeuse alcoolisée obtenue par fermentation alcoolique d'un moût préparé à partir de malt de céréales, de céréales, de houblon et d'eau potable selon les étapes décrites dans le **document 9**.

Les différentes étapes de fabrication de la bière consistent à préparer un milieu favorable au développement de la levure puis à la placer dans les conditions qui la conduisent à produire de l'éthanol et du CO<sub>2</sub>.

Q8. Justifier plus l'intérêt des étapes de brassage, d'aération, de fermentation primaire et de fermentation secondaire, en précisant le but recherché et le processus qui permet de l'atteindre.

## 1.4. La croissance cellulaire de *S. cerevisiae*

La croissance des levures est un élément important dans l'utilisation de ces micro-organismes en biotechnologie. Les levures constituent un groupe de microorganismes eucaryotes à croissance rapide. L'optimisation de la croissance est une étape primordiale en vue de la production d'une molécule d'intérêt par les levures.

La croissance peut se définir par l'augmentation de la taille chez un organisme pluricellulaire et/ou l'augmentation du nombre d'individus chez les microorganismes unicellulaires.

La croissance correspond donc à l'augmentation de la biomasse au cours du temps. Durant la phase exponentielle, la croissance est du type :

$$X_{t_2} = X_{t_1} e^{\mu(t_2-t_1)} \quad \text{Équation (1)}$$

Avec	$X_{t_1}$	la biomasse au temps $t_1$
	$X_{t_2}$	la biomasse au temps $t_2$
	$t_1$ et $t_2$	temps en heure appartenant à la phase exponentielle
	$\mu = \mu_{\text{exc}}$	le taux de croissance répérier en $h^{-1}$

Il est possible de linéariser la courbe obtenue en utilisant la fonction logarithme répérier.

Q9. Montrer que le logarithme répérier de l'équation (1) correspond à l'équation d'une droite de type :  $y = ax + b$

Rappels :  $\ln xy = \ln x + \ln y$   
 $\ln e^x = x$

Dans le but de déterminer le taux de croissance (ou vitesse de croissance), *S.cerevisiae* est mise en culture en milieu liquide M1 dont la composition est corrigée dans le **document 10**.

La culture est réalisée dans un fermenteur de 1 litre contenant 450 mL de milieu de culture et 50 mL d'inoculum à  $2,5 \cdot 10^8$  levures.mL<sup>-1</sup>.

Au bout de 2 heures (fin de phase de latence), la biomasse est de  $3,0 \cdot 10^7$  levures.mL<sup>-1</sup>.

Au bout de 10 heures (fin de phase exponentielle), la biomasse est de  $7,0 \cdot 10^{10}$  levures.mL<sup>-1</sup>.

Q10. Expliquer l'intérêt d'ajouter ces « extraits autolytiques de levures » au milieu.

Q11. Calculer la biomasse dans le fermenteur à  $t = 0$  h.

Q12. Établir l'équation aux grandeurs et aux unités permettant de calculer le taux de croissance  $\mu_{\text{exc}}$ . Écrire l'équation aux valeurs numériques et rendre un résultat avec 2 chiffres significatifs.

Q13. Indiquer comment va évoluer la biomasse au-delà de 10 heures. Justifier la réponse.

Afin de déterminer l'influence de la source de carbone sur la croissance, on réalise la même expérience avec un milieu M2 contenant 1 g de glucose par litre.

Le graphique du **document 11** montre l'influence de la concentration en substrat sur le taux de croissance de la levure.

Q14. D'après l'équation de l'hyperbole du **document 11**, calculer le taux de croissance  $\mu_{\text{exc}}$  pour une concentration en glucose dans le fermenteur de 1 g.L<sup>-1</sup>

Q15. Sachant que la durée de la phase exponentielle est de 10 heures pour la souche en culture dans le milieu M2, calculer à l'aide de l'équation (1), la biomasse produite.

Q16. Discuter l'effet de la concentration en glucose sur le développement de la souche.

## 2. La levure, modèle d'étude de pathologies humaines

### 2.1. Modèle d'étude de l'efficacité de nouvelles molécules à visées thérapeutiques

#### Le contexte

Certaines maladies génétiques humaines se traduisent par des déficits de la production d'ATP par les mitochondries. C'est le cas du syndrome NARP (neuropathie, ataxie, rétinite pigmentaire), associé à des mutations ponctuelles dans le gène *MT-ATP 6* de l'ADN mitochondrial, codant pour la sous-unité « a » de l'ATP synthase. Cette enzyme catalyse la dernière étape de production d'ATP par phosphorylation oxydative dans les mitochondries.

La sous unité « a » fait partie de la portion F0 de l'enzyme (voir **document 8**).

Le syndrome NARP se déclare généralement chez les jeunes adultes. Les signes cliniques correspondent à une combinaison des symptômes suivants : faiblesse musculaire, troubles de l'équilibre, troubles visuels et nerveux.

D'autres personnes présentent un déficit d'activité ATP synthase à cause de mutations dans deux gènes d'ADN nucléaire *ATP12* et *TMEM70*, codant pour des protéines nécessaires pour l'assemblage des différentes sous-unités de l'ATP synthase.

La levure *S. cerevisiae* est un bon modèle pour l'étude des maladies mitochondriales car :

- les gènes mitochondriaux et leurs fonctions ont été particulièrement conservés des levures aux cellules humaines ;
- on peut facilement détruire, déléter, muter ou remplacer un gène précis de levure ;
- les levures ont la capacité de survivre soit grâce à la respiration, soit grâce à la fermentation.

Ainsi on peut conserver des souches de levures mutées ayant perdu l'activité ATP synthase sur des milieux contenant des glucides fermentescibles (glucose par exemple).

On peut aussi rechercher si ces souches ont retrouvé leur aptitude à la phosphorylation oxydative en les plaçant sur des milieux où la respiration est nécessaire (milieux contenant du glycérol, de l'éthanol ou du lactate).

Cette levure est donc d'une aide précieuse pour tester l'efficacité de nouveaux médicaments ou l'effet de diverses substances, sans avoir recours à l'Être humain ou l'animal pour les essais thérapeutiques.

#### 2.1.1. Validation du modèle « levure »

Différentes levures mutantes vont être utilisées pour la recherche de molécules capables de corriger des défauts de l'ATP synthase.

Il s'agit :

- d'une levure **fmc1Δ**, ayant subi une délétion d'un **gène nucléaire** codant pour une protéine nécessaire à l'assemblage de la sous-unité F1 de l'ATP synthase, à des températures de 35 à 37 °C. Cette levure montre les mêmes déficits que les cellules des personnes atteintes des mutations nucléaires citées précédemment ;
- de **cinq souches** de levures portant les mêmes mutations dans le gène **mitochondrial ATP6** que de nombreux patients atteints de syndrome de NARP : mutation T8993G ou mutation T8993C ou mutation T9176G ou mutation T9176C ou mutation T8851C.

Des dilutions en série de suspensions de levure sauvage (*wild type*) ou de levure fmc1Δ, ou des 5 mutants NARP sont déposées par spot sur des milieux gélosés contenant soit du glucose, soit du glycérol, puis cultivées à 35 ou 37 °C pendant plusieurs jours. Le **document 12a** montre les résultats de culture.

Les dilutions en série des suspensions de levure suivent une raison de 1/5.

Q17. Dresser un tableau de travail montrant comment obtenir 100 µL de chacune de ces dilutions. Le diluant utilisé est l'eau physiologique. Établir une liste du matériel nécessaire.

Q18. En tenant compte du contexte évoqué précédemment, préciser l'intérêt des cultures sur milieu glucosé.

Q19. Analyser les résultats obtenus sur milieu contenant du glycérol.

**Le document 12b** présente la production d'ATP par les divers types de levures lors de la culture sur milieu glycérolé à 37 °C.

Remarque : le déficit de production d'ATP doit être marqué (de l'ordre de 80 % ou plus) pour qu'un défaut net de culture apparaisse chez la levure ou que les symptômes du syndrome de NARP soient sévères chez l'être humain.

Q20. Montrer que les résultats présentés dans le document 12 sont en accord avec la remarque précédente.

Pour évaluer la fiabilité des réactions de la levure vis-à-vis de substances médicamenteuses pouvant agir sur la synthèse d'ATP, on place la souche *fmc1Δ* en présence d'acide dihydrolipoïque (DHLA), substance actuellement utilisée pour le traitement d'encéphalopathies d'origine mitochondriale. La levure *fmc1Δ* est ensemencée en nappe sur un milieu gélosé glycérolé. Des disques stériles imprégnés de différentes quantités de DHLA ou de DMSO (diméthylsulfoxyde, sans effet sur la synthèse d'ATP) sont déposés à la surface de la gélose. La boîte est incubée 7 jours à 35 °C. Les résultats figurent dans le **document 13**.

Q21. Analyser les résultats.

Q22. Expliquer en quoi l'ensemble des résultats obtenus permet de valider le modèle de la levure pour l'étude des substances actives sur les déficits en ATP synthase.

### 2.1.2. Recherche de substances actives sur les déficits en ATP synthase

La recherche est conduite en deux étapes.

Dans un premier temps, 12 000 composés, dont la biodisponibilité et la toxicité ont été testées sur des êtres humains, sont mis en présence de levure *fmc1Δ* selon un test voisin de celui décrit pour la DHLA : ensemencement en nappe de milieu glycérolé et dépôt de disques imbibés des différentes substances à tester puis incubation à 35 °C.

Une substance X est capable de corriger le défaut présenté par la souche *fmc1Δ*.

Q23. Décrire le résultat attendu au test pour la substance X.

En pratique, seules 0,1 % des molécules testées ont montré cette aptitude. C'est le cas de la chlorhexidine (CH). Le **document 14** est une photographie du résultat observé lorsque le disque est imbibé de 4 nanomoles de CH.

Q24. Interpréter le résultat a priori surprenant du test de CH.

Dans un deuxième temps, les molécules efficaces sur la souche *fmc1Δ* sont testées sur les levures mutantes *ATP6*. Le **document 15** montre les résultats d'une culture de différentes souches de levures mutantes, à différentes concentrations, sur milieu glycérolé supplémenté avec de la chlorhexidine ou du DMSO. L'incubation a duré 7 jours à 35 °C.

Q25. Analyser et interpréter les résultats.

## 2.2. Modèle d'étude du cycle cellulaire et de ses dysfonctionnements

Comme vu lors de la première partie, ces êtres vivants unicellulaires eucaryotes peuvent exister à l'état haploïde ou diploïde et leurs mécanismes cellulaires sont un peu moins complexes que dans les cellules humaines. De plus leur culture est facile.

Cette partie du sujet propose d'étudier un aspect du contrôle du cycle cellulaire de la levure et son application comme modèle dans l'espèce humaine. En effet, ces mécanismes présentent de grandes similitudes entre la levure et l'espèce humaine.

Le prix Nobel de médecine a été décerné en 2001 à Leland Hartwell, Paul Nurse et Tim Hunt pour leurs travaux sur les contrôles du cycle cellulaire depuis le début des années 1970.

Comme le montre le **document 16**, la levure *S. cerevisiae* bourgeonne pour donner 2 cellules filles de tailles différentes. Le point START est un point de contrôle entre G1 et S de ce cycle cellulaire de bourgeonnement.

L. Hartwell et ses collaborateurs ont émis l'hypothèse qu'il serait possible d'identifier les gènes responsables de la régulation du cycle cellulaire en mettant en culture des levures mutées au niveau de

gènes dont l'expression dépend de la température (gènes dits « température sensible TS »). Ces levures mutées sont appelées mutants TS.

L'inactivation du gène muté, à température restrictive, se traduit par un arrêt de culture. La culture est normale (phénotype sauvage) à température permissive.

Parmi les protéines du cycle cellulaire, certaines comme les CDC (« *cell division cycle* ») régulent le passage d'une étape du cycle à l'autre. Les mutations sur les gènes *cdc* sont numérotées dans l'ordre de leur découverte (exemple *cdc3<sup>ts</sup>*).

Q26. D'après le **document 16**, émettre une hypothèse sur la morphologie possible d'une levure TS dont un facteur protéique CDC contrôlant le point START serait inactivé à température restrictive.

La méthode de sélection des mutants TS est illustrée par le **document 17**.

Q27. Préciser le(s) numéro(s) porté(s) par la colonie de mutants TS.

La microscopie optique permet d'observer les étapes du cycle cellulaire dans lequel les levures TS se trouvent après prélèvement de cultures à 22 °C (température permissive) et 36 °C (température restrictive).

Les **documents 18 et 19** montrent les morphologies observées par l'équipe de L. H. Hartwell.

Q28. D'après le **document 19**, préciser l'étape du cycle cellulaire à laquelle les mutants *cdc7<sup>ts</sup>* et *cdc28<sup>ts</sup>* se sont arrêtés.

Q29. Comparer la morphologie des levures TS sur les 2 photographies du **document 18** et conclure quant à l'état d'avancement dans le cycle des levures TS après culture à 22 °C ou après culture à 36 °C.

Comme le montre le **document 19**, le nombre de gènes entrant en jeu dans les contrôles du cycle est bien supérieur au nombre d'étapes du cycle, il y a donc des gènes différents qui interagissent entre eux sur un processus commun, ce phénomène est appelé épistasie.

Les expériences d'épistasie ont permis de détailler l'ordre dans lequel les protéines issues de l'expression des gènes *cdc* interviennent comme par exemple les protéines CDC7 et CDC28.

Q30. D'après l'analyse des schémas du **document 20**, donner l'ordre dans lequel les protéines CDC7 et CDC28 agissent sur le cycle cellulaire.

La levure étant un micro-organisme eucaryote, Melanie G. Lee et Paul Nurse se sont demandés s'il n'y avait pas des gènes *cdc* communs entre la levure et les cellules de mammifères. Ils ont donc utilisé l'approche de la complémentation dont les résultats ont été publiés en 1987 (*Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene cdc2, Nature 1987*).

