Un système d'expression par intégration ciblée chez Yarrowia lipolytica : application à l'étude de protéines hétérologues par mutagénèse dirigée

Catherine Madzak, Claude Jolivalt, Christian Mougin, Pierre Briozzo, David Kopecny, Nicole Houba-Hérin, Michel Laloue, Jean-Marie Beckerich

▶ **To cite this version:**

Catherine Madzak, Claude Jolivalt, Christian Mougin, Pierre Briozzo, David Kopecny, et al.. Un système d'expression par intégration ciblée chez Yarrowia lipolytica : application à l'étude de protéines hétérologues par mutagénèse dirigée. Rencontres des microbiologistes de l'INRA, Jun 2006, Dourdan, France. 2006. hal-01607933

HAL Id: hal-01607933
https://hal.science/hal-01607933

Submitted on 6 Jun 2020

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.

Distributed under a Creative Commons Attribution - ShareAlike 4.0 International License

Un système d'expression par intégration ciblée chez *Yarrowia lipolytica* : application à l'étude de protéines hétérologues par mutagénèse dirigée

Catherine MADZAK, Claude JOLIVALT, Christian MOUGIN, Pierre BRIOZZO, David KOPECNY, Nicole HOUBA-HÉRIN, Michel LALOUE & Jean-Marie BECKERICH

UMR1238 Microbiologie et Génétique Moléculaire, INRA / CNRS / INA-PG, 78850 Thiverval-Grignon

en collaboration avec :

UMR7573 Synthèse Sélective Organique et Produits Naturels, CNRS / ENSCP, 75005 Paris

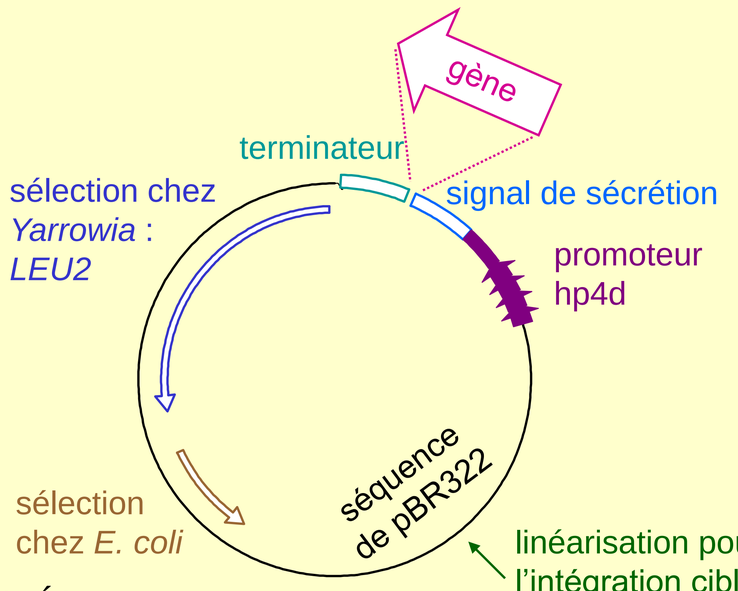
UR251 Physicochimie et Ecotoxicologie des Sols Agrosystèmes Contaminés, INRA, 78026 Versailles

UMR206 Chimie Biologique, INRA / INAPG, 78850 Thiverval-Grignon

UR501 Biologie Cellulaire, INRA, 78026 Versailles

Un système d'intégration ciblée pour l'expression/sécrétion de protéines hétérologues chez *Yarrowia*

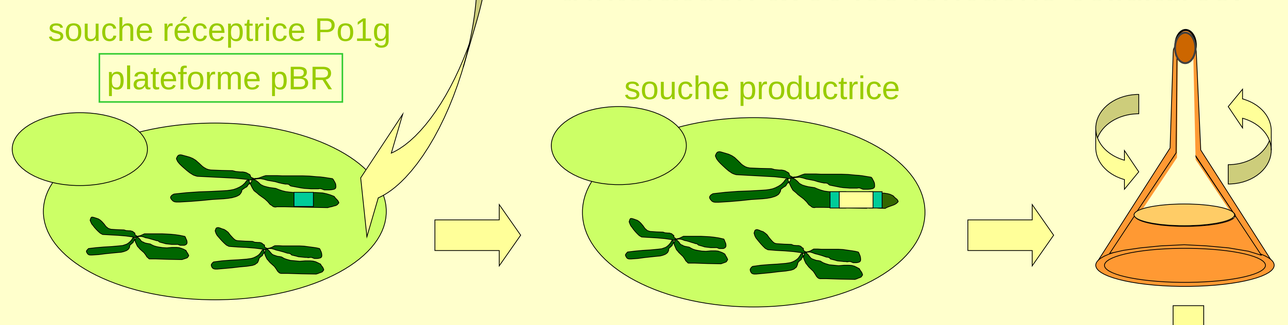
- des vecteurs navettes basés sur pBR322
- une cassette d'expression comprenant :
  - un promoteur recombinant breveté : hp4d
  - une séquence signal de sécrétion
- une fréquence de transformation de *Yarrowia* très élevée (de l'ordre de 10^5 transformants par µg)
- une intégration ciblée par homologie avec le génome
- des transformants comportant une seule copie du gène hétérologue, intégrée en un site défini (plateforme pBR)
- la sécrétion dans le milieu de la protéine hétérologue
- la production efficace (10-100 mg/l) de protéines complexes sous leur forme active



Le promoteur recombinant **hp4d** dirige une **forte expression** dans des conditions de culture variées, permettant si nécessaire l 'optimisation du milieu de production.

Son activité est maximale lorsque le plateau de croissance est atteint, ce qui permet une certaine **dissociation des phases de croissance et de production**.

La linéarisation des vecteurs dans la région "pBR322" permet de diriger efficacement leur **intégration par homologie dans une "plateforme pBR"** du génome de la souche réceptrice. Les transformants ainsi obtenus contiennent une **copie unique**, intégrée en un **site défini**, sans risque d'interaction avec les fonctions cellulaires.



La souche Po1g a été optimisée pour la production hétérologue :
- introduction d'une plateforme pBR dans le génome
- délétion des gènes codant pour des protéases extracellulaires
- capacité à métaboliser le saccharose (donc les mélasses)

protéine recombinante sécrétée dans le milieu de culture

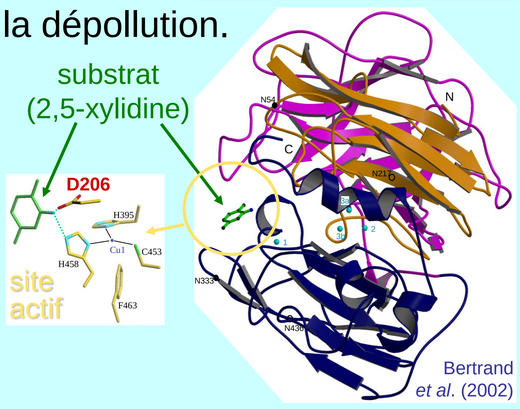
Madzak *et al*., J. Mol. Microbiol. Biotechnol. (2000) 2, 207-216
Madzak *et al*., J. Biotechnol. (2004) 109, 63-81
Madzak *et al*., FEMS Yeast Res. (2005) 5, 635-646

Ce système d'expression/sécrétion par intégration ciblée permet d'**analyser l'effet de mutations du gène hétérologue par simple comparaison des propriétés des protéines recombinantes, mesurables dans les surnageants de cultures**. La fréquence de transformation très élevée du système devrait permettre de l'utiliser pour l'optimisation d'enzymes, par le biais de mutagénèse au hasard par PCR, ou d'évolution moléculaire.

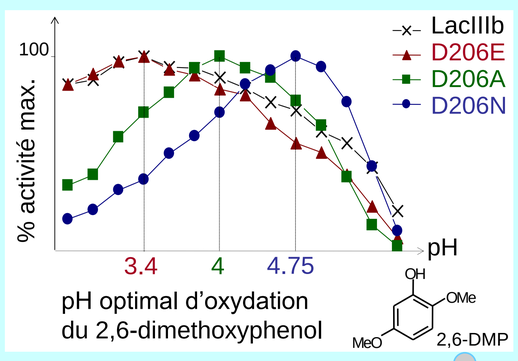
Production et mutagénèse dirigée de la laccase LacIIIb du Basidiomycète ligninolytique *Trametes versicolor*

Les laccases fongiques sont utilisées dans des procédés oxydatifs industriels, et ont de nombreuses autres applications potentielles, notamment dans le domaine de la dépollution.