Leur modèle d'étude a été *Saccharomyces pombe*, une autre levure. Lorsque la mitose de *S. pombe* est bloquée, celle-ci s'allonge et sa taille devient supérieure à la normale comme illustré **document 21**.

(Remarque : chez *S. pombe* *cdc2* correspond à *cdc28* de *S. cerevisiae*).

La complémentation a consisté dans ce cas à utiliser des mutants *cdc<sup>ts</sup>* classiques puis à introduire un plasmide porteur d'un gène *cdc* humain pour observer si celui-ci pouvait remplacer le *cdc<sup>ts</sup>*.

Q31. Expliciter l'hypothèse de travail de M. Lee et P. Nurse quant aux expériences de complémentation entre les gènes *cdc* des levures et les gènes *cdc* humains.

Q32. Comparer les morphologies des mutants *cdc<sup>ts</sup>* et des mutants complémentés.

Q33. Grâce à une synthèse des réponses aux questions Q29 à Q35, argumenter quant à l'intérêt d'utiliser les levures comme modèles d'études du cycle cellulaire des cellules humaines et notamment en cancérologie.

### 3. *S. cerevisiae*, outil de production « up-to-date »

#### 3.1. Ingénierie métabolique par CRISPR-Cas9

Le  $\beta$ -carotène est une molécule dont la production mondiale ne cesse d'augmenter. En effet il présente de nombreuses applications dans les industries chimiques, pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires en tant que précurseur de la vitamine A, pigment coloré en jaune-orangé et anti-oxydant (Cf. **document 22**). Le marché mondial du  $\beta$ -carotène était de 233 millions de dollars en 2010 et il devrait atteindre 309 millions de dollars en 2018. De nombreuses levures appartenant notamment au genre *Rhodotorula* produisent naturellement du  $\beta$ -carotène.

Une des stratégies utilisée pour réduire les coûts de production et obtenir des souches hyper-productrices de  $\beta$ -carotène est de modifier le génome d'une levure, *S. cerevisiae*, non productrice de  $\beta$ -carotène, pour la transformer en productrice de  $\beta$ -carotène.

##### 3.1.1. La voie métabolique permettant la biosynthèse du $\beta$ -carotène

Q34. Nommer les classes auxquelles appartiennent les différentes enzymes de cette voie métabolique. Argumenter la réponse.

Q35. Naturellement *S. cerevisiae* ne peut pas synthétiser le  $\beta$ -carotène mais synthétise le geranylgeranyl diphosphate (GGPP). Nommer les enzymes manquant potentiellement à *S. cerevisiae* pour qu'elle puisse synthétiser du  $\beta$ -carotène. Préciser les noms des gènes codant ces enzymes.

##### 3.1.2. Présentation du système CRISPR-Cas9 permettant la modification du génome de *Saccharomyces cerevisiae*

Pour transformer *S. cerevisiae* non productrice en levure productrice de  $\beta$ -carotène, il faut intégrer dans son génome le(s) gène(s) codant(s) le(s) enzyme(s) indispensable(s) pour la synthèse du  $\beta$ -carotène. L'utilisation des ciseaux moléculaires CRISPR-Cas9 utilisés pour modifier le génome de *S. cerevisiae* est décrite dans le **document 24**. CRISPR-Cas9 est un outil biotechnologique mis au point par deux chercheuses, l'une française, Emmanuelle Charpentier, l'autre américaine, Jennifer Doudna. Après avoir lu attentivement le **document 24 (a et b)**, répondre aux questions suivantes.

La séquence d'ADN cible à hydrolyser est la suivante :

5' TACTCGATATTCATTCATTGAACTGG 3'

Q36. Reproduire cette séquence sur la copie, entourer la séquence PAM, écrire le brin complémentaire et préciser son orientation.

Q37. Écrire la séquence de l'ARN guide correspondante au brin d'ADN cible 3'-5'.

Q38. Indiquer, à l'aide d'une flèche, le site où la protéine Cas9 hydrolyse cet ADN cible.

Q39. Préciser le nom de la liaison hydrolysée par la protéine Cas9.

Le **document 25**, représente la structure tertiaire de la protéine Cas9 de la bactérie *Streptococcus pyogenes*.

Q40. Nommer la liaison qui stabilise les structures secondaires de la protéine Cas9.

##### 3.1.3. Intégration simultanée de trois gènes de la voie métabolique du $\beta$ -carotène dans différents sites chromosomiques de *S. cerevisiae*

Des cellules de *S. cerevisiae* exprimant la protéine enzymatique Cas9 grâce à un vecteur plasmidique centromérique<sup>1</sup>(cf. **document 26a**) sont simultanément transformées avec trois ADN plasmidiques linéarisés apportant les gènes *BTS1*, *gène 2* et *gène 3* à intégrer au niveau de trois sites spécifiques X-

<sup>1</sup> Vecteur plasmidique centromérique : vecteur contenant un marqueur de sélection de levure, une origine de réplication chromosomique ARS (*Autonomously Replication Sequence*) et le centromère CEN des chromosomes de levure. Ils sont propagés avec un faible nombre de copies.

3, XI-2 et XII-5 du génome de *S. cerevisiae* (document 26b). Les cellules sont co-transformées soit avec un vecteur plasmidique épisomique<sup>2</sup> (roté + gRNA), exprimant les trois ARN guides complémentaires des trois sites d'intégration X-3, XI-2 et XII-5 du génome de *S. cerevisiae* (cf. document 26a) soit avec un vecteur plasmidique vice (= sans les gènes codant les trois ARN guides) roté - gRNA.

Les cellules de *S. cerevisiae* transformées obtenues sont cultivées sur un milieu adapté. Les résultats sont présentés dans le document 27.

- Q41. À l'aide du document 23, indiquer l'intérêt d'intégrer le gène *BTS1* dans une levure qui synthétise normalement le géranylgeranyl diphosphate.
- Q42. Donner les noms des gènes rotés gène 2 et gène 3 dans le document 26b nécessaires pour que la voie métabolique du  $\beta$ -carotène soit complète.
- Q43. Justifier la présence des gènes gRNA1, gRNA2 et gRNA3 et du gène Cas9 dans les deux vecteurs plasmidiques présentés dans le document 26a.
- Q44. Justifier la couleur des colonies du document 27a ayant intégré simultanément les trois gènes *BTS1*, gène 2 et gène 3.
- Q45. Analyser les résultats présentés dans les documents 27a et 27b et expliquer le rôle du vecteur plasmidique épisomique vice (-gRNA) dans ces expériences. Montrer que les résultats présentés dans le document 27c étaient prévisibles.

### 3.2. *S. cerevisiae* prometteur aussi pour la biologie de synthèse

*S. cerevisiae* est aussi le premier modèle eucaryote utilisé par la biologie synthétique<sup>3</sup> afin de créer une voie de biosynthèse de l'acide artémisinique (le précurseur nécessaire pour synthétiser par voie chimique un antipaludéen : l'artémisinine).

La production classique de cet antipaludéen est assurée par la culture d'*Artemisia annua* (*A. annua*), une plante annuelle dont les feuilles contiennent ce principe actif. Mais cette production est variable selon les variations météorologiques, la richesse du sol, les maladies... L'idée de fabriquer les gènes de biosynthèse de l'acide artémisinique et de les exprimer chez la *S. cerevisiae* est donc apparue comme étant une possibilité permettant de s'affranchir de ces aléas.

Le document 28 présente l'ensemble de la voie de biosynthèse et tous les gènes impliqués. La stratégie employée doit résoudre 3 problèmes :

- utiliser et augmenter l'expression des protéines enzymatiques de la phase de synthèse du farnésyl diphosphate (FPP), cette voie de biosynthèse est naturellement présente chez la levure ;
- bloquer la voie de synthèse de l'ergostérol<sup>4</sup> (en réprimant le gène *ERG9*), en utilisant un « interrupteur génique »;
- synthétiser et faire exprimer de la manière la plus efficace les gènes (5 au total) d'*A. annua* permettant la synthèse d'acide artémisinique (AA) à partir de l'amorphosine (AD).

Après lecture et analyse du document 28 :

- Q46. Lister les gènes nécessaires à la synthèse de l'acide artémisinique en différenciant ceux issus de *S. cerevisiae* et ceux issus d'*A. annua*.
- Q47. Expliquer pourquoi la voie de biosynthèse de l'ergostérol doit être réprimée.

La biologie de synthèse optimise l'expression des gènes et la production de protéines en concevant et associant ces gènes et ces séquences régulatrices de façon à les faire fonctionner de manière coordonnée. Chacun de ces éléments est qualifié de « biobrique ».

<sup>2</sup> Vecteur plasmidique épisomique : vecteur contenant un marqueur de sélection de levure et l'origine de réplication du vecteur 2 $\mu$  de levure. Ils sont propagés de façon stable avec 20 à 50 copies par cellule.

<sup>3</sup> La biologie de synthèse, discipline récente utilisant les ressources de la biologie moléculaire, de la bioinformatique, des nanotechnologies et de la synthèse chimique pour construire des gènes, des voies métaboliques, des génomes... afin de produire des biomolécules, des virus, des bactéries, des levures « synthétiques ».

<sup>4</sup> La synthèse de l'ergostérol doit être possible en début de culture car cette molécule est indispensable pour l'intégrité et le fonctionnement des membranes de la levure.

La répression de ERG9 (gène codant la squalène synthase) est obtenue avec un promoteur<sup>5</sup> connu de la levure, le promoteur du gène CTR3 (pour « Copper Transport 3 »). Le gène CTR3 code une protéine membranaire transportant l'ion  $\text{Cu}^{2+}$ . Le fonctionnement simplifié de ce système figure dans le **document 29**.

- Q48. Schématiser la construction réalisée avec le gène ERG9.  
Q49. Préciser quel autre gène doit être présent et exprimé chez la levure pour que ce système fonctionne et préciser, en le justifiant, si du cuivre sera ou non nécessaire pour réprimer l'expression de ERG9.

Ce système, peu coûteux, a été préféré à un système similaire utilisant un promoteur issu du métabolisme de la méthionine ( $P_{\text{MET3}}$ ). À ces fins de validation du système retenu, on procède à une comparaison des deux.

- Q50. Analyser le **document 30** et conclure quant à l'efficacité du système utilisant le promoteur de CTR3.

La surexpression des gènes de la levure est obtenue par l'utilisation de promoteurs adaptés (ceux connus du système GAL, qui régulent l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme du galactose), par exemple celui de GAL7 ( $P_{\text{GAL7}}$ ).

Une collection de souches a été construite avec ces promoteurs « forts » assurant une transcription élevée du gène (promoteur de GAL7 par exemple) ou « faibles » assurant une transcription basse (promoteur de GAL3 par exemple). Une approche « pas à pas » est mise en œuvre, au cours de laquelle 4 gènes d'*A. annua* sont intégrés progressivement dans différentes souches de levure. Ces différentes souches (Y301 à Y1283) sont testées, les résultats sont présentés dans le **document 31**.

Au cours de ces tests l'enzyme codée par CPR1 et certains intermédiaires métaboliques se sont révélés toxiques pour les levures. Pour réduire le stress oxydatif et faciliter les réactions d'oxydation, un gène codant un cytochrome a été recherché chez *A. annua*, synthétisé puis introduit dans la levure (CYB5, à partir de la levure Y692).

D'autres améliorations génétiques et du procédé de fermentation ont permis d'augmenter significativement la production d'acide artémisinique. En particulier en solubilisant l'acide artémisinique produit dans un solvant, le myristate d'isopropyl (MIP), permettant d'extraire en continu l'acide artémisinique produit (méthode qualifiée de fermentation extractive, le composé d'intérêt étant extrait pendant la fermentation).

- Q51. D'après les **documents 31a, b et c** et en utilisant la chaire de biosynthèse présentée dans le **document 28** montrer que :

- les produits intermédiaires ou l'acide artémisinique sont toxiques et/ou le produit du gène CPR1 est effectivement toxique ;
- l'ajout de CYB5 permet une meilleure oxydation des sesquiterpènes.
- l'IPM n'est pas toxique et peut être utilisé pour mettre en œuvre une fermentation extractive ;
- la souche Y1283 permet la transformation à plus de 90 % des précurseurs en acide artémisinique.

Une souche encore plus efficace a été construite : Y1284. Une production en *fed-batch* avec extraction en présence de MIP permet d'obtenir une forte concentration en acide artémisinique (**document 32**).

- Q52. À partir de ces données calculer le facteur d'efficacité (valeur obtenue/valeur de référence) obtenu pour les 2 souches Y1283 et Y1284 en référence à Y285.

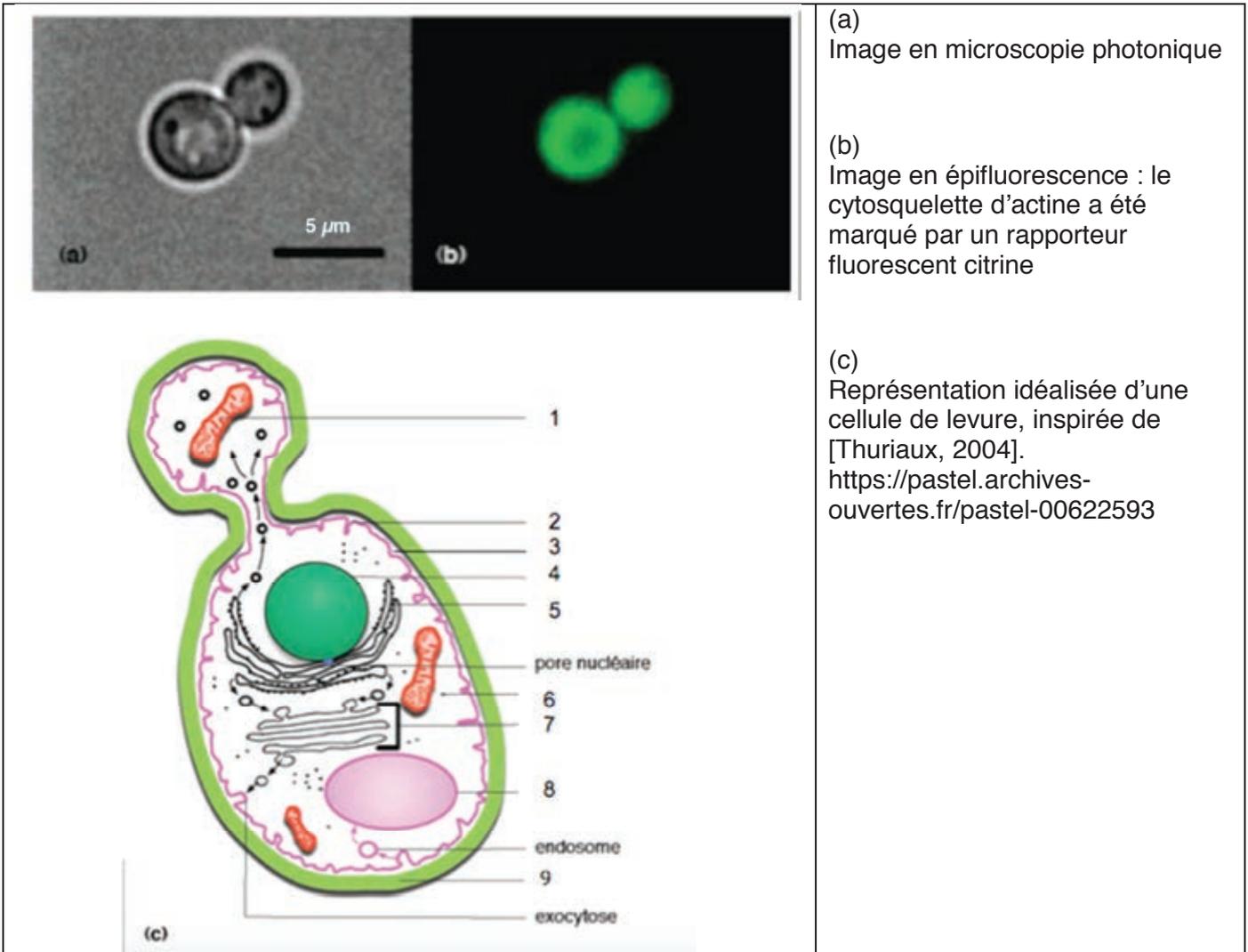
---

<sup>5</sup> Un **promoteur** est une région de l'ADN située à proximité d'un gène. Il est indispensable à la transcription de l'ADN en ARN. Le promoteur est la zone de l'ADN sur laquelle se fixe initialement l'ARN polymérase, avant de commencer la synthèse de l'ARN.

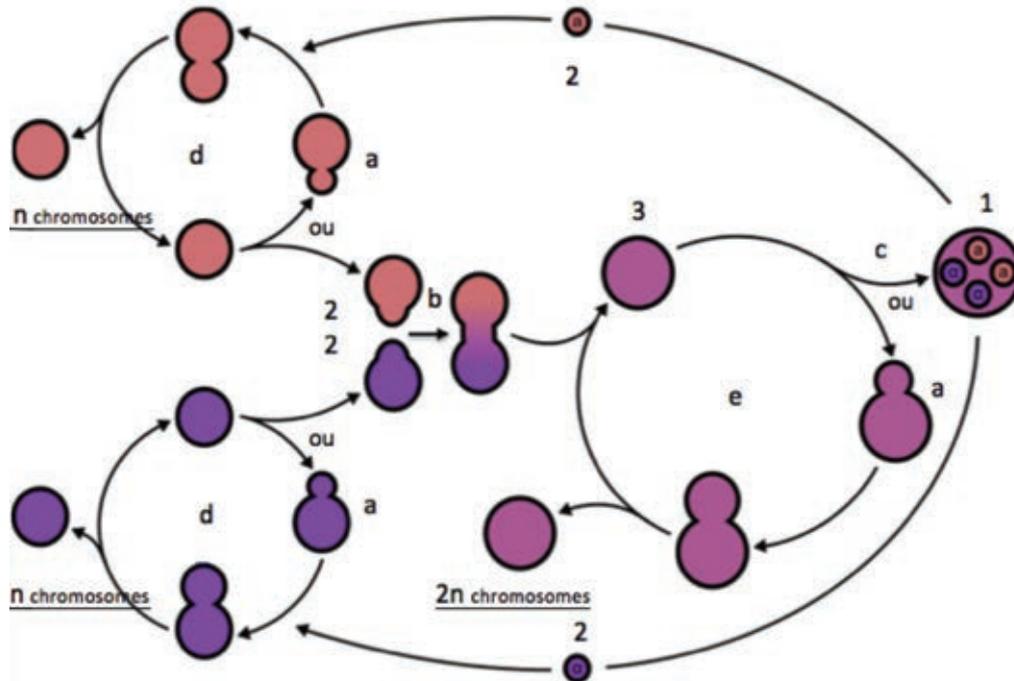
# Dossier technique

<b>Document 1</b> - Cellule de levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en bourgeonnement	2
<b>Document 2</b> - Cycles de vie de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (d'après <a href="https://fr.wikipedia.org">https://fr.wikipedia.org</a> )	3
<b>Document 3</b> - Représentation schématique du métabolisme du glucose chez la levure	3
<b>Document 4</b> - Dégradation enzymatique du glucose en acide pyruvique par la voie de la glycolyse	4
<b>Document 5</b> - Représentation schématique de la fermentation éthanolique à partir du glucose	5
<b>Document 6</b> - Représentation schématique d'une mitochondrie vue en coupe	5
<b>Document 7</b> - Cycle de Krebs	6
<b>Document 8</b> - Représentation schématique de la chaîne respiratoire mitochondriale	6
<b>Document 9</b> - La fabrication de la bière	7
<b>Document 10</b> - Composition des milieux de culture	8
<b>Document 11</b> - Évolution du taux de croissance de <i>S. cerevisiae</i> en fonction [glucose] <sub>milieu de culture</sub>	8
<b>Document 12</b> - Effet de la température, du glucose et du glycérol sur la culture de diverses souches de levure et leur production d'ATP	9
<b>Document 13</b> - Effet du DHLA sur la croissance de levures <i>fmc1Δ</i>	9
<b>Document 14</b> - Culture de la levure <i>fmc1Δ</i> autour d'un disque imbibé de chlorhexidine	10
<b>Document 15</b> - Effet de la chlorhexidine et du DMSO sur la croissance de différentes souches de levures	10
<b>Document 16</b> - Le bourgeonnement de <i>S. cerevisiae</i>	10
<b>Document 17</b> - Sélection de mutants TS	11
<b>Document 18</b> - Observations microscopiques de <i>S. cerevisiae</i>	11
<b>Document 19</b> - Phénotypes des mutants <i>cdc<sup>ts</sup></i> en fin de cycle cellulaire à une température restrictive	12
<b>Document 20</b> - Morphologies des levures mutantes TS cultivées à 22 °C puis 36 °C après deux cycles cellulaires	12
<b>Document 21</b> - Observations microscopiques des mutants <i>cdc2</i>	13
<b>Document 22</b> - Le β-carotène	13
<b>Document 23</b> - Voie métabolique de la biosynthèse du β-carotène	14
<b>Document 24</b> - L'outil biotechnologique, CRISPR-Cas9	15
<b>Document 25</b> - Structure tertiaire de la protéine Cas9 de <i>Streptococcus pyogenes</i>	16
<b>Document 26</b> - Schématisation du système CRISPR-Cas9 permettant l'intégration simultanée de trois gènes indispensables à la biosynthèse du bêta-carotène	17
<b>Document 27</b> - Résultats expérimentaux de l'intégration simultanée de trois gènes de la voie métabolique de biosynthèse du bêta-carotène dans le génome de <i>S. cerevisiae</i>	18
<b>Document 28</b> - Vue générale de la voie de synthèse de l'acide artémisinique	19
<b>Document 29</b> - Propriété et fonctionnement du promoteur de CTR3 ( $P_{CTR3}$ )	20
<b>Document 30</b> - Comparaison des 2 systèmes de répression de ERG9	20
<b>Document 31</b> - Augmentation de la production d'acide artémisinique en fiole d'erlenmeyer par construction de différentes souches de levure	21
<b>Document 32</b> - Production d'acide artémisinique	22

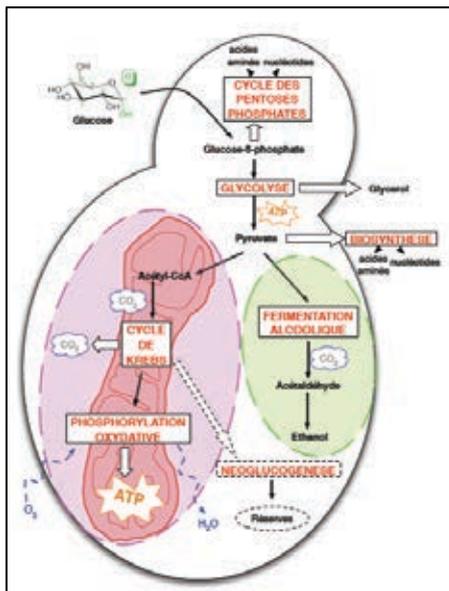
Document 1 - Cellule de levure *Saccharomyces cerevisiae* en bourgeonnement



**Document 2 - Cycles de vie de *Saccharomyces cerevisiae*** (d'après <https://fr.wikipedia.org>)



**Document 3 - Représentation schématique du métabolisme du glucose chez la levure**  
Adapté de [Rodrigues et al., 2006]), <https://pastel.archives-ouvertes.fr/pastel-00622593>

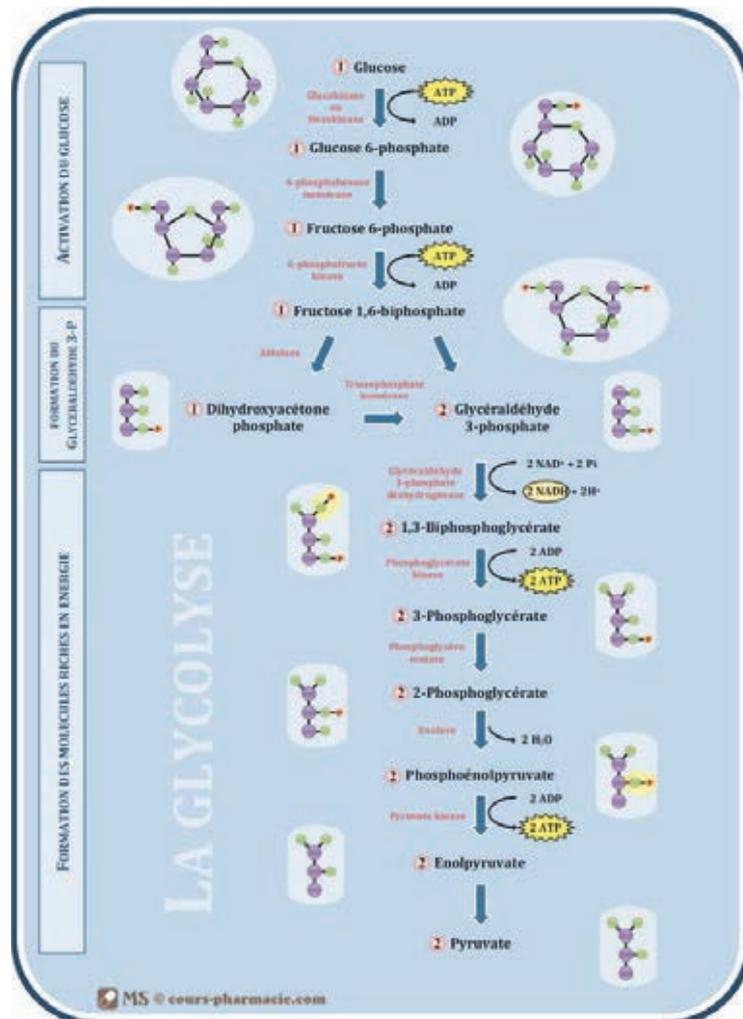


Le glucose est oxydé soit par la voie des pentoses phosphates, soit par la glycolyse. La glycolyse permet la synthèse d'ATP, de transporteurs réduits et de pyruvate. Le pyruvate peut soit être réduit par fermentation (à droite) soit oxydé par respiration (à gauche).

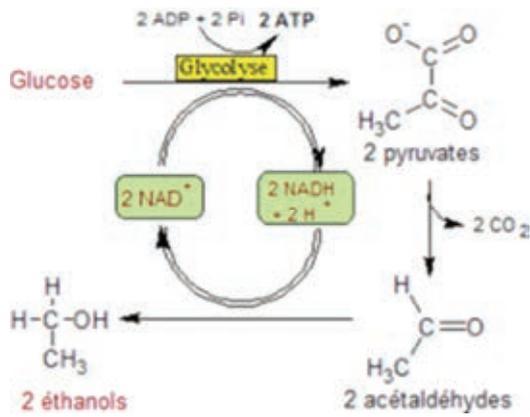
La fermentation alcoolique produit de l'éthanol en réoxydant les transporteurs réduits, ce qui permet de rétablir l'équilibre redox.

La respiration a lieu dans les mitochondries. Le pyruvate y est totalement oxydé en dioxyde de carbone grâce au cycle de Krebs via l'acétyl-coenzyme A. Les transporteurs réduits créés lors de cette oxydation sont réoxydés dans la membrane interne des mitochondries générant, par une cascade de transporteurs d'électrons, un flux de protons transmembranaire. Celui-ci permet, par phosphorylation oxydative, la synthèse d'ATP.

**Document 4** - Dégradation enzymatique du glucose en acide pyruvique par la voie de la glycolyse  
<http://www.cours-pharmacie.com/biochimie/metabolisme-des-glucides.html>  
 À partir d'une molécule de glucose on obtient 2 molécules d'acide pyruvique.