Nous avons déterminé la première structure d'une laccase active, complexée avec son substrat, par l'analyse de cristaux de LacIIIb purifiée à partir de *T. versicolor*. La structure du site actif a mis en évidence l'interaction d'un acide aminé, l'Aspartate (D) 206, avec le substrat.



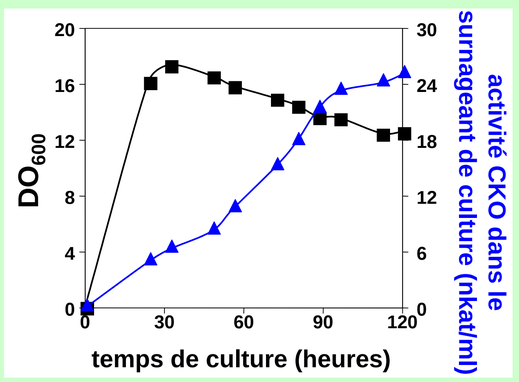
La production de *Tv*LacIIIb recombinante chez *Yarrowia*, pour analyse biochimique, ayant donné des résultats satisfaisant, nous avons entrepris une mutagénèse dirigée de l'Asp206, avec production chez *Yarrowia* des LacIIIb mutées.



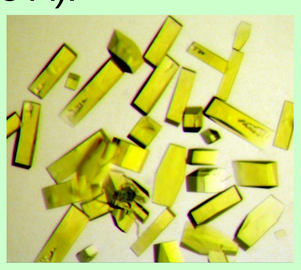
Parmi les résultats obtenus, nous avons pu en particulier obtenir, avec le mutant D206N, un déplacement vers la neutralité du pH optimal vis-à-vis d'un substrat phénolique. C'est une 1ère étape dans l'optimisation de l'enzyme pour des applications environnementales, qui pourrait permettre la dégradation *in situ*, dans des sols à pH neutre, de polluants environnementaux de structure phénolique.

Bertrand *et al*., Biochemistry (2002) 41, 7325- 7333
Mougin *et al*., Environ. Chem. Lett. (2003) 1, 145-148
Jolivalt *et al*., App. Microbiol. Biotechnol. (2005) 66, 450-456
Madzak *et al*., Protein Eng. Des. Sel. (2006) 19(2), 77-84

Production et mutagénèse dirigée de la cytokinine oxydase CKO1 de *Zea mays*



La production de *Zm*CKO1 recombinante chez *Yarrowia* a permis sa purification, son analyse biochimique, sa cristallisation, et l'étude de sa structure par diffraction aux rayons X (résolution : 1,95 Å).



Une analyse de la structure des complexes formés par l'enzyme avec différents inhibiteurs et accepteurs d'électrons est en cours, par le biais de la co-cristallisation ou de l'infiltration des cristaux.

L'analyse de la *Zm*CKO1 recombinante par MALDI-MS a montré que 5 sites de N-glycosylation, sur 8 sites potentiels, étaient glycosylés chez *Yarrowia*, la longueur moyenne des chaînes de mannoses étant de 17 résidus (l'hyperglycosylation, problème fréquent dans les systèmes d 'expression chez d'autres levures, correspond à des chaînes de l'ordre de 50-150 mannoses).

Les données cristallographiques obtenues ont permis de cibler des acides aminés pour une mutagénèse dirigée, afin d'analyser finement les mécanismes réactionnels de l'enzyme. La production chez *Yarrowia* des CKO1 mutées, actuellement en cours, permettra leur étude biochimique et leur cristallisation pour étude structurale. Les premiers résultats ont déjà permis de confirmer la prédiction d'un résidu clef de la catalyse, et de définir des limites stériques pour l'accessibilité du substrat.

Massonneau *et al*., J. Exper. Botany (2004) 55, 2549-2557
Kopecny *et al*., Acta Crystal. D (2004) 60, 1500-1501
Kopecny *et al*., Biochimie (2005) 87, 1011-1022