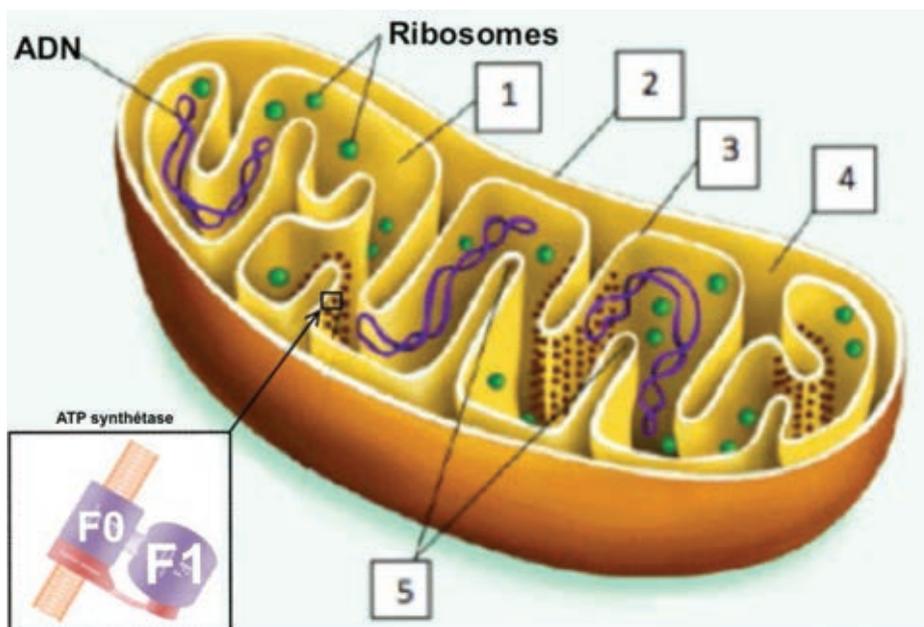
**Document 5 - Représentation schématique de la fermentation éthanolique à partir du glucose**



Lors de la fermentation alcoolique, l'acide pyruvique produit par la glycolyse est décarboxylé en acétaldéhyde puis hydrogéné en éthanol.

source : <https://upload.wikimedia.org>

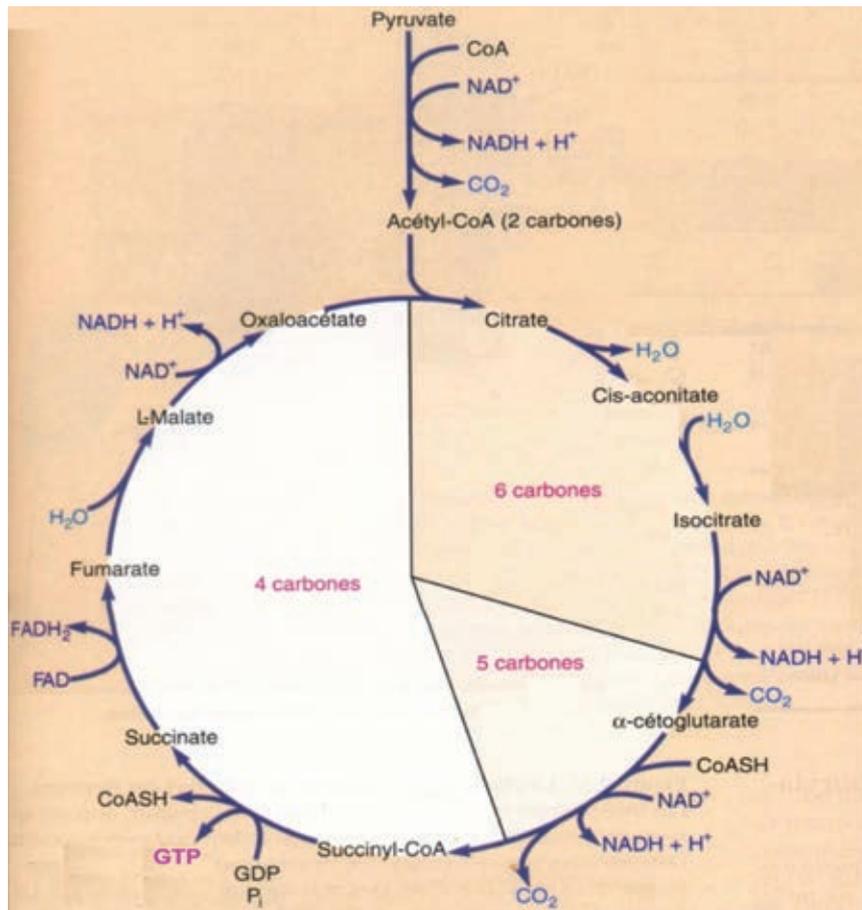
**Document 6 - Représentation schématique d'une mitochondrie vue en coupe**



## Document 7 – Cycle de Krebs

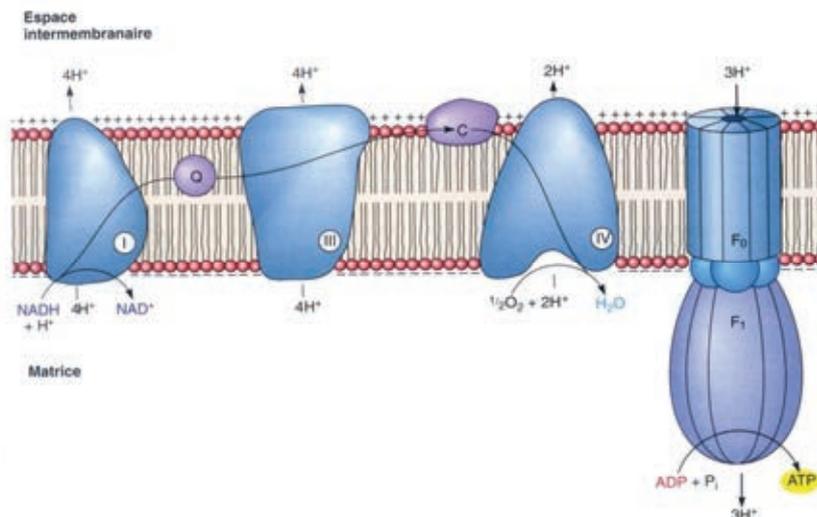
Microbiologie : Prescottt, Harley, Klein, ed. De Beek Université 2007

Transformation de l'acide pyruvique en acétyl-coenzyme A et sa dégradation complète dans la chaîne de réactions enzymatiques appelée « cycle de Krebs » (ou cycle des acides tricarboxyliques).



## Document 8 - Représentation schématique de la chaîne respiratoire mitochondriale

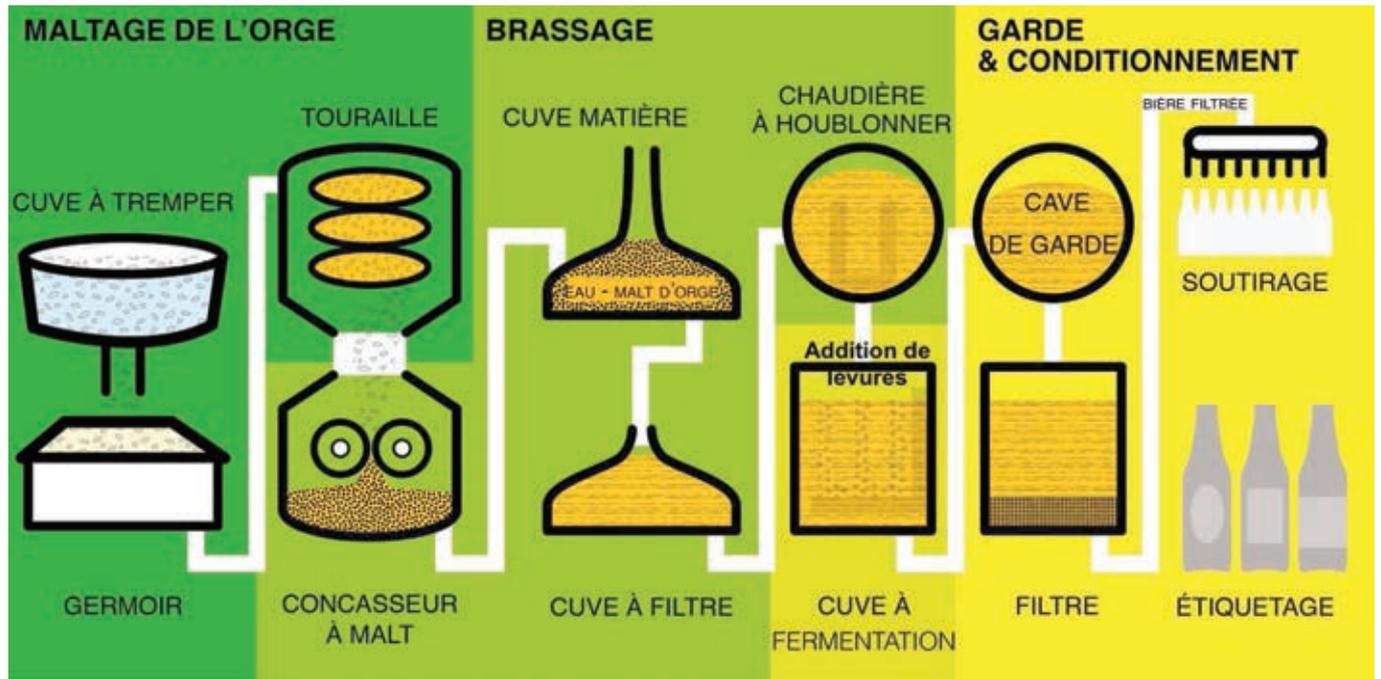
Microbiologie : Prescottt, Harley, Klein, ed. De Beek Université 2007



La réoxydation des transporteurs réduits ( $\text{NADH}, \text{FADH}_2$  et  $\text{NAD}^+$ ) gère dans la membrane interne mitochondriale un transport d'électrons ( $2e^-$ ) en cascade engendrant un flux de protons ( $\text{H}^+$ ) au travers de la membrane permettant par phosphorylation oxydative la synthèse d'ATP par l'ATP synthase. Le transport d'électrons est dépendant du dioxygène.

Selon le consensus actuel, il est admis que la réoxydation, dans la chaîne respiratoire mitochondriale, d'un  $\text{NADH}, \text{FADH}_2$  permet la synthèse de 3 ATP alors que celle de  $\text{FADH}_2$  permet la synthèse de 2 ATP.

## Document 9 - La fabrication de la bière



L'orge malté moulu, riche en amidon et alpha amylase, est mélangé à de l'eau dans une cuve chauffée afin que les amylases hydrolysent l'amidon (**brassage**). Le brassin obtenu est filtré, additionné de houblon et cuit pour supprimer les microorganismes d'altération et libérer les substances aromatiques du houblon.

Le moût obtenu refroidi et **aéré** est additionné de levures et gardé en cuve à 25-30°C le temps de la **fermentation éthanolique primaire**.

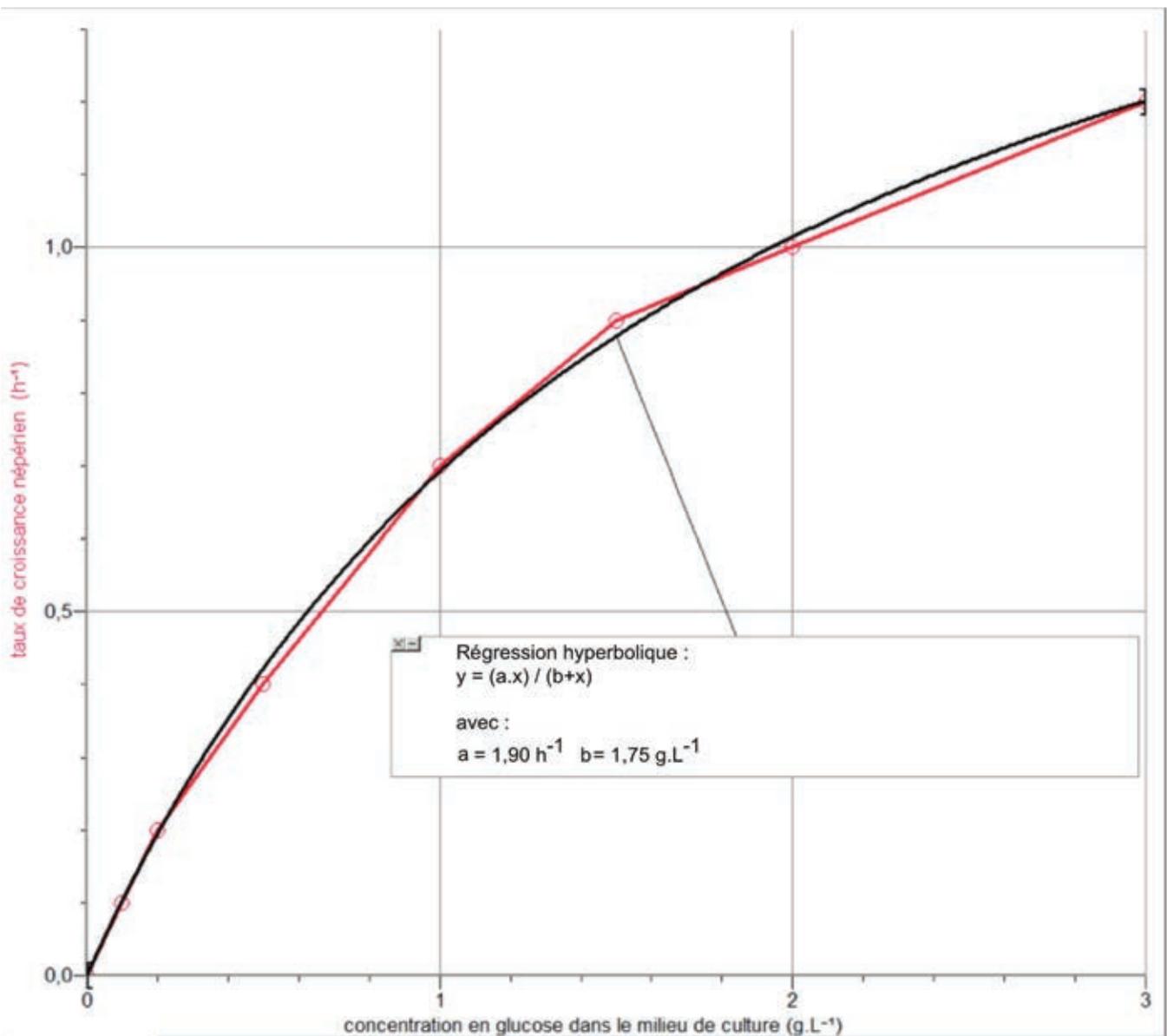
Après un repos en cuve au froid pour améliorer les qualités organoleptiques (garde), la bière est mise en bouteille. Une **fermentation éthanolique secondaire** (voire tertiaire) peut être provoquée en ajoutant lors de l'embouteillage un peu de sucre et de levures (refermentation).

Après 2 à 3 semaines à température ambiante, la bière peut être dégustée.

## Document 10 - Composition des milieux de culture

Milieu M1	Milieu M2
<ul style="list-style-type: none"><li>- 10 g d'extrait autolytique de levures,</li><li>- 10 g de peptones,</li><li>- 2 g de glucose,</li><li>- eau distillée pour compléter à 1 L.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- 10 g d'extrait autolytique de levures,</li><li>- 10 g de peptones,</li><li>- 1 g de glucose,</li><li>- eau distillée pour compléter à 1 L.</li></ul>

## Document 11 - Évolution du taux de croissance de *S cerevisiae* en fonction [glucose]<sub>milieu de culture</sub>



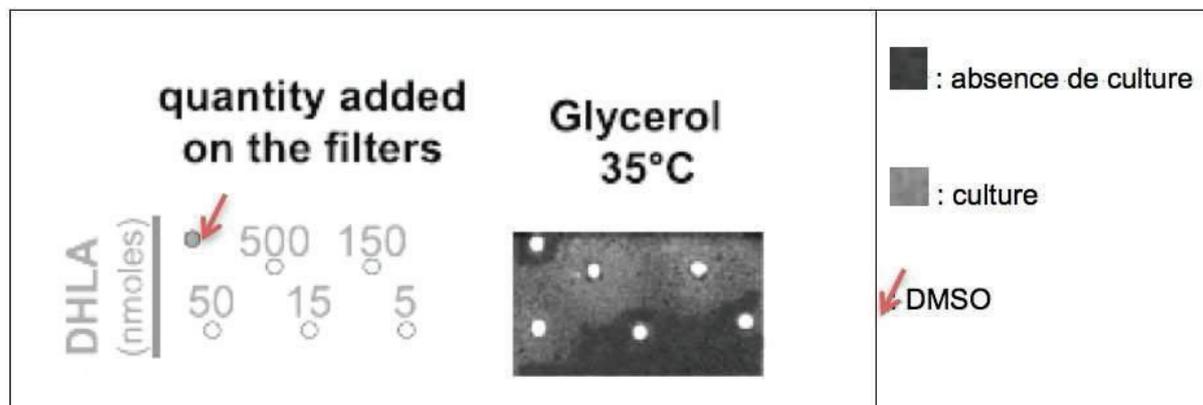
**Document 12 – Effet de la température, du glucose et du glycérol sur la culture de diverses souches de levure et leur production d'ATP**

Extrait de l'article du PNAS, juillet 2011 : « *A yeast-based assay identifies drugs active against human mitochondrial disorders* »

Document 12a Cultures de différentes souches de levures sur milieu riche en glucose ou en glycérol	Document 12b synthèse d'ATP par ces souches sur milieu glycérolé à 37°C																																																														
<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th colspan="2">Glucose</th> <th colspan="3">Glycerol</th> </tr> <tr> <th></th> <th colspan="2">35°C</th> <th>35°C</th> <th colspan="2">37°C</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><i>Wild type</i></td> <td colspan="2"></td> <td></td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td><i>T8993G</i></td> <td colspan="2"></td> <td></td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td><i>T8993C</i></td> <td colspan="2"></td> <td></td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td><i>T9176G</i></td> <td colspan="2"></td> <td></td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td><i>T9176C</i></td> <td colspan="2"></td> <td></td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td><i>T8851C</i></td> <td colspan="2"></td> <td></td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td><i>fmc1Δ</i></td> <td colspan="2"></td> <td></td> <td colspan="2"></td> </tr> </tbody> </table>		Glucose		Glycerol				35°C		35°C	37°C		<i>Wild type</i>						<i>T8993G</i>						<i>T8993C</i>						<i>T9176G</i>						<i>T9176C</i>						<i>T8851C</i>						<i>fmc1Δ</i>						<table border="1"> <thead> <tr> <th>% ATP synthesis</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>100</td> </tr> <tr> <td>7</td> </tr> <tr> <td>50</td> </tr> <tr> <td>&lt;5</td> </tr> <tr> <td>74</td> </tr> <tr> <td>6</td> </tr> <tr> <td>8</td> </tr> </tbody> </table>	% ATP synthesis	100	7	50	<5	74	6	8
	Glucose		Glycerol																																																												
	35°C		35°C	37°C																																																											
<i>Wild type</i>																																																															
<i>T8993G</i>																																																															
<i>T8993C</i>																																																															
<i>T9176G</i>																																																															
<i>T9176C</i>																																																															
<i>T8851C</i>																																																															
<i>fmc1Δ</i>																																																															
% ATP synthesis																																																															
100																																																															
7																																																															
50																																																															
<5																																																															
74																																																															
6																																																															
8																																																															

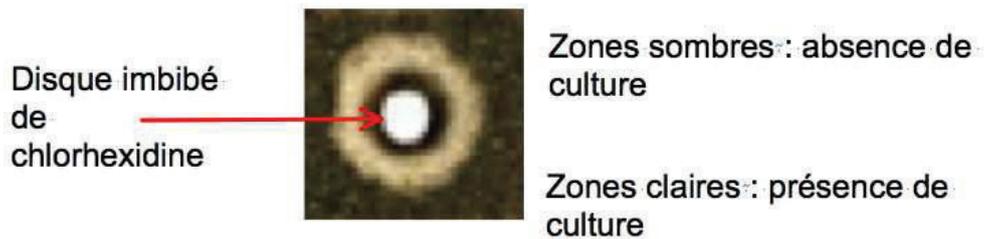
**Document 13 - Effet de DHLA sur la croissance de levures *fmc1Δ***

Extrait de l'article du PNAS, juillet 2011 : « *A yeast-based assay identifies drugs active against human mitochondrial disorders* »



**Document 14 - Culture de la levure *fmc1Δ* autour d'un disque imbibé de chlorhexidine**

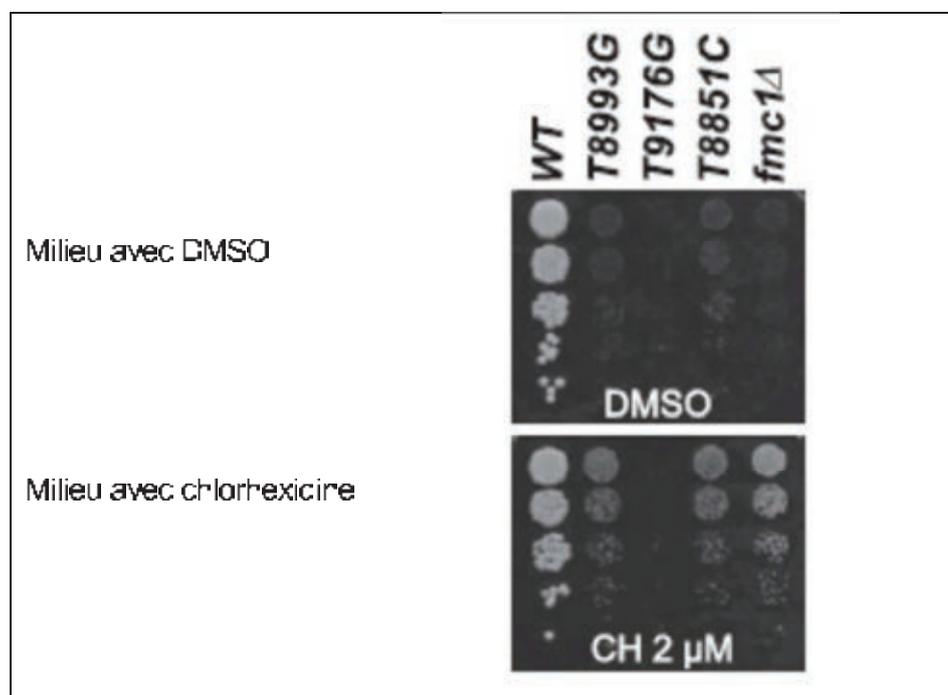
Extrait de l'article du PNAS, juillet 2011 : « *A yeast-based assay identifies drugs active against human mitochondrial disorders* »



**Document 15 - Effet de la chlorhexidine et du DMSO sur la croissance de différentes souches de levures**

Extrait de l'article du PNAS, juillet 2011 : « *A yeast-based assay identifies drugs active against human mitochondrial disorders* »

Rappel : le DMSO est une molécule sans effet sur la production d'ATP

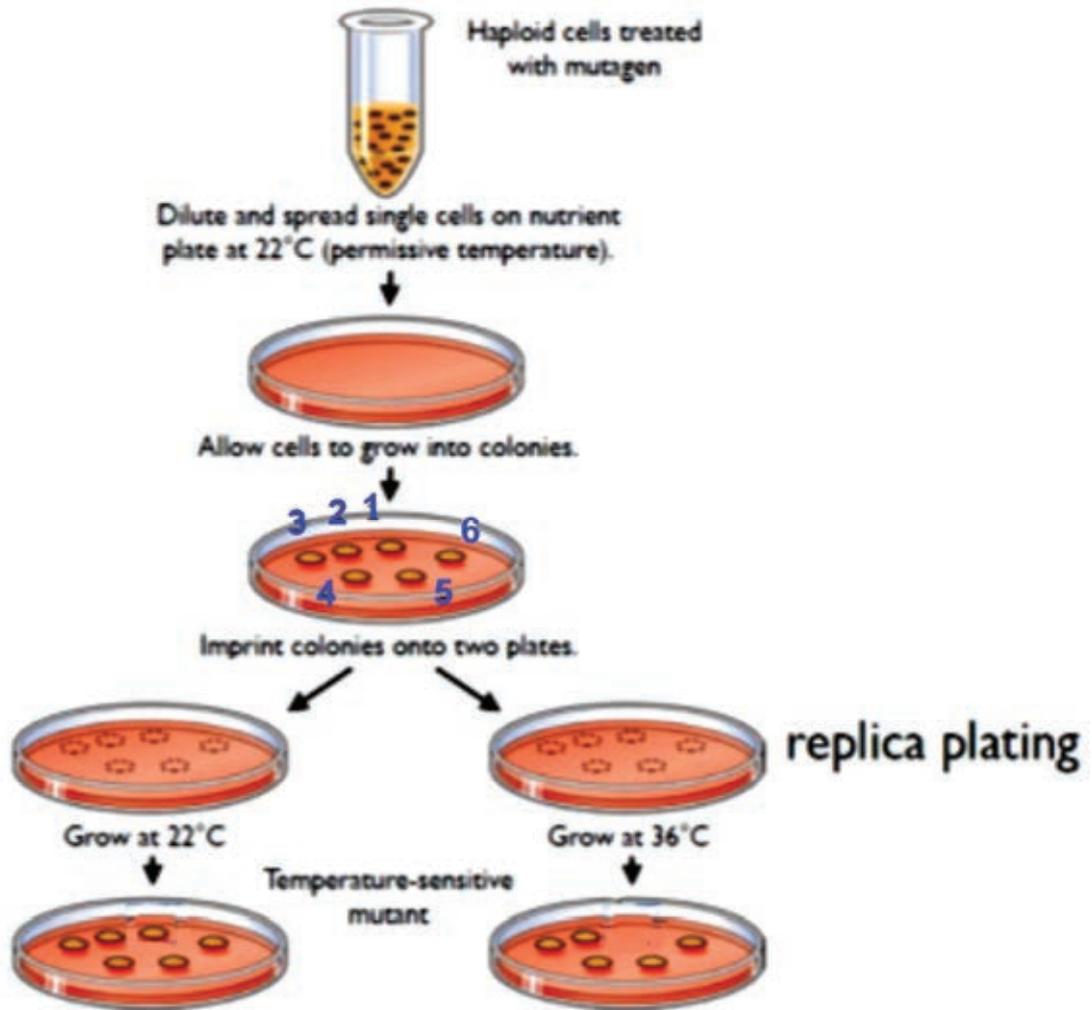


**Document 16 - Le bourgeonnement de *S. cerevisiae***

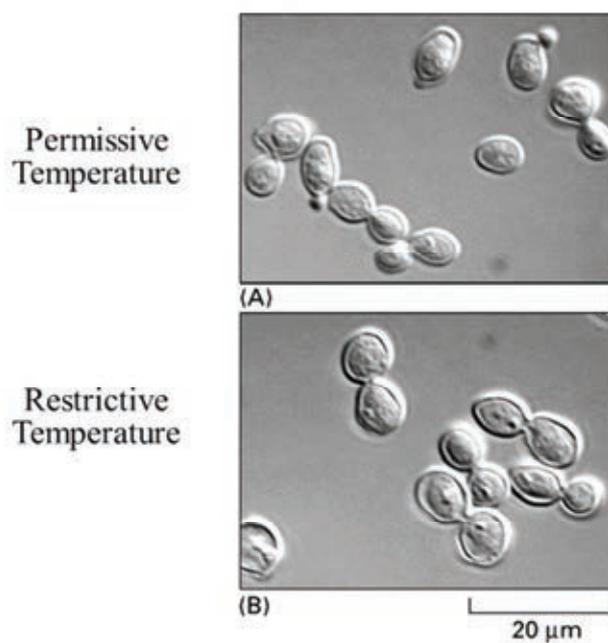
Molecular Biology of the cell, 4ème édition



Document 17 - Sélection de mutants TS



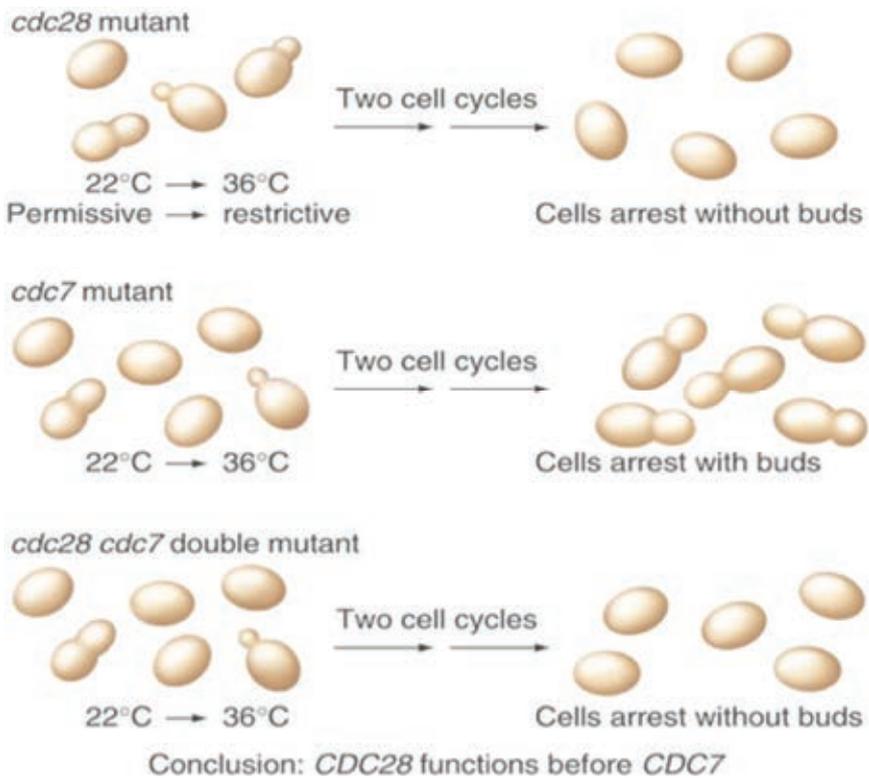
Document 18 - Observations microscopiques de *S. cerevisiae*



**Document 19** - Phénotypes des mutants *cdc*<sup>ts</sup> en fin de cycle cellulaire à une température restrictive  
 L. H. Hartwell et al., Genetics 74: 267-286 June, 1973

<i>cdc</i> gene number	prototype phenotype
1,19,25,29	
22,28,32	
24	
4	
2,6,7,8,9,13,16,17,20,21,23,26,30	
14,15,27,31	
5,18	
3,10,11,12	

**Document 20** - Morphologies des levures mutantes TS cultivées à 22°C puis 36°C après deux cycles cellulaires  
 MacGraw-Hill Companies, Inc

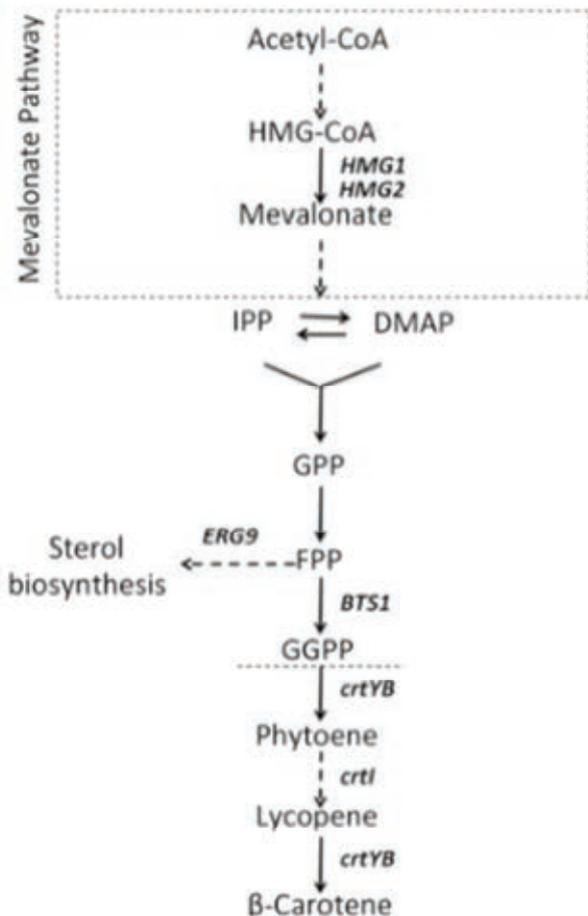


bud = bourgeon



**Document 23 - Voie métabolique de la biosynthèse du  $\beta$ -carotène**

D'après <https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-015-0288-3>



Légendes :

HMG-CoA : hydroxyméthylglutaryl-CoA

HMG1 et HMG2 : gènes codant l'enzyme HMG-CoA réductase (EC 1.1.1.88)

IPP :  $\Delta^3$  Isopentenyl diphosphate

DMAP : Diméthylallyl diphosphate

GPP : Geranyl diphosphate

FPP : Farnesyl diphosphate

ERG9 : gène codant l'enzyme squalène synthase (EC 2.5.1.21)

BTS1 : gène codant pour l'enzyme GGPP synthase (EC 2.5.1.29)

GGPP : Geranylgeranyl diphosphate

crtYB : gène codant l'enzyme phytoene synthase et l'enzyme lycopene cyclase (EC 2.5.1.32)

crtI : gène codant l'enzyme phytoene desaturase (EC 1.3.99.31)

## Document 24 - L'outil biotechnologique, CRISPR-Cas9

CRISPR-Cas9 est un outil biotechnologique révolutionnaire de découverte récente (2012). Cette technique puissante, facile à mettre en œuvre, peu onéreuse, permet de façon très spécifique de supprimer, modifier ou ajouter des gènes à la demande et de concevoir ainsi des organismes mutants.

Cette construction génétique se compose essentiellement de 2 éléments : Cas9 et CRISPR.

Les gènes codant ces deux éléments sont insérés dans des vecteurs plasmidiques d'expression qui sont ensuite intégrés dans la cellule à transformer.

La séquence d'ADN Cas9 code la synthèse de la protéine Cas9 qui appartient à la famille des endonucléases et dont l'activité est d'hydrolyser l'ADN cible afin de le modifier.

La séquence d'ADN CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Regions*) permet à la cellule de produire un ARN guide qui en se couplant à la protéine enzymatique Cas9 guide la protéine vers la zone de l'ADN cible à hydrolyser.

Une fois fixée à l'ADN cible grâce à la complémentarité entre l'ARN guide et l'ADN cible, la protéine Cas9 hydrolyse l'ADN cible en un endroit spécifique.

La spécificité du système CRISPR-Cas9 est déterminée par la séquence des **20 nucléotides** à l'extrémité 5' de l'ARN guide (gRNA) (partie en rouge dans le schéma ci-dessous).

Pour que le système CRISPR-Cas9 soit fonctionnel, la séquence d'ADN cible doit être immédiatement précédée d'une séquence PAM (*Protospacer Adjacent Motif*) 5'-NGG-3' (G = guanine et N = A, T, C ou G) pour être hydrolysée.

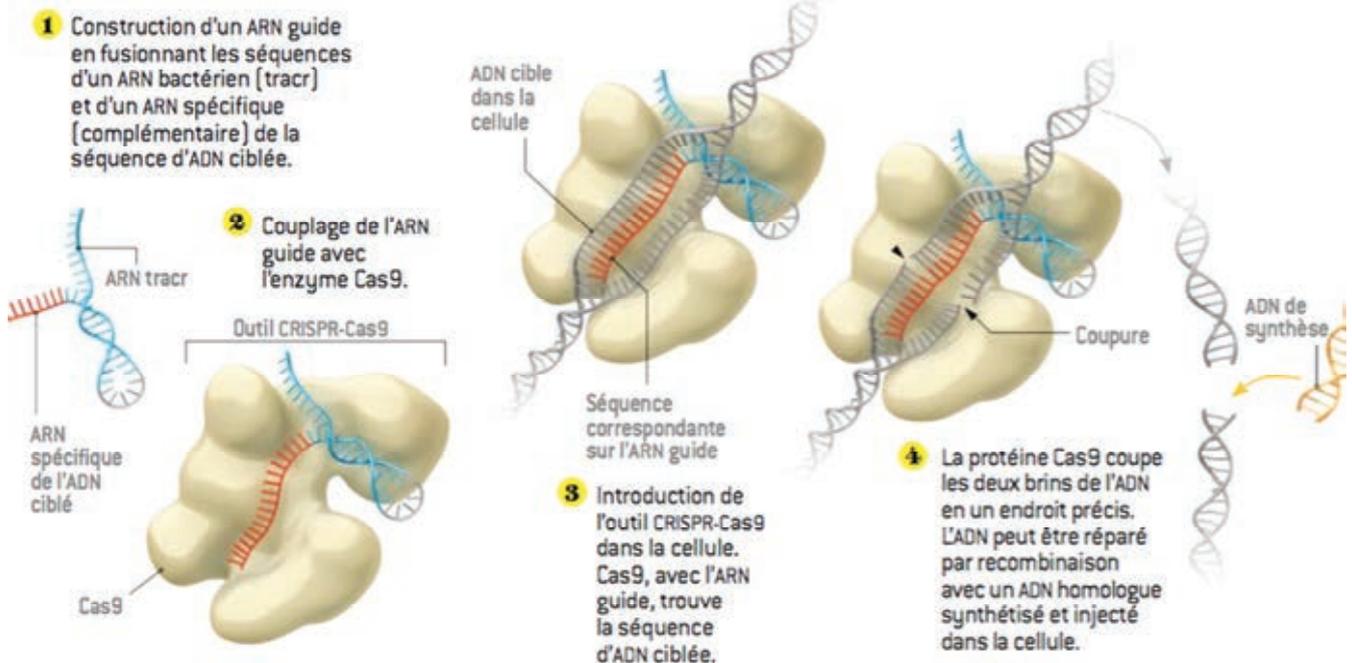
L'ARN guide positionne la protéine Cas9 au niveau de la séquence d'ADN cible grâce à la complémentarité des bases azotées puis la protéine Cas9 hydrolyse simultanément les deux brins d'ADN cible entre le troisième et le quatrième nucléotide en amont de la séquence PAM.

Par ailleurs, un ADN synthétique ayant été également introduit dans la cellule pourra être inséré par recombinaison homologue<sup>1</sup> au lieu de coupure pour obtenir un génome modifié.

### Document 24a

#### COMMENT L'OUTIL CRISPR-CAS9 FONCTIONNE

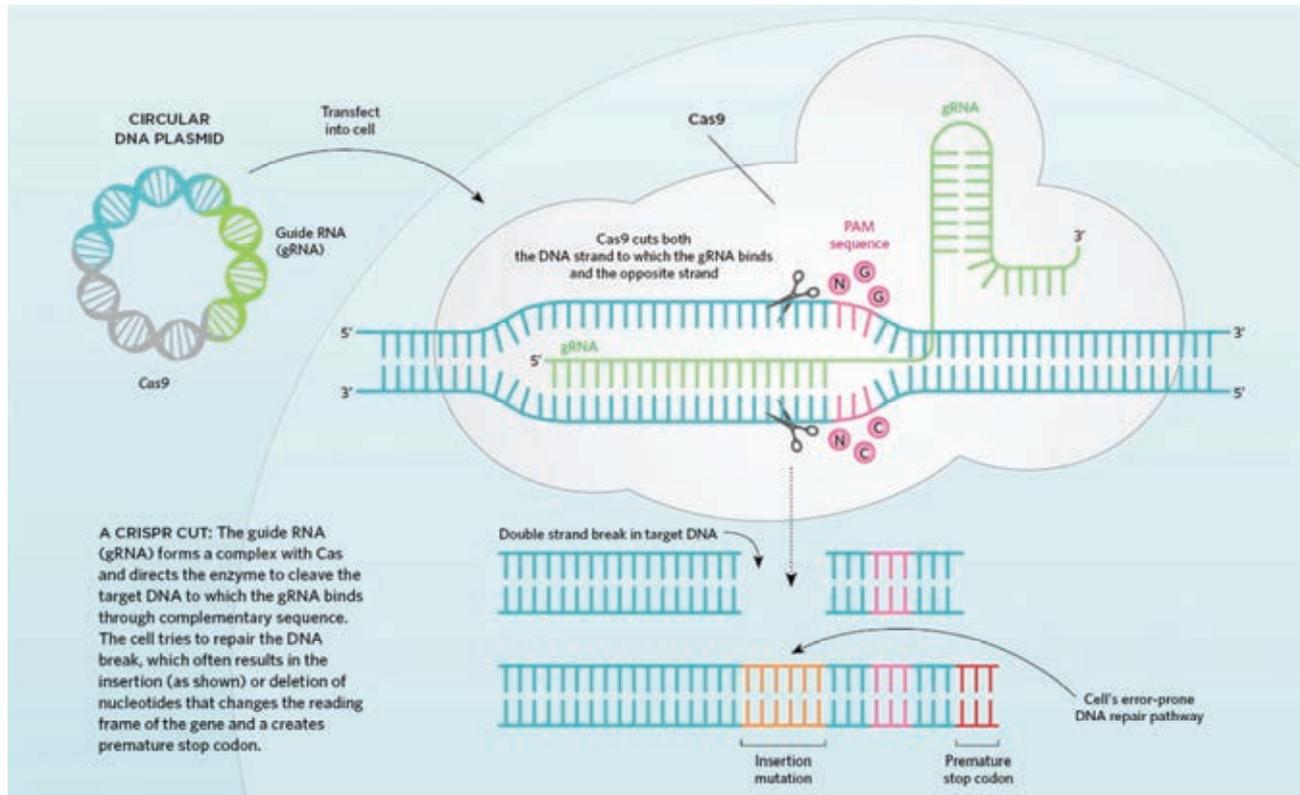
Les bactéries ont développé une arme précise et efficace, CRISPR-Cas9, contre les invasions virales. Des biologistes l'ont détournée pour en faire des ciseaux moléculaires coupant, dans les cellules, l'ADN à un endroit ciblé. Contrairement aux méthodes antérieures pour modifier le génome, qui nécessitent des enzymes spécifiques à chaque situation, l'outil CRISPR-Cas9 utilise une même protéine, l'enzyme Cas9, pour toutes les situations. Le seul élément spécifique à construire est un ARN qui guide l'enzyme Cas9 à l'endroit du génome à couper. Et les ARN sont bien plus simples à synthétiser que des enzymes...



Pour la Science - N°456-Octobre 2015

<sup>1</sup> La recombinaison homologue permet l'échange de fragments d'ADN entre des double-brins possédant des séquences identiques aux extrémités.

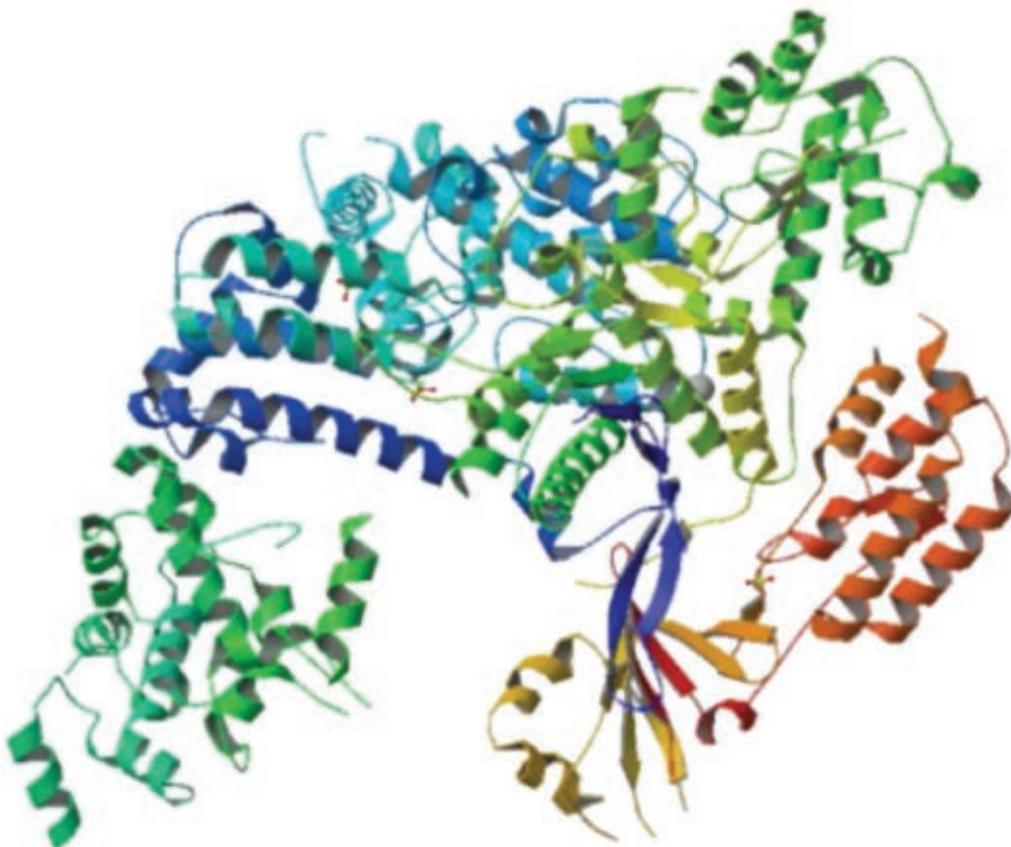
## Document 24b



<http://ssaft.com/Blog/dotclear/?post/2015/06/25/CRISPR-la-mutagenese-qui-croustille>

## Document 25 - Structure tertiaire de la protéine Cas9 de *Streptococcus pyogenes*

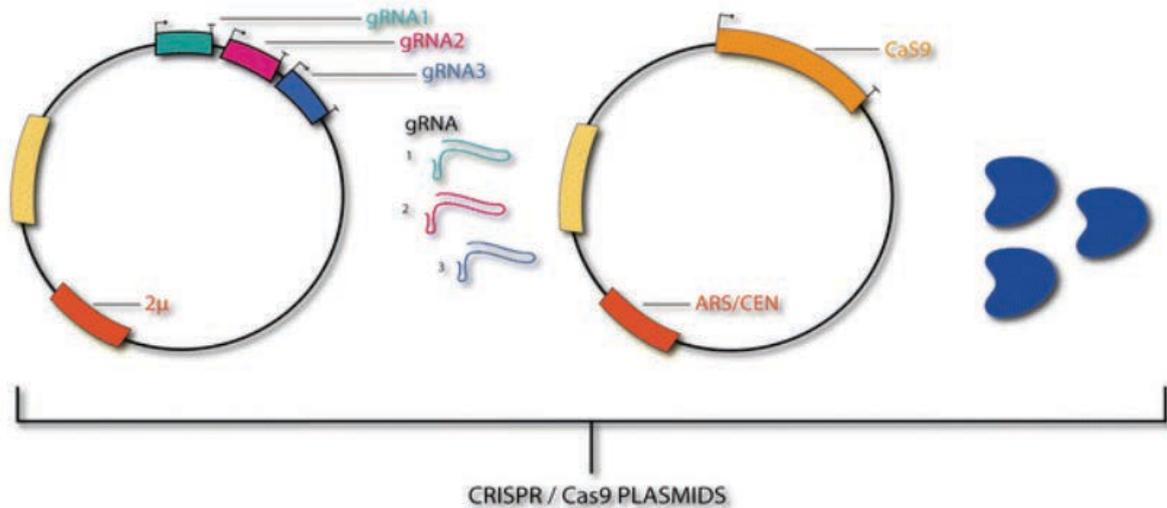
<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=4CMP>



**Document 26** - Schématisation du système CRISPR-Cas9 permettant l'intégration simultanée de trois gènes indispensables à la biosynthèse du bêta-carotène

D'après <https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-015-0288-3>

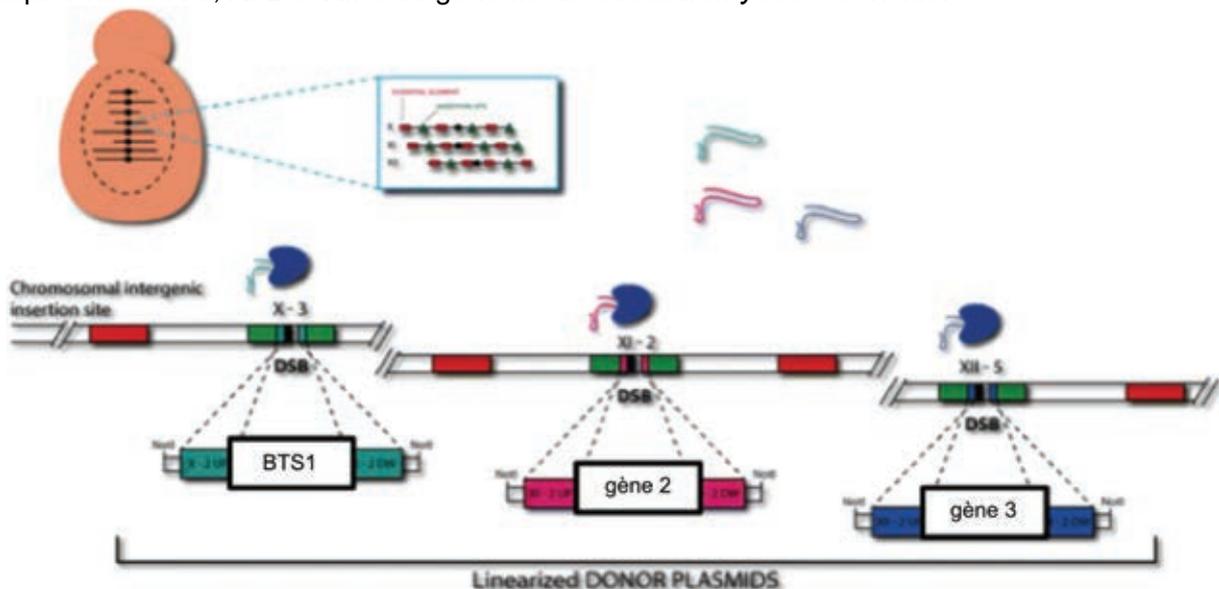
**Document 26a** : vecteurs plasmidiques exprimant les ARN guides, gRNA (à gauche), et la protéine enzymatique Cas9 (à droite)



À gauche, le vecteur plasmidique épisomique exprimant les gènes des trois ARN guides (gRNA) spécifiques des trois sites d'intégration X-3, XI-2 et XII-5 dans le génome de *Saccharomyces cerevisiae*: 2μ = origine de répllication du vecteur 2μ de levure.

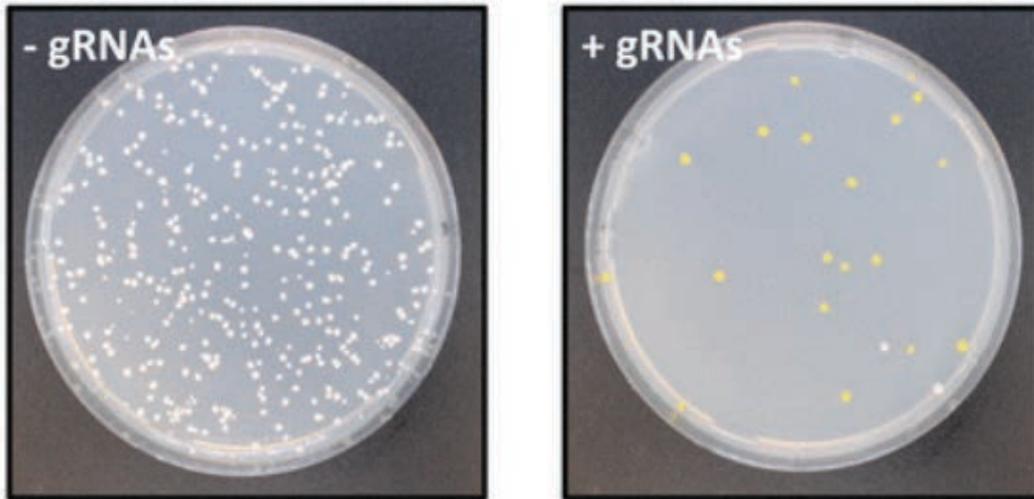
À droite, le vecteur plasmidique centromérique exprimant la protéine enzymatique Cas9 : ARS (*Autonomously Replication Sequence*) = origine de répllication chromosomique ; CEN = centromère des chromosomes de levure

**Document 26b** - Les trois sites d'intégration X-3, XI-2 et XII-5 dans le génome de *Saccharomyces cerevisiae* reconnus par le système CRISPR-Cas9 et les ADN plasmidiques linéarisés donneurs des gènes *BTS1*, gène 2 et gène 3 à intégrer par recombinaison homologue au niveau des trois sites spécifiques notés X-3, XI-2 et XII-5 du génome de *Saccharomyces cerevisiae*.



**Document 27** - Résultats expérimentaux de l'intégration simultanée de trois gènes de la voie métabolique de biosynthèse du bêta-carotène dans le génome de *S. cerevisiae*  
<https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-015-0288-3>

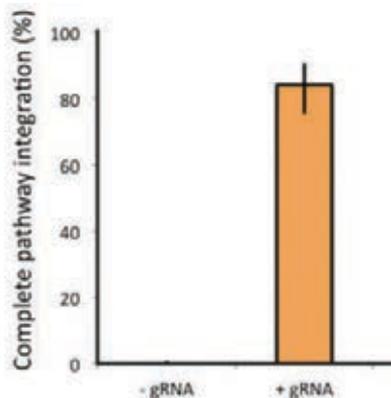
**Document 27a** - Photographie des colonies obtenues après intégration des gènes *BTS1*, gène 2 et gène 3.



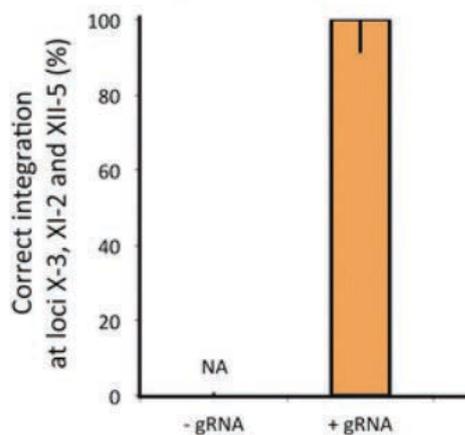
*S. cerevisiae* contenant un plasmide exprimant la protéine Cas9 est co-transformée avec :

- à gauche, un vecteur plasmidique épisomique vide (= sans gRNA noté -gRNA) et trois ADN plasmidiques linéarisés comportant les gènes *BTS1*, gène 2 et gène 3 ;
- à droite, un vecteur plasmidique épisomique, noté + gRNA, exprimant les trois ARN guides complémentaires des trois sites X-3, XI-2 et XII-5 du génome de *S. cerevisiae* et trois ADN plasmidiques linéarisés comportant les gènes *BTS1*, gène 2 et gène 3.

**Document 27b**  
 Pourcentage de cellules de *S. cerevisiae* ayant intégré la voie métabolique complète du bêta-carotène en présence et en absence des trois ARN guides.

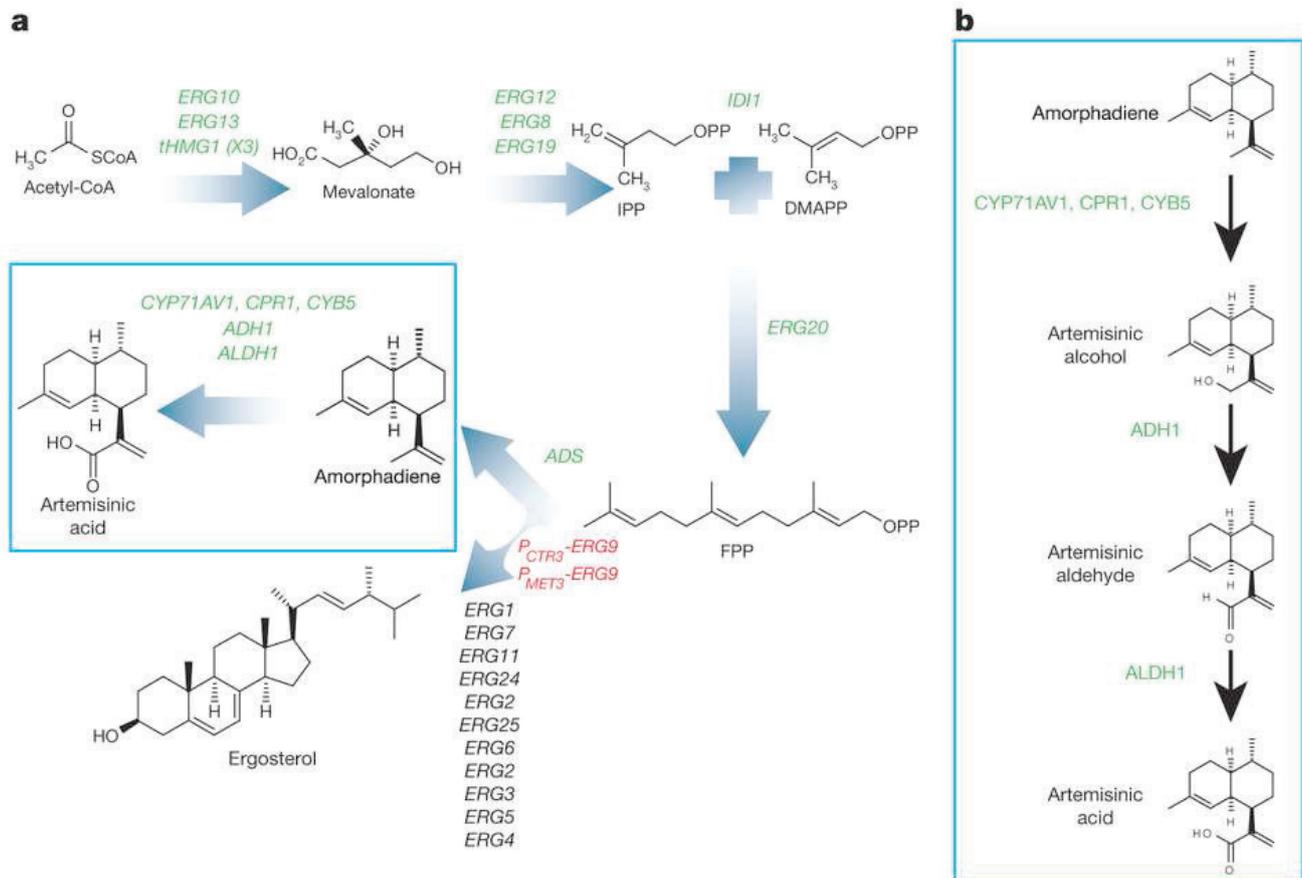


**Document 27c**  
 Fréquence des intégrations simultanées correctes des trois gènes au niveau des trois sites spécifiques du génome des colonies orange de *S. cerevisiae* X-3, XI-2 et XII-5.



## Document 28 - Vue générale de la voie de synthèse de l'acide artémisinique

Extrait de : C.J. Padon et al, *High level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin*, Nature, 496, 528-532, (2013)



**a.** Voie de biosynthèse de l'acide artémisinique implantée chez la levure (les gènes en vert ont été surexprimés par l'emploi de promoteur adéquat, les gènes en rouge réprimés grâce à  $P_{CTR3}$ , un promoteur spécial).

tHMG1 (X3) : gène présent en 3 exemplaires pour augmenter la production de HMG-CoA réductase.

IPP : isopentényl diphosphate ; DMAPP : diméthylallyl diphosphate ; FPP : farnésyl diphosphate.

**b.** Partie de la voie de biosynthèse utilisant des gènes de *A. annua*

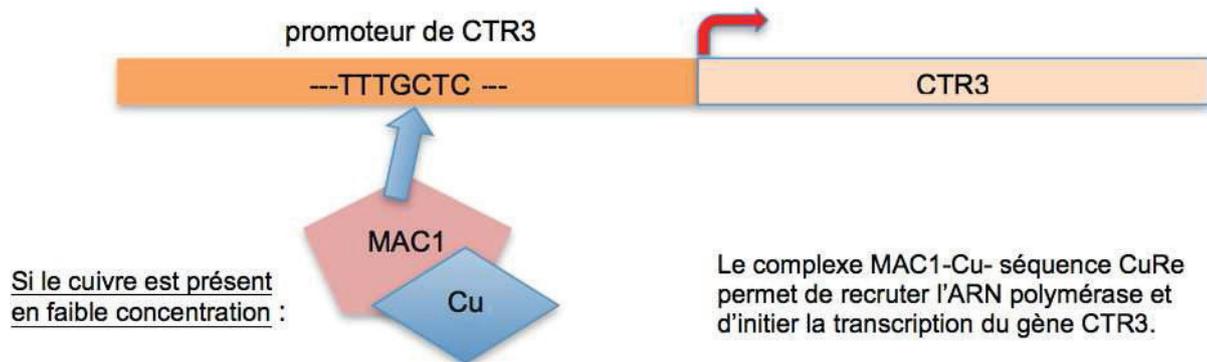
L'oxydation en 3 étapes de l'amorphadiène à l'acide artémisinique, grâce à 5 enzymes d'*A. annua* exprimées chez la levure :

- CPR1 : cognate réductase ;
- CYP71AV : amorphadiène oxydase (cytochrome P450 monooxygénase) ;
- CYB5 : cytochrome b5 : oxydant l'amorphadiène (AD) en alcool artémisinique (A.OH) ;
- ADH1 : *alcool dehydrogenase oxyde* A.OH en aldéhyde artémisinique (A.CHO) ;
- ALDH1 : *artemisinic aldehyde dehydrogenase oxyde* A.CHO en acide artémisinique (AA).

### Document 29 - Propriété et fonctionnement du promoteur de CTR3 ( $P_{CTR3}$ )

D'après : <http://www.yeastgenome.org/locus/SCCC4403/overview>

$P_{CTR3}$  fonctionne avec un facteur de transcription MAC1 (= « *Metal Binding activator* » une protéine qui doit être présente chez la levure) qui se fixe sur l'ADN (sur les séquences « CuRe » : *Copper-responsive element*, séquence en noir).



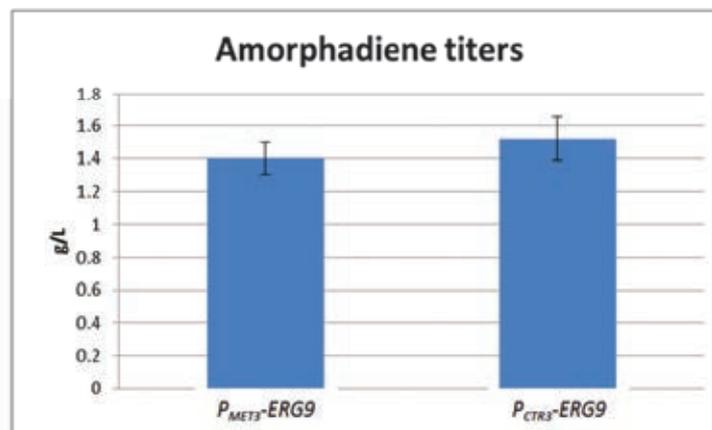
Lorsque le cuivre est présent en forte concentration ( $>1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) : MAC1 est modifié et ne fixe plus le cuivre, ne se fixe pas sur les séquences CuRe : l'ARN polymérase n'est pas recrutée et il n'y a pas de transcription.



: indique le point de départ de la transcription

### Document 30 - Comparaison des 2 systèmes de répression de ERG9

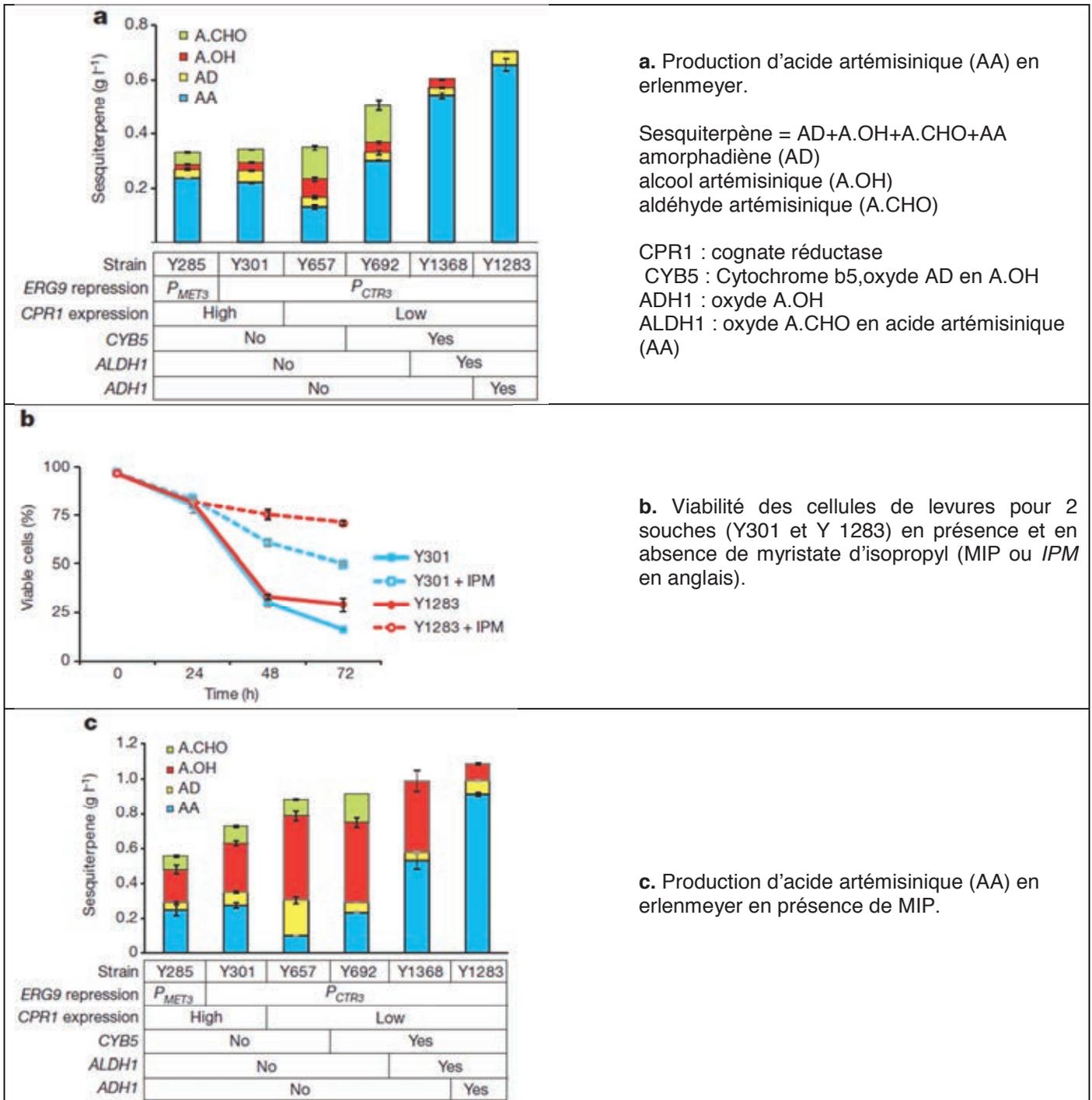
Extrait de : C.J. Pacor et al, *High level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin*, Nature, 496, 528-532, (2013)



Comparison of amorphadiene production during growth in shake flasks by repression of ERG9 expression using either the MET3 (strain Y337) or CTR3 (strain Y1516) promoters from *S. cerevisiae*. The MET3 promoter was repressed by the addition of 1.7 mM methionine to the culture. The CTR3 promoter was repressed by the addition of 150  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  to the culture.

**Document 31 - Augmentation de la production d'acide artémisinique en fiole d'erenmeyer par construction de différentes souches de levure**

D'après : C.J. Padon et al, High level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin, Nature,496, 528-532,(2013)



### Document 32 - Production d'acide artémisinique

Extrait de : C.J. Padon et al, *High level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin*, Nature, 496, 528-532, (2013)

Valeurs obtenues en optimisant les conditions de culture : *fed batch* (alimentation discontinue en milieu), induction (par le galactose, sauf pour Y1284) / répression précoce (par CuSO<sub>4</sub>), fermentation extractive en présence de MIP (ou *IPM* en anglais).

La souche Y285 (non présentée ci-dessous) permet une production maximale d'acide artémisinique dans les mêmes conditions de  $2,9 \pm 0,4 \text{ g.L}^{-1}$

Strain	Modifications	Amorphadiene (g/L)	Artemisinic Alcohol (g/L)	Artemisinic Aldehyde (g/L)	Artemisinic Acid (g/L)
<b>Mixed feed process, early induction /repression, +IPM</b>					
Y1283	Integrated <i>AaCPR1</i> <i>AaCYB5</i> <i>AaALDH1</i> <i>AaADH1</i>	1.2	0.4	0.3	14.1
Y1284	Integrated <i>AaCPR1</i> <i>AaCYB5</i> <i>AaALDH1</i> <i>AaADH1</i> <i>gal80Δ</i>	2.15 ± 0.15	0.25 ± 0.05	0.25 ± 0.05	13 ± 1.7
<b>Ethanol pulse feed process, +IPM</b>					
Y1284	Integrated <i>AaCPR1</i> <i>AaCYB5</i> <i>AaALDH1</i> <i>AaADH1</i> <i>gal80Δ</i>	2.5	1.1	1.3	25.